

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS DOCTORAL

UTILIZACIÓN DEL PURÍN DE CERDO COMO  
ENMIENDA ORGÁNICA EN SUELOS DEGRADADOS:  
VALORACIÓN AGRONÓMICA Y AMBIENTAL

DIANA HERNÁNDEZ GARCÍA  
2006



UTILIZACIÓN DEL PURÍN DE CERDO COMO ENMIENDA ORGÁNICA EN  
SUELOS DEGRADADOS: VALORACIÓN AGRONÓMICA Y AMBIENTAL

Memoria que presenta Dña. DIANA HERNÁNDEZ GARCÍA para optar al  
grado de Doctora en Ciencias

LOS DIRECTORES

Dr. D. ALFREDO POLO SÁNCHEZ

Investigador Científico (CSIC)

Dr. D. CÉSAR PLAZA DE CARLOS

Investigador Contratado "Juan de  
la Cierva" (CSIC)

EL TUTOR ACADÉMICO

Dr. D. RAIMUNDO JIMÉNEZ BALLESTA

Catedrático de Universidad (UAM)

Madrid, Mayo de 2006



***A mis padres***

*Podrán cortar todas las flores, pero  
no podrán detener la primavera  
(Pablo Neruda)*



## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo se ha realizado en el Centro de Ciencias Medioambientales (CSIC), en el marco de un proyecto de investigación financiado por la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha y gracias a la concesión de una beca predoctoral I3P del CSIC. Al término de la presente tesis, quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas y organismos que han participado, de una forma u otra, en su elaboración:

Al Dr. Alfredo Polo por su apoyo constante y la confianza que me ha brindado durante estos años.

Al Dr. César Plaza, por su ayuda inestimable, su dedicación plena y su amistad.

Al Dr. Raimundo Jiménez, por su labor como tutor y su grata disposición en todo momento.

Al Dr. Nicola Senesi de la Universidad de Bari, y a su equipo científico, por su valiosa cooperación con la realización e interpretación de los análisis de las sustancias húmicas.

A los Dres. Emilio Reyes y Antonio Delgado, y al equipo del Laboratorio de Isótopos Estables de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) de Granada, por la colaboración prestada con los análisis isotópicos.

A la Dra. M<sup>a</sup> Carmen Guerrero, de la Universidad Autónoma de Madrid, por sus valiosas sugerencias y su excelente ayuda con los análisis microbiológicos. A la Dra. M<sup>a</sup> del Mar Delgado, del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, por colaborar amablemente con los análisis de los purines. A la Dra. Francisca Guerrero, de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, por su ayuda con las propiedades físicas de los suelos.

A la empresa Luis López Herrera por suministrar los purines empleados en este estudio.

A la Dirección del Centro de Ciencias Medioambientales, por haber permitido mi estancia y disponer de sus instalaciones. Al personal de la finca "La Higuera" por su labor de campo, especialmente a Carlos Lacasta por su disposición y sus buenos consejos en todos los ámbitos. A todo el personal del Centro de Ciencias Medioambientales que en algún momento me ha prestado su apoyo, en especial al Servicio de Análisis y de Biblioteca.

A mis compañeros Josema, Juan Carlos, Pilar Tere, Feli, Rafa, Héctor, Raúl, Beatriz, Vanesa, Paloma y Laura, por su dedicación y su amistad dentro y fuera del laboratorio. A Clara, Susana, Javi, José Miguel y Jose Manuel, por su amistad y su apoyo.

A mi familia, sobre todo a mis padres, por su cariño y por la confianza depositada en mí en todo momento. A mis amigos, por su paciencia y su apoyo incondicional. Y a Abraham, por estar siempre a mi lado.





## ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>I.1. EL SUELO .....</b>	<b>9</b>
I.1.1. VALOR AMBIENTAL .....	9
I.1.2. PROCESOS DE DEGRADACIÓN DEL SUELO .....	11
I.1.3. MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO.....	12
<b>I.2. PROBLEMÁTICA GENERAL DEL PURÍN DE CERDO .....</b>	<b>14</b>
I.2.1. CARACTERIZACIÓN.....	14
I.2.2. LA INTENSIFICACIÓN GANADERA .....	16
I.2.3. PROBLEMÁTICA AMBIENTAL Y SANITARIA .....	20
I.2.4. GESTIÓN Y TRATAMIENTO .....	22
<b>I.3. VALORACIÓN AGRONÓMICA DEL PURÍN DE CERDO. ....</b>	<b>24</b>
I.3.1. EFECTOS SOBRE LA MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO .....	26
I.3.2. EFECTOS SOBRE LA DISPONIBILIDAD DE NUTRIENTES.....	26
I.3.3. EFECTOS SOBRE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DEL SUELO .....	27
I.3.4. FACTORES LIMITANTES Y RIESGOS DE CONTAMINACIÓN .....	28

<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
<b>III.1. MATERIALES .....</b>	<b>35</b>
III.1.1. PURINES DE CERDO .....	35
III.1.2. SUELO .....	36
<b>III.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>38</b>
<b>III.3. MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
III.3.1. ANÁLISIS DEL SUELO .....	41
III.3.1.1. Toma y preparación de muestras .....	41
III.3.1.2. Propiedades físico-químicas.....	42
III.3.1.2.1. pH.....	42
III.3.1.2.2. Conductividad eléctrica.....	43
III.3.1.2.3. Agregados estables al agua.....	43
III.3.1.2.4. Capacidad de retención hídrica. ....	43
III.3.1.3. Contenido de nitrógeno .....	44
III.3.1.3.1. Nitrógeno total .....	44
III.3.1.3.2. Nitrógeno inorgánico .....	44
III.3.1.4. Macroelementos asimilables .....	45
III.3.1.5. Microelementos .....	45
III.3.1.5.1. Microelementos totales.....	45
III.3.1.5.2. Microelementos potencialmente asimilables.....	45
III.3.1.6. Contenido de materia orgánica .....	46
III.3.1.6.1. Carbono orgánico total .....	46
III.3.1.6.2. Carbono de las sustancias húmicas .....	46
• Carbono de los ácidos húmicos y fúlvicos .....	47
III.3.1.6.3. Materia orgánica hidrosoluble .....	47
• Carbono hidrosoluble.....	47
• Carbohidratos solubles .....	47
• Compuestos fenólicos.....	48
• Proteínas hidrosolubles.....	48
III.3.1.7. Caracterización de las sustancias húmicas.....	48
III.3.1.7.1. Extracción, fraccionamiento y purificación .....	48
III.3.1.7.2. Materia seca y cenizas.....	49
III.3.1.7.3. Análisis elemental.....	49
III.3.1.7.4. Relación $E_4/E_6$ .....	49
III.3.1.7.5. Análisis por espectroscopía infrarroja.....	50
III.3.1.7.6. Propiedades ácido-base .....	50
• Análisis de grupos funcionales ácidos.....	51

• Modelo NICA-Donnan .....	51
III.3.1.7.7. Análisis por espectroscopía de fluorescencia. ....	54
• Modelo de Ryan y Weber .....	54
III.3.1.8. Abundancia de isótopos estables $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ .....	56
III.3.1.9. Propiedades biológicas .....	57
III.3.1.9.1. Carbono de la biomasa microbiana .....	57
III.3.1.9.2. Respiración basal.....	57
III.3.1.10. Actividades enzimáticas .....	58
III.3.1.10.1. Actividad deshidrogenasa (EC 1.1.1.).....	58
III.3.1.10.2. Actividad catalasa (EC 1.11.1.6.) .....	59
III.3.1.10.3. Actividad ureasa (EC 3.5.1.5.) .....	59
III.3.1.10.4. Actividad proteasa-BAA (EC 3.4) .....	59
III.3.1.10.5. Actividad fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2).....	60
III.3.1.10.6. Actividad $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21.) .....	60
III.3.1.11. Análisis de microorganismos patógenos .....	61
III.3.1.11.1. Preparación de suspensiones y medios de cultivo....	61
III.3.1.11.2. Siembra por filtración a través de membrana .....	61
III.3.1.11.3. Coliformes fecales .....	61
III.3.1.11.4. Estreptococos fecales .....	62
III.3.1.11.5. <i>Clostridium</i> sulfito-reductores .....	62
III.3.1.11.6. <i>Salmonella</i> sp.....	62
III.3.1.11.7. Expresión de resultados .....	62
III.3.2. ANÁLISIS DE LOS PURINES .....	63
III.3.2.1. Toma y preparación de muestras .....	63
III.3.2.2. Materia seca y cenizas.....	63
III.3.2.3. Demanda química de oxígeno.....	63
III.3.2.4. Demanda bioquímica de oxígeno.....	64
III.3.2.5. pH y conductividad eléctrica.....	64
III.3.2.6. Carbono orgánico total .....	64
III.3.2.7. Macro y microelementos totales.....	65
III.3.2.8. Nitrógeno amoniacal y nítrico .....	65
III.3.2.9. Abundancia de isótopos estables $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ .....	65
III.3.2.10. Extracción y caracterización de los ácidos húmicos y fúlvicos.....	66
III.3.2.11. Análisis de microorganismos patógenos .....	66
III.3.3. ANÁLISIS DE LAS PLANTAS .....	66
III.3.3.1. Toma y preparación de muestras .....	66
III.3.3.2. Rendimiento de cosecha .....	66
III.3.3.3. Calidad de grano .....	66
III.3.3.4. Composición mineral .....	67
III.3.3.5. Abundancia de isótopos estables $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ .....	67
III.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	67

<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>71</b>
<b>IV.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES.....</b>	<b>71</b>
IV.1.1. PURINES DE CERDO.....	71
IV.1.2. SUELO .....	74
IV.1.3. CONDICIONES METEOROLÓGICAS. BALANCE HÍDRICO .....	76
<b>IV.2. EFECTOS SOBRE EL CULTIVO .....</b>	<b>79</b>
IV.2.1. RENDIMIENTO DE COSECHA.....	79
IV.2.2. CALIDAD DEL GRANO .....	87
IV.2.3. COMPOSICIÓN MINERAL.....	92
IV.2.3.1. Concentración de macroelementos .....	92
IV.2.3.2. Concentración de microelementos .....	102
IV.2.4. ÍNDICES DE EFICIENCIA FERTILIZANTE .....	107
<b>IV.3. EFECTOS SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL SUELO .....</b>	<b>113</b>
IV.3.1. pH .....	113
IV.3.2. CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA .....	117
IV.3.3. ESTABILIDAD DE AGREGADOS .....	120
IV.3.4. CAPACIDAD DE RETENCIÓN HÍDRICA. ....	121
<b>IV.4. EFECTOS SOBRE EL ESTADO NUTRICIONAL DEL SUELO ....</b>	<b>123</b>
IV.4.1. NITRÓGENO .....	124
IV.4.2. MACROELEMENTOS ASIMILABLES .....	127
IV.4.3. MICROELEMENTOS.....	129
IV.4.3.1. Microelementos totales .....	129
IV.4.3.2. Microelementos potencialmente asimilables .....	130
<b>IV.5. EFECTOS SOBRE LA MATERIA ORGÁNICA.....</b>	<b>134</b>
IV.5.1. CARBONO ORGÁNICO TOTAL.....	134
IV.5.2. CARBONO DE LAS SUSTANCIAS HÚMICAS.....	137
IV.5.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS SUSTANCIAS HÚMICAS.....	141
IV.5.3.1. Composición elemental .....	142
IV.5.3.2. Contenido de grupos funcionales ácidos .....	143
IV.5.3.3. Relación E <sub>4</sub> /E <sub>6</sub> .....	144
IV.5.3.4. Espectros infrarrojos .....	145

IV.5.3.5. Características ácido-base .....	151
IV.5.3.5.1. Isotermas de protonación .....	151
IV.5.3.5.2. Parámetros del modelo NICA-Donnan .....	154
• Parámetro b .....	154
• Contenido de grupos funcionales ácidos .....	155
• Constantes de afinidad protónica .....	155
• Amplitud de las distribuciones de afinidad .....	157
• Distribuciones de afinidad protónica .....	158
IV.5.3.6. Capacidad para formar complejos con los iones cobre(II) y zinc(II) mediante espectroscopía de fluorescencia .....	158
IV.5.3.6.1. Espectros de fluorescencia .....	159
IV.5.3.6.2. Determinación de capacidades complejantes y constantes de estabilidad .....	164
• Constantes de estabilidad y capacidades complejantes .....	164
IV.5.4. MATERIA ORGÁNICA HIDROSOLUBLE .....	169
IV.5.4.1. Carbono hidrosoluble .....	170
IV.5.4.2. Carbohidratos hidrosolubles .....	171
IV.5.4.3. Compuestos fenólicos .....	173
<b>IV.6. ESTUDIO DE LA ABUNDANCIA DE ISÓTOPOS ESTABLES <math>\delta^{13}\text{C}</math> Y <math>\delta^{15}\text{N}</math> EN SUELO Y PLANTA .....</b>	<b>174</b>
IV.6.1. $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ EN EL PURÍN DE CERDO .....	175
IV.6.2. $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ EN EL GRANO Y LA PAJA DE CEBADA .....	176
IV.6.3. $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ EN EL SUELO .....	177
<b>IV.7. EFECTOS SOBRE PROPIEDADES BIOLÓGICAS .....</b>	<b>180</b>
IV.7.1. CARBONO DE LA BIOMASA MICROBIANA .....	181
IV.7.2. RELACIÓN $C_{\text{BIO}}/C_{\text{OT}}$ .....	183
IV.7.3. RESPIRACIÓN BASAL .....	185
IV.7.4. COCIENTE METABÓLICO $q\text{CO}_2$ .....	186
<b>IV.8. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DEL SUELO .....</b>	<b>188</b>
IV.8.1. ACTIVIDAD DESHIDROGENASA .....	190
IV.8.2. ACTIVIDAD CATALASA .....	192
IV.8.3. ACTIVIDAD UREASA .....	193
IV.8.4. ACTIVIDAD PROTEASA-BAA .....	195
IV.8.5. ACTIVIDAD FOSFATASA .....	196
IV.8.6. ACTIVIDAD $\beta$ -GLUCOSIDASA .....	199
IV.8.7. DIAGRAMAS <i>SUN-RAY</i> .....	202

IV.8.8. ANÁLISIS DE CORRELACIONES.....	206
<b>IV.9. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.....</b>	<b>210</b>
<b>IV.10. EVOLUCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PATÓGENOS... </b>	<b>215</b>
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>225</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>231</b>

**RESUMEN**  
***ABSTRACT***

---





## RESUMEN

En este trabajo se aborda el estudio del aprovechamiento agronómico del purín de cerdo, con objeto de proporcionar una solución adecuada a la creciente producción de este residuo, mejorando la fertilidad de los suelos agrícolas de una manera respetuosa con el medio ambiente. Para ello, se estudiaron en campo los efectos residuales y acumulativos de la aplicación de purín de cerdo a varias dosis sobre la fertilidad y las propiedades físico-químicas, biológicas y bioquímicas de un suelo degradado representativo de un agroecosistema semiárido, valorando especialmente las transformaciones de la materia orgánica y los riesgos de contaminación en suelos y plantas.

El diseño experimental constó de parcelas cultivadas con cebada y enmendadas con 30, 60, 90, 120 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo, que se compararon con un suelo control y con un tratamiento de fertilización mineral anual. Un bloque de parcelas recibió una única adición de purín al inicio del experimento en 1997 con el fin de estudiar el efecto residual en los años siguientes, mientras que el otro conjunto se enmendó durante siete años consecutivos para estudiar el efecto acumulativo de la aplicación de purín. En este trabajo se incluyen los resultados de los tres últimos años.

En términos generales, la fertilización anual con purín mejora la respuesta del cultivo, aumentando los valores de producción respecto al control y a la fertilización mineral, sin que se adviertan problemas de contaminación por metales pesados ni en grano ni en paja. El estudio de índices de eficiencia fertilizante revela que el empleo de dosis moderadas consigue un aprovechamiento más eficaz del nitrógeno aplicado. Los suelos enmendados con purín experimentan un incremento del pH, de la conductividad eléctrica y del contenido de nitratos, fósforo, calcio y sodio asimilables. La concentración total y potencialmente asimilable de cobre

aumenta respecto al suelo control después de siete años de aplicación, aunque no llegan a alcanzar niveles considerados contaminantes.

Los contenidos de carbono orgánico total y de las fracciones orgánicas analizadas (sustancias húmicas y compuestos hidrosolubles) apenas se ven afectados por la aplicación de purín, aunque se advierte un descenso gradual en todos los tratamientos con el transcurso del tiempo, lo que pone de manifiesto la capacidad limitada de la enmienda para atenuar la degradación de la materia orgánica del suelo ocasionada por las condiciones ambientales y el manejo agrícola. De hecho, el estudio de la abundancia isotópica de  $^{13}\text{C}$  indica una incorporación significativa de carbono procedente del purín y sugiere una mineralización de la materia orgánica nativa. Asimismo, se han caracterizado los ácidos húmicos y fúlvicos del purín de cerdo, del suelo control y de los enmendados con 90 y 150  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$  durante siete años. La adición de purín de cerdo influye sobre la composición, la estructura molecular, el comportamiento ácido-base y la capacidad para formar complejos con el cobre(II) y el zinc(II) de las sustancias húmicas de los suelos enmendados, lo que sugiere una incorporación parcial de la fracción húmica del purín en la del suelo nativo.

El aporte de materia orgánica fácilmente biodegradable induce una reactivación del crecimiento y de la actividad biológica del suelo, como revelan el contenido de carbono de la biomasa microbiana y las actividades oxidorreductasas (deshidrogenasa y catalasa). Los resultados del cociente metabólico apuntan hacia una atenuación de la situación de estrés para las poblaciones biológicas; sin embargo, este efecto es temporal debido al agotamiento de los recursos biodisponibles, como indica el hecho de que la respiración basal apenas se vea afectada. La adición de purín provoca diversas respuestas en las actividades hidrolasas; la actividad fosfatasa se inhibe todos los años como consecuencia de una elevada disponibilidad de fósforo, mientras que la ureasa apenas varía y las actividades proteasa-BAA y  $\beta$ -glucosidasa se estimulan como respuesta a la incorporación de sustratos orgánicos.

En el estudio de la supervivencia de los microorganismos patógenos en el suelo, se observa que los coliformes y los estreptococos fecales desaparecen después de tres y seis semanas, respectivamente, mientras que los *Clostridium* sulfito-reductores no recuperan los niveles del control hasta un año después.

## **ABSTRACT**

This research deals with the study of pig slurry use in agriculture, with the aim of providing a suitable solution for the increasing production of this waste and improving soil fertility in a sustainable way. Both residual and cumulative effects of pig slurry application to soil at different rates were studied in a semiarid agroecosystem under a continuous barley monoculture. Barley yield and soil physicochemical, biological and biochemical properties were assessed, focusing on the organic matter transformations and soil and plant pollution risks.

The experimental design included plots cropped to barley and amended with pig slurry at rates of 30, 60, 90, 120 and 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> and were compared to an unamended soil (control) and a soil treated with mineral fertilizer. One set of plots was amended with pig slurry only once at the beginning of the experiment in order to study residual effects in the next years, while the another set of plots was amended for seven consecutive years to study the cumulative effects of pig slurry application. This study includes the results of the last three years.

In general, annual pig slurry fertilization improved crop response, increasing barley yield with respect to control soil and mineral fertilizer treatment. No heavy metal pollution was observed in grain or straw. The study of fertilizer efficiency indexes revealed that the use of pig slurry at moderate rates achieved more efficient use of the applied N. pH, electrical conductivity, nitrates content, and available P, Ca and Na contents increased in amended soils. Total and potentially available Cu contents rose with respect to control soil after seven amendments, although they did not reach pollutant levels.

Total organic C and several organic fractions (humic substances and water-soluble organic matter) contents were hardly affected by pig slurry

additions. A gradual drop with time was noticed in every treatment, revealing the limited ability of the amendment to moderate soil organic matter degradation caused by environmental conditions and agricultural practices. Natural abundance  $^{13}\text{C}$  results indicated a significant incorporation of pig slurry derived-C into soil C, suggesting a partial mineralization of soil organic matter. Humic and fulvic acids isolated from pig slurry, control soil and amended soils with 90 and 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> for seven years were characterized. Pig slurry amendment induced changes on the compositional and structural properties, acid-base behaviour and Cu(II) and Zn(II) complexing capacities of the humic substances isolated from amended soil, suggesting a partial incorporation of pig slurry humic fraction.

The supply of easily decomposable C induced a reactivation of soil biological growth and activity, as indicated by microbial biomass C content and oxidoreductase activities (dehydrogenase and catalase). The results of the metabolic quotient pointed to a stress alleviation; however this effect was transient due to the exhaustion of available resources, as indicated by basal respiration. Pig slurry additions caused several effects on hydrolase enzymes. Phosphatase activity was inhibited due to high available P content; urease is not affected and protease-BAA and  $\beta$ -glucosidase activities increase due to addition of available substrates.

Pathogen survival in soil was also assessed. Fecal coliforms and fecal *Streptococci* disappeared after three and six weeks, respectively. Sulfite reducer *Clostridium* only recovered control levels one year after the amendment.

# **I. INTRODUCCIÓN**

---

**I.1. EL SUELO**

**I.2. PROBLEMÁTICA GENERAL DEL PURÍN DE CERDO**

**I.3. MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO**



# **I. INTRODUCCIÓN**

## **I.1. EL SUELO**

El suelo es uno de los recursos más importantes que existen y uno de los retos futuros de la humanidad ha de ser la lucha contra su degradación. Este proceso, en el que la materia orgánica influye de manera decisiva, altera sus propiedades físicas, químicas y biológicas, provocando un descenso de su capacidad productiva y un riesgo mayor de erosión y desertificación.

### **I.1.1. VALOR AMBIENTAL**

El suelo es un sistema natural, organizado e independiente, cuya formación se debe a la acción conjunta del clima, los organismos, la vegetación, el relieve y el tiempo sobre la roca madre. Constituye una matriz de componentes orgánicos y minerales que engloba una red porosa por donde circulan líquidos y gases y que alberga numerosas poblaciones de organismos vivos, en una situación de equilibrio dinámico. A pesar de que, en principio, el suelo es un recurso natural renovable, su génesis es un proceso muy lento, por lo que debe ser tratado como un recurso no renovable (Agencia Europea de Medio Ambiente, 2004).

En los años noventa empezó a generalizarse una nueva concepción del suelo destacando la importancia de sus funciones para el desarrollo social y económico; con ello, se superó una concepción más relacionada con sus propiedades y con los aspectos que condicionan la edafogénesis y se generalizó el concepto de "calidad" del suelo, que se relaciona con las diferentes funciones actuales o potenciales que pueden desempeñar los suelos. Así, la Sociedad Americana de la Ciencia del Suelo (SSSA, 1995)

definió la calidad del suelo como “la capacidad de un tipo específico de suelo para desempeñar sus funciones dentro de los límites de un ecosistema natural o manejado, sosteniendo la producción de las plantas y de los animales, manteniendo o realzando la calidad del agua y del aire y apoyando la salud y la ocupación humana”. De acuerdo con este enfoque, las funciones que desempeña un suelo son, por una parte, ecológicas, y por otro están relacionadas con la actividad humana (tabla I.1.1). La importancia de los suelos en un ecosistema residirá fundamentalmente en su capacidad para mantener una producción biológica y para desempeñar funciones de protección ambiental (Porta, 2005).

**Tabla I.1.1. Funciones del suelo**

---

**FUNCIONES ECOLÓGICAS**

---

**Producción de biomasa:** suministro de nutrientes, aire y agua a las plantas; proporcionar alimentos, energía renovable, materias primas y rasgos naturales.

**Función hidrológica:** regulación de la infiltración, almacenamiento y flujo de agua superficiales y subsuperficiales y de su calidad.

**Función medioambiental de filtrado, tampón, almacenamiento y transformación:** amortiguación del pH; almacenamiento de agua; filtrado; retención de compuestos peligrosos de residuos y vertidos (si no se supera la capacidad depurativa del suelo).

**Hábitat biológico:** conservación de biodiversidad, reserva de genes.

**Función reguladora del clima:** sumidero de gases de efecto invernadero; efectos sobre el equilibrio energético global y sobre el ciclo hidrológico; reserva de carbono.

**Función de conexión entre ecosistemas.**

---

**FUNCIONES RELACIONADAS CON LA ACTIVIDAD HUMANA**

---

**Medio físico:** el suelo constituye la base espacial para las actividades agrícolas, asentamientos humanos, infraestructuras y actividades sociales.

**Fuente de materia primas para uso humano:** agua, gravas, arenas, minerales.

**Reserva de genes** de plantas, animales y microorganismos.

**Conservación del archivo y herencia cultural.**

---

Fuente: Porta (2005).



La creciente preocupación por la conservación del suelo para el desarrollo de sus funciones implica la necesidad de establecer estrategias que eviten, o al menor reduzcan, la degradación de los sistemas edáficos a escala global y local, contribuyendo con ello a un desarrollo sostenible. En este contexto, hay que considerar el papel fundamental del establecimiento de prácticas agrícolas adecuadas, que en el marco de una gestión integral de los recursos naturales permitan alcanzar la máxima productividad sin comprometer la fertilidad del suelo para las generaciones futuras, ya que es el medio del que depende la producción de alimentos.

### **I.1.2. PROCESOS DE DEGRADACIÓN DEL SUELO**

La degradación del suelo se produce cuando disminuye su capacidad actual o futura para generar, en términos de calidad y cantidad, bienes o servicios. Supone una alteración del equilibrio entre sus constituyentes, debido a los cambios experimentados en sus propiedades físicas, químicas, biológicas o bioquímicas que conducen a la pérdida o disminución de su fertilidad. Aunque en Europa los problemas son, en general, menos graves que en otras partes del mundo, existen extensas zonas afectadas por la erosión eólica e hídrica, la anegación y salinización, la compactación, la acidificación, la pérdida de materia orgánica y microorganismos, el agotamiento de nutrientes y la acumulación de contaminantes (Agencia Europea de Medio Ambiente, 2004).

En los ecosistemas de la región mediterránea, los suelos manifiestan procesos de degradación debidos a factores climáticos de marcada aridez, con temperaturas elevadas, escasez e irregularidad de las precipitaciones, fuerte insolación y una evapotranspiración muy intensa, que favorecen el deterioro de sus propiedades, observándose procesos irreversibles de desertificación en el medio (Zalidis et al., 2002). Estas condiciones ambientales favorecen y aceleran los procesos de mineralización de la materia orgánica existente en el sistema, lo que les confiere una escasa capacidad de retención hídrica y provoca una disminución progresiva de la cobertura vegetal, favoreciendo los procesos de erosión (Dunjó et al., 2003).

Por otra parte, en las últimas décadas la agricultura se ha dirigido hacia un aumento de la productividad, intensificando al máximo los recursos existentes. Muchas de las prácticas agrícolas que se han llevado a cabo para conseguir los anteriores objetivos, han resultado a largo plazo perjudiciales para el suelo (utilización de monocultivos, abuso de fertilizantes minerales y plaguicidas, maquinaria agrícola pesada, sobrepastoreo, etc.). La agricultura intensiva llevada a cabo en gran parte de los suelos del área mediterránea ha forzado el empleo de técnicas inadecuadas de manejo, dando lugar a una pérdida de su calidad y de su fertilidad que ha llevado a

su posterior abandono (Dunjó et al., 2003). Sin embargo, el mantenimiento de la capacidad productiva de estos agroecosistemas a corto y a largo plazo es de vital importancia y, para ello, es necesario que los procesos de degradación del suelo, naturales o antrópicos, se equilibren mediante la aplicación de prácticas de conservación.

### **I.1.3. MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO**

El término "materia orgánica del suelo" hace referencia a todas las sustancias presentes en el mismo que contienen carbono orgánico. En los suelos se almacenan más de  $1.5 \cdot 10^{15}$  kg de carbono en forma orgánica, además de unos  $0.9 \cdot 10^{15}$  kg de carbono inorgánico. Aunque el contenido de materia orgánica de los suelos es muy variable en función de sus características y de las condiciones climáticas y de manejo, en total engloba cuatro veces el carbono contenido en los seres vivos y tres veces el presente en la atmósfera (Lal, 2004).

Las principales funciones de la materia orgánica del suelo señaladas por Lal (2004) se enumeran en la tabla I.1.2. La materia orgánica del suelo tiene un papel fundamental en el desarrollo y funcionamiento de los ecosistemas terrestres, ya que el contenido y dinámica de la misma determina la productividad potencial tanto de los sistemas naturales como de los cultivados. Existe una estrecha relación, ampliamente constatada, entre la pérdida de materia orgánica, la merma del potencial agrícola y el avance de la erosión, en especial cuando confluyen otros factores como la ausencia de vegetación, la pendiente del terreno y las condiciones climáticas (Stoate et al., 2001). La escasez de materia orgánica en los suelos agrícolas es una constante en las regiones mediterráneas debido principalmente al clima y al sistema de cultivo basado fundamentalmente en un laboreo continuo y en la aplicación de abonos minerales para el mantenimiento de la fertilidad (Zalidis et al., 2002).

La materia orgánica de un ecosistema maduro presenta un estado en evolución permanente, que tiende a alcanzar un equilibrio dinámico cuando las entradas de carbono al suelo por los aportes de los residuos vegetales y animales son iguales a las salidas debidas a los procesos de mineralización y lixiviación de sus fracciones solubles (Schulze y Freibauer, 2005). La alteración de este equilibrio, por ejemplo cuando un suelo natural se somete a cultivo, puede provocar grandes pérdidas de materia orgánica, debido a una intensificación de las alteraciones del sistema y a un menor aporte de residuos vegetales (Stoate et al., 2001). En los últimos años se ha señalado la implicación que los cambios en el clima pueden ejercer sobre la estabilidad y el contenido de materia orgánica del suelo, liberando carbono en forma de dióxido de carbono a la atmósfera, lo que supondría una

retroalimentación del proceso (Lal, 2004; Schulze y Freibauer, 2005) y da idea de la implicación global que alcanza su conservación (Janzen, 2004).

**Tabla I.1.2. Funciones de la materia orgánica del suelo**

---

**FUNCIONES DIRECTAS**

---

- Actúa como reserva de los principales nutrientes para las plantas.
  - Participa en reacciones de intercambio iónico
  - Absorbe agua a bajos potenciales hídricos, aumentando el agua útil para las plantas.
  - Mejora la agregación del suelo, disminuyendo la susceptibilidad a la erosión.
  - Aumenta la capacidad de infiltración de agua y reduce las pérdidas debido a escorrentía superficial.
  - Es la fuente de energía para la biota del suelo, contribuyendo al aumento de la biodiversidad.
  - Mejora la eficiencia en el empleo de agua y nutrientes, ya que disminuyen las pérdidas por drenaje, evaporación y volatilización.
  - Contribuye a la capacidad amortiguadora del pH.
  - Modera la temperatura del suelo.
- 

**FUNCIONES INDIRECTAS**

---

- Se reduce la carga de sedimentos en cursos de agua.
  - Filtra la carga contaminante de compuestos orgánicos.
  - Participa en la biodegradación de contaminantes
  - Amortigua las emisiones de gases de efecto invernadero del suelo.
- 

Fuente: Lal (2004).

La materia orgánica del suelo se puede dividir en dos bloques, en función de su estructura química: las sustancias no húmicas, que incluye los compuestos orgánicos pertenecientes a las clases químicamente conocidas (aminoácidos, carbohidratos, lípidos, etc.) y que no se encuentran únicamente en los suelos; y sustancias húmicas, que es la fracción cuantitativamente más importante y que está constituida por una mezcla químicamente heterogénea de compuestos, por lo que no puede ser descrita mediante una estructura molecular única definida químicamente;

se trata de sustancias relativamente resistentes a la degradación biológica, generadas mediante el proceso de humificación, en el que los restos orgánicos procedentes de seres vivos se descomponen y transforman, teniendo lugar un proceso de reorganización estructural secundario que origina las sustancias húmicas (Stevenson, 1994; Senesi y Loffredo, 1999). Contribuyen de forma trascendental al desarrollo de las funciones del suelo, debido a su colaboración en la formación de su estructura, su participación en el control de contaminantes y su papel como reservorio en los ciclos biogeoquímicos del carbono y de otros elementos (Piccolo, 2002). Por otra parte, aunque la fracción hidrosoluble representa un pequeño porcentaje del total, tiene una contribución fundamental en la dinámica global de la materia orgánica, en especial al actuar como fuente de energía y nutrientes para la actividad biológica del suelo (Chantigny, 2003). Finalmente, hay que señalar que la fracción más activa de la materia orgánica es la biomasa microbiana, la cual engloba al conjunto de microorganismos, sin distinciones en sus funciones metabólicas, presentes en el suelo y que están involucrados en la mineralización y humificación de la materia orgánica y en el cierre de los ciclos biogeoquímicos de diversos elementos. Por consiguiente, la disponibilidad de nutrientes y la productividad de los agrosistemas va a depender fundamentalmente de la cantidad y actividad de su biomasa microbiana (Sparling, 1997).

## **I.2. PROBLEMÁTICA GENERAL DEL PURÍN DE CERDO**

### **I.2.1. CARACTERIZACIÓN**

En las explotaciones ganaderas intensivas, el sistema de recogida de los residuos se basa en la limpieza con agua a presión de los establos. En éstos la cama del animal se ha sustituido por un enrejado y se disponen sobre un colector subterráneo, que recoge los materiales residuales arrastrados y los conduce hacia una fosa séptica, donde se almacenan. Este sistema supone un cambio muy importante en su naturaleza, con respecto a la de los estiércoles sólidos que se generan con los sistemas más tradicionales.

El purín de cerdo es el material generado en las explotaciones intensivas de ganado porcino, formado por una mezcla de deyecciones sólidas y líquidas, mezclado con agua procedente de la limpieza de las instalaciones, pérdidas de los bebederos y lluvias, y que además puede contener remanentes de alimentos, restos de cama y del propio animal. El efluente generado es una mezcla heterogénea, de color oscuro, y en un proceso permanente de fermentación anaeróbica (Sánchez, 2001).

En la fosa de almacenamiento tiene lugar una distribución de los materiales que lo constituyen. En la parte superior, más aireada, se produce una desecación superficial acompañada de una fermentación anaerobia que con el tiempo da lugar a la formación de una costra, bajo la que se encuentra una suspensión más o menos pastosa; en el fondo de la fosa se depositan los sólidos más densos (Carballas y Díaz-Fierros, 1990).

**Tabla I.2.1. Características principales de los purines de cerdo.**

Parámetro <sup>a</sup>	Origen		
	Castilla y León <sup>b</sup> (Sánchez y González, 2005)	C. Valenciana <sup>b</sup> (Moral et al., 2005b)	UE-15 <sup>c</sup> (Comisión Europea, 2001)
Materia seca (g L <sup>-1</sup> )	32.4 ± 37.3	22.7 ± 3.1	10-180
Cenizas (g L <sup>-1</sup> )	9.0 ± 8.2	n. d.	n. d.
pH	7.6 ± 0.4	7.4 ± 0.3	n. d.
CE (dS m <sup>-1</sup> )	15.6 ± 9.4	17.9 ± 8.1	n. d.
DBO <sub>5</sub> (g O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	n. d.	14.2 ± 9.4	n. d.
COT (g L <sup>-1</sup> )	13.6 ± 17.2	n. d.	34-70
N total (g L <sup>-1</sup> )	3.2 ± 1.8	2.6 ± 1.3	2-16
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	1.86 ± 1.26	2.01 ± 1.06	2.1-3.6
Macroelementos totales (g L <sup>-1</sup> )			
P	0.82 ± 0.82	0.76 ± 1.04	0.1-1.2
K	1.01 ± 0.62	2.26 ± 1.27	2-9
Ca	1.10 ± 1.29	10.8 ± 17.6	1.4-6.7
Mg	0.22 ± 0.26	1.12 ± 1.17	0.5-1.8
Na	0.23 ± 0.20	n. d.	0.8-0.9
Microelementos totales (mg L <sup>-1</sup> )			
Fe	75 ± 118	n. d.	n. d.
Mn	12 ± 17	n. d.	n. d.
Zn	25 ± 35	n. d.	403-919
Cu	13 ± 20	n. d.	180-574

<sup>a</sup>CE: conductividad eléctrica; DBO<sub>5</sub>: demanda bioquímica de oxígeno; COT: carbono orgánico total.

<sup>b</sup>Media ± desviación estándar.

<sup>c</sup>Máximo-mínimo.

n.d.: no determinado.

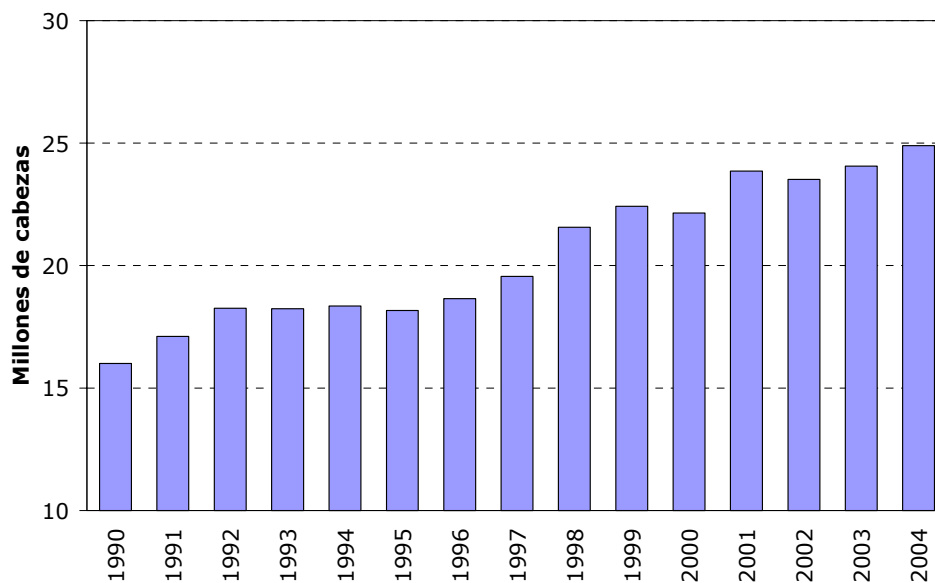
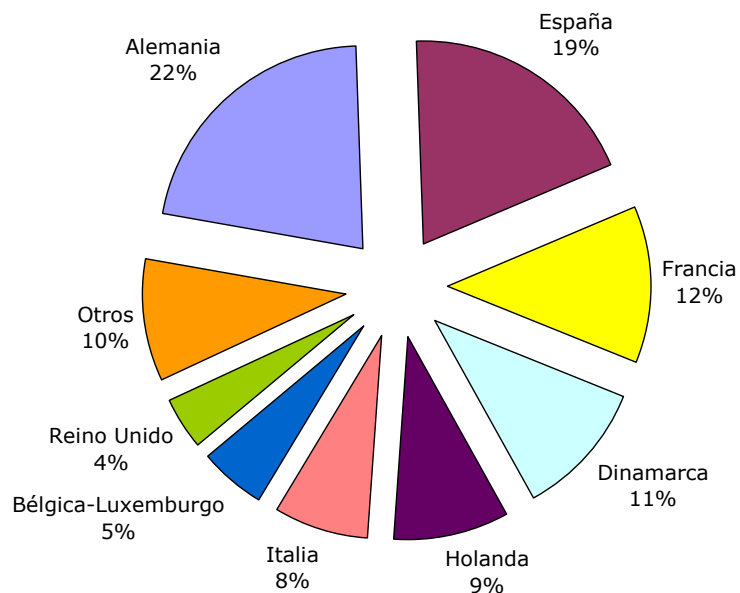
Como resultado, se obtiene un residuo que se caracteriza por una gran variabilidad tanto en su aspecto como en su composición y en la concentración de sus constituyentes. Además, influyen diversos factores relacionados con la gestión de la explotación y con las características de los animales: edad, raza, estado fisiológico, tipo de alimentación, método de limpieza, cantidad de agua empleada, tiempo y forma de almacenamiento y época del año (Sánchez, 2001; Moral et al., 2005a). La tabla I.2.1. muestra los resultados obtenidos en tres estudios de caracterización de purín de cerdo llevados a cabo en Castilla y León (Sánchez y González, 2005), en la Comunidad Valenciana (Moral et al., 2005b) y en la Unión Europea (Comisión Europea, 2001). En todos ellos resulta patente el grado de heterogeneidad de las muestras.

En términos generales, el purín de cerdo es un material líquido, con un contenido muy bajo de materia seca, de carácter ligeramente básico y bastante salino. Comparado con otros residuos orgánicos, es relativamente pobre en materia orgánica (Comisión Europea, 2001; Moral et al., 2005a); una fracción importante de la misma está formada por sustancias sencillas poco humificadas y fácilmente biodegradables. Contiene cantidades importantes de carbohidratos, como lignina, celulosa, lignocelulosa y hemicelulosa, junto con urea, aminoácidos, polipéptidos, lípidos, ácidos grasos libres, fenoles y compuestos azufrados (Saviozzi et al., 1997; Giusquiani et al., 1998).

La mayor parte del nitrógeno del purín almacenado está presente como amonio (Béline et al., 1998) y el resto, como nitrógeno orgánico de resistencia variable a la descomposición microbiana (aminoácidos, proteínas, lignoproteínas, etc.). Asimismo, el purín contiene cantidades apreciables de fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro y manganeso. También se encuentran concentraciones relativamente altas de cobre y zinc, ya que ambos se emplean como aditivos alimentarios (L'Herroux et al., 1997); también pueden contener otros compuestos como insecticidas, fungicidas, antibióticos u hormonas.

### **I.2.2. LA INTENSIFICACIÓN GANADERA**

En los últimos años se ha producido un aumento considerable de la cabaña española de ganado porcino (figura I.2.1.); en diciembre de 2004 se encontraba próxima a los 25 millones de animales, según datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Esta cifra representa el 19% del censo de la Unión Europea en 2003 (figura I.2.1) y sitúa a España como segundo productor comunitario, sólo superado por Alemania. Cabe destacar el enorme peso específico del sector en algunas Comunidades Autónomas; el mayor número de animales se encuentra en Cataluña, en la que se

**Evolución del censo ganadero porcino en España****Distribución del censo ganadero porcino en la Unión Europea (2003)**

**Figura I.2.1.** Evolución del censo de ganado porcino en España y distribución en los países de la Unión Europea (UE-15) en 2003. (Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación)

**Tabla I.2.2. Censo de ganado porcino por Comunidades Autónomas en 2004.**

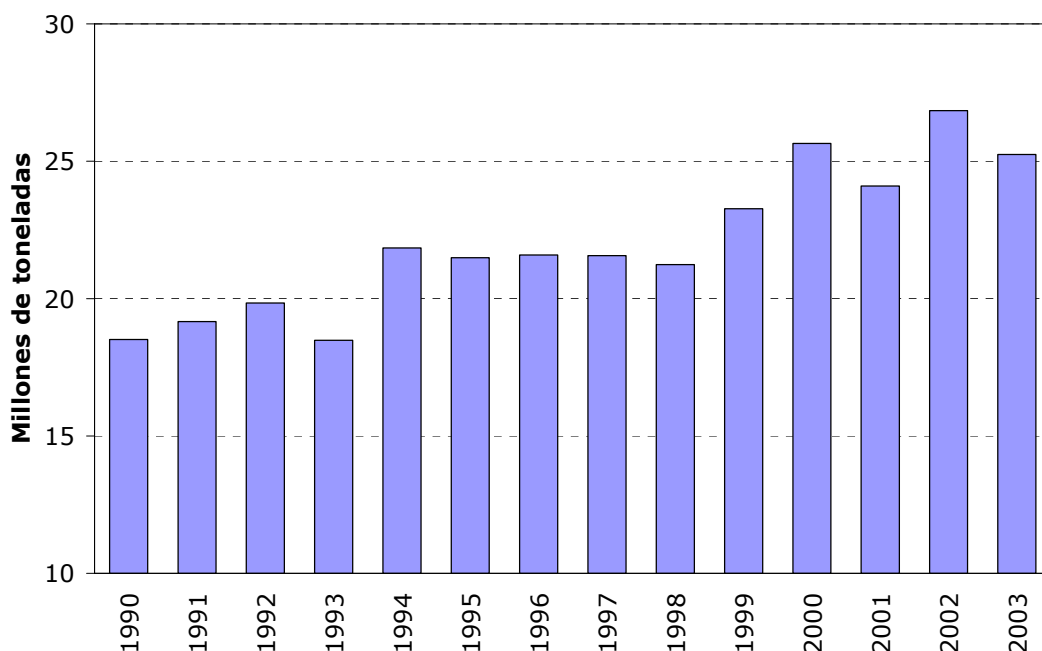
<b>Comunidad Autónoma</b>	<b>Nº de animales</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Galicia	821082	3.3
Principado de Asturias	31172	0.1
Cantabria	16712	0.1
País Vasco	35521	0.1
Navarra	575051	2.3
La Rioja	89826	0.4
Aragón	4528954	18.2
Cataluña	5970936	24.0
Baleares	43855	0.2
Castilla y León	3578080	14.4
Madrid	45459	0.2
Castilla-La Mancha	1679085	6.7
Comunidad Valenciana	1173725	4.7
Región de Murcia	2033340	8.2
Extremadura	1669812	6.7
Andalucía	2532693	10.2
Canarias	69653	0.3
ESPAÑA	24894956	100.0

Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

concentra el 24% del total (tabla I.2.2.). También destacan Aragón, Castilla y León, Andalucía y Murcia, reuniendo entre las cinco las tres cuartas partes de la producción nacional. En Castilla-La Mancha existen alrededor de 1.7 millones de cabezas (6.7% del total nacional), de las que casi 1.2 millones se encuentran concentradas en la provincia de Toledo. Paralelamente, ha tenido lugar una reducción del número de explotaciones de ganado porcino. Los datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación muestran que se ha pasado de 209859 granjas en 1995 a 130748 en 2003, lo que supone una descenso del 38%, mientras que si se compara con las existentes en 1962 (1468801 explotaciones), la disminución alcanza el 90%. Todos estos datos indican una tendencia manifiesta hacia un incremento del número de cabezas por unidad de superficie y hacia una intensificación del sistema productivo de la ganadería porcina (explotaciones sin tierra, mecanización alta, alimentación a base de piensos compuestos, etc.).



### Evolución de la producción de estiércol porcino en España



**Figura I.2.2.** Evolución de la producción de estiércol porcino en España (Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación)

Tradicionalmente, en toda España el cerdo ha estado íntimamente ligado a la economía familiar del medio rural, constituyendo la cría de un escaso número de animales una importante actividad complementaria de la misma. Dadas sus características zootécnicas (fisiológicas, patológicas, de manejo, nutricionales, etc.), la porcicultura ha alcanzado, junto con la avicultura, el mayor grado de industrialización e intensificación productiva. Este desarrollo creciente de la actividad ganadera ha venido impuesto por el aumento de la necesidad de un abastecimiento de alimentos a menor coste, originando el aumento del número de explotaciones y la concentración de las mismas en regiones específicas. Al mismo tiempo, se ha mejorado la eficacia productiva del ganado y se han reducido las cantidades de residuos generados por unidad productiva debido a un mejor aprovechamiento del pienso (Westerman y Bicudo, 2005), mejorando la comercialización de los productos. Sin embargo, el sistema intensivo de producción conlleva una automatización creciente de las granjas y un aumento considerable en la utilización de agua en la limpieza de los establos, lo que produce una mayor cantidad, fluidez y dilución del estiércol producido. Además, la explotación ganadera se ha desligado de la agrícola, por lo que en zonas de alta producción intensiva, existen numerosas explotaciones ganaderas sin una base territorial suficiente para reutilizar los purines generados. Otro factor a

tener en cuenta es que que la superficie agraria útil ha ido disminuyendo por distintos motivos como el crecimiento urbanístico y de infraestructuras o el abandono de tierras marginales. Por ello, la intensificación ganadera lleva asociada la producción de cantidades crecientes de residuos (figura I.2.2.) que hay que gestionar, agravando la problemática ambiental de esta actividad ganadera.

### **I.2.3. PROBLEMÁTICA AMBIENTAL Y SANITARIA**

Desde el punto de vista medioambiental los problemas se originan por una gestión inadecuada del purín, pero esto no desautoriza el valor real que para la mejora del medio ambiente tiene su aplicación como abono agrícola. La tabla I.2.3. resume las posible afecciones sobre el medio ambiente que pueden originar los residuos ganaderos, bien por un vertido incontrolado o por su filtrado desde balsas de almacenamiento mal dimensionadas o inadecuadamente impermeabilizadas.

Los purines de cerdo almacenados representan una importante fuente de emisiones de amoniaco a la atmósfera. Este proceso, además de suponer pérdidas del contenido de nitrógeno del residuo, contribuye a la acidificación de la atmósfera y, por tanto, de los suelos y aguas a través de la lluvia ácida. Igualmente, la fermentación anaerobia de la materia orgánica origina la emisión de metano, uno de los gases de efecto invernadero más importantes. Por otra parte, la intensificación ganadera ha generado numerosas denuncias sobre olores desagradables; los compuestos responsables de los malos olores, una gran parte azufrados (Westerman y Bicudo, 2005), tienen fundamentalmente su origen en los procesos de degradación anaerobia.

El impacto sobre las aguas puede ser por vertido directo a los cauces o mediante la contaminación de las aguas subterráneas debido a filtraciones o un exceso de aplicación al suelo, que origina un enriquecimiento en nutrientes de las aguas, especialmente en fósforo y nitrógeno, lo que da lugar a procesos de eutrofización. El crecimiento excesivo de algas y otros microorganismos provocan una aumento de la carga orgánica de las aguas y una disminución del oxígeno disponible, disminuyendo su calidad y afectando a la supervivencia de los seres vivos del ecosistema acuático (Smith et al., 2000a). Además, se provoca una pérdida de calidad de las aguas para el consumo humano, especialmente debido a un exceso de nitratos que puede causar problemas sanitarios graves.

Finalmente, no hay que olvidar que el purín de cerdo contiene diversos agentes infecciosos que pueden transmitirse a través de las aguas o de la atmósfera (Bicudo y Goyal, 2003). El empleo de antibióticos hace que se eliminen algunos agentes patógenos; sin embargo, esto acarrea el riesgo

adicional de que los microorganismos desarrollen mecanismos de resistencia a dichos fármacos (Sengeløv et al., 2003).

**Tabla I.2.3. Potencial contaminante de los residuos ganaderos sobre el medio ambiente**

ATMÓSFERA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Malos olores por emisión de compuestos volátiles</li> <li>• En condiciones de anaerobiosis emisiones de NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, CH<sub>4</sub>.</li> <li>• Contaminación biológica: dispersión de patógenos</li> </ul>
SUELO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Costras en superficie: aumento de escorrentía superficial</li> <li>• Episodios pasajeros de anaerobiosis</li> <li>• Salinización de los suelos</li> <li>• Fitotoxicidad</li> <li>• Lixiviación de N.</li> <li>• Desequilibrios nutricionales</li> <li>• Metales pesados (Cu y Zn)</li> </ul>
AGUAS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ambiente reductor por disminución de O<sub>2</sub> disuelto</li> <li>• Turbidez que dificulta fotosíntesis</li> <li>• Procesos anaerobios en el fondo de los cauces</li> <li>• Eutrofización (exceso de N y P)</li> <li>• Contaminación biológica: difusión de microorganismos patógenos</li> <li>• Deterioro de calidad de aguas para consumo (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)</li> </ul>
SERES VIVOS	<p>Plantas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Desequilibrios nutricionales</li> <li>• Fitotoxicidad y alteraciones fisiológicas</li> <li>• Sequía fisiológica por salinización</li> <li>• Desarrollo de malas hierbas</li> </ul> <p>Animales y humanos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Enfermedades por consumo de aguas y plantas contaminadas</li> <li>• Metahemoglobinemia y trastornos gástricos</li> </ul>

Existen varias disposiciones normativas de carácter estatal para intentar reducir al máximo los efectos negativos de la generación, almacenamiento y vertido de purines. La Ley 6/2001, de modificación del Real Decreto Legislativo 1302/1986, de evaluación de impacto ambiental, exige que los proyectos consistentes en la realización de instalaciones de ganadería

intensiva con más de 2000 plazas para cerdos de cría y 750 para cerdas sean sometidos a una evaluación de impacto ambiental. Esta evaluación debe contemplar, entre otros aspectos, una estimación de los tipos y de la cantidad de residuos vertidos, una valoración de los efectos previsibles directos o indirectos de esta actividad sobre la población, la fauna, la flora, el suelo, el aire, el agua, los factores climáticos y los bienes materiales, incluido el patrimonio artístico y el arqueológico, unas medidas previstas para reducir, eliminar o compensar los efectos ambientales significativos y un programa ambiental.

La Ley 16/2002, de prevención y control integrados de la contaminación, tiene como objeto evitar o, si no es posible, reducir y controlar la contaminación de la atmósfera, del agua y del suelo. Esta ley obliga a los titulares de explotaciones ganaderas con más de 2000 plazas para cerdos de cría y 750 para cerdas, a disponer de una autorización ambiental integrada y cumplir las condiciones establecidas en la misma. La autorización deberá contener, entre otros aspectos, los valores límite de emisión de sustancias contaminantes y los procedimientos y métodos que se vayan a emplear para la gestión correcta de los residuos generados por la propia instalación.

### **I.2.4. GESTIÓN Y TRATAMIENTO**

Todas las tecnologías de gestión de purines se dirigen a la mejora de sus condiciones para el empleo adecuado a la agricultura y a la reducción de su volumen y, en todo caso, a garantizar su contribución a la mejora medioambiental. Sin embargo, según la Comisión Europea (2001) los residuos ganaderos no suelen ser tratados antes de su incorporación al suelo, excepto un pequeño porcentaje cercano al 5%, sometido generalmente a procesos de compostaje o de digestión anaerobia.

El Real Decreto 324/2000, sobre normas básicas de ordenación de las explotaciones porcinas, intenta paliar los problemas ambientales y sanitarios que generan la actividad ganadera y la acumulación de purines. Además de establecer condiciones respecto al bienestar animal y a la ubicación e infraestructura de las explotaciones, dispone que la gestión de los estiércoles podrá realizarse mediante la utilización de cualquiera de los siguientes procedimientos: valorización como abono órgano-mineral; tratamiento mediante compostaje, secado artificial y otros, según lo establecido en la Ley 10/1998 de Residuos; eliminación mediante vertido, que estará sometida a la autorización regulada en el Real Decreto Legislativo 1/2001, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas, y entrega a Centros de gestión de estiércoles, que se encargarán de recogerlos en las granjas y de tratarlos o valorizarlos bajo su responsabilidad.

En ocasiones, el purín se somete a una separación físico-química de las fases sólida y líquida, lo que puede constituir un tratamiento por sí mismo, cuando el sólido se aplica directamente al suelo y el líquido se emplea como agua de riego, o una fase previa que aumenta la eficacia del proceso de tratamiento posterior.

El vertido de la fracción líquida a los cauces requiere un proceso de depuración que alcance los parámetros de vertido que se recogen en el Reglamento de Dominio Público Hidráulico (Real Decreto 849/1986). El sólido se utiliza normalmente como fertilizante, bien directamente o bien después de someterlo a un proceso de compostaje, fermentación anaerobia o secado térmico (cogeneración).

El compostaje "es un proceso biooxidativo controlado, en el que intervienen numerosos y variados microorganismos, que requiere una humedad adecuada y sustratos orgánicos heterogéneos en estado sólido, implica el paso por una etapa termofílica y una producción temporal de fitotoxinas, dando al final como productos de los procesos de degradación dióxido de carbono, agua y minerales, así como una materia orgánica estabilizada, libre de fitotoxinas y dispuesta para su empleo en agricultura sin que provoque fenómenos adversos" (Costa et al., 1991). En el caso del purín, debido a su estado líquido y a su relación C/N baja es necesario mezclarlo previamente con otro material como paja de cereal, virutas de madera, cortezas de árboles, etc. (Sánchez, 2001), además de emplear sustancias adsorbentes como zeolitas para reducir la volatilización del amoníaco (Venglovsky et al., 2005).

La fermentación anaerobia permite, además de reducir la carga contaminante del purín, la obtención de biogás que puede emplearse como fuente energética en las instalaciones. El secado térmico asociado a la cogeneración permite la reducción drástica del contenido de agua del purín a la vez que se genera energía eléctrica cuyos excedentes pueden venderse a la red de distribución. Estos sistemas son capaces de conseguir una eficacia depuradora bastante alta, además de una reducción del volumen de residuo y, por tanto, de los costes de transporte del mismo; sin embargo, presentan un alto grado de tecnificación y un elevado coste de inversión y mantenimiento (Westerman y Bicudo, 2005).

### **I.3. VALORACIÓN AGRONÓMICA DEL PURÍN DE CERDO.**

Actualmente se considera que el aprovechamiento agrícola del purín de cerdo es la opción más adecuada desde el punto de vista técnico, económico y ambiental, debido a su composición, a la capacidad depuradora del suelo y al coste de las tecnologías de tratamiento disponibles (Stockdale et al., 2001; Westerman y Bicudo, 2005). El purín posee un elevado valor fertilizante que puede suponer una alternativa de bajo coste respecto a otros fertilizantes orgánicos y minerales (Sánchez y González, 2005; Schröder, 2005) a la vez que aporta materia orgánica al suelo, aspecto crucial en zonas de climatología árida o semiárida como España. Sin embargo, no conviene olvidar que existen ciertos factores limitantes que es necesario controlar.

El principio clave de la aplicación agrícola de purín de cerdo es que se recuperan los nutrientes y la materia orgánica que contiene, que de otra manera serían desaprovechados. Por ejemplo, en el secado térmico se recupera energía, pero se generan cenizas que necesitan ser gestionadas y se desprende dióxido de carbono, cuyas emisiones deben controlarse de acuerdo con el Protocolo de Kyoto. A la vez, se considera que la aplicación de estiércoles es una práctica más sostenible que el empleo de fertilizantes químicos, los cuales conllevan en su proceso de fabricación un coste energético alto, como los abono nitrogenados, o se abastecen de fuentes agotables, como los fosfatados. La Directiva 1999/31/EC, relativa al vertido de residuos, establece entre sus prioridades la de fomentar la prevención, el reciclado y el aprovechamiento de los residuos, en especial para los biodegradables, de forma que no se malgasten los recursos naturales, potenciando el reciclaje frente al vertido controlado o la incineración.

La Ley 10/1998 de Residuos dispone que los estiércoles no serán calificados como residuos a los efectos de dicha ley cuando se utilicen en el marco de las explotaciones agrícolas, y que no se considerará que con tal operación se está efectuando un vertido de acuerdo a lo establecido en el texto refundido de la Ley de Aguas (Real Decreto Legislativo 1/2001).

El Real Decreto 261/1996, sobre protección de las aguas contra la contaminación producida por los nitratos procedentes de fuentes agrarias, regula la aplicación de fuentes de nitrógeno en la agricultura, incluidos el estiércol y los purines. Se definen zonas vulnerables como "aquellas superficies territoriales cuya escorrentía o filtración influye o puede influir en la contaminación por nitratos de las aguas que se encuentran ya afectadas, o en riesgo de estarlo, por la aportación de nitratos de origen agrario". Las Comunidades Autónomas deben declarar las zonas vulnerables

y establecer un programa de actuación que contenga con carácter obligatorio un código de buenas prácticas agrarias que incluyan medidas que eviten que la cantidad de nitrógeno aplicado con el estiércol cada año exceda de los 170 kg ha<sup>-1</sup>.

Esta normativa se complementa y amplía mediante el ya mencionado Real Decreto 324/2000, sobre normas básicas de ordenación de las explotaciones porcinas. En ella se establece (artículo 5) que para la valorización del purín como abono órgano-mineral, las explotaciones deberán cumplir los siguientes requisitos:

1º Disponer de balsas de estiércol cercadas e impermeabilizadas, natural o artificialmente, que eviten el riesgo de filtración y contaminación de las aguas superficiales y subterráneas, asegurando que se impidan pérdidas por rebosamiento o por inestabilidad geotécnica, con el tamaño preciso para poder almacenar la producción de al menos tres meses, que permita la gestión adecuada de los mismos.

2º Respetar como distancia mínima, en la distribución del estiércol sobre el terreno, la de 100 metros, respecto a otras explotaciones con capacidad hasta 120 UGM (unidad ganadera mayor, equivalente a un bovino adulto), y 200 metros, respecto a las explotaciones con más de 120 UGM y a los núcleos urbanos. En relación con los cursos de aguas, se respetará lo establecido en el Reglamento de Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los títulos I, IV, V, VI y VII de la Ley 29/1985, de Aguas, aprobado por el Real Decreto 849/1986, y lo dispuesto en los diferentes planes hidrológicos de cuenca.

3º Acreditar, ante el Órgano competente de la Comunidad Autónoma, que disponen de superficie agrícola suficiente, propia o concertada, para la utilización de los estiércoles como fertilizantes, cumpliendo lo siguiente:

En las zonas vulnerables, la cantidad máxima de estiércoles aplicada en dicha superficie, procedente o no del porcino, y su contenido en nitrógeno, calculado según la tabla del anexo I (equivalencias en UGM de los distintos tipos de ganado porcino y el contenido de nitrógeno en sus estiércoles al inicio del periodo de almacenamiento), se ajustará a lo establecido en el Real Decreto 261/1996, debiendo presentar un plan de gestión y producción de estiércoles de acuerdo con el anexo II y con los programas de actuación elaborados por las Comunidades Autónomas.

Para el resto del territorio (zonas no vulnerables), los titulares de las explotaciones únicamente presentarán el plan de gestión y producción agrícola de estiércoles cuando el contenido de nitrógeno, aplicado con el estiércol procedente o no del porcino, calculado de acuerdo con el anexo I, supere el valor de 210 kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>.

La valoración se llevará a cabo individualmente por cada explotación. Se podrá llevar a cabo a través de un programa de gestión común para varias explotaciones, previa autorización del Órgano competente de la Comunidad Autónoma.

#### **I.3.1. EFECTOS SOBRE LA MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO**

El purín de cerdo es un material relativamente pobre en materia orgánica en comparación con otros residuos orgánicos utilizados en agricultura (Moral et al., 2005a), por lo que no es de esperar un aumento considerable del contenido de materia orgánica en el suelo. Sin embargo, este material puede actuar sobre las características físico-químicas de la materia orgánica nativa y la distribución de sus fracciones humificada e hidrosoluble. La dinámica de los sustratos orgánicos adicionados depende de las propiedades del medio edáfico (temperatura, humedad, pH, etc.), de la dosis y características de la enmienda y de factores bióticos que van a ejercer una influencia determinante sobre los procesos de mineralización y humificación en el suelo, y en definitiva, sobre las funciones que desempeña la materia orgánica.

#### **I.3.2. EFECTOS SOBRE LA DISPONIBILIDAD DE NUTRIENTES**

El purín de cerdo aumenta los contenidos en nutrientes del suelo, debido a que presenta cantidades importantes de macro y microelementos que son esenciales para las plantas. La eficiencia como fertilizante depende de diversos factores, entre los que figura el tipo de suelo y de cultivo empleado, la composición del residuo y los factores ambientales (Griffin et al., 2002). Éstos inciden directamente sobre los procesos de mineralización y la disponibilidad de nutrientes para la planta. En consecuencia, su aplicación debe realizarse en función de los requerimientos nutricionales del cultivo, tanto en tiempo como en dosis, con el fin de minimizar las pérdidas de nitrógeno y de otros nutrientes.

El purín incorpora un contenido elevado de nitrógeno en forma amoniacal, el cual puede volatilizarse durante y después de la aplicación en superficie, pudiendo llegar a superar el 50% del amonio total en las primeras 6 horas (Smith et al., 2000b), dependiendo de las condiciones meteorológicas (humedad y velocidad del viento), contenido de amonio y materia seca en el purín, características del suelo o forma de aplicación (Misselbrook et al., 2005). Por ello, se recomienda su inyección en el terreno o que se mezcle con el suelo inmediatamente después de aplicarlo en superficie (Sogaard et al., 2002). El amonio también puede ser fijado en los minerales de la arcilla, inmovilizado a través del crecimiento microbiano (Sørensen y Amato, 2002) u oxidarse a nitrato (nitrificación), el cual puede a su vez perderse por desnitrificación, o lixiviación (Dittert et al., 1998;



Dauden y Quílez, 2004; Díez et al., 2004; Vallejo et al., 2005). El nitrógeno orgánico, conjuntamente con el inmovilizado biológicamente, puede ser mineralizado a formas minerales disponibles para la planta, lo que contribuye al efecto a largo plazo de la fertilización con purín de cerdo (Gutser et al., 2005). Esta mineralización está determinada tanto por factores físico-químicos como biológicos, por lo que la estimación de la carga de nitrógeno que se debe aplicar al suelo para una correcta fertilización del cultivo debe considerar los procesos a los que está sometido este elemento en el suelo (Schröder, 2005).

El purín de cerdo también contiene cantidades variables de fósforo y potasio. La disponibilidad de fósforo para la planta es, en general, buena, aunque depende de las características del suelo y de la dosis de aplicación (Gagnon, 2004). El potasio que se aporta está fundamentalmente en forma mineral, por lo que se encuentra inmediatamente disponible para la planta.

El elevado valor fertilizante del purín de cerdo justifica ampliamente su aprovechamiento con el fin de obtener el máximo beneficio en términos de calidad y de producción de los cultivos, siempre y cuando se tengan en cuenta una serie de consideraciones agronómicas y ambientales. En primer lugar se necesita determinar su eficacia fertilizante en función de la composición del cultivo, las características agroclimáticas, el tipo de suelo y las necesidades de los cultivos, definiendo el grado de recuperación de nutrientes y los efectos residuales asociados. Con ello, se pueden implantar programas de fertilización que establezcan las cantidades, la forma de aplicación y la época del año que optimicen el aprovechamiento agrícola del purín, consiguiendo una disminución del empleo de fertilizantes químicos, el aporte excesivo de nutrientes al sistema y la minimización de los efectos negativos sobre el medio ambiente (Schröder, 2005).

### **I.3.3. EFECTOS SOBRE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DEL SUELO**

Los microorganismos realizan un amplio rango de actividades, esenciales para el funcionamiento normal del suelo y el desempeño de sus funciones características. Son responsables de la descomposición de la materia orgánica, de la liberación de nutrientes en formas asimilables para las plantas y de la degradación de residuos vegetales o de origen antrópico. También forman asociaciones simbióticas con raíces, actúan como antagonistas de los microorganismos patógenos, influyen en el desgaste y en la solubilización de los componentes minerales y contribuyen a la estructura y la agregación del suelo. El papel determinante de la fracción microbiana en el desarrollo de los procesos edáficos, y su relativa alta tasa de renovación, lógicamente sugieren que las poblaciones microbianas y la actividad biológica del suelo pueden ser indicadores sensibles y rápidos de

otros cambios de los procesos que se puedan producir en el suelo a más largo plazo (Pankhurst et al., 1997; García et al., 2000; Nannipieri et al., 2002).

La incorporación de residuos orgánicos, incluido el purín de cerdo, a los suelos produce una reactivación de sus propiedades biológicas y bioquímicas, estimulando la proliferación microbiana y su actividad metabólica, como consecuencia de los aportes de fuentes lábiles de carbono que van a servir como sustrato a la biota del suelo. Simultáneamente, el estudio del estado biológico, a través de la biomasa microbiana, la actividad respiratoria y las actividades enzimáticas oxidorreductasas e hidrolasas, puede servir como un marcador del estado del suelo, es decir, como un indicador de su calidad, lo cual irá unido ineludiblemente a su fertilidad natural (Lalande et al., 2000; Plaza et al., 2004).

#### **I.3.4. FACTORES LIMITANTES Y RIESGOS DE CONTAMINACIÓN**

El principal factor limitante del uso de purín de cerdo como fertilizante es el contenido de nitrógeno, debido a que un exceso de aplicación conlleva una acumulación de nitratos en el suelo y en consecuencia, existe el riesgo de que se lixivien contaminando las aguas subterráneas. La posibilidad de lixiviación puede adquirir relevancia en sistemas donde se combinen suelos de texturas gruesas con regadío, o en zonas donde las precipitaciones sean intensas. Generalmente, se considera que en zonas semiáridas y con cultivos de secano el riesgo de contaminación de los acuíferos es menor que en cultivos de regadío, aunque depende de la proximidad a zonas vulnerables. También es recomendable controlar la cantidad de fósforo aportado, ya que es responsable, junto con el nitrógeno, de los procesos de eutrofización de las aguas.

Otro de los riesgos asociados al empleo de purín de cerdo en agricultura es el aumento de la salinidad del suelo (Hao y Chang, 2003; Díez et al., 2004), lo que puede acarrear dificultades para el crecimiento de las plantas y la germinación de las semillas y, en definitiva, la disminución de la calidad del suelo. También se ha establecido el riesgo de la acumulación excesiva de cobre y zinc en el suelo por efecto de la aplicación prolongada de purín y la posible acumulación de los mismo en los cultivos. Finalmente, la aplicación de purín de cerdo implica la liberación de algunas sustancias fitotóxicas y de elementos no deseados, como insecticidas, fungicidas, antibióticos, semillas o microorganismos patógenos (Stockdale et al., 2001).

## **II. OBJETIVOS**

---



## II. OBJETIVOS

La pérdida de materia orgánica del suelo se relaciona estrechamente con la merma del potencial agrícola y con el riesgo creciente de erosión. Este problema se hace más acuciante en la región mediterránea, donde las condiciones climáticas, unidas a prácticas agrícolas inadecuadas, han favorecido un agravamiento de los procesos degradativos del suelo, acelerando los riesgos de erosión y desertificación.

La aplicación de residuos orgánicos se contempla como una opción eficaz para mejorar la calidad de los suelos e incrementar su fertilidad. En este contexto, la utilización del purín de cerdo en suelos agrícolas se considera una forma adecuada de eliminar este residuo, aprovechando su valor fertilizante y el poder depurador del suelo, pero sin olvidar los riesgos sobre el medio ambiente que conlleva su uso indiscriminado.

Los efectos de la adición de cualquier material orgánico al suelo dependen de las características de ambos, de la dosis y época de aplicación y de las condiciones ambientales, por lo que los experimentos de campo están sujetos a una serie de variables difíciles de controlar y que repercuten indiscutiblemente en los resultados que se obtengan. A pesar de estas limitaciones, la realización de estudios de campo a largo plazo proporciona una información extremadamente valiosa acerca de la capacidad fertilizante del residuo aplicado y la influencia que ejerce sobre el suelo y las plantas en condiciones reales.

En 1997 se inició un experimento de campo en la finca experimental "La Higuera", situada en Santa Olalla (Toledo), en el marco del proyecto "Aprovechamiento agrícola de purines de cerdo: riesgos de contaminación sobre suelos y plantas". En este trabajo se recogen los resultados obtenidos en los tres últimos años de experimentación, continuando los estudios realizados por Plaza (2002).

**El objetivo fundamental de este trabajo fue estudiar en condiciones de campo los efectos residuales y acumulativos de la aplicación de purín de cerdo a varias dosis sobre la fertilidad y las propiedades físico-químicas, biológicas y bioquímicas de un suelo representativo de un agroecosistema semiárido, valorando especialmente las transformaciones de la materia orgánica y los riesgos de contaminación en suelos y plantas.**

El objetivo fundamental se desglosa en los siguientes **objetivos concretos**:

- Valorar la capacidad fertilizante del purín de cerdo, estudiando su efecto sobre el rendimiento, calidad y composición mineral de un cultivo de cebada en condiciones de secano.
- Determinar los efectos sobre algunas propiedades físicas y químicas del suelo, evaluando los posibles riesgos de contaminación por metales pesados.
- Evaluar la incidencia que el purín de cerdo ejerce sobre el contenido y la dinámica de las distintas fracciones de la materia orgánica, profundizando en el estudio de los efectos a largo plazo sobre las características funcionales y estructurales de las sustancias húmicas, especialmente sus propiedades ácido-base y su capacidad para formar complejos con el cobre(II) y el zinc(II).
- Estudiar la influencia de la aplicación de purín sobre la transferencia de carbono y nitrógeno en el sistema suelo-planta, mediante análisis de abundancia de isótopos estables  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ .
- Determinar la influencia del purín de cerdo sobre la actividad microbiana y los ciclos biogeoquímicos del suelo, examinando las interrelaciones entre los parámetros biológicos y bioquímicos y otras propiedades físico-químicas del suelo.
- Estudiar los riesgos de contaminación por microorganismos patógenos de origen fecal, realizando un seguimiento de la supervivencia de los mismos en el suelo tras la aplicación de purín.

---

## **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

**III.1. MATERIALES**

**III.2. DISEÑO EXPERIMENTAL**

**III.3. MÉTODOS**





## III. MATERIALES Y MÉTODOS

### III.1. MATERIALES

#### III.1.1. PURINES DE CERDO

Los purines de cerdo fueron suministrados por una explotación de ganado porcino ubicada en el término municipal de Santa Olalla (Toledo) y gestionada por la empresa Luis López Herrera.

Esta granja cuenta con unas 3700 cabezas, de las que 1100 son lechones de hasta 25 kg, 2200 de cebo y 400 son reproductoras. El sistema de producción es de ciclo cerrado, con 2.2 ciclos anuales. El suelo de las porquerizas está enrejado y se sitúa sobre un colector que conduce los residuos generados hacia una balsa exterior descubierta de  $450 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  de capacidad. La producción anual de purín es de unos  $7300 \text{ m}^3$ , según datos suministrados por la propia explotación.



**Figura III.1.1.** Vista de las porquerizas y de la balsa de almacenamiento de purines.

### III.1.2. SUELO

El experimento se ha desarrollado en la finca experimental "La Higuera", perteneciente al Centro de Ciencias Medioambientales (CSIC), situada en el término municipal de Santa Olalla (Toledo). Sus coordenadas geográficas son 40° 3' de latitud norte y 4° 26' de longitud oeste y se encuentra a una altitud media de 450 m sobre el nivel del mar (figura III.1.2).

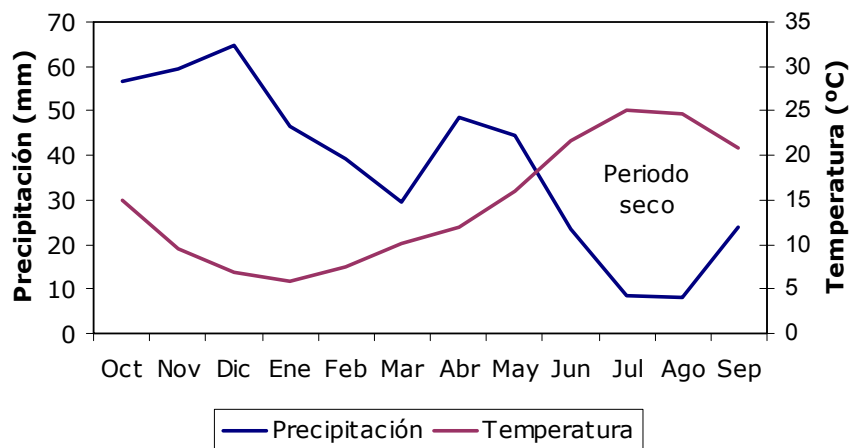


**Figura III.1.2.** Situación geográfica (hoja número 603 serie L-17-24 del mapa cartográfico nacional a escala 1:50000) y vista aérea de la finca experimental "La Higuera".

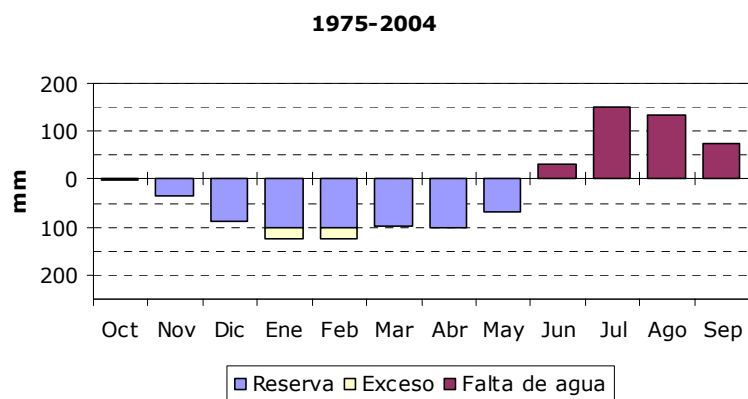
Los suelos de la finca se desarrollan sobre sedimentos detríticos arcósicos procedentes de la erosión de los materiales ígneos metamorizados, muy abundantes en todo el Sistema Central (Monturiol, 1984). En conjunto, la zona es muy sensible al problema de la erosión, encontrándose una degradación máxima en los suelos que han recibido

prácticas de laboreo convencional, como revelan resultados obtenidos en estudios previos (De Alba, 1998).

Los datos meteorológicos se tomaron de la estación existente en la propia finca. Con los datos correspondientes al periodo comprendido entre 1975 y 2004 se realizó la clasificación climática de la zona de estudio según Köppen (Strahler y Strahler, 1989), Thornthwaite (1948) y UNESCO-FAO (1963). Igualmente, se confeccionó el climodiagrama ombrotérmico de Gausson (Ministerio de Medio Ambiente, 2000, figura III.1.3.) y el balance hídrico según Thornthwaite (figura III.1.4). La pluviometría media anual es de 454 mm, con una evapotranspiración potencial (ETP) según Thornthwaite de 793 mm y una temperatura media anual de 14.6°C.



**Figura III.1.3.** Climodiagrama ombrotérmico de Gausson (periodo 1975-2004).



**Figura III.1.4.** Balance hídrico según Thornthwaite (periodo 1975-2004).

La clasificación de Köppen define el clima de la zona como templado húmedo, mesotérmico, con estación seca en verano, siendo éste caluroso (Csa). Según Thornthwaite (1948), el área estudiada presenta un tipo de humedad semiárido con exceso de agua pequeño o nulo, mesotérmico segundo con concentración moderada de la eficacia térmica en el verano (DB'2db'3). Según la clasificación bioclimática UNESCO-FAO, la zona se caracteriza por tener un clima templado medio (Grupo I) con invierno moderado, con un solo período seco ( $P_i < 2t_{m_i}$ ) que va de junio a septiembre (monoxérico) y con 112 días al año considerados como biológicamente secos, por lo que el clima es termomediterráneo atenuado.

## III.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

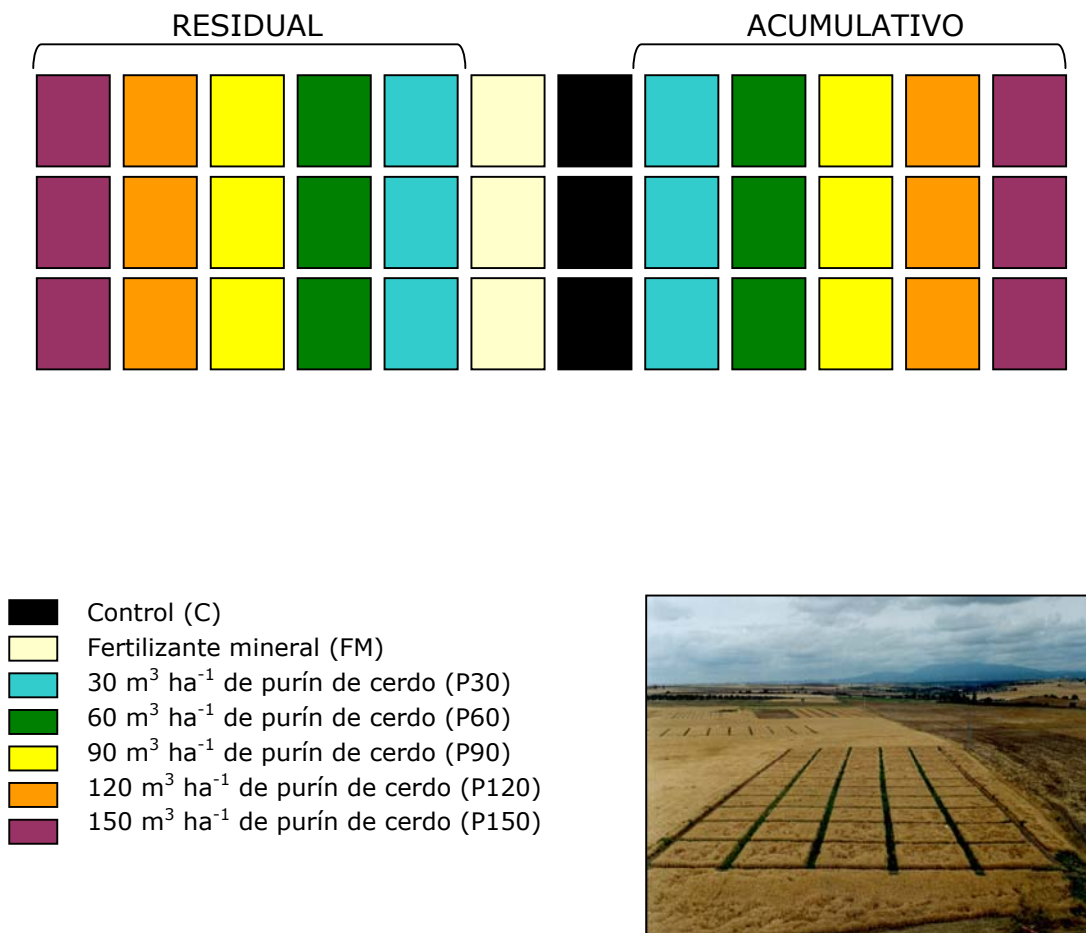
El experimento continuó los estudios realizados por Plaza (2002), siguiendo el mismo diseño. Constó de parcelas cultivadas con cebada (*Hordeum vulgare* L.), de 10 x 8 m<sup>2</sup> a las que se aplicaron 30 (P30), 60 (P60), 90 (P90), 120 (P120) y 150 (P150) m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo. Se compararon con un conjunto de parcelas no tratadas (control C) y con un tratamiento de fertilización mineral (FM) consistente en 400 kg ha<sup>-1</sup> de abono triple 15-15-15 como abonado de fondo y 100 kg ha<sup>-1</sup> de nitrato amónico como cobertera, similar a la fertilización empleada en la zona para el cultivo de cebada. Un bloque de parcelas tratadas con purín recibió una única adición al inicio del experimento con el fin de estudiar el efecto residual en los años siguientes, mientras que el otro conjunto se enmendó anualmente para estudiar el efecto acumulativo de la aplicación de purín. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, siguiendo la distribución mostrada en la figura III.2.1.

La duración total del experimento fue de siete años, iniciándose con la primera aplicación de purín en octubre de 1997. En este trabajo se realiza el seguimiento de los efectos residuales y acumulativos de los tres últimos años (muestras de suelo y planta tomadas tras las cosechas de 2002, 2003 y 2004).

La aplicación de purín de cerdo se realizó cada año en la segunda quincena de octubre, excepto en el último que se tuvo que retrasar a primeros de noviembre, debido a las precipitaciones de las últimas semanas de octubre. El sistema de aplicación consistió en la distribución del purín desde una cisterna sobre surcos previamente preparados sobre el suelo, con el propósito de evitar la contaminación de parcelas adyacentes.

Inmediatamente después se incorporaron al suelo mediante la realización de dos labores con cultivador.

Posteriormente se realizó la siembra de cebada a inicios de noviembre, con una densidad de  $140 \text{ kg ha}^{-1}$  de semilla, equivalente a unas 300 plantas  $\text{m}^{-2}$ . Se seleccionó la cebada (*Hordeum vulgare* L.), variedad Reinette, por su buena adaptación a las condiciones bioclimáticas y por ser un cultivo frecuente en la zona de estudio. En primavera se aplicó un tratamiento herbicida con glifosato en todas las parcelas. En junio de cada año se realizó la recolección de la cosecha con una cosechadora apropiada para trabajar con parcelas como las de este experimento.



**Figura III.2.1.** Esquema de la distribución de los tratamientos en el experimento de campo y vista aérea de la parcela experimental.

En el momento de la cosecha se recogieron las muestras de planta, sobre las que se han estudiado los siguientes parámetros: rendimiento de materia seca, rendimiento de grano, índice de cosecha, número de espigas

por unidad de superficie, número de granos por espiga, factor de acumulación, calidad de grano (peso específico y peso de 1000 granos), composición mineral (nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, calcio, sodio, hierro, manganeso, zinc y cobre) del grano y de la paja e índices de eficiencia fertilizante. También se determinaron las abundancias isotópicas  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  en muestras de grano y de paja recogidas en la última cosecha, correspondientes al tratamiento control y a los enmendados anualmente con 90 y 150  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$ .



**Figura III.2.2.** Sistema de aplicación e incorporación al suelo del purín de cerdo, desarrollo del cultivo y recolección de la cosecha.

Las muestras de suelo se tomaron poco después de la cosecha y sobre ellas se analizaron pH, conductividad eléctrica, contenido de nitrógeno total y mineral (amoniaco y nítrico), carbono orgánico total, carbono de las sustancias húmicas, carbono de los ácidos húmicos y fúlvicos, carbono hidrosoluble y algunas de sus fracciones (carbohidratos, compuestos fenólicos y proteínas), carbono de la biomasa microbiana, relación carbono de la biomasa microbiana/carbono orgánico total, respiración basal, cociente metabólico y actividades enzimáticas (actividad deshidrogenasa, catalasa, ureasa, proteasa-BAA, fosfatasa y  $\beta$ -glucosidasa). En los suelos del último año se analizaron además contenido de macroelementos asimilables (fósforo, potasio, magnesio, calcio y sodio), concentración de microelementos (hierro, manganeso, cobre y zinc) totales y potencialmente asimilables (extraíbles con DTPA). También se determinó la abundancia isotópica  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de los suelos del último año tratadas con 90 y 150  $\text{m}^3$

ha<sup>-1</sup> de purín y del suelo sin enmendar. Sobre estas mismas muestras se evaluaron algunas propiedades físicas de los suelos: agregados estables al agua, capacidad de campo, punto de marchitamiento y agua útil. Por último, se realizó la extracción y fraccionamiento de los ácidos húmicos y fúlvicos del suelo control, del purín de cerdo y de los suelos enmendados anualmente con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín con el fin de estudiar cambios en su composición (análisis elemental y de grupos funcionales), estructura molecular (espectroscopía infrarroja y de fluorescencia), características ácido-base (valoraciones potenciométricas) y capacidad para formar complejos con los iones cobre (II) y zinc (II) (espectroscopía de fluorescencia).

Con objeto de realizar un seguimiento de la evolución de microorganismos patógenos, indicadores de contaminación fecal, y de grupos indicadores de poblaciones microbiológicas del suelo, se llevó a cabo paralelamente un estudio en condiciones de campo y sin cultivo. En el área elegida, adyacente al experimento principal, se establecieron dos parcelas de 10 x 16 m<sup>2</sup>. Una de ellas recibió una única aplicación de 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín, mientras que la otra correspondió al tratamiento control, sin ningún tipo de enmienda.

La duración del experimento fue de un año, iniciándose en abril de 2003. La aplicación del purín se realizó con manguera desde una cisterna sobre surcos practicados en el suelo, con el fin de evitar la posible contaminación del terreno adyacente. Inmediatamente después el purín fue incorporado al suelo mediante dos labores con cultivador.

Las muestras de suelo se tomaron inmediatamente después de la incorporación del purín al suelo y posteriormente a los 1, 3, 6, 8, 14, 22, 28, 42, 56, 69, 99, 129, 156, 195, 244, 293, 328 y 367 días del comienzo del experimento. En ellas se analizaron coliformes fecales, estreptococos fecales, *Clostridium* sulfito-reductores y *Salmonella* spp.

### **III.3. MÉTODOS**

#### **III.3.1. ANÁLISIS DEL SUELO**

##### **III.3.1.1. Toma y preparación de muestras**

La toma de muestras de suelo se llevó a cabo después de recoger la cosecha de cada año con una sonda cilíndrica de tubo hueco de 3 cm de

diámetro, considerando los primeros 20 cm y tomando en cada parcela 20 submuestras al azar en zigzag. Inmediatamente después, se disgregaron los terrones de cada muestra con un rodillo de madera y se pasó por un tamiz de 2 mm, desechándose la fracción gruesa no disgregable.

Una parte de la muestra tamizada se conservó a 4°C para la determinación de nitrógeno inorgánico, microelementos potencialmente asimilables, materia orgánica hidrosoluble, propiedades biológicas y actividades enzimáticas; el resto se secó al aire y una parte de la misma se molió para obtener la fracción de granulometría más fina (<0.2 mm), con la que se analizaron los contenidos totales de carbono, nitrógeno, micronutrientes e isótopos estables  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ .

Para la extracción de sustancias húmicas se preparó una muestra compuesta, mezclando cantidades iguales de suelo seco y tamizada a 2 mm de las tres repeticiones correspondientes a los tratamientos control y los enmendados con 90 y 150  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$  de purín.

En el caso de las muestras de suelo tomadas para los análisis microbiológicos, se procuró mantener condiciones asépticas durante el proceso de toma y tratamiento de las muestras. Para ello, se limpió cuidadosamente la sonda con alcohol previamente a cada toma, se emplearon bolsas estériles para el transporte y almacenamiento de las muestras y se tamizaron en campana de flujo laminar. Todas las muestras se conservaron en nevera a 4°C y se procuraron analizar antes de 7 días desde la toma de muestra.

Todos los resultados se refieren a peso seco de suelo. El contenido de humedad se determinó por secado a 105°C empleando un analizador Sartorius MA 30.

#### **III.3.1.2. Propiedades físico-químicas**

##### **III.3.1.2.1. pH**

El pH del suelo se midió en una suspensión suelo/agua 1:2.5 mediante un electrodo de vidrio, siguiendo el procedimiento propuesto por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (1994).

Se pesaron 10 g de suelo y se añadieron 25 mL de agua destilada. Se sometió la suspensión a agitación durante 10 minutos y se dejó reposar durante 30. Seguidamente, se agitó de nuevo y se realizó la medida con un pH-metro con compensación automática de temperatura (CRISON micro pH 2001).



### III.3.1.2.2. Conductividad eléctrica

Se determinó en el extracto acuoso suelo/agua 1:5, mediante la medida con una célula de conductividad apropiada, refiriendo el resultado a 25°C (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1994).

Se agitó durante media hora una suspensión compuesta por 10 g de suelo y 50 mL de agua destilada. Después se centrifugó a 15300 g, se filtró y se midió la conductividad eléctrica en el extracto con un conductímetro con compensación automática de temperatura (CRISON micro CM 2201).

### III.3.1.2.3. Agregados estables al agua

Para la determinación del porcentaje de agregados estables al agua se empleó un aparato de tamizado en húmedo (Wet Sieving Apparatus Eijelkamp) siguiendo el método descrito por Nimmo y Perkins (2002).

La muestra de suelo (<2 mm) se pasó por un tamiz de 1 mm, obteniéndose la fracción comprendida entre 1 y 2 mm, de la que se pesaron 4 g y se colocaron en un tamiz de 250 µm. Se sumergió en agua subiendo y bajando con un recorrido vertical de 1.3 cm durante 3 minutos, aproximadamente 34 veces por minuto. Los agregados inestables destruidos se recogieron en un vaso con agua destilada dispuesto debajo del tamiz. Posteriormente, se colocó un vaso con 100 mL de una solución dispersante de hexametáfosfato sódico al 0.5% (p/v) y se continuó con el tamizado en húmedo el tiempo necesario hasta la destrucción de los agregados estables, quedando en el tamiz arena y restos vegetales. Los vasos con agregados inestables y estables se secaron en estufa a 105°C hasta pesada constante.

El porcentaje de agregados (>250 µm) estables al agua ( $AE_{H_2O}$ ) se calculó de acuerdo a la fórmula:

$$AE_{H_2O} (\%) = \frac{P_{AE}}{P_{AE} + P_{AI}} \times 100$$

donde  $P_{AE}$  es el peso (g) de los agregados estables y  $P_{AI}$  es el peso (g) de los agregados inestables. Para obtener  $P_{AE}$ , se restó la cantidad de hexametáfosfato que había en los vasos con solución dispersante (0.5 g) junto con el peso del suelo.

### III.3.1.2.4. Capacidad de retención hídrica.

La determinación de la capacidad de retención hídrica a diferentes presiones se realizó siguiendo el método de la membrana de Richards

(Richards, 1949; Dane y Hopmans, 2002), que consiste en la determinación de la cantidad de agua que retiene el suelo saturado sometido a una presión de succión dada.

La muestra de suelo, previamente saturada en agua, se dispuso en anillos cilíndricos de 0.5 cm de altura y se colocó sobre una membrana porosa dentro de la cámara de succión. Se sometió a una presión de succión de 1/3 de atmósfera hasta alcanzar el equilibrio (24 horas), tras lo cual se determinó la humedad de la muestra a 105°C. Se procedió de igual modo sometiendo la muestra saturada a una presión de 15 atm.

#### **III.3.1.3. Contenido de nitrógeno**

##### **III.3.1.3.1. Nitrógeno total**

La concentración de nitrógeno total se determinó siguiendo el método Kjeldahl, consistente en la digestión de la muestra con ácido sulfúrico concentrado. El nitrógeno orgánico se mineraliza, pasando a forma amoniacal, que junto con el amonio ya existente en el suelo se valora por colorimetría (Hinds y Lowe, 1980).

En un matraz se trató 1 g de suelo con 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y 0.5 mL de catalizador y se sometió a digestión durante dos horas a 420°C. Una vez enfriado el matraz, se añadió agua destilada hasta 50 mL. Posteriormente, se tomó una alícuota que se mezcló con una disolución complejante de hierro (20 g de hidróxido sódico, 50 g de citrato sódico y 150 g de tartrato sódico por litro) y con disoluciones de fenato de sodio (89 g de fenol y 60 g de hidróxido sódico por litro), hipoclorito de sodio (8% p/p de cloro activo por litro) y de nitroprusiato de sodio (2 g L<sup>-1</sup>). A continuación, la disolución problema se arrastró mediante flujo constante, calentada a 38°C, y se midió por espectrofotometría a 660 nm, utilizando para ello un autoanalizador Technicon AAI.

##### **III.3.1.3.2. Nitrógeno inorgánico**

El nitrógeno mineral, tanto el de solución como el de cambio, se analizó mediante el método de extracción con cloruro de potasio de Keeney y Nelson (1982).

Los extractos se prepararon a partir de 3 g de suelo y 30 mL de cloruro potásico 2 M, tras agitación mecánica durante 1 hora. Después se centrifugaron y se filtraron. La concentración de nitrato se midió por espectrofotometría a 520 nm utilizando un autoanalizador Technicon AAI y la de amonio de la misma forma que el total (apartado III.3.1.3.1.). Las

rectas de calibrado se prepararon con nitrato potásico y sulfato amónico en cloruro potásico.

#### **III.3.1.4. Macroelementos asimilables**

El fósforo asimilable se determinó según el método de Burriel y Hernando (1950).

A 1 g de suelo se le añadieron 100 mL de una solución extractante compuesta por 1 g de carbonato cálcico, 0.88 g de carbonato magnésico, 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y 24.5 mL de ácido acético al 98% diluyéndolo en 10 L de agua destilada y ajustando el pH entre 3.2 y 3.3. Tras agitar durante cinco minutos, la solución se filtró y se determinó el fósforo por colorimetría en un autoanalizador Technicon AAII.

Los macroelementos calcio, magnesio, sodio y potasio se determinaron en los extractos de suelo con acetato amónico 1 M (relación suelo:agua 1:10) a pH 7. Se agitó la mezcla durante 10 minutos, se dejó reposar y se filtró. El potasio, calcio y sodio se midieron por fotometría de llama (Eppendorf Elex 6361), y el magnesio mediante espectrofotometría de emisión de plasma (Perkin Elmer ICP/5500).

#### **III.3.1.5. Microelementos**

##### **III.3.1.5.1. Microelementos totales**

Los contenidos totales de hierro, manganeso, zinc y cobre en el suelo se determinaron mediante digestión de la muestra de suelo con una solución ácido nítrico-perclórica. Para ello, se pesaron 0.5 g de suelo y se añadieron 12 mL de ácido nítrico concentrado. A continuación, se calentó la mezcla a 180°C en digestor durante dos horas. Después de dejar enfriar, se trasvasó a un erlenmeyer y se evaporó hasta 1 mL en baño de arena. Posteriormente, se añadieron 5 mL de ácido perclórico concentrado y se dejó evaporar a sequedad en el mismo baño de arena. El residuo se diluyó con agua destilada y se filtró con papel lavado a los ácidos, aforándose a 50 mL. Seguidamente, se realizó la medida con un espectrofotómetro de emisión de plasma Perkin Elmer ICP/5500.

##### **III.3.1.5.2. Microelementos potencialmente asimilables**

Se siguió el procedimiento propuesto por Lindsay y Norwell (1978) de extracción con ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA). Para ello se prepararon los extractos con 10 g de suelo y 30 mL de una solución de DTPA ajustada a pH 7.3 (DTPA 0.005 M, cloruro cálcico 0.01 M y

trietanolamina 0.1 M). Se sometieron a agitación durante dos horas, se centrifugaron a 15300 g y se filtraron. El análisis de microelementos se realizó mediante espectrometría de emisión de plasma con un Perkin Elmer ICP/5500.

### **III.3.1.6. Contenido de materia orgánica**

#### **III.3.1.6.1. Carbono orgánico total**

La determinación de carbono orgánico oxidable se llevó a cabo según el método de oxidación con dicromato potásico por vía húmeda (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1994).

En un erlenmeyer de 500 mL, se mezclaron 1 g de suelo, 10 mL de dicromato potásico 0.17 M y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado, agitando después de cada adición para asegurar una buena mezcla. Transcurridos 30 minutos se añadieron 200 mL de agua destilada y 10 mL de ácido fosfórico concentrado. Una vez enfriada la mezcla a temperatura ambiente, se valoró el exceso de dicromato con sulfato ferroso amónico 0.5 M (sal de Mohr), empleándose ortofenantrolina como indicador (viraje verde a rojo-pardo). Al mismo tiempo, se valoraron blancos sin suelo. El contenido de carbono orgánico total (COT) se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{COT (g kg}^{-1}\text{)} = \frac{(V_b - V_m) \times M \times 3.87}{P}$$

donde  $V_b$  y  $V_m$  es el volumen de sal de Mohr (mL) gastado en la valoración del blanco y de la muestra, respectivamente,  $M$  es la molaridad de la sal de Mohr y  $P$  es el peso de la muestra (g).

#### **III.3.1.6.2. Carbono de las sustancias húmicas**

El extracto húmico total se obtuvo agitando durante 4 horas las muestras de suelo con pirofosfato sódico 0.1 M a pH 9.8 en la proporción suelo/extractante 1:10, centrifugando a 15300 g durante 15 minutos y filtrando.

El carbono orgánico en el extracto se determinó por colorimetría siguiendo el método de Sims y Haby (1971). Para ello se disolvieron 98 mg de dicromato potásico en 4 mL del extracto. Después de agitar, se añadieron 4 mL de ácido sulfúrico concentrado, se colocó el tubo de ensayo durante 15 minutos en un bloque digestor a 150°C y se dejó en reposo durante 12 horas. Posteriormente se añadieron 2 mL de agua destilada, se agitó y se leyó la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro Shimadzu

UV-1603 frente a una curva patrón realizada con glucosa.

#### • **Carbono de los ácidos húmicos y fúlvicos**

Su determinación se realizó sobre una alícuota del extracto húmico total, que se llevó hasta pH 1 con ácido sulfúrico concentrado. Después se mantuvo en nevera durante 24 horas para que precipitaran los ácidos húmicos y se centrifugó a 30100 g durante 15 minutos. El contenido de carbono en el sobrenadante (carbono de ácidos fúlvicos) se determinó por colorimetría, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior.

El contenido de carbono de los ácidos húmicos en el suelo se calculó por diferencia entre la concentración de carbono del extracto total (carbono de las sustancias húmicas) y la del extracto después de acidificarlo (carbono de los ácidos fúlvicos).

#### **III.3.1.6.3. Materia orgánica hidrosoluble**

La extracción de la materia orgánica hidrosoluble del suelo se realizó con agua destilada en relación 1:10, a partir de 3 g de suelo. Después de dos horas de agitación en un baño a 50°C, se centrifugó a 15300 g durante 15 minutos y se filtró. En el extracto acuoso se determinaron el carbono, los carbohidratos, los compuestos fenólicos y las proteínas, siguiendo los métodos descritos a continuación.

#### • **Carbono hidrosoluble**

Se determinó según el procedimiento de oxidación con dicromato potásico en medio ácido descrito en el apartado III.3.1.6.2., a partir de 4 mL del extracto hidrosoluble.

#### • **Carbohidratos solubles**

Los carbohidratos en el extracto acuoso se determinaron por el método de la antrona (Brink et al., 1960), basado en que las hexosas se convierten en derivados de hidroximetilfurfural por acción del ácido sulfúrico, los cuales forman posteriormente complejos de color verde con la antrona.

Una alícuota de 1 mL del extracto acuoso se trató con 4 mL de antrona (0.2% en ácido sulfúrico concentrado), agitando y calentando en un baño de agua a 80°C durante 10 minutos. A continuación, se leyó la absorbancia del extracto frío a 630 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603. Paralelamente, se realizó una curva patrón utilizando tartrato de glucosa.

### • **Compuestos fenólicos**

Se determinaron según el método del reactivo de Folin modificado (Kuwatsuka y Shindo, 1973).

A 0.5 mL del extracto acuoso se añadieron 3.5 mL de carbonato de sodio al 3.7% y 0.5 mL de sulfato cúprico 5-hidrato al 0.06%. Tras agitar se mantuvo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 0.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu diluido 1:4 con agua destilada y se agitó. Después, se dejó reposar 15 minutos y se midió la absorbancia a 578 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603. La curva patrón se realizó con ácido p-cumárico.

### • **Proteínas hidrosolubles**

Se empleó el método del reactivo de Folin-Ciocalteu descrito por Lowry et al. (1951) y modificado por Rad (1992).

En un tubo de ensayo se mezclaron 0.5 mL del extracto acuoso y 2 mL de disolución alcalina de cobre (50 mL de carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1 M y 2 mL de sulfato cúprico al 0.5% en tartrato de sodio y potasio al 1%). Tras agitar y dejar reposar durante 10 minutos, se añadieron 0.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu previamente diluido con agua destilada (2:5). Seguidamente se volvió a agitar y se mantuvo 30 minutos en reposo. Finalmente, se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603, frente a una curva patrón preparada con albúmina.

## **III.3.1.7. Caracterización de las sustancias húmicas**

### **III.3.1.7.1. Extracción, fraccionamiento y purificación**

Las sustancias húmicas se obtuvieron mediante un procedimiento convencional (Schnitzer, 1982) basado en la extracción alcalina con pirofosfato sódico, acidificación, separación de ácidos húmicos y fúlvicos basándose en su diferente solubilidad a distintos valores de pH, eliminación de impurezas y liofilización.

La presencia de carbonatos en el suelo se eliminó por agitación mecánica de la muestra de suelo durante 30 minutos con ácido fosfórico 2 M, repitiendo tres veces este tratamiento. Después se lavaron las muestras de suelo con agua destilada hasta que la suspensión alcanzó pH 7. Seguidamente, se realizó una extracción con pirofosfato sódico 0.1 M (pH 9.8) en la proporción 1:10 (suelo/extractante) y posteriormente con hidróxido sódico 0.1 M, a temperatura ambiente. Cada extracción se repitió

tres veces, agitando mecánicamente durante 3 horas, centrifugado a 15300 g durante 15 minutos y filtrando el sobrenadante a través de un papel de filtro Wathman nº 31. Los extractos alcalinos se unieron y se acidificaron con ácido clorhídrico hasta pH 1, dejándolos en nevera durante 24 horas para permitir la precipitación completa de los ácidos húmicos, los cuales se separaron del sobrenadante (conteniendo los ácidos fúlvicos) mediante centrifugación a 30100 g durante 15 minutos.

Los ácidos húmicos obtenidos se purificaron disolviéndolos en hidróxido sódico 0.1 M, centrifugando a 30100 g y desechando el residuo. El sobrenadante se acidificó con ácido clorhídrico concentrado hasta pH 1. La suspensión se dejó en reposo durante 12 horas a temperatura ambiente y después se centrifugó a 30100 g durante 15 minutos. Los ácidos húmicos precipitados se lavaron con agua destilada, se dializaron y finalmente se liofilizaron.

La purificación de los ácidos fúlvicos se llevó a cabo pasando el filtrado ácido a través de una columna de resina XAD-8. Los ácidos fúlvicos fijados por adsorción se recuperaron eluyendo con hidróxido sódico 0.1 M, se eliminaron los cationes haciéndolo pasar por una resina de intercambio iónico Amberlyst 15 y finalmente se liofilizaron.

#### **III.3.1.7.2. Materia seca y cenizas**

Los contenidos de humedad y cenizas de los ácidos húmicos y fúlvicos liofilizados se midieron, respectivamente, por secado a 105°C y por combustión a 550°C, hasta pesada constante.

#### **III.3.1.7.3. Análisis elemental**

Los contenidos de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre se determinaron empleando un analizador elemental Fisons Instruments EA 1108. Cada muestra de sustancia húmica se analizó por triplicado. La concentración de oxígeno se calculó por diferencia:

$$O\% = 100 - (C + H + N + S)\%$$

#### **III.3.1.7.4. Relación E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub>**

La relación entre la absorbancia a 465 nm y 665 nm (relación E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub>) se determinó disolviendo 3 mg de cada sustancia húmica en 10 mL de hidrogenocarbonato sódico 0.05 M y ajustando el pH a 8.3 con hidróxido sódico 0.02 M. Las absorbancias a 465 y a 665 nm se midieron empleando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 15 UV/Vis (Chen et al., 1977).

### **III.3.1.7.5. Análisis por espectroscopía infrarroja**

Los espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR) de las sustancias húmicas se registraron en el rango comprendido entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$ . La pastilla para el análisis se preparó mezclando 1 mg de sustancia húmica con 400 mg de bromuro potásico anhidro; se homogeneizaron y se molieron finamente, después la mezcla se sometió a vacío en una prensa durante 5 minutos y finalmente, a una presión de aproximadamente 1000  $\text{kg cm}^{-2}$  durante otros 5 minutos. Se empleó un espectrofotómetro FT-IR Nicolet 5 PC, con una resolución de 2  $\text{cm}^{-1}$ , para la obtención de los espectros y el programa Omnic versión 1.2 para su procesamiento.

### **III.3.1.7.6. Propiedades ácido-base**

Las características ácido-base de los ácidos húmicos y fúlvicos se determinaron mediante valoraciones potenciométricas a diferentes fuerzas iónicas (Milne et al., 1995; Kinniburgh et al., 1999).

Se disolvieron 25 mg de sustancia húmica en 50 mL de agua destilada, se añadió hidróxido potásico para ajustar a pH 10.2 y se agitó durante una hora en atmósfera de nitrógeno. Para eliminar efectos de histéresis, se realizaron dos valoraciones con ácido nítrico 0.05 M hasta pH 3.3 seguidas cada una de otra valoración con hidróxido potásico 0.05 M hasta pH 10.2. Después se llevaron a cabo cuatro valoraciones más con ácido y con base, ajustando la fuerza iónica a 0.01, 0.05, 0.1 y 0.3 M con nitrato potásico.

Todas las valoraciones se realizaron a 25°C, con agitación constante y en atmósfera de nitrógeno, añadiendo alícuotas de entre 0.002 y 0.05 mL de la disolución valorante, con objeto de que la variación del potencial del electrodo fuera menor de 10 mV. Se registraron el volumen añadido de ácido o base y el pH, cuando la lectura del mismo fuera estable durante 30s con una desviación inferior a  $\pm 0.02$  mV. Las valoraciones potenciométricas se realizaron con un titulador automático Mettler DL 77 equipado con un electrodo de vidrio Mettler DG-111-SC, que se calibró adecuadamente antes de cada titulación, y con una bureta automática para la adición de reactivo y capaz de controlar la evolución de todos los parámetros durante la valoración. Las valoraciones con ácido y con base dieron resultados idénticos, por lo que sólo se han considerado las titulaciones con hidróxido potásico. No se tuvieron en cuenta en los cálculos los datos de las valoraciones a  $\text{pH} < 3.5$  o  $\text{pH} > 10$ .

Se calcularon la fuerza iónica y la concentración de protones en cada punto de la valoración, mediante un procedimiento iterativo a partir de la concentración del electrolito de fondo y el pH. Con la fuerza iónica calculada, se determinaron los coeficientes de actividad usando la ecuación



de Davies (Davies, 1962). La carga relativa neta de la sustancia húmica a un pH y fuerza iónica dados se calculó como la diferencia entre la cantidad de base añadida en cada punto de la titulación de la disolución problema y la cantidad de base que teóricamente se necesitaría añadir a una disolución blanco (sólo con el electrolito de fondo) para alcanzar ese pH.

### • Análisis de grupos funcionales ácidos

Una vez calculada la carga en función del pH, el contenido de grupos carboxílicos se estimó como el valor de carga a pH 8 y fuerza iónica 0.1 M y el de grupos hidroxilo fenólicos como dos veces la diferencia de cargas a pH 8 y 10 (Ritchie y Perdue, 2003). La acidez total se determinó como suma de ambos parámetros.

### • Modelo NICA-Donnan

En el modelo Donnan se considera que las sustancias húmicas forman una fase de tipo gel eléctricamente neutra, en la que se define un volumen a través del cual hay un potencial electrostático uniforme, conocido como el potencial de Donnan ( $\psi_D$ ). La condición de electroneutralidad en la fase gel viene dada por:

$$\frac{q}{V_D} + \sum z_i(c_{D,i} - c_i) = 0$$

donde  $q$  es la carga neta de la sustancia húmica en  $\text{mol kg}^{-1}$ ,  $V_D$  es el volumen de Donnan o el volumen específico de electrolito en la fase gel en  $\text{L kg}^{-1}$ ,  $z_i$  es la carga del ion  $i$  (incluyendo el signo),  $c_{D,i}$  es la concentración molar del ion  $i$  en la fase gel, y  $c_i$  en la concentración molar del ion  $i$  en la disolución. De acuerdo con la distribución de Boltzmann,  $c_{D,i}$  y  $c_i$  pueden relacionarse según:

$$c_{D,i} = c_i \exp\left(\frac{-z_i F \psi_D}{RT}\right)$$

donde  $F$  es la constante de Faraday en  $\text{C mol}^{-1}$ ,  $\psi_D$  es el potencial de Donnan en voltios,  $R$  es la constante universal de los gases en  $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ , y  $T$  es la temperatura absoluta en K. El modelo de Donnan requiere que  $V_D$  sea conocido en un rango completo de condiciones de la disolución. Según Benedetti et al. (1996a),  $V_D$  disminuye al aumentar la fuerza iónica de la disolución siguiendo la relación empírica:

$$\log V_D = b(1 - \log I) - 1$$

donde  $I$  es la fuerza iónica y  $b$  es un parámetro empírico que describe como varía  $V_D$  con la fuerza iónica.

Si se asume una distribución continua de puntos de enlace, la fracción de sitios ocupados por la especie  $i$  ( $\theta_i$ ) viene dada por la siguiente ecuación integral:

$$\theta_i = \int_{\Delta \log K_i} \theta_{i,l} f(\log K_i) d(\log K_i)$$

donde  $\theta_{i,l}$  es la isoterma de adsorción local, que describe la unión de  $i$  a un grupo de puntos idénticos,  $f(\log K_i)$  es la función de distribución de la constante de afinidad  $K_i$ , y  $\Delta \log K_i$  es el rango de posibles valores de  $\log K_i$ . En un sistema multicomponente, el empleo de la ecuación extendida de Hill como isoterma local, en combinación con la función de distribución de Sips (cuasi-gausiana), conduce a la ecuación básica NICA para el enlace de iones  $i$  en situación competitiva (Koopal et al., 1994; Benedetti et al., 1995; Benedetti et al., 1996a; Kinniburgh et al., 1996; Koopal et al., 2001):

$$\theta_i = \frac{(\tilde{K}_{i,c_{D,i}})^{n_i}}{\sum_j (\tilde{K}_{j,c_{D,j}})^{n_j}} \times \frac{\left[ \sum_j (\tilde{K}_{j,c_{D,j}})^{n_j} \right]^p}{1 + \left[ \sum_j (\tilde{K}_{j,c_{D,j}})^{n_j} \right]^p}$$

donde  $\tilde{K}_i$  representa el valor de la mediana de la constante de afinidad para el componente  $i$ ,  $p$  es la amplitud de la distribución de afinidad, que refleja la heterogeneidad química intrínseca de las sustancias húmicas, y  $n_i$  representa la estequiometría de la reacción de formación del enlace.

La cantidad de ion  $i$  enlazada,  $Q_i$ , viene dada por:

$$Q_i = \theta_i n_i Q_{\max}$$

donde  $Q_{\max}$  es la densidad global de puntos de unión, y el factor de estequiometría  $n_i$  refleja el número de iones enlazados a cada punto. Cuando el ion de referencia es el protón, la densidad global de sitios se convierte en la del protón y la cantidad de iones  $i$  unidos debería corregirse por  $n_i/n_H$ :

$$Q_i = \theta_i \left( \frac{n_i}{n_H} \right) Q_{\max,H}$$

Las distribuciones de afinidad protónica derivadas de las valoraciones ácido-base de las sustancias húmicas exhiben típicamente dos picos anchos,

indicando que hay dos grupos mayoritarios de puntos de enlace que pueden identificarse como sitios de baja y de alta afinidad (De Wit et al., 1993; Milne et al., 1995; Fiol et al., 1999). El modelo NICA puede extenderse a una distribución bimodal de afinidades protónicas:

$$Q_i = \theta_{i,1} \left( \frac{n_{i,1}}{n_{H,1}} \right) Q_{\max,1} + \theta_{i,2} \left( \frac{n_{i,2}}{n_{H,2}} \right) Q_{\max,2}$$

donde los sufijos 1 y 2 denotan los dos tipos de puntos de unión. Así, para la protonación de las sustancias húmicas en ausencia de otro tipo de cationes, la cantidad de protones unidos,  $Q_H$ , viene dada por:

$$Q_H = Q_{\max,1} \frac{(\tilde{K}_{H,1} c_{D,H})^{m_1}}{1 + (\tilde{K}_{H,1} c_{D,H})^{m_1}} + Q_{\max,2} \frac{(\tilde{K}_{H,2} c_{D,H})^{m_2}}{1 + (\tilde{K}_{H,2} c_{D,H})^{m_2}}$$

donde  $m_1$  y  $m_2$  definen la amplitud de las distribuciones de afinidad protónica ( $m_j = n_{H,j} \times p_j$ ;  $j=1, 2$ ) (Kinniburgh et al., 1996). La cantidad total de protones unidos,  $Q_{H,t}$ , es igual a la suma de protones específicamente enlazados y la cantidad de protones unidos electrostáticamente en la fase de Donnan:

$$Q_{H,t} = Q_H + V_D (c_{D,H} - c_H)$$

La carga relativa neta de la sustancia húmica a una concentración de protones y fuerza iónica dadas es equivalente a la cantidad relativa de protones enlazados a la sustancia húmica ( $\Delta Q_H$ ). Con el fin de obtener la cantidad absoluta de protones unidos, se sumó la cantidad inicial de protones unidos ( $Q_{H0}$ ) para cada punto de la curva de valoración:

$$Q_{H,t} = \Delta Q_H + Q_{H0}$$

Una vez obtenidos  $\Delta Q_H$ , la concentración de protones libres y la fuerza iónica en cada punto de la valoración, se obtuvo el conjunto óptimo de parámetros del modelo NICA-Donnan (es decir,  $Q_{\max,1}$ ,  $Q_{\max,2}$ ,  $\tilde{K}_{H,1}$ ,  $\tilde{K}_{H,2}$ ,  $m_1$  y  $m_2$ ) de cada muestra de sustancia húmica mediante cálculos iterativos, variando los parámetros ajustables, hasta minimizar la suma de los cuadrados de las diferencias entre valores observados y calculados de  $\Delta Q_H$ . Para ello se empleó un algoritmo híbrido basado en la aproximación de Marquadt-Levenberg, usando el programa FIT 2.5 (Kinniburgh, 1993).

### **III.3.1.7.7. Análisis por espectroscopía de fluorescencia.**

Los espectros de fluorescencia en los modos de emisión y de excitación de las muestras de sustancias húmicas se obtuvieron siguiendo el procedimiento descrito por Senesi et al., (1991). La afinidad de los ácidos húmicos y fúlvicos por el ion cobre(II) y el ion zinc(II) se estudió mediante la valoración de la sustancia húmica con una disolución del ion metálico correspondiente seguida del análisis por fluorescencia (Ryan y Weber, 1982; Senesi, 1992).

Para obtener la suspensión sobre la que se realizaron los análisis, se disolvieron 5 mg de sustancia húmica en 100 mL de hidróxido potásico 1 M. Se agitó durante 30 minutos bajo atmósfera de nitrógeno y después se añadieron 100 mL de ácido nítrico 1 M. Posteriormente, la solución se llevó a un volumen de 950 mL con agua destilada, se ajustó a pH 6 con hidróxido potásico 0.1 M y finalmente se enrasó a 1 L con agua destilada. Posteriormente, se valoraron alícuotas de 100 mL de la disolución de sustancia húmica con una disolución de nitrato de cobre(II) 0.01 M o nitrato de zinc(II) 0.01 M. Para ello se empleó un valorador automático Mettler DL77, equipado con dos buretas automáticas. Todos las valoraciones se llevaron a cabo en atmósfera de nitrógeno, a una velocidad constante de agitación y en un vaso termostatzado a 25°C. Durante la valoración, se dispensaron automáticamente el valorante (disolución de ion metálico) y una solución de hidróxido potásico 0.1 M con objeto de mantener el pH constante. Después de cada adición de valorante, se hizo circular la solución del vaso durante 15 minutos, mediante una bomba peristáltica, a través de una cubeta de flujo de cuarzo para el análisis del espectro de fluorescencia.

Los espectros de fluorescencia tridimensionales de excitación-emisión (EEM) se obtuvieron con un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS-55 equipado con el programa WinLab 4.00.02 para el procesamiento de los datos. Los espectros de emisión se registraron en el rango comprendido entre 350 y 550 nm, con una velocidad de barrido de 500 nm min<sup>-1</sup> para el monocromador de emisión, mientras que la longitud de onda de excitación se incrementaba secuencialmente a intervalos de 5 nm desde 300 a 500 nm. Los gráficos EEM se generaron a partir de los espectros de fluorescencia empleando el programa Surfer 8.01.

#### **• Modelo de Ryan y Weber**

La capacidad de las sustancias húmicas para formar complejos con el cobre(II) y el zinc(II) y sus constantes de estabilidad se determinaron mediante el modelo propuesto por Ryan y Weber (1982). En este modelo se supone que la unión del catión ocurre en puntos de enlace idénticos e independientes, y que sólo se forman complejos metal-ligando de tipo 1:1. La formación del complejo ML por unión de un ion metálico M a un ligando

orgánico L, a pH y fuerza iónica constantes, puede describirse mediante la constante condicional de estabilidad K:

$$K = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad [1]$$

donde [M] representa la concentración molar de ion M libre, [L] es la concentración molar de todas las formas del ligando que no están enlazadas a M, y [ML] es la concentración molar del complejo ML.

Las ecuaciones del balance de masas para el metal y el ligando son:

$$C_M = [M] + [L] \quad [2]$$

$$C_L = [L] + [ML] \quad [3]$$

donde  $C_M$  y  $C_L$  son las concentraciones estequiométricas del ion metálico y del ligando, respectivamente. La capacidad complejante (CC), es decir, la cantidad de puntos de enlace activos por unidad de masa de sustancia húmica, se relaciona con  $C_L$  según:

$$CC = \frac{C_L}{(HS)_{total}} \quad [4]$$

siendo  $(HS)_{total}$  la concentración total de sustancia húmica.

Las ecuaciones [1] y [3] pueden combinarse para obtener la fracción de ligando complejado ( $v$ ), en función de la constante de estabilidad y la concentración de ion metálico libre:

$$v = \frac{[ML]}{C_L} = \frac{K[M]}{1 + K[M]} \quad [5]$$

Si se combina con la ecuación [2], la ecuación [5] toma la forma:

$$v = \frac{K(C_M - vC_L)}{1 + K(C_M - vC_L)} \quad [6]$$

Esta ecuación puede resolverse para un valor de  $v$  dado:

$$v = \left( \frac{1}{2KC_L} \right) \left( 1 + KC_L + KC_M - \sqrt{(1 + KC_L + KC_M)^2 - 4K^2C_LC_M} \right) \quad [7]$$

Según Ryan y Weber (1982), la intensidad de fluorescencia ( $I$ ) varía linealmente con la fracción del ligando total que está formando un complejo, de acuerdo con la siguiente relación:

$$v = \frac{I_0 - I}{I_0 - I_{ML}} \quad [8]$$

donde  $I_0$  es la intensidad de fluorescencia al inicio de la valoración, es decir, la intensidad de fluorescencia de la sustancia húmica libre de metal, y  $I_{ML}$  es el valor límite de intensidad de fluorescencia del complejo saturado del metal, esto es, el valor de intensidad de fluorescencia bajo el cual la intensidad no disminuye por efecto de la adición de metal.

Después de combinar las ecuaciones [7] y [8] y de reorganizar términos, queda la siguiente ecuación:

$$I = I_0 + (I_{ML} - I_0) \left( \frac{1}{2KC_L} \right) \times (1 + KC_L) + KC_M - \sqrt{(1 + KC_L + KC_M)^2 - 4K^2C_LC_M} \quad [9]$$

La ecuación [9] se puede resolver mediante regresión no lineal para  $K$ ,  $C_L$  e  $I_{ML}$ , introduciendo los valores de intensidad de fluorescencia obtenidos experimentalmente a diferentes valores de concentración total de ion metálico (Plaza et al., 2005b).

### III.3.1.8. Abundancia de isótopos estables $\delta^{13}C$ y $\delta^{15}N$

La abundancia isotópica representa la medida de las razones isotópicas de un elemento en un determinado compuesto. Los diferentes isótopos de dicho elemento son separados basándose en sus diferentes masas mediante un campo magnético en un espectrómetro de masas. En este caso, las muestras se analizaron mediante sistemas de flujo continuo, con un cromatógrafo de gases conectado al espectrómetro de masas (Barrie et al., 1995; Hoefs, 1997).

Previamente al análisis, la presencia de carbonatos en el suelo se eliminó por agitación mecánica durante 30 minutos con ácido fosfórico 2 M (Midwood y Boutton, 1998). Después el suelo se sometió a combustión a 1020°C con aporte de oxígeno externo, obteniéndose una mezcla de óxidos de carbono y nitrógeno. Ambos se redujeron después a 650°C, de manera que se produjo una mezcla de  $CO_2$ ,  $N_2$  y  $H_2O$ . Posteriormente, el agua se eliminó por vía química (trampa de Cromosorb), y el  $CO_2$  y el  $N_2$  se separaron mediante una columna cromatográfica para que al penetrar en el espectrómetro de masas no interfirieran entre sí. El proceso completo de

combustión, reducción, eliminación de agua y separación cromatográfica se realizó en un analizador elemental Carlo Erba NA1500. El N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> obtenidos se introdujeron en un espectrómetro de masas Finnigan MAT 251 para su análisis isotópico.

La abundancia de <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N se expresó en unidades relativas δ (‰), según la ecuación:

$$\delta (\text{‰}) = \frac{R_{\text{muestra}} - R_{\text{estándar}}}{R_{\text{estándar}}} \times 1000$$

donde  $R_{\text{muestra}}$  es la relación molar entre el isótopo pesado y el ligero (<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N o <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C) en la muestra y  $R_{\text{estándar}}$  en el material empleado como referencia, Pee Dee Belemnite (V-PDB) para el enriquecimiento de <sup>13</sup>C y el N<sub>2</sub> atmosférico para el <sup>15</sup>N. El error de los análisis fue menor de 0.2 ‰ para las determinaciones de δ<sup>15</sup>N y δ<sup>13</sup>C.

### **III.3.1.9. Propiedades biológicas**

#### **III.3.1.9.1. Carbono de la biomasa microbiana**

Se utilizó el método de fumigación-extracción con cloroformo modificado por Gregorich et al. (1990).

Se prepararon una muestra y un control de cada suelo, pesando 5 g en tubos de 50 mL de capacidad, dejándolos destapados una noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se añadió sólo a la muestra 0.20 mL de cloroformo (libre de etanol). Seguidamente se añadieron 20 mL de sulfato potásico 0.5 M tanto a la muestra como al control. Se agitaron ambas suspensiones por volteo durante 30 minutos, se centrifugaron a 2000 g y se filtraron. En los extractos de las muestras se hizo burbujear aire exento de dióxido de carbono durante 30 segundos para desplazar el cloroformo. El contenido de carbono de cada uno de los extractos obtenidos se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el apartado III.3.1.6.2.

El contenido de carbono de la biomasa microbiana de la muestra se calculó siguiendo la relación descrita por Vance et al. (1987), multiplicando la concentración de carbono en el extracto por un factor de proporcionalidad de 2.64.

#### **III.3.1.9.2. Respiración basal**

La respiración basal se consideró como el dióxido de carbono desprendido por gramo de suelo y día, durante su incubación en un sistema

cerrado durante 14 días en condiciones controladas de humedad y temperatura (Hernández y García, 2003).

Se incubaron 50 g de suelo humedecidos al 60% (p/p) de su capacidad de retención hídrica en un frasco de 250 mL con cierre hermético, a una temperatura controlada de 28°C, conteniendo un vial con 15 mL de hidróxido sódico 0.25 M. Los viales se repusieron diariamente durante los cinco primeros días, y cada dos o tres días los siguientes hasta completar dos semanas. Como blancos se utilizaron frascos que contenían únicamente el vial con los 15 mL de hidróxido sódico.

El dióxido de carbono desprendido se determinó valorando el exceso de hidróxido de sodio con ácido clorhídrico 0.2 M, previa precipitación de los carbonatos formados con 3 mL de cloruro de bario dihidrato al 20% (p/v), y utilizando timolftaleína como indicador (viraje azul a blanco).

El carbono desprendido como dióxido de carbono (C-CO<sub>2</sub>) recogido en cada vial se calculó mediante la fórmula:

$$\text{mg C - CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ suelo} = \frac{2.4 \times (V_B - V_M)}{P}$$

donde V<sub>B</sub> y V<sub>M</sub> son los mL de ácido clorhídrico gastados en la valoración del blanco y de la muestra, respectivamente, y P es el peso seco del suelo (g). Los resultados se expresaron en µg C-CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

### **III.3.1.10. Actividades enzimáticas**

#### **III.3.1.10.1. Actividad deshidrogenasa (EC 1.1.1.)**

Se determinó mediante el método de García et al. (1993), basado en la incubación del suelo en presencia del sustrato cloruro de 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolio (INT) como aceptor de electrones (en ausencia de tampón) seguida de la determinación colorimétrica del iodo-nitrotetrazolio formazano (INTF) formado.

A 1 g de suelo se añadieron 0.4 mL de agua destilada y 0.2 mL de INT 0.4% (p/v). Por cada muestra de suelo se preparó un control sin adición de INT, en el que a 1 g del suelo se le añadieron 0.6 mL de agua. A continuación, se incubó en oscuridad a 20°C durante 20 horas. Se añadieron 10 mL de metanol y se agitó enérgicamente durante 1 minuto, filtrando a continuación. La absorbancia del extracto se leyó a 490 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603, frente a una recta patrón preparada con INTF. Los resultados se expresaron en µg INTF g<sup>-1</sup>.



### **III.3.1.10.2. Actividad catalasa (EC 1.11.1.6.)**

Se utilizó el método propuesto por Rodríguez-Kábana y Truelove (1982), que se basa en el desprendimiento de oxígeno al añadir peróxido de hidrógeno al suelo, valorando posteriormente con permanganato potásico la cantidad de peróxido en exceso que no ha sido degradado por la actividad catalasa.

Por cada suelo se prepararon una muestra y un control, pesando 0.5 g de suelo y añadiendo 40 mL de agua destilada. Se agitaron por volteo durante 30 minutos y a continuación, se añadieron 5 mL de peróxido de hidrógeno (diluido 1:100) a la muestra y 5 mL de agua destilada al control. Seguidamente, se agitaron ambas suspensiones durante 10 minutos e inmediatamente después se les adicionaron 5 mL de ácido sulfúrico 1.5 M. Después de filtrar, se tomó una alícuota de 25 mL que se valoró con permanganato potásico 0.01 M. Paralelamente, se procedió de igual forma con un blanco sin muestra de suelo, pero con peróxido de hidrógeno. El desprendimiento de oxígeno se calculó a partir de la diferencia entre el permanganato gastado por el blanco y el gastado por la muestra, corregido por el empleado por el control. La actividad catalasa se expresó en  $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

### **III.3.1.10.3. Actividad ureasa (EC 3.5.1.5.)**

Para la determinación de la actividad ureasa se siguió el método de Nannipieri et al. (1980), basado en la medida del amonio producido por la descomposición del sustrato urea adicionado.

A 0.5 g de suelo se le añadieron 2 mL de tampón fosfato 0.1 M (pH 7) y 0.5 mL de disolución de urea 6.4% (p/v). Paralelamente se preparó un control sin adición de urea. Se incubaron en un baño de agua a 30°C con agitación durante 90 minutos. Después se llevó a un volumen de 10 mL con agua destilada y se centrifugó a 2000 g durante 10 minutos. El amonio producido se midió según el método colorimétrico de Crooke y Simpson (1971) a 660 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

### **III.3.1.10.4. Actividad proteasa-BAA (EC 3.4)**

La determinación de la actividad proteasa hidrolizante de la N-a-benzoil-L-arginamida (BAA) es análoga a la de la actividad ureasa (Nannipieri et al., 1980).

A 0.5 g de suelo se le añadieron 2 mL de tampón fosfato 0.1 M (pH 7) y 0.5 mL de disolución de BAA 0.03 M. Paralelamente se preparó un control

sin adición de BAA. Se incubaron en un baño de agua a 40°C con agitación durante 90 minutos. Después se llevó a un volumen de 10 mL con agua destilada y se centrifugó a 2000 g durante 10 minutos. El amonio producido se midió según el método colorimétrico de Crooke y Simpson (1971) a 660 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

#### **III.3.1.10.5. Actividad fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2)**

Su determinación se basó en la incubación del suelo con p-nitrofenil fosfato (PNF) y posterior medición colorimétrica del p-nitrofenol (PNP) liberado, que en medio básico desarrolla color amarillo (Tabatabai, 1994).

A 0.5 g de suelo se le añadieron 2 mL de tampón maleato 0.1 M (pH 6.5) y 0.5 mL de PNF 0.115 M. La suspensión se incubó en agitación en un baño de agua a 30°C durante 90 minutos. Pasado este tiempo, se enfrió en frigorífico a 2°C durante 15 minutos para detener la reacción. Paralelamente, se preparó un control al que se le añadió el sustrato inmediatamente después de la incubación. Se añadieron 0.5 mL de cloruro cálcico 0.5 M y 2 mL de hidróxido sódico 0.5 M y se centrifugó durante 10 minutos a 2000 g. El extracto obtenido se diluyó adecuadamente y se midió la absorbancia a 398 nm frente a una curva patrón de PNP en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603. La actividad fosfatasa se expresó en  $\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

#### **III.3.1.10.6. Actividad $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21.)**

Se utilizó el método propuesto por Tabatabai (1994) basado en la evaluación colorimétrica del p-nitrofenol (PNP) liberado en presencia de p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (PNG) como sustrato, de forma análoga a la determinación descrita para la actividad fosfatasa.

A 0.5 g de suelo se le añadieron 2 mL de tampón maleato 0.1 M (pH 6.5) y 0.5 mL de PNG 0.05 M. La suspensión se incubó en agitación en un baño de agua a 30°C durante 90 minutos. Pasado este tiempo, se enfrió en frigorífico a 2°C durante 15 minutos para detener la reacción. Paralelamente, se preparó un control al que se le añadió el sustrato inmediatamente después de la incubación. Después se añadieron 0.5 mL de cloruro cálcico 0.5 M y 2 mL de hidróxido sódico 0.5 M y se centrifugó durante 10 minutos a 2000 g. El extracto obtenido se diluyó adecuadamente y se midió la absorbancia a 398 nm frente a una curva patrón con PNP en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603. La actividad  $\beta$ -glucosidasa se expresó en  $\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

### **III.3.1.11. Análisis de microorganismos patógenos**

La determinación del contenido de microorganismos patógenos en el suelo se ha realizado según métodos estándar (APHA/AWWA/WPFC, 1998).

#### **III.3.1.11.1. Preparación de suspensiones y medios de cultivo**

Se suspendieron 10 g de suelo en 100 mL de tampón fosfato 100 mM (pH 7.2) y se homogeneizaron durante 10 minutos en agitador rotativo. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones decimales seriadas; para ello, se tomaron 0.5 mL de cada suspensión y se añadieron a 4.5 mL de cloruro sódico al 0.9% (p/v), agitando previamente para asegurar una distribución homogénea de los microorganismos. Este procedimiento se repitió sucesivamente con cada dilución hasta llegar al grado de dilución que se consideró conveniente en función de la presencia esperada de microorganismos. Se extrajeron tres alícuotas de cada muestra de suelo y cada dilución se sembró por triplicado.

Todo el proceso se realizó en ambiente estéril (bajo llama de mechero o en cámara de flujo laminar). Las disoluciones y el material empleado se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Se utilizaron medios de cultivo comerciales específicos de cada uno de los grupos de microorganismos estudiados, preparados según las instrucciones indicadas por el fabricante. Las placas Petri con medio de cultivo se almacenaron en nevera a 4°C durante un máximo de 15 días desde su preparación.

#### **III.3.1.11.2. Siembra por filtración a través de membrana**

La técnica de filtración a través de membrana representa uno de los métodos más ampliamente aceptados para el análisis bacteriológicos de extractos acuosos, ya que posee un alto grado de reproducibilidad. Se hizo pasar una alícuota de 100 µL de la dilución apropiada a través de una membrana microporosa y estéril, compuesta de ésteres de celulosa con un tamaño de poro de 0.45 µm, empleando un dispositivo de filtración conectado a una bomba de vacío. Cada membrana con las bacterias retenidas en su superficie se incubó sobre un medio de cultivo selectivo y diferencial, a una determinada temperatura.

#### **III.3.1.11.3. Coliformes fecales**

El número de coliformes fecales se estimó mediante el método de filtración a través de membrana e incubación sobre medio agar m-FC (Merck) a 44°C durante 24 horas. Las colonias de coliformes fecales se

identifican por desarrollar color azul oscuro. También pueden aparecer colonias de color azul pálido a turquesa (algunas cepas de *Shigella*, *Yersinia*, *Salmonella*) o incoloras, que no se tuvieron en cuenta para el recuento.

#### **III.3.1.11.4. Estreptococos fecales**

Los estreptococos fecales se determinaron mediante filtración a través de membrana, incubando posteriormente sobre medio de Slannetz y Bartley (Merck) durante 48 horas a 44°C. Las colonias se reconocen por presentar color rosa o rojo oscuro.

#### **III.3.1.11.5. *Clostridium* sulfito-reductores**

Se cultivaron en condiciones de anaerobiosis tras filtración a través de membrana. Previamente a la filtración, se calentó la suspensión del suelo en un baño de agua a 80°C durante 15 minutos para eliminar las células vegetativas. Las placas sobre las que incubaron las membranas se prepararon fundiendo el medio de cultivo de agar sulfito de hierro (Scharlau) en el autoclave; después se vertió una fina capa sobre cada placa de Petri que se dejó solidificar. Sobre esta capa se colocó la membrana y se cubrió con más medio de cultivo fundido a 45-55°C, para tener condiciones de anaerobiosis. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C. Las colonias formadas a partir de esporas viables de *Clostridium* sulfito-reductores aparecen de color negro debido a la formación de sulfuro de hierro.

#### **III.3.1.11.6. *Salmonella* sp.**

Para determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* en los suelos, se mezclaron en una bolsa estéril 50 g de muestra de suelo con 100 mL de caldo de enriquecimiento de selenito (Merck), homogeneizándolo convenientemente. Después de 18-24 horas de incubación 37°C, se sembró una alícuota del caldo sobre medio BPLS (agar verde brillante-rojo de fenol-lactosa-sacarosa, Merck). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Si hay presencia de *Salmonella*, el medio pasa de color anaranjado a granate intenso, sobre el cual se ven las colonias. A veces también proliferan coliformes fecales q dan un color amarillo intenso.

#### **III.3.1.11.7. Expresión de resultados**

Los resultados se expresaron en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo de suelo, teniendo en cuenta el factor de dilución y la

humedad del suelo, y haciendo la media de los replicados que se hicieron por cada muestra de suelo.

$$\text{UFC g}^{-1}\text{suelo (m.s.)} = \frac{n^{\circ}\text{colonias} \times 10^4 \times \text{factor dilución}}{100 - \% \text{ humedad}}$$

### **III.3.2. ANÁLISIS DE LOS PURINES**

#### **III.3.2.1. Toma y preparación de muestras**

Las muestras de los purines tomaron en el momento de su aplicación al suelo, directamente de la cisterna empleada para ello.

Todas las muestras se conservaron en nevera a 4°C desde su recogida. Parte de las siete muestras de los purines empleados en el experimento de campo desde su inicio se liofilizaron y, mezclando cantidades iguales en peso, se compuso una muestra destinada a la extracción de los ácidos húmicos y fúlvicos.

#### **III.3.2.2. Materia seca y cenizas**

El contenido en materia seca se determinó por secado a 105°C en estufa y el de cenizas se analizó por calcinación a 550°C de la muestra seca hasta pesada constante (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1994).

#### **III.3.2.3. Demanda química de oxígeno**

La demanda química de oxígeno (DQO) representa el contenido de materia orgánica susceptible de oxidarse por acción de un oxidante químico enérgico en condiciones definidas. En el método empleado, la muestra se lleva a ebullición en presencia de una cantidad conocida de dicromato potásico y de un catalizador de plata en medio fuertemente ácido. Tras la digestión, el dicromato en exceso se valora con sulfato ferroso amónico. La DQO se calcula a partir del cromato consumido y se expresa en términos de oxígeno equivalente (APHA/AWWA/WPFC, 1998).

Se tomaron 5 mL de purín que se diluyó convenientemente. A continuación, se añadieron 25 mL de solución digestora (2.4516 g de dicromato potásico, 10 g de sulfato de plata, 500 mL de ácido fosfórico y 500 mL de ácido sulfúrico concentrado) y 0.2 g de sulfato de mercurio(II). Posteriormente, se calentó hasta 165°C y, cuando alcanzó esta temperatura, se dejó enfriar. Una vez frío, se pasó a un erlenmeyer, arrastrando la muestra con agua destilada hasta 300 mL y se valoró el cromo no reducido con sulfato ferroso amónico 0.05 M (sal de Mohr),

previamente factorizada. Paralelamente, se repitió el mismo procedimiento con blancos de agua destilada.

La DQO se calcula mediante la siguiente expresión:

$$DQO \text{ (mg O}_2 \text{ L}^{-1}\text{)} = \frac{(V_b - V_m) \times M \times 8000}{V}$$

donde  $V_b$  es el volumen de sal de Mohr (mL) gastado en la titulación del blanco,  $V_m$  es el volumen de sal de Mohr (mL) gastado en la titulación de la muestra,  $V$  es el volumen de muestra (mL) y  $M$  es la molaridad real de la sal de Mohr.

#### **III.3.2.4. Demanda bioquímica de oxígeno**

La demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) es la cantidad de oxígeno consumido por la acción de los microorganismos aerobios presentes en el purín para la degradación bioquímica de la materia orgánica.

El método consiste en la incubación, durante cinco días y a 20°C en ausencia de luz, de una serie de diluciones de la muestra de purín, midiendo el oxígeno consumido mediante la variación manométrica de mercurio (APHA/AWWA/WPFC, 1998).

#### **III.3.2.5. pH y conductividad eléctrica**

Ambos se analizaron directamente sobre las muestras frescas de purín convenientemente homogeneizadas.

El pH se determinó utilizando un pH-metro CRISON micro pH 2001 con compensación automática de temperatura previamente calibrado.

La conductividad eléctrica se determinó con un conductímetro con compensación automática de temperatura CRISON micro CM 2201, refiriendo el resultado a 25°C.

#### **III.3.2.6. Carbono orgánico total**

El carbono orgánico total (COT) se determinó a partir de la pérdida de peso de la muestra de purín seca tras calcinación a 550°C, aplicando el coeficiente de Van Bemmelen que relaciona el carbono orgánico y la materia orgánica (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1994).

$$COT = \frac{MO}{1.72}$$

donde MO equivale a la pérdida de peso por calcinación.

### III.3.2.7. Macro y microelementos totales

El nitrógeno total se analizó según el método Kjeldahl empleando diluciones de purín 1:10 y posterior determinación espectrofotométrica con un autoanalizador Technicon AAI, según el procedimiento indicado en el apartado III.3.1.3.1.

Las concentraciones totales de macro y microelementos en cada muestra se midieron mediante un espectrofotómetro de emisión de plasma con un Perkin Elmer ICP/5500, previa digestión de una dilución de purín 1:10 con ácido nítrico-perclórico, procediendo tal y como se detalla en el apartado III.3.1.5.1.

### III.3.2.8. Nitrógeno amoniacal y nítrico

La concentración de nitrógeno amoniacal se analizó mediante la destilación del amoniaco en medio alcalino y posterior valoración; el nitrógeno nítrico se determinó mediante la reducción del mismo con aleación Devarda, destilación del amoniaco formado en el medio alcalino y posterior valoración (Bremner y Mulvaney, 1982).

Se pesaron entre 2 y 4 g de purín fresco y 0.2 mg de óxido de magnesio en matraces Kjeldahl y se añadieron 20 mL de cloruro cálcico 0.01 M. Se destiló con arrastre de vapor recogiendo sobre 10 mL de ácido bórico con mezcla de indicadores (verde de bromocresol y rojo de metilo) y se valoró con ácido clorhídrico 0.2 M. Paralelamente, se repitió el mismo procedimiento con blancos de agua destilada. Para la determinación del nitrógeno nítrico, se realizó de nuevo la destilación añadiendo previamente 0.2 g de aleación Devarda.

Para el cálculo de las concentraciones de nitrógeno amoniacal se empleó la siguiente fórmula:

$$N - \text{NH}_4^+ \text{ o } N - \text{NO}_3^- (\text{g L}^{-1}) = \frac{(V_m - V_b) \times M \times 14}{V}$$

donde  $V_m$  es el volumen de ácido clorhídrico (mL) gastado en la valoración de la muestra,  $V_b$  es el volumen ácido clorhídrico (mL) gastado en la valoración del blanco,  $M$  es la molaridad del ácido clorhídrico y  $V$  es el volumen de muestra (mL).

### III.3.2.9. Abundancia de isotópos estables $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$

La metodología empleada es análoga a la descrita en el apartado III.3.1.8.

### **III.3.2.10. Extracción y caracterización de los ácidos húmicos y fúlvicos**

Se extrajeron de la mezcla de las muestras liofilizadas y se analizaron siguiendo mismos procedimientos que para los ácidos húmicos y fúlvicos de los suelos (apartado III.3.1.7.).

### **III.3.2.11. Análisis de microorganismos patógenos**

Las diluciones para la determinación de microorganismos se realizaron directamente a partir de cada muestra de purín, previamente homogeneizado mediante agitación durante 10 minutos.

Se emplearon los mismos métodos de cultivo y recuento descritos para los suelos (apartado III.3.1.10.).

## **III.3.3. ANÁLISIS DE LAS PLANTAS**

### **III.3.3.1. Toma y preparación de muestras**

Las parte aérea de cebada se cortó en dos puntos de cada una de las parcelas en el momento de la cosecha; en cada uno de ellos se tomaron las plantas presentes en 0.5 m de tres filas contiguas. Al ser la separación entre filas de 0.15 m, la muestra total de cada parcela se compuso de tres metros lineales que equivalen a 0.45 m<sup>2</sup>. Posteriormente, se separaron el grano y la paja de cada muestra y se molió una fracción de cada parte para la realización de los análisis químicos.

Todos los resultados analíticos se refirieron a peso de materia seca, obtenida por secado del material vegetal en estufa de aire forzado a 60°C durante 24 horas.

### **III.3.3.2. Rendimiento de cosecha**

Se determinó el peso total de materia seca, el número de espigas y una vez trilladas, el peso de grano. Con estos resultados se calcularon los parámetros de rendimiento de cosecha.

### **III.3.3.3. Calidad de grano**

El peso de 1000 granos se calculó por conteo directo y pesada, empleando un molde que incluye 100 granos.



Para la determinación del peso específico se utilizó una balanza mecánica de cereales COBOS, que permite determinar el peso del grano contenido en una probeta de 250 cm<sup>3</sup>.

#### **III.3.3.4. Composición mineral**

El nitrógeno total en el grano y en la paja de cebada se cuantificó siguiendo el método Kjeldahl a partir de 0.1 g de muestra y posterior determinación espectrofotométrica con un autoanalizador Technicon, tal y como se describe en el apartado III.3.1.3.1. El resto de elementos se analizaron por digestión de 1 g de material vegetal con ácido nítrico-perclórico, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.3.1.5.1. Se midieron por espectrometría de emisión de plasma con un Perkin Elmer ICP/5500.

#### **III.3.3.5. Abundancia de isotópos estables $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$**

La composición isotópica de las muestras de grano y paja de cebada se determinó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.3.1.8.

### **III.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico de cada variable se llevó a cabo mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor (tratamiento), considerando cada año independientemente. El efecto residual y el acumulativo se analizaron por separado, comparándolos a su vez con el tratamiento control y el de fertilización mineral. En el caso de obtener diferencias significativas entre las medias ( $p \leq 0.05$ ) se hicieron comparaciones *post-hoc* utilizando el test de Bonferroni. Las correlaciones entre las distintas variables se realizaron mediante coeficientes de Pearson, considerando los niveles de significación  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.001$ .

Dado el elevado número de variables estudiadas, se efectuó un Análisis de Componentes Principales (PCA) sobre algunos de los parámetros analizados en el suelo, con el fin de examinar las relaciones subyacentes entre las variables. Se extrajeron los componentes con autovalores mayores que 1, seleccionando el método de rotación Varimax.

En el seguimiento de la supervivencia de los microorganismos patógenos, se compararon el control con el tratamiento con purín mediante un test de *t*-Student.

Los cálculos estadísticos se realizaron con el programa SPSS 13.0.



## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

- IV.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES**
- IV.2. EFECTOS SOBRE EL CULTIVO**
- IV.3. EFECTOS SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**
- IV.4. EFECTOS SOBRE EL ESTADO NUTRICIONAL DEL SUELO**
- IV.5. EFECTOS SOBRE LA MATERIA ORGÁNICA**
- IV.6. ESTUDIO DE LA ABUNDANCIA DE ISÓTOPOS ESTABLES**
- IV.7. EFECTOS SOBRE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS**
- IV.8. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DEL SUELO**
- IV.9. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES**
- IV.10. EVOLUCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PATÓGENOS**



## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **IV.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES**

#### **IV.1.1. PURINES DE CERDO**

Las características analíticas de los purines de cerdo empleados se recogen en la tabla IV.1.1, así como los valores medios correspondientes a los utilizados durante todo el experimento de campo.

Si se comparan con los valores medios encontrados en otros estudios sobre caracterización de este tipo de materiales (Comisión Europea, 2001; Díez et al., 2004; Moral et al., 2005b; Sánchez y González, 2005), los tres purines aplicados entre 2001 y 2003 se distinguen por una dilución elevada, lo que repercute en unos contenidos bajos de materia seca y de carbono orgánico, así como una concentración ligeramente baja de casi todos los macro y micronutrientes analizados. Sin embargo, los valores obtenidos se encuentran dentro de los rangos normales debido a la alta variabilidad característica de este material (Moral et al., 2005b).

Las propiedades del purín de cerdo dependen de numerosos factores, como la edad de los animales, el tipo de almacenamiento, la época de muestreo o las condiciones de manejo (Sánchez y González, 2005). A pesar de que se tomaron de una misma explotación y en la misma época del año, los purines empleados en este estudio presentan, en general, menor contenido en materia seca, DQO, DBO<sub>5</sub>, carbono y nutrientes si se comparan con las características de los analizados en los primeros años del experimento (1997-2000). Esto indica que, incluso dentro de una misma explotación ganadera, la variabilidad encontrada es elevada.

**Tabla IV.1.1. Características principales de los purines de cerdo aplicados al suelo cada año en el experimento de campo.**

Parámetro <sup>a</sup>	Purín de cerdo			
	2001	2002	2003	Media ± SD <sup>b</sup> 1997-2003
Materia seca (g L <sup>-1</sup> )	14.5	12.6	10.0	16.0 ± 5.7
Cenizas (g L <sup>-1</sup> )	5.1	5.4	4.9	5.7 ± 1.3
DQO (g L <sup>-1</sup> )	20	35	14	25.6 ± 9.5
DBO <sub>5</sub> (g L <sup>-1</sup> )	7	5	2	9.1 ± 4.7
pH	7.4	7.8	7.8	7.5 ± 0.2
CE (dS m <sup>-1</sup> )	10.8	12.7	10.9	13.5 ± 2.5
COT (g L <sup>-1</sup> )	5.4	3.1	2.7	5.8 ± 2.9
N total (g L <sup>-1</sup> )	2.5	1.9	1.5	2.2 ± 0.5
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	1623	1421	1313	1509 ± 241
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	17	16	13	24 ± 16
Macroelementos totales (mg L <sup>-1</sup> )				
P	233	191	123	326 ± 159
K	726	1202	608	811 ± 260
Ca	231	267	247	335 ± 138
Mg	122	139	111	188 ± 78
Na	229	256	273	265 ± 111
Microelementos totales (mg L <sup>-1</sup> )				
Fe	47	73	33	40 ± 16
Mn	4	7	3	5 ± 2
Zn	24	19	20	31 ± 16
Cu	14	10	8	14 ± 4
Patógenos (UFC L <sup>-1</sup> )				
Coliformes fecales	2.1·10 <sup>7</sup>	2.3·10 <sup>7</sup>	1.7·10 <sup>7</sup>	2.0·10 <sup>7</sup> ±0.3·10 <sup>7</sup> <sup>c</sup>
Estreptococos fecales	8.3·10 <sup>6</sup>	7.8·10 <sup>6</sup>	8.6·10 <sup>6</sup>	8.2·10 <sup>6</sup> ±0.4·10 <sup>6</sup> <sup>c</sup>
<i>Salmonella</i> spp.	presencia	presencia	presencia	
<i>Clostridium</i> sulfito-reductores	presencia	presencia	presencia	
Composición isotópica				
δ <sup>13</sup> C (‰)	n.d. <sup>d</sup>	n.d.	-14.39	
δ <sup>15</sup> N (‰)	n.d.	n.d.	14.37	

<sup>a</sup>CE: conductividad eléctrica; DQO: demanda química de oxígeno; DBO<sub>5</sub>: demanda bioquímica de oxígeno; COT: carbono orgánico total; UFC: unidades formadoras de colonias.

<sup>b</sup>SD: desviación estándar.

<sup>c</sup>Media ± SD del periodo 2001-2003

<sup>d</sup>n.d.: no determinado.

El purín de cerdo posee todos los nutrientes esenciales para las plantas, siendo de especial interés su contenido elevado en nitrógeno. Sin embargo, esta característica también constituye el principal factor limitante, ya que puede provocar contaminación de las aguas debido a la lixiviación de nitratos. De acuerdo con el Real Decreto 261/1996, sobre protección de las aguas contra la contaminación producida por los nitratos procedentes de fuentes agrarias, se limita la cantidad de nitrógeno aplicado con el estiércol a  $170 \text{ kg ha}^{-1}$  anuales, en zonas declaradas vulnerables. La tabla IV.1.2. muestra la cantidad de nitrógeno aportado por cada tratamiento. Las dosis de  $120$  y  $150 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  de purín exceden este límite todos los años estudiados, al igual que las de  $90 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  en 2001 y 2002.

**Tabla IV.1.2. Nitrógeno aportado cada año por el purín de cerdo en cada tratamiento acumulativo ( $\text{kg N ha}^{-1}$ ).**

Tratamiento	2001	2002	2003
<b>P30</b>	75	57	45
<b>P60</b>	150	114	90
<b>P90</b>	225	171	135
<b>P120</b>	300	228	180
<b>P150</b>	375	285	225

Otros factores limitantes de la aplicación agronómica de purín de cerdo lo constituyen el cobre y el zinc. Sin embargo, los contenidos de estos elementos en los residuos empleados se encuentran por debajo de los límites impuestos por el Real Decreto 1310/1990, por el que se regula la aplicación de lodos de depuración en el sector agrario, en cuanto a la concentración de metales en el residuo y a la cantidad de los mismos introducidos anualmente en el suelo.

En los tres últimos años se analizaron algunos grupos de microorganismos patógenos, indicadores de contaminación fecal. Los valores encontrados se encuentran dentro de los intervalos normales en este tipo de residuos (Bicudo y Svoboda, 1995; Placha et al., 2001; Hutchison et al., 2005a).

Finalmente, se determinó la abundancia de isótopos estables  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  en el purín de cerdo aplicado el último año, encontrándose dentro de los rangos obtenidos habitualmente con residuos de origen similar (Glaser et al., 2001; Curt et al., 2004).

### **IV.1.2. SUELO**

El perfil edáfico (figura IV.1.1.) consta de los siguientes horizontes, según la caracterización realizada por Carrasco (1997):

Ap1: 0-24 cm: color 10YR5/3 en húmedo; estructura entre moderada a débil; no plástico, friable ligeramente duro; textura franco arenosa; sin cutanes; frecuentes raíces finas y medianas; límite con el horizonte inferior gradual y ondulado.

Ap2: 24-47 cm: color 10YR4/4 en húmedo; caracteres similares al anterior; menos raíces; el límite con el horizonte inferior es neto y ondulado.

Bt: 47-73 cm: color 7.5YR4/6 en húmedo; estructura fuerte en bloques subangulares tendiendo a prismática; adherente, plástico, friable y firme; textura arcillo arenosa; se observan cutanes zonales; algunas raíces finas pero escasas; el límite con el horizonte inferior es brusco y ondulado.

Ck1: 73-114 cm: color 10YR7/4 en húmedo; estructura moderada en bloques subangulares; no adherente, no plástico, duro, sin raíces, con abundantes carbonatos; sin cutanes, poco poroso; el límite con el horizonte inferior es gradual y ondulado.



**Figura IV.1.1.** Perfil del suelo.



Ck2: 114- cm: Horizonte en bandas subhorizontales, alternando carbonatos (10YR8/4) con masas arcillo arenosas rojizas (7.5YR5/6); las bandas rojas son adherentes y plásticas; es friable y duro; sin raíces y poco poroso.

Las características observadas permiten clasificar el suelo como *Typic Haploxeralf*, según la Soil Taxonomy (Soil Survey Staff, 2003), o *Calcic Luvisol*, según la FAO (FAO/ISRIC/ISSS, 1998).

La tabla IV.1.3 muestra la caracterización analítica del horizonte superficial del suelo llevada a cabo al inicio del experimento y que ha sido discutida ampliamente por Plaza (2002). Aquí se destacará que se trata de un suelo de textura franco-arenosa (Soil Survey Staff, 2003) que presenta un pH ligeramente ácido, una conductividad eléctrica baja y un contenido en materia orgánica pobre, debido a las condiciones climáticas y al sistema de monocultivo que se ha empleado. Por otra parte, la concentración de nitrógeno total es ligeramente baja, así como la de otros nutrientes como el fósforo y el calcio, mientras que el contenido de potasio es alto. Los niveles de hierro y manganeso se consideran dentro del rango de suficiencia, mientras que los de cobre y zinc se encuentran en valores deficitarios para el cultivo (Cadahía y Lucena, 1998; López y Grau, 2004). En resumen, el nivel de fertilidad natural del suelo es bajo, estando sometido a procesos degradativos similares a otros suelos de la región mediterránea (Zalidis et al., 2002).

**Tabla IV.1.3. Características principales del suelo al inicio del experimento.**

Parámetro <sup>a</sup>	Valor	Parámetro	Valor
Textura	Franco arenosa	Macroelementos asimilables (mg kg <sup>-1</sup> )	
Arena (%)	59	P	41
Limo (%)	22	K	487
Arcilla (%)	19	Ca	1440
		Mg	150
pH	5.8	Na	15
CE (dS m <sup>-1</sup> )	0.06	Microelementos totales (mg kg <sup>-1</sup> )	
		Fe	8895
COT (g kg <sup>-1</sup> )	12.9	Mn	143
N total (g kg <sup>-1</sup> )	1.2	Zn	15
Relación C/N	10.8	Cu	5

<sup>a</sup>CE: conductividad eléctrica; COT: carbono orgánico total.

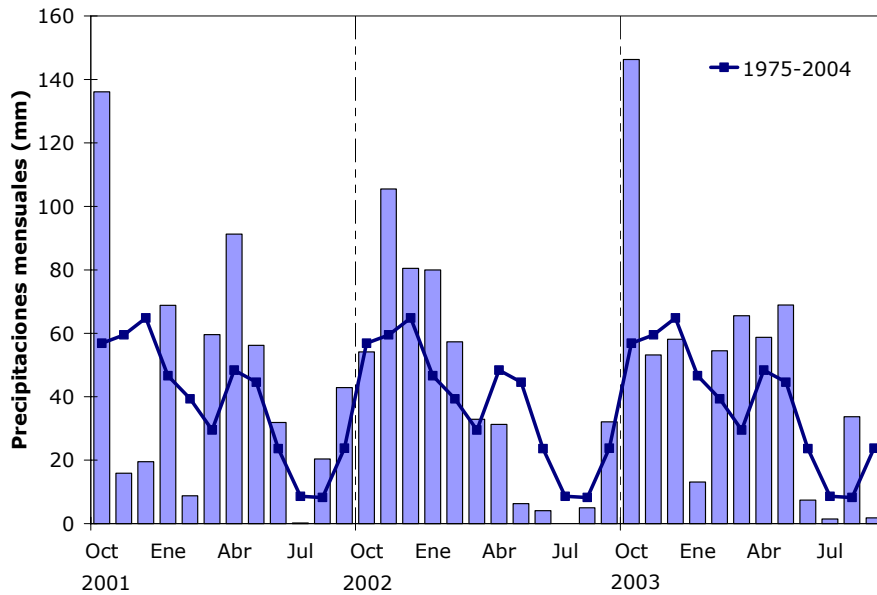
### **IV.1.3. CONDICIONES METEOROLÓGICAS. BALANCE HÍDRICO**

Las condiciones meteorológicas específicas de cada campaña tienen un efecto muy marcado sobre el cultivo de la cebada, de manera que para una misma variedad, zona de producción y manejo del cultivo, la producción es muy variada en función de la meteorología.

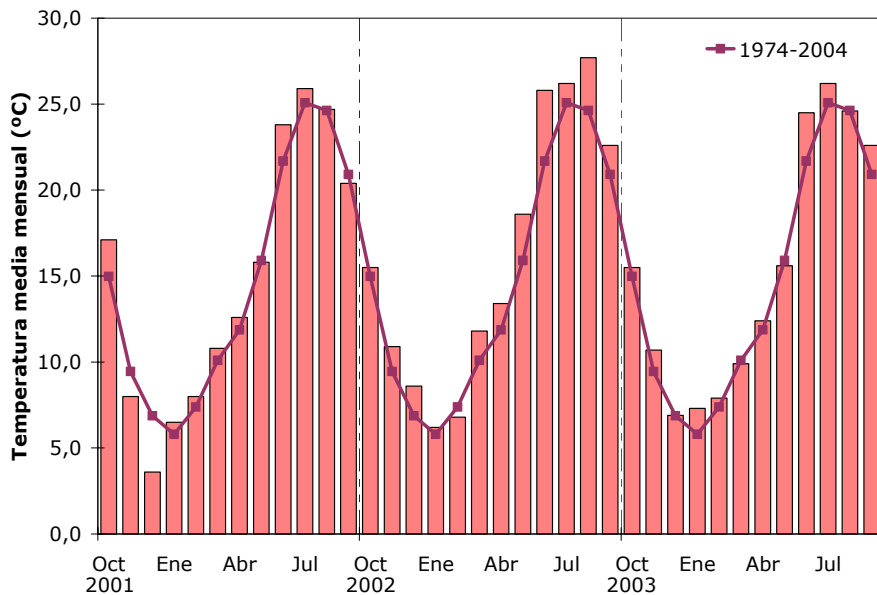
Las precipitaciones registradas en los tres años objeto de estudio son 552, 489 y 563 mm, respectivamente. En ningún caso son inferiores a 454 mm, correspondientes al año medio (periodo 1975-2004). La distribución mensual de las precipitaciones, comparada con la del año medio, se representa en la figura IV.1.2. En la primera campaña, las lluvias son más abundantes en primavera, mientras que el otoño es relativamente seco, con lluvias concentradas en octubre y enero. En el segundo año de estudio, la situación es inversa, con un otoño e invierno más húmedos que la media y una primavera más seca. En la última campaña las precipitaciones se reparten de manera muy uniforme a lo largo del ciclo de cultivo, siendo la primavera ligeramente más lluviosa de lo esperado.

Por otra parte, la figura IV.1.3. muestra la distribución de las temperaturas medias mensuales registradas durante el periodo estudiado, así como las calculadas para el año medio a partir del periodo 1975-2004. Cabe destacar que durante la primavera las temperaturas medias mensuales fueron superiores a las correspondientes al año medio en los tres años estudiados, aunque de manera más pronunciada en la cosecha de 2003, coincidiendo con el final del ciclo de cultivo.

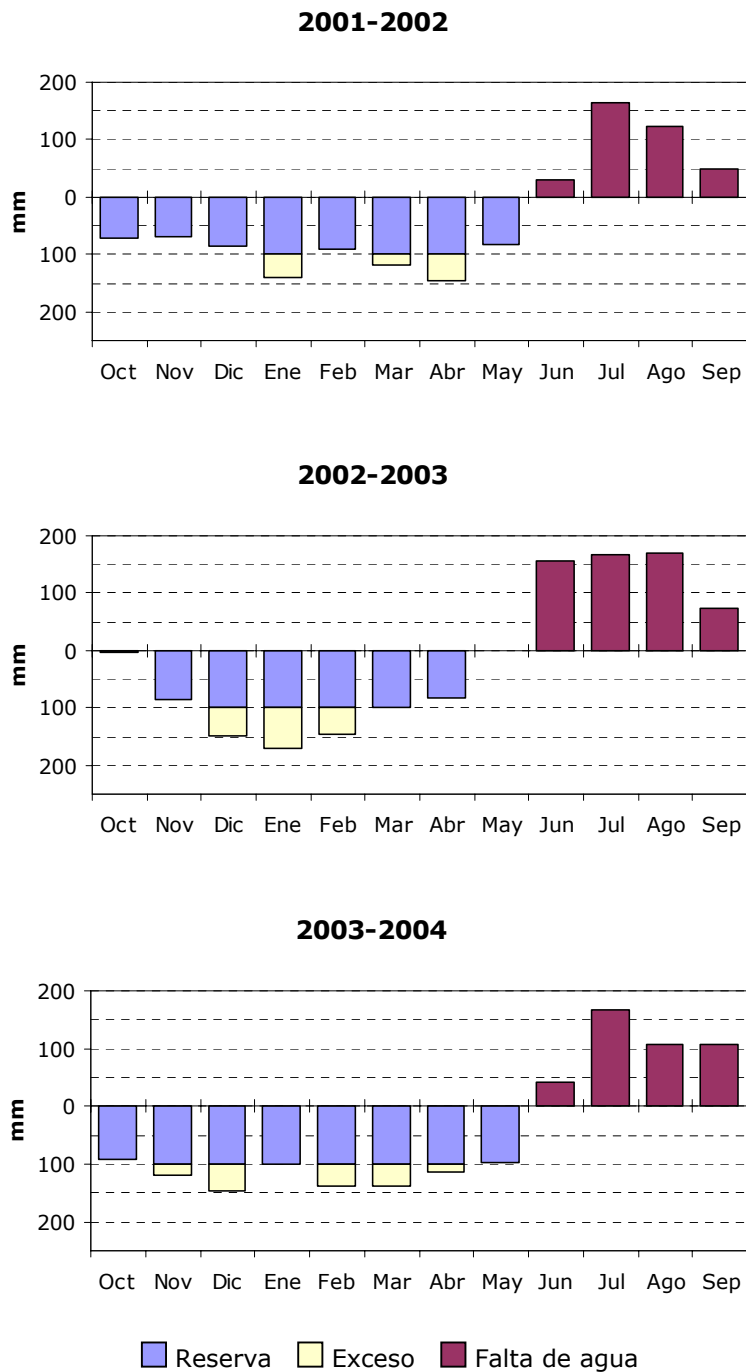
Uno de los factores que tiene mayor influencia sobre la respuesta de la planta es la disponibilidad de agua en el suelo, ya que tanto las temperaturas como la cantidad y la distribución de las precipitaciones a lo largo del ciclo de cultivo determinan los procesos que se van a desarrollar en el suelo y la evolución del cultivo, especialmente en condiciones de secano como las que nos ocupan (Díaz-Ambrona y Mínguez, 2001; Cantero-Martínez et al., 2003). Por ello, se han realizado los balances hídricos en los tres años agronómicos estudiados mediante el método de Thornthwaite, considerando una capacidad máxima de retención de agua de 100 mm. Según esta aproximación, se calcula la evapotranspiración potencial a partir de las temperaturas medias mensuales y del número máximo de horas de luz según el mes y la latitud de la zona. Los balances obtenidos se representan en la figura IV.1.4, observándose que la disponibilidad de agua en el suelo es muy similar a la del año medio (figura III.1.4.) en todos los casos, a excepción de la primavera de 2003, en la que la reserva de agua es inferior a la media durante la última fase del ciclo de cultivo.



**Figura IV.1.2.** Precipitaciones mensuales de cada uno de los tres años hidrológicos de experimentación y del año medio (1975-2004).



**Figura IV.1.3.** Temperaturas medias mensuales de cada uno de los tres años hidrológicos de experimentación y del año medio (1975-2004).



**Figura IV.1.4.** Balances hídricos según el método de Thornthwaite de los tres años de experimentación.

## **IV.2. EFECTOS SOBRE EL CULTIVO**

En esta parte del trabajo se evalúa el valor agronómico del purín de cerdo, prestando atención a los efectos residuales y acumulativos que se observan sobre parámetros de rendimiento, calidad y composición mineral del cultivo de cebada, así como a la evolución de algunos índices de eficiencia fertilizante.

### **IV.2.1. RENDIMIENTO DE COSECHA**

El rendimiento de una cosecha puede considerarse en términos biológicos o agronómicos (Mengel y Kirkby, 2001); el rendimiento biológico se define como la producción total de material vegetal, mientras que el agronómico tiene en cuenta aquella parte de la planta que resulta de interés para su cultivo, que en el caso de la cebada es la producción de grano.

En las tablas IV.2.1. y IV.2.2. y las figuras IV.2.1 y IV.2.2 se muestran los rendimientos obtenidos de grano de cebada y de materia seca total en cada uno de los años estudiados.

Los rendimientos de grano obtenidos en la cosecha de 2002 son muy superiores a los recogidos en 2003 y 2004 y, en general, mayores que los producidos en los años anteriores del experimento. De hecho, en el tratamiento control, los niveles de producción de grano aumentan respecto a cosechas anteriores, lo que indica que las condiciones meteorológicas durante este año han sido más propicias para el cultivo incluso en ausencia de fertilización. Además, no se detectan diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los tratamientos. Sin embargo, hay que señalar que la producción de grano con la fertilización mineral es inferior a la obtenida con cualquier tratamiento acumulativo, y que el rendimiento mayor se alcanza en los suelos tratados con  $150 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  durante cinco años.

En 2003 se observa una disminución generalizada de la producción de grano en todas los tratamientos, siendo menos acusada en los acumulativos que en los residuales. En éstos, los rendimientos obtenidos no muestran diferencias significativas respecto a la fertilización mineral o al control. En el caso de los acumulativos, los rendimientos son significativamente superiores al control y al fertilizante mineral cuando se añaden 120 y  $150 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ . La máxima producción vuelve a corresponder a la dosis más alta, observándose una tendencia más marcada que en 2002 a aumentar conforme lo hace la dosis de purín recibido. Además, mientras que la producción de grano en 2003 disminuye un 66% respecto a la de 2002,

**Tabla IV.2.1. Rendimiento de grano de cebada ( $t\ ha^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	4.1	1.3	1.1	4.1	1.3 c	1.1 c
<b>FM</b>	3.5	1.2	1.0	3.5	1.2 c	1.0 bc
<b>P30</b>	3.2	0.7	0.8	4.1	1.7 bc	2.7 abc
<b>P60</b>	3.5	0.8	0.6	4.3	2.5 abc	3.7 ab
<b>P90</b>	4.1	0.7	0.8	5.0	2.0 bc	3.9 a
<b>P120</b>	3.6	0.6	1.0	4.9	4.1 ab	5.3 a
<b>P150</b>	4.6	0.7	0.8	6.4	4.7 a	4.3 a
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	ns	***	***

\*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ )

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.2.2. Rendimiento de materia seca de cebada ( $t\ ha^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	10.8 ab	2.8	3.3	10.8 b	2.8 b	3.3 b
<b>FM</b>	10.5 ab	2.7	3.4	10.5 b	2.7 b	3.4 b
<b>P30</b>	7.6 b	1.7	1.8	9.9 b	4.0 ab	8.1 ab
<b>P60</b>	8.3 ab	2.0	1.7	12.5 ab	6.9 a	10.8 a
<b>P90</b>	10.0 ab	2.0	2.4	14.1 ab	6.5 a	11.3 a
<b>P120</b>	8.6 ab	2.0	2.3	15.3 ab	10.9 a	13.1 a
<b>P150</b>	11.7 a	1.9	1.6	17.9 a	10.8 a	9.8 a
<b>Valor p</b>	**	ns	ns	**	***	***

\*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ )

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

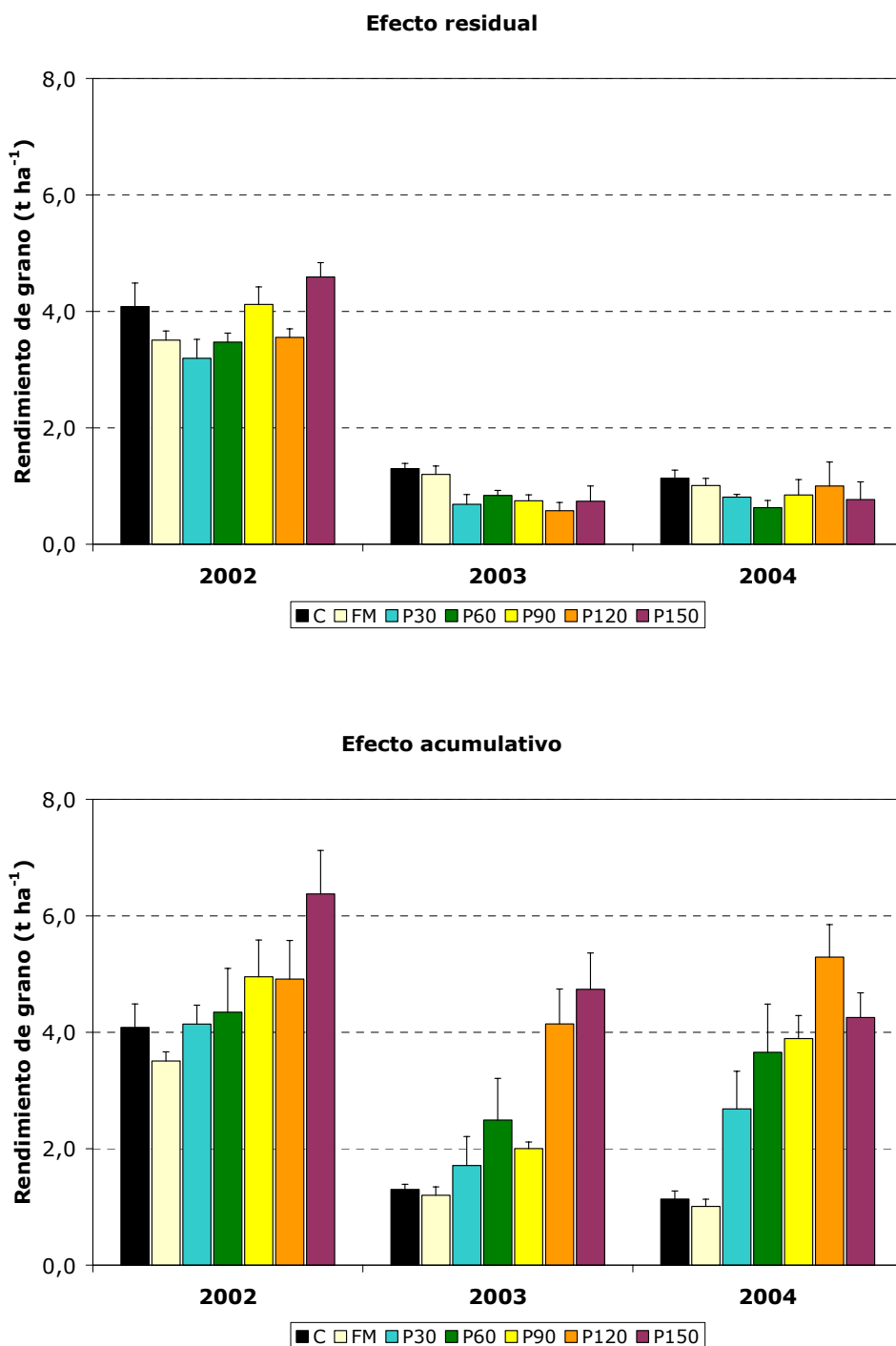
tanto en el control como en la fertilización mineral, este porcentaje se reduce en los tratamientos acumulativos, variando desde un 60% en P30 a un 16% en P120.

En el último año se mantienen los rendimientos bajos de los tratamientos residuales, sin que muestren valores significativamente distintos a los logrados en el control y en la fertilización mineral. Por el contrario, todos los tratamientos acumulativos, excepto el de  $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  de purín, producen una mayor cantidad de grano que los cultivos de fertilización mineral y del control, alcanzándose el máximo rendimiento en el suelo enmendado con  $120 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ , el cual multiplica por cinco la producción conseguida con el fertilizante mineral.

El rendimiento en materia seca de cebada responde a la aplicación de purín de manera similar a la producción de grano. Igualmente, la producción en 2002 es claramente superior a la de los años siguientes y sólo se detecta un efecto residual positivo en la dosis de  $150 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  en el año 2002. En 2003 y 2004 no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los suelos enmendados una sola vez.

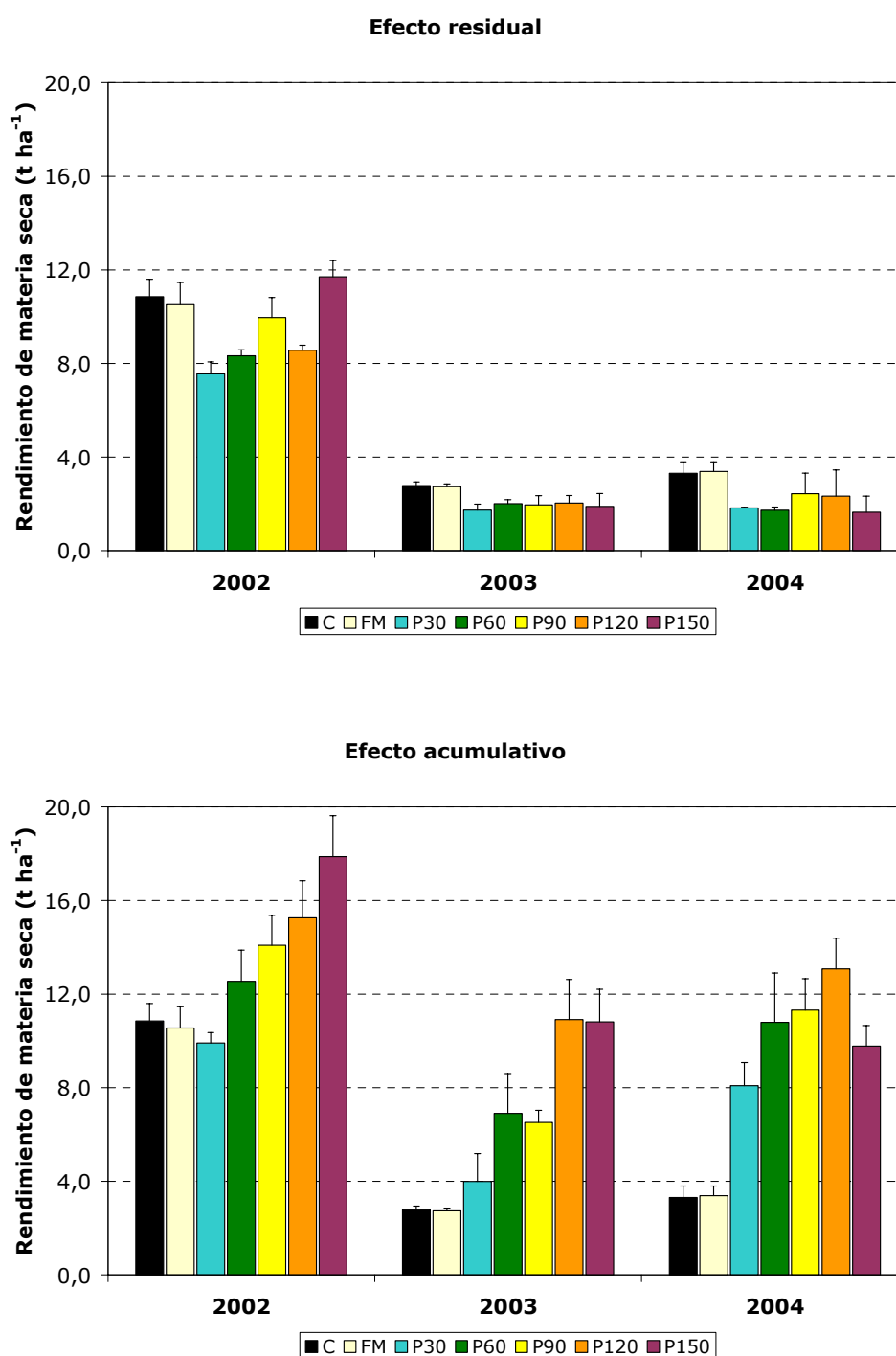
En el caso de los tratamientos acumulativos, los rendimientos de materia seca aumentan, en general, con la dosis de aplicación. Esta tendencia, que es menos clara en 2002 ya que sólo hay diferencias significativas respecto al control y a la fertilización mineral en la dosis máxima, se acentúa en los años siguientes, en los que la producción disminuye drásticamente en todos los tratamientos, como ya se ha comentado para la respuesta en la producción de grano. Tanto en 2003 como en 2004, los rendimientos de todos los tratamientos acumulativos fueron estadísticamente más elevados que el control y el fertilizante mineral, excepto en las parcelas enmendadas con la dosis más baja de purín.

Por otra parte, hay que considerar los efectos negativos que el régimen de monocultivo ejerce sobre la productividad de los agrosistemas, en especial en sistemas de secano sobre suelos de baja fertilidad (Díaz-Ambroña y Mínguez, 2001). Un monocultivo que se repita año tras año puede acabar seleccionando poblaciones de malas hierbas adaptadas a él, muy difíciles de erradicar. En las cosechas de 2003 y 2004 se han manifestado problemas de competencia con malas hierbas (principalmente vallico, *Lolium rigidum* L.), en especial en las parcelas residuales. En 2003 el porcentaje de biomasa de malas hierbas frente a la total de la parcela alcanza el 45-50% en los tratamientos residuales, 42% en la fertilización mineral, 32% en el control y 25% en la dosis anual de  $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ , mientras que en el resto de los tratamientos acumulativos es inferior al 10%, siendo del 3% para la dosis máxima. En la cosecha de 2004 (figura IV.2.3.) estos



**Figura IV.2.1.** Rendimiento de grano de cebada del suelo control (C), del abonado con fertilizante mineral (FM) y de los enmendados con 30, 60, 90, 120 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P30, P60, P90, P120 y P150, respectivamente) una vez al inicio del experimento (efecto residual) o anualmente (efecto acumulativo). Las barras indican el error estándar de la media (n=3).





**Figura IV.2.2.** Rendimiento de materia seca de cebada del suelo control (C), del abonado con fertilizante mineral (FM) y de los enmendados con 30, 60, 90, 120 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P30, P60, P90, P120 y P150, respectivamente) una vez al inicio del experimento (efecto residual) o anualmente (efecto acumulativo). Las barras indican el error estándar de la media (n=3).

porcentajes son menores, aunque todavía importantes en los tratamientos residuales y el control (15-35%), mientras que en la fertilización mineral y los acumulativos son prácticamente inapreciables (menor del 4% en todos los casos). La aparición de especies adventicias provoca una reducción importante de la productividad de cebada, además de un incremento del empleo de fitosanitarios para su control, debido a la competencia por los nutrientes del suelo y por los añadidos con el purín, especialmente el nitrógeno (Petersen, 2003). Sin embargo, el aporte de purín parece contrarrestar este inconveniente, al menos en el caso de las dosis más elevadas.



**Figura IV.2.3.** Vista de algunas parcelas antes de la cosecha de 2004.

Como se ha comentado anteriormente, las condiciones meteorológicas de cada año pueden condicionar la producción de un cultivo, en ocasiones en mayor medida que el abonado, lo que se conoce como *efecto campaña* y que habitualmente se manifiesta en estudios interanuales como éste. Con el fin de analizar conjuntamente el efecto ejercido en los siete años de experimento sobre el rendimiento de cosecha, se ha calculado la producción total, tanto de grano como de materia seca, de cada uno de los tratamientos, así como el porcentaje de variación respecto al control y a la fertilización mineral (tabla IV.2.3.).

**Tabla IV.2.3. Rendimiento de materia seca y de grano de cebada ( $t\ ha^{-1}$ ) en los siete años del experimento de campo y variación respecto al control (%C) y a la fertilización mineral (%FM).**

Tratamiento	Rendimiento de materia seca			Rendimiento de grano		
	Total	%C <sup>a</sup>	%FM	Total	%C	%FM
<b>Residual</b>						
<b>C</b>	48.7 b	-	-24	17.0 b	-	-23
<b>FM</b>	63.7 a	31	-	22.1 a	30	-
<b>P30</b>	48.2 b	-1	-24	17.2 ab	1	-22
<b>P60</b>	50.8 b	4	-20	19.3 ab	13	-13
<b>P90</b>	59.1 ab	22	-7	20.7 ab	21	-7
<b>P120</b>	57.7 ab	19	-9	19.3 ab	13	-13
<b>P150</b>	57.1 ab	17	-10	19.3 ab	13	-13
<b>Valor p</b>	**			*		
<b>Acumulativo</b>						
<b>C</b>	48.7 d	-	-24	17.0 c	-	-23
<b>FM</b>	63.7 c	31	-	22.1 bc	30	-
<b>P30</b>	67.5 bc	39	6	23.8 ab	40	8
<b>P60</b>	79.0 ab	62	24	26.0 ab	52	17
<b>P90</b>	81.6 a	68	28	27.4 ab	61	24
<b>P120</b>	84.4 a	74	33	29.3 a	72	32
<b>P150</b>	81.5 ab	68	28	28.7 ab	68	30
<b>Valor p</b>	***			***		

<sup>a</sup>%C y %FM: variación en el rendimiento de cada tratamiento respecto al rendimiento del tratamiento control y al de la fertilización mineral, respectivamente.

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

Los resultados indican que la cantidad total de grano y de materia seca aumenta con la adición consecutiva de dosis crecientes de purín, hasta alcanzar el máximo con  $120\ m^3\ ha^{-1}$ , y que todos los tratamientos acumulativos son más productivos que el control. Cuando se comparan con la fertilización mineral, el rendimiento de materia seca se incrementa para todos los tratamientos, excepto con la dosis de  $30\ m^3\ ha^{-1}$ , aunque el rendimiento total de grano sólo es significativamente superior en los suelos que recibieron  $120\ m^3\ ha^{-1}$ . Por el contrario, en los tratamientos que

recibieron una única enmienda con purín la producción de materia seca y de grano no difiere respecto al control. Aunque en los tres primeros años del experimento se detectó un efecto residual positivo (Plaza, 2002), éste desaparece en los años siguientes, de forma que la respuesta del cultivo en los tratamientos residuales y el control evoluciona de manera paralela.

Numerosos estudios indican que la aplicación de purín de cerdo puede lograr rendimientos de cosecha satisfactorios, siendo posible sustituir la fertilización mineral parcial o totalmente (Petersen, 1996; Nicholson et al., 1999; Mooleki et al., 2002; Faz et al., 2003; Dauden y Quílez, 2004; Díez et al., 2004). Sin embargo, como señalan Díez et al. (2004), la aplicación de dosis superiores a la óptima, calculada en función de las necesidades de fertilización del cultivo, las características del suelo y las condiciones ambientales, no siempre supone un aumento significativo de la producción, sino que conlleva un riesgo mayor de salinización del suelo o de lixiviación de nitratos, entre otros problemas.

La relación entre producción biológica y agronómica se define mediante el índice de cosecha (Mengel y Kirkby, 2001). Este parámetro representa la fracción de peso seco total de la planta que se encuentra en forma de grano. Refleja la eficacia del cultivo en el uso del fertilizante, ya que un índice de cosecha elevado indica una distribución mejor de compuestos asimilados dentro de la planta, mayor en el grano que en la paja (Molina, 1989).

En general, los cultivos de los tratamientos acumulativos son menos eficientes que los residuales correspondientes (tabla IV.2.1.4.), excepto en el caso de las dosis altas (120 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) en la cosecha de 2003. Por otra parte, el índice de cosecha disminuye en 2002 en la fertilización mineral respecto a los tratamientos residuales. En 2003 y 2004 se obtienen índices de cosecha mayores al aumentar la dosis de purín aplicado anualmente.

En general, el incremento del nivel de nitrógeno aplicado causa una fuerte estimulación de la producción de materia seca de la parte aérea del cultivo. En cambio, la respuesta de la producción de grano no suele ser tan elevada, por lo que el índice de cosecha tiende a descender, lo que explicaría las diferencias entre tratamientos residuales y acumulativos. En las cosechas de 2003 y 2004 influirían las condiciones ambientales menos favorables y la continuación del régimen de monocultivo.

La producción de grano en la cebada puede ser considerada como resultado del producto de ciertos parámetros, lo que permite estudiar la contribución de distintas partes de la planta a la producción de grano y las causas de variación en la cosecha final (Molina, 1989). El rendimiento de grano puede expresarse como el producto entre el número de espigas por

unidad de superficie, el número de granos por espiga y el peso medio del grano. El producto de los dos primeros se denomina factor de acumulación o capacidad de almacenamiento y equivale al número de granos por unidad de superficie, mientras que el peso medio por grano indica la medida en que esta capacidad se transforma en rendimiento final. Las tablas IV.2.5., IV.2.6. y IV.2.7. presentan los resultados obtenidos en el número de espigas, número de granos por espiga y factor de acumulación. En las parcelas de efecto residual no resultan diferencias significativas en ninguno de estos parámetros. Por el contrario, en el caso de la aplicación acumulada de purín, tanto el número de espigas como el factor de acumulación aumentan con la dosis recibida, siendo de manera significativa en las cosechas de 2003 y 2004.

El factor de acumulación muestra una elevada correlación con la producción de grano en los tres años estudiados, significativa todos los años al nivel de probabilidad  $p \leq 0.001$  (tabla IV.2.8.). La principal causa de variación de dicho parámetro se debe al número de espigas, el cual también se correlaciona con la producción de grano. Por tanto, las diferencias en los rendimientos, tanto entre los distintos años como entre tratamientos dentro de un mismo año, se explican por una mayor producción de espigas. En cambio, la contribución del número de granos por espiga a las variaciones del factor de acumulación no es significativa, excepto en 2002, cuando se obtuvo un rendimiento de grano notablemente más elevado. La influencia del peso medio del grano sobre el rendimiento final se comentará más adelante.

En la cebada, el número final de espigas depende tanto de la cantidad de tallos formados durante el ahijado como de la proporción de los mismos que sobrevivan y que puedan diferenciarse para desarrollar una espiga viable (García del Moral et al., 2002). Por otra parte, los granos por espiga resultan del número de primordios florales formados, de la cantidad de ellos que den una espiguilla fértil y del porcentaje de éstas que originen granos viables (Molina, 1989). El aporte de nitrógeno procedente del purín al inicio del desarrollo de la cebada puede aumentar la producción de tallos y su supervivencia, lo que explicaría la mayor producción de espigas en los tratamientos acumulativos que en los residuales (Antolín et al., 2005). Las variaciones de rendimiento de un año a otro se atribuyen a otros factores como la temperatura o la disponibilidad de agua en cada una de las etapas del ciclo de cultivo.

#### **IV.2.2. CALIDAD DEL GRANO**

La evaluación de la calidad del grano obtenido en cada cosecha se ha realizado en función de dos parámetros relacionados con el tamaño y peso

**Tabla IV.2.4. Índice de cosecha de cebada en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	0.38 ab	0.47	0.35	0.38	0.47 a	0.35 b
<b>FM</b>	0.34 b	0.44	0.31	0.34	0.44 ab	0.31 ab
<b>P30</b>	0.42 ab	0.39	0.44	0.38	0.43 ab	0.32 ab
<b>P60</b>	0.42 a	0.42	0.36	0.34	0.36 ab	0.33 ab
<b>P90</b>	0.41 a	0.40	0.37	0.35	0.31 a	0.35 ab
<b>P120</b>	0.41 a	0.28	0.44	0.32	0.38 ab	0.40 ab
<b>P150</b>	0.39 ab	0.38	0.52	0.36	0.44 ab	0.43 a
<b>Valor p</b>	**	ns	ns	ns	*	*

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ )

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.2.5. Número de espigas de cebada (espigas m<sup>-2</sup>) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	501	210	159	501	210 b	159 c
<b>FM</b>	486	178	147	486	178 b	147 c
<b>P30</b>	427	121	143	427	216 ab	366bc
<b>P60</b>	441	136	104	441	348 ab	439 abc
<b>P90</b>	495	142	111	495	267 ab	511 ab
<b>P120</b>	420	107	144	420	472 a	727 a
<b>P150</b>	534	110	127	534	576 a	535 ab
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	ns	***	***

\*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ )

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.2.6. Número de granos por espiga de cebada en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	18	17	20	18	17	20
<b>FM</b>	16	19	19	16	19	19
<b>P30</b>	17	20	16	20	22	17
<b>P60</b>	17	18	19	18	18	21
<b>P90</b>	18	17	20	20	21	19
<b>P120</b>	18	18	21	19	22	18
<b>P150</b>	18	23	17	20	21	20
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns: no significativo ( $p > 0.05$ )

**Tabla IV.2.7 Factor de acumulación (número de granos  $m^{-2}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	9105	3509	2809	9105 b	3509 c	2809 d
<b>FM</b>	7809	3365	2704	7809 ab	3365 c	2704 cd
<b>P30</b>	7180	2064	2220	9421 ab	4730 bc	6201 bcd
<b>P60</b>	7520	2394	1753	9601 ab	6453 bc	9257 abc
<b>P90</b>	8872	2305	2306	10771 ab	5471 abc	9567 ab
<b>P120</b>	7438	1893	2650	10717 ab	10304 ab	13210 a
<b>P150</b>	9741	2276	2105	14134 a	11898 a	10480 ab
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	*	***	***

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ )

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.2.8. Coeficientes de correlación de parámetros de producción y calidad de grano de cebada con el rendimiento de grano, en cada año estudiado (n=36) y considerando el conjunto de datos de los tres años (n=108).**

	NESP <sup>a</sup>	NGE	FA	1000G
<b>2002</b>	0.930 <sup>***</sup>	0.583 <sup>***</sup>	0.985 <sup>***</sup>	
<b>2003</b>	0.974 <sup>***</sup>		0.998 <sup>***</sup>	0.425 <sup>*</sup>
<b>2004</b>	0.977 <sup>***</sup>		0.998 <sup>***</sup>	
<b>Todos</b>	0.974 <sup>***</sup>		0.990 <sup>***</sup>	0.493 <sup>***</sup>

<sup>a</sup>NESP: número de espigas por m<sup>2</sup>; NGE: número de granos por espiga; FA: factor de acumulación; 1000G: peso de mil granos.

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

No figuran coeficientes de correlación de valor absoluto menor que 0.4.

del grano: el peso específico y el peso de mil granos. Los valores medidos se muestran en las tablas IV.2.9. y IV.2.10.

En 2002 las diferencias encontradas en los resultados del peso específico de grano no resultan estadísticamente significativas. En 2003 este parámetro disminuye de manera generalizada en todos los tratamientos, especialmente en los residuales, aunque al año siguiente se incrementa de nuevo. A pesar de estas fluctuaciones de un año para otro, se observa que el peso específico de los tratamientos acumulativos con dosis altas de purín se mantiene casi constante.

Respecto al peso de mil granos, no se encuentran variaciones significativas dentro de cada año. Al igual que con el peso específico, las variaciones de un año a otro de este parámetro son importantes, obteniéndose los valores más elevados en la cosecha de 2002.

Anteriormente se comentó que el peso medio del grano es uno de los componentes determinantes del rendimiento de grano. En la tabla IV.2.8 se muestra que dicho parámetro se correlaciona con la producción de grano en 2003 y cuando se considera el conjunto de datos de los tres años. El peso del grano es función de la etapa de maduración y de la velocidad de crecimiento de grano (Molina, 1989) y se considera un componente de la cosecha relativamente estable bajo condiciones normales de cultivo. Un peso de grano menor indica un descenso en los aportes de compuestos asimilados, debido especialmente a condiciones ambientales desfavorables como una mayor sequedad y temperatura al final del ciclo de cultivo. Únicamente en 2004, la adición anual de purín parece empeorar el llenado de los granos.



**Tabla IV.2.9. Peso específico del grano de cebada ( $\text{kg m}^{-3}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	636	605 a	675	636	605 ab	675
<b>FM</b>	671	564 b	657	671	564 b	657
<b>P30</b>	650	572 ab	644	636	611 ab	679
<b>P60</b>	667	593 ab	660	626	624 ab	668
<b>P90</b>	682	569 ab	667	658	623 ab	675
<b>P120</b>	683	582 ab	657	658	637 ab	677
<b>P150</b>	682	573 ab	659	670	667 a	671
<b>Valor p</b>	ns	**	ns	ns	*	ns

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.2.10. Peso de mil granos de cebada (g) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	47	41	45	47	41	45
<b>FM</b>	47	40	42	47	40	42
<b>P30</b>	47	40	43	46	39	46
<b>P60</b>	49	41	44	47	40	41
<b>P90</b>	48	38	43	47	39	42
<b>P120</b>	50	38	43	47	41	41
<b>P150</b>	49	38	43	46	41	42
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

### **IV.2.3. COMPOSICIÓN MINERAL**

Los análisis de los macro y micronutrientes estudiados se han llevado a cabo en el grano y en la paja de forma separada. De esta forma se puede estudiar su distribución en la planta según los distintos tratamientos.

#### **IV.2.3.1. Concentración de macronutrientes**

Las tablas IV.2.11., IV.2.13, IV.2.15, IV.2.17, IV.2.19 y IV.2.21 muestran la concentración de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y sodio en el grano de cebada, mientras que los resultados correspondientes a estos mismos elementos en la paja se encuentran en las tablas IV.2.12., IV.2.14, IV.2.16, IV.2.18, IV.2.20 y IV.2.22.

El nitrógeno es, en general, el macronutriente más afectado por la adición de purín, especialmente en grano, como ya se observó en los cuatro primeros años del experimento (Plaza, 2002). Respecto a la concentración en grano (figura IV.2.4), se encuentran escasas diferencias entre los tratamientos residuales, al igual que respecto al control y a la fertilización mineral, siendo únicamente significativas en 2004. Por su parte, la aplicación anual consecutiva de purín aumenta la concentración de nitrógeno en grano con la dosis, excepto en la última cosecha.

La concentración de nitrógeno en la paja (figura IV.2.5) de los tratamientos residuales es similar independientemente de la dosis inicial de purín recibida. No se encuentran diferencias al comparar con el control y con el tratamiento mineral en ninguna de las tres cosechas consideradas. En el caso de los tratamientos acumulativas, el contenido de nitrógeno en paja aumenta con las dosis más elevadas, aunque sólo en 2002 las diferencias resultan significativas.

La cantidad de nitrógeno en el grano conduce a la estimación de contenidos proteicos ( $\text{g N kg}^{-1} \times 0.64$ ) del orden de 8.7-13.6 %. La cebada dedicada a maltería precisa granos de tamaño mínimo de 2.5 mm y un contenido proteico del 9-11.5 %, lo que equivale a una concentración de nitrógeno en grano entre 14 y 18  $\text{g kg}^{-1}$  (Grashoff y d'Antuono, 1997). Por tanto, un aumento del contenido de nitrógeno del grano como consecuencia de la fertilización con purín podría suponer un inconveniente si el cultivo se dedica a la fabricación de cerveza, por lo que habría que alcanzar un equilibrio en los aportes de nitrógeno para obtener un grano de la calidad requerida sin pérdidas de rendimiento.

En 2002, la concentración de fósforo en grano (tabla IV.2.13.) disminuye en los tratamientos residuales que recibieron dosis mayores de purín inicial, mostrando en todos los casos diferencias significativas

**Tabla IV.2.11. Concentración de nitrógeno en el grano de cebada ( $\text{g kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	17.3	16.2	15.1 ab	17.3 ab	16.2 ab	15.1
<b>FM</b>	15.1	16.0	14.6 ab	15.1 b	16.0 b	14.6
<b>P30</b>	15.4	15.8	14.5 ab	15.6 b	16.4 ab	14.1
<b>P60</b>	17.2	15.3	15.0 ab	17.4 ab	17.3 ab	15.8
<b>P90</b>	16.0	15.0	16.0 a	19.5 ab	17.8 ab	17.1
<b>P120</b>	15.9	15.6	14.0 ab	19.4 ab	20.4 ab	16.4
<b>P150</b>	15.6	14.2	13.5 a	21.1 a	21.2 a	15.0
<b>Valor p</b>	ns	ns	*	**	**	ns

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

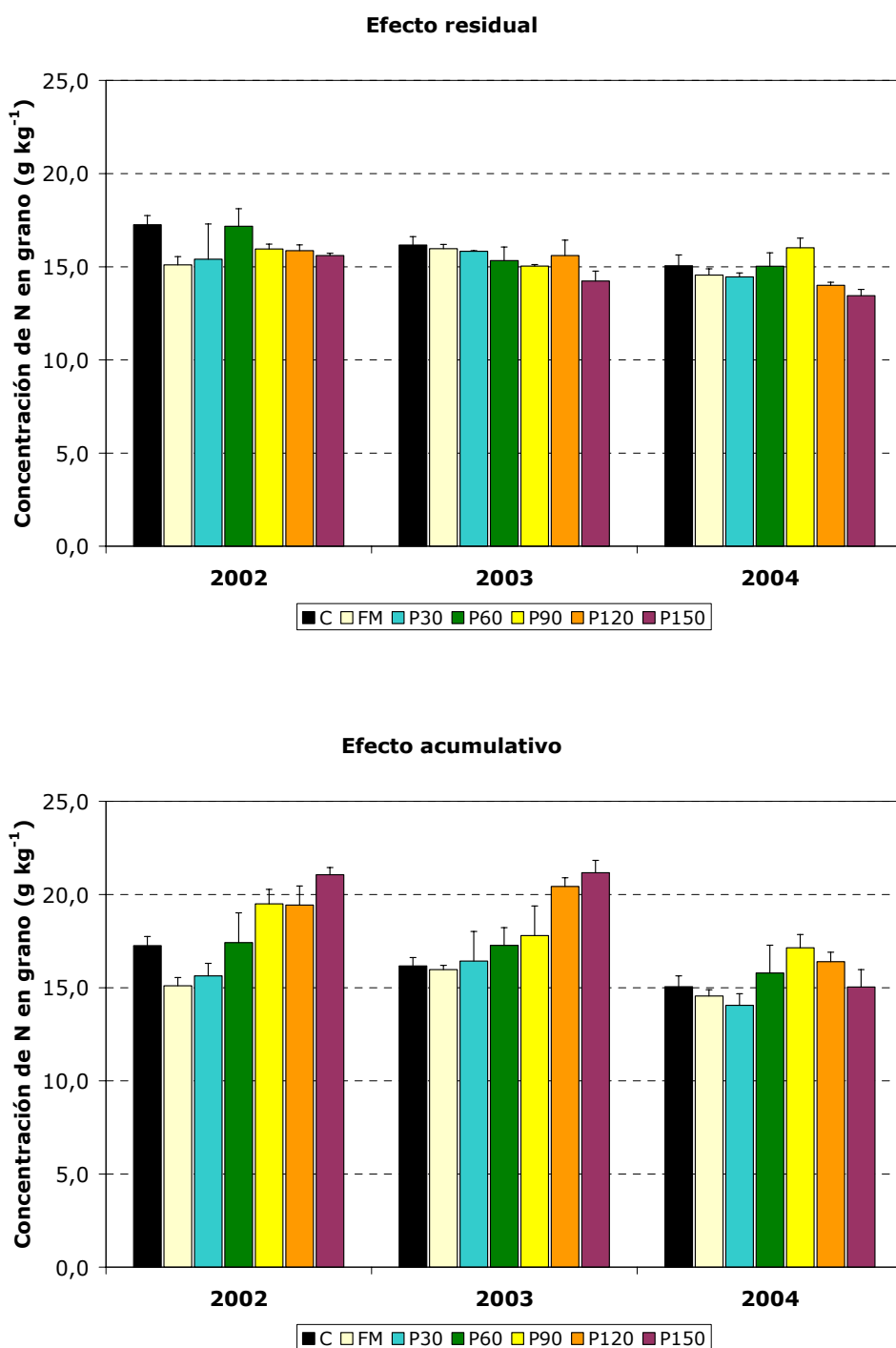
Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.2.12. Concentración de nitrógeno en la paja de cebada ( $\text{g kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

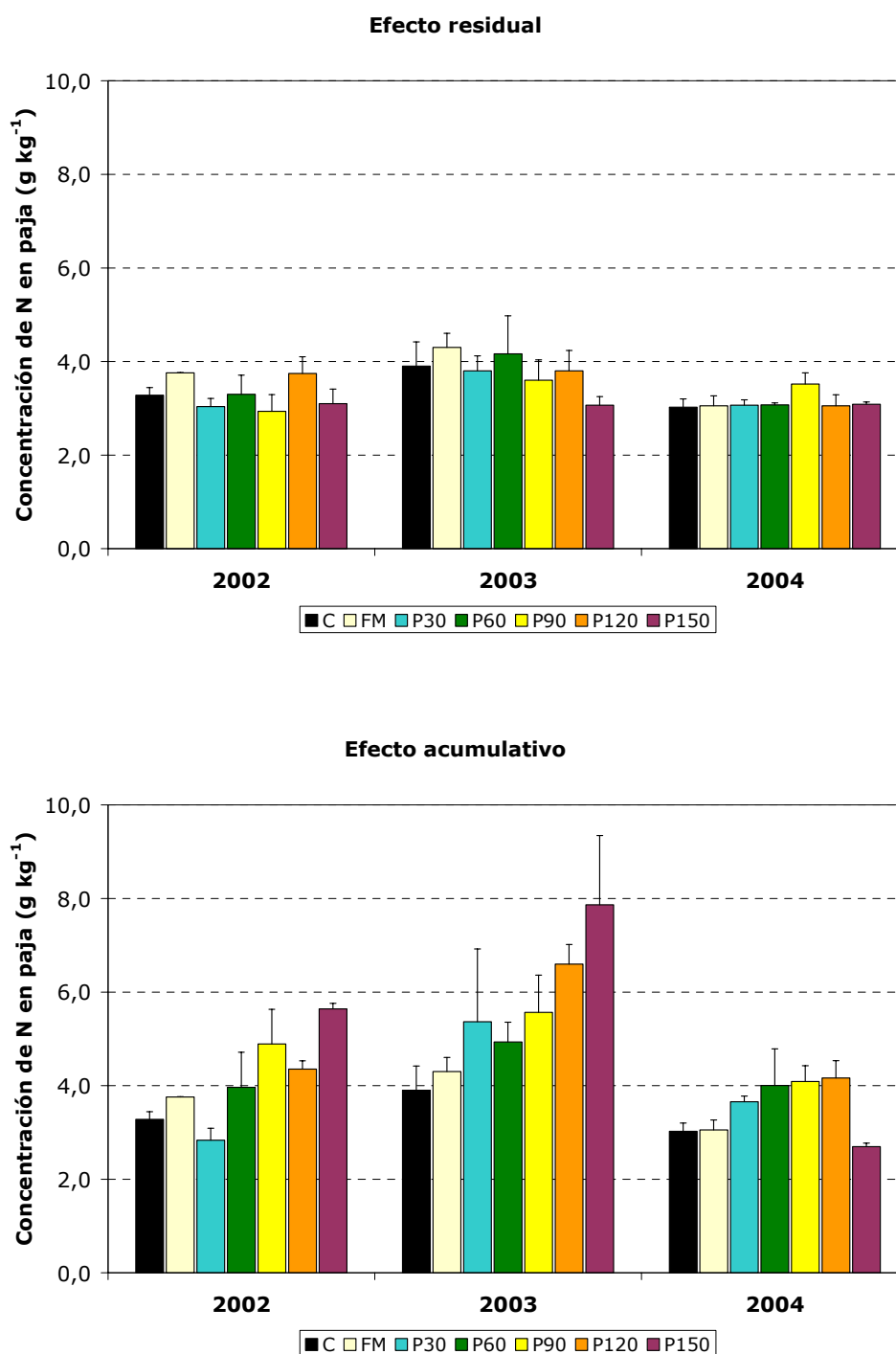
Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	3.3	3.9	3.0	3.3 b	3.9	3.0
<b>FM</b>	3.8	4.3	3.1	3.8 ab	4.3	3.1
<b>P30</b>	3.0	3.8	3.1	2.8 b	5.4	3.7
<b>P60</b>	3.3	4.2	3.1	4.0 ab	4.9	4.0
<b>P90</b>	2.9	3.6	3.5	4.9 ab	5.6	4.1
<b>P120</b>	3.7	3.8	3.1	4.4 ab	6.6	4.2
<b>P150</b>	3.1	3.1	3.1	5.6 a	7.9	2.7
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	**	ns	ns

\*\*  $p \leq 0.01$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura IV.2.4.** Concentración de nitrógeno en el grano de cebada del suelo control (C), del abonado con fertilizante mineral (FM) y de los enmendados con 30, 60, 90, 120 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P30, P60, P90, P120 y P150, respectivamente) una vez al inicio del experimento (efecto residual) o anualmente (efecto acumulativo). Las barras indican el error estándar de la media (n=3).



**Figura IV.2.5.** Concentración de nitrógeno en la paja de cebada del suelo control (C), del abonado con fertilizante mineral (FM) y de los enmendados con 30, 60, 90, 120 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P30, P60, P90, P120 y P150, respectivamente) una vez al inicio del experimento (efecto residual) o anualmente (efecto acumulativo). Las barras indican el error estándar de la media (n=3).

respecto al control. En los años siguientes no se mantienen estas desigualdades, y ninguno de ellos presenta niveles significativamente diferentes a los del control y la fertilización mineral. Respecto a la adición anual de purín, la concentración de fósforo en grano aumenta ligeramente con la dosis en 2002, mientras que en 2003 y 2004 los valores de los distintos tratamientos son similares. Por el contrario, la concentración de fósforo en la paja de cebada (tabla IV.2.14) apenas se ve afectada por los diferentes tratamientos y no se observan variaciones significativas en ninguno de los años estudiados.

El purín de cerdo aporta elevadas cantidades de fósforo, en su mayor parte presente en forma inorgánica (Sánchez y González, 2005). Sin embargo, su absorción por el cultivo puede verse notablemente disminuida como consecuencia de la incorporación de calcio, también presente en los purines, y del incremento del pH del suelo, que favorecen la formación de formas no asimilables por la planta (Whalen y Chang, 2001).

Los contenidos de potasio en grano y paja (tablas IV.2.15 y IV.2.16) apenas presentan variaciones significativas con los distintos tratamientos. Únicamente en 2002, la concentración en el grano disminuye con la dosis de purín en los tratamientos residuales, al igual que el contenido de potasio en la paja cosechada en 2003. Por el contrario, las diferencias detectadas en los tratamientos acumulativos no resultaron estadísticamente significativas.

Con respecto a la concentración de calcio, aunque el contenido en grano (tabla IV.2.17.) aumenta ligeramente con la dosis de aplicación anual de purín de cerdo, el tratamiento estadístico no revela diferencias significativas entre los valores medios. En cambio, los niveles de este elemento en paja (tabla IV.2.18) presentan valores superiores al tratamiento control en el caso de las dosis más elevadas en la cosecha de 2003.

Los contenidos de magnesio en grano y en paja (tabla IV.2.19 y IV.2.20) apenas se alteran entre los diferentes tratamientos, excepto un ligero descenso en grano de los tratamientos residuales en la cosecha de 2002. Por su parte, la concentración de sodio en grano (tabla IV.2.21) aumenta con la aplicación consecutiva de purín respecto al control y a la fertilización mineral, si bien únicamente en 2003 lo hace de manera significativa. Respecto a los niveles de sodio en paja (tabla IV.2.22), se obtienen resultados similares, ya que la adición anual de purín provoca un aumento significativo de dicha concentración en 2003.

Los análisis del grano correspondiente a la cosecha de 2003 muestran, en general, un menor contenido en nutrientes comparado con el obtenido en los demás años del experimento, disminuyendo las concentraciones de

**Tabla IV.2.13. Concentración de fósforo en el grano de cebada ( $\text{g kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	5.7 a	1.9	4.5	5.7 ab	1.9	4.5
<b>FM</b>	5.4 b	2.0	4.3	5.4 b	2.0	4.3
<b>P30</b>	5.4 b	1.8	4.7	5.5 ab	1.9	4.4
<b>P60</b>	5.4 b	1.8	4.4	5.6 ab	1.9	4.4
<b>P90</b>	5.2 bc	1.8	4.6	5.9 ab	1.6	4.3
<b>P120</b>	5.1 c	1.8	4.5	6.1 a	1.8	4.3
<b>P150</b>	5.0 c	1.8	4.3	6.0 ab	1.8	4.3
<b>Valor p</b>	***	ns	ns	*	ns	ns

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.2.14. Concentración de fósforo en la paja de cebada ( $\text{g kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	0.8	1.2	1.4	0.8	1.2	1.4
<b>FM</b>	1.0	1.3	1.0	1.0	1.3	1.0
<b>P30</b>	0.9	1.1	1.2	0.8	1.3	1.5
<b>P60</b>	1.0	1.3	0.9	1.4	0.9	1.2
<b>P90</b>	1.2	1.5	1.3	0.9	0.9	1.2
<b>P120</b>	1.5	1.8	1.4	0.7	1.1	0.9
<b>P150</b>	1.1	1.2	1.9	0.6	0.9	0.5
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

**Tabla IV.2.15. Concentración de potasio en el grano de cebada ( $\text{g kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	6.0 a	3.0	6.0	6.0	3.0	6.0
<b>FM</b>	6.0 a	3.2	5.9	6.0	3.2	5.9
<b>P30</b>	5.8 ab	2.8	6.4	5.8	3.1	6.1
<b>P60</b>	5.5 ab	2.9	6.6	6.5	2.9	5.9
<b>P90</b>	5.3 ab	3.1	6.1	5.9	2.7	5.8
<b>P120</b>	5.2 ab	3.1	6.2	6.0	2.6	6.2
<b>P150</b>	4.7 b	2.8	5.9	5.7	2.7	6.3
<b>Valor p</b>	**	ns	ns	ns	ns	ns

\*\*  $p \leq 0.01$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.2.16. Concentración de potasio en la paja de cebada ( $\text{g kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	15.9	16.0 b	17.1	15.9	16.0	17.1
<b>FM</b>	19.7	19.3 ab	16.5	19.7	19.3	16.5
<b>P30</b>	17.5	22.0 a	15.0	16.3	17.3	16.7
<b>P60</b>	18.4	18.6 ab	14.7	23.1	18.7	21.4
<b>P90</b>	16.9	16.9 ab	16.6	22.4	17.6	21.8
<b>P120</b>	19.1	15.4 b	15.9	18.1	20.7	16.8
<b>P150</b>	15.5	16.2 b	16.7	21.2	16.6	14.5
<b>Valor p</b>	ns	**	ns	ns	ns	ns

\*\*  $p \leq 0.01$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).



**Tabla IV.2.17. Concentración de calcio en el grano de cebada ( $\text{g kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	0.52	0.22	0.45 ab	0.52	0.22	0.45
<b>FM</b>	0.71	0.22	0.43 ab	0.71	0.22	0.43
<b>P30</b>	0.54	0.21	0.43 ab	0.50	0.22	0.45
<b>P60</b>	0.49	0.21	0.48 a	0.55	0.20	0.50
<b>P90</b>	0.46	0.24	0.40 ab	0.67	0.20	0.51
<b>P120</b>	0.46	0.21	0.40 ab	0.71	0.24	0.56
<b>P150</b>	0.44	0.20	0.38 b	0.71	0.24	0.52
<b>Valor p</b>	ns	ns	*	ns	ns	ns

\*  $p \leq 0.05$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.2.18. Concentración de calcio en la paja de cebada ( $\text{g kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	2.2 b	2.4 ab	2.7	2.2	2.4 b	2.7
<b>FM</b>	2.4 b	3.1 a	2.8	2.4	3.1 b	2.8
<b>P30</b>	2.4 ab	3.0 ab	2.4	2.8	3.0 b	2.6
<b>P60</b>	2.0 b	2.7 ab	2.3	2.4	3.2 b	2.8
<b>P90</b>	4.4 a	2.5 ab	2.5	2.7	3.1 b	3.6
<b>P120</b>	3.9 ab	2.3 ab	2.3	2.8	5.8 a	4.0
<b>P150</b>	3.0 ab	2.1 b	2.7	2.0	4.4 ab	3.5
<b>Valor p</b>	**	*	ns	ns	***	ns

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.2.19. Concentración de magnesio en el grano de cebada ( $\text{g kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	1.36 a	0.55	1.18	1.36	0.55	1.18
<b>FM</b>	1.26 ab	0.56	1.17	1.26	0.56	1.17
<b>P30</b>	1.31 ab	0.52	1.19	1.35	0.52	1.13
<b>P60</b>	1.30 ab	0.55	1.21	1.24	0.55	1.17
<b>P90</b>	1.30 ab	0.54	1.25	1.36	0.54	1.16
<b>P120</b>	1.21 b	0.52	1.14	1.36	0.52	1.21
<b>P150</b>	1.19 b	0.53	1.10	1.37	0.53	1.20
<b>Valor <math>p</math></b>	**	ns	ns	ns	ns	ns

\*\*  $p \leq 0.01$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.2.20. Concentración de magnesio en la paja de cebada ( $\text{g kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	0.34	0.44	0.58	0.34	0.55	0.58
<b>FM</b>	0.39	0.57	0.75	0.39	0.56	0.75
<b>P30</b>	0.49	0.54	0.66	0.52	0.47	0.52
<b>P60</b>	0.44	0.60	0.44	0.44	0.51	0.64
<b>P90</b>	0.81	0.61	0.60	0.38	0.48	0.56
<b>P120</b>	0.68	0.53	0.63	0.37	0.66	0.57
<b>P150</b>	0.50	0.49	0.81	0.26	0.65	0.59
<b>Valor <math>p</math></b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

**Tabla IV.2.21. Concentración de sodio en el grano de cebada ( $\text{g kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	0.02	0.02	0.07 ab	0.02	0.02 b	0.07
<b>FM</b>	0.02	0.02	0.06 ab	0.02	0.02 ab	0.06
<b>P30</b>	0.02	0.02	0.09 ab	0.02	0.03 ab	0.14
<b>P60</b>	0.02	0.02	0.11 a	0.02	0.02 ab	0.12
<b>P90</b>	0.02	0.02	0.05 b	0.02	0.02 ab	0.08
<b>P120</b>	0.02	0.02	0.10 ab	0.03	0.04 ab	0.11
<b>P150</b>	0.02	0.02	0.09 ab	0.03	0.05 a	0.11
<b>Valor p</b>	ns	ns	*	ns	*	ns

\*  $p \leq 0.05$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.2.22. Concentración de sodio en la paja de cebada ( $\text{g kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	0.25	0.47 a	0.49	0.25	0.47 b	0.49
<b>FM</b>	0.20	0.38 ab	0.50	0.20	0.38 b	0.50
<b>P30</b>	0.35	0.39 ab	0.32	0.26	0.66 b	0.49
<b>P60</b>	0.27	0.37 ab	0.32	0.46	0.62 b	1.16
<b>P90</b>	0.30	0.29 ab	0.34	0.79	1.07 b	1.14
<b>P120</b>	0.29	0.25 b	0.32	0.76	2.07 ab	1.54
<b>P150</b>	0.25	0.36 ab	0.45	0.61	3.07 a	1.81
<b>Valor p</b>	ns	*	ns	ns	***	ns

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

fósforo, potasio, calcio y magnesio. En cambio, la composición de la paja no se altera de un año para otro, lo que indica que en 2003 la traslocación de macronutrientes desde los órganos vegetativos (tallos y hojas) al grano se ha visto perjudicada.

### **IV.2.3.2. Concentración de microelementos**

Entre los distintos micronutrientes, se ha estudiado la evolución de los contenidos en hierro (tablas IV.2.23 y IV.2.24), manganeso (tablas IV.2.25 y IV.2.26), zinc (tablas IV.2.27 y IV.2.28) y cobre (tabla IV.2.29), tanto en grano como en paja de cebada. No se han tenido en consideración otros elementos potencialmente tóxicos, al ser mínima su presencia en el purín de cerdo.

La concentración de hierro en grano disminuye con la dosis de purín en los tratamientos residuales de 2002, que muestran valores significativamente inferiores a los encontrados en el control y en la fertilización mineral. Igualmente, el contenido de hierro en grano desciende ligeramente en el último año con la aplicación consecutiva de las dosis más elevadas, aunque no de manera estadísticamente significativa. Respecto a la paja, las variaciones entre tratamientos no son significativas, aunque se detecta un descenso en 2004 con la acumulación de la fertilización con purín, que es similar al observado en el grano.

Los contenidos de manganeso, tanto en grano como en paja, no se ven significativamente afectados por los distintos tratamientos, excepto una disminución en grano en las parcelas residuales respecto al control, en la cosecha de 2002. En ambos casos, se han descrito descensos de hierro y manganeso en planta (Liu et al., 2004), relacionados con un aumento del pH del suelo (efecto observado en los tratamientos acumulativos, como se discutirá más adelante), ya que favorece una disminución de las formas disponibles para la planta (Fageria et al., 2002).

Por otra parte, se observa un aumento de la concentración de zinc en grano a medida que se incrementa la dosis de purín, aunque sólo las más altas muestran diferencias significativas respecto al control y a la fertilización mineral, en los años 2002 y 2004. Sin embargo, en la cosecha de 2003 disminuyen los niveles de zinc en grano en todos los tratamientos, comparados con los de otros años. El contenido de zinc en la paja no experimenta la tendencia observada para el grano, aunque también se detecta una acumulación menor de este elemento en el año 2003 respecto a las demás cosechas.

Se produce una cierta acumulación de cobre en grano al aumentar la dosis de purín, especialmente en la cosecha de 2002. Aunque en 2003

**Tabla IV.2.23. Concentración de hierro en el grano de cebada ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	57 a	33	29	57	33	29
<b>FM</b>	50 ab	39	27	50	39	27
<b>P30</b>	45 bc	31	32	48	28	28
<b>P60</b>	42 bc	29	37	52	28	30
<b>P90</b>	40 bc	31	32	57	29	31
<b>P120</b>	37 c	29	30	53	33	26
<b>P150</b>	37 c	29	33	47	29	23
<b>Valor p</b>	***	ns	ns	ns	ns	ns

\*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.2.24. Concentración de hierro en la paja de cebada ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	50	47	41	50	47	41
<b>FM</b>	63	43	44	63	43	44
<b>P30</b>	53	41	44	63	47	49
<b>P60</b>	50	53	42	63	49	45
<b>P90</b>	67	36	52	53	34	44
<b>P120</b>	67	35	49	53	48	38
<b>P150</b>	70	32	51	60	35	26
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

**Tabla IV.2.25. Concentración de manganeso en grano de cebada ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	15 a	22	11	15	22	11
<b>FM</b>	10 ab	23	11	10	23	11
<b>P30</b>	9 ab	15	11	16	22	12
<b>P60</b>	11 ab	11	10	13	18	11
<b>P90</b>	11 ab	16	14	12	13	12
<b>P120</b>	9 ab	11	10	13	15	13
<b>P150</b>	8 b	14	12	15	20	12
<b>Valor p</b>	*	ns	ns	ns	ns	ns

\*  $p \leq 0.05$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.2.26. Concentración de manganeso en la paja de cebada ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	13	14	13	13	14	13
<b>FM</b>	11	27	22	11	27	22
<b>P30</b>	14	17	9	11	12	19
<b>P60</b>	14	28	10	12	25	13
<b>P90</b>	13	31	14	13	18	12
<b>P120</b>	13	26	10	11	20	14
<b>P150</b>	12	25	9	13	16	13
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

**Tabla IV.2.27. Concentración de zinc en el grano de cebada ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	18 b	9	15 b	18 b	9	15 b
<b>FM</b>	22 ab	9	14 b	22 ab	9	14 b
<b>P30</b>	27 ab	10	21 a	21 ab	8	17 ab
<b>P60</b>	29 ab	11	21 a	23 ab	8	17 ab
<b>P90</b>	25 ab	11	18 ab	22 ab	8	22 ab
<b>P120</b>	27 ab	10	21 a	26 ab	9	26 a
<b>P150</b>	35 a	9	21 a	32 a	12	26 a
<b>Valor <math>p</math></b>	***	ns	**	*	ns	***

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.2.28. Concentración de zinc en la paja de cebada ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	22	9	18	22	9	18
<b>FM</b>	25	6	15	25	6	15
<b>P30</b>	22	9	14	13	7	13
<b>P60</b>	23	11	17	20	8	19
<b>P90</b>	12	11	14	16	11	13
<b>P120</b>	21	11	17	25	11	12
<b>P150</b>	16	11	15	18	11	10
<b>Valor <math>p</math></b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

**Tabla IV.2.29. Concentración de cobre en el grano de cebada ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	2.1 ab	1.0	2.0	2.1 c	1.0 ab	2.0
<b>FM</b>	2.0 b	1.3	2.0	2.0 c	1.3 ab	2.0
<b>P30</b>	2.9 a	1.2	2.5	2.4 bc	0.6 b	2.0
<b>P60</b>	2.8 a	1.5	3.0	1.9 c	0.7 b	2.3
<b>P90</b>	2.5 ab	1.4	2.5	3.3 abc	0.9 ab	2.7
<b>P120</b>	2.2 ab	1.1	3.0	3.8 ab	1.1 ab	3.3
<b>P150</b>	2.0 b	1.0	3.3	4.8 a	1.5 a	3.0
<b>Valor p</b>	**	ns	ns	***	**	ns

\*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

también se observa esta tendencia, ninguno de los tratamientos se diferencia estadísticamente de los niveles encontrados en el control. En 2004 no se detectan diferencias significativas respecto al control y a la fertilización mineral. Al igual que en el caso del zinc, los niveles de cobre en la cosecha de 2003 son inferiores. La concentración de cobre en paja se mantiene entre  $0.2$  y  $0.6 \text{ mg kg}^{-1}$ , sin que se detecten variaciones importantes debidas al tratamiento recibido o al año de experimentación.

La mayor acumulación de Zn y Cu en grano no tiene por qué considerarse negativa. No sólo permanecen en niveles muy por debajo de los márgenes de toxicidad (Fageria et al., 2002) sino que se tratan de microelementos esenciales para la planta cuya concentración en el suelo de partida puede llegar a constituir una limitación a la producción agrícola (Rashid y Ryan, 2004).

En resumen, los contenidos en cebada de los micronutrientes analizados son normales o ligeramente bajos, especialmente en el caso del cobre, ya que se halla en niveles considerados de deficiencia para la planta (Mengel y Kirkby, 2001; Calace et al., 2002; Fageria et al., 2002). Se puede concluir que en las condiciones del experimento en campo (características del suelo, tipo de cultivo, composición del residuo empleado, etc.) la aplicación de purín de cerdo no supone un riesgo de acumulación de metales pesados en la cebada.



#### IV.2.4. ÍNDICES DE EFICIENCIA FERTILIZANTE

En este apartado se plantea el estudio de la eficacia con que la planta utiliza el nitrógeno que tiene disponible en el suelo tras la aplicación de purín de cerdo, comparándolo con la fertilización mineral.

La eficiencia aparente en la utilización del nitrógeno, NUE (*Nitrogen Use Efficiency*, Mooleki et al., 2002) se calcula como la cantidad de este elemento extraído por el cultivo respecto al añadido por el fertilizante empleado, y corregido por el extraído en el tratamiento control:

$$NUE(\%) = \frac{N_{\text{ceb.}}(\text{TRAT}) - N_{\text{ceb.}}(\text{C})}{N_{\text{apl.}}(\text{TRAT})} \cdot 100$$

donde  $N_{\text{ceb.}}(\text{TRAT})$  y  $N_{\text{ceb.}}(\text{C})$  se refieren al nitrógeno extraído por el cultivo (atendiendo a su contenido y a la producción de grano y paja) en el tratamiento considerado y en el control, respectivamente, y  $N_{\text{apl.}}(\text{TRAT})$  es la cantidad del añadido con el fertilizante mineral o con el purín de cerdo. Se considera que la recuperación de nitrógeno en la parte de cebada cosechada es un buen indicador para el cálculo de NUE (Mooleki et al., 2002).

Para comparar la eficacia de los tratamientos orgánicos con respecto al tratamiento mineral, se emplea el índice MFE (*Mineral-Fertilizer-N Equivalents*, Gutser et al., 2005):

$$MFE(\%) = \frac{N_{\text{ceb.}}(\text{P}) - N_{\text{ceb.}}(\text{C})}{N_{\text{ceb.}}(\text{FM}) - N_{\text{ceb.}}(\text{C})} \cdot 100$$

donde  $N_{\text{ceb.}}(\text{P})$  es la extracción total de nitrógeno por la parte aérea de cebada en el tratamiento con purín correspondiente y  $N_{\text{ceb.}}(\text{FM})$  es la extracción en el tratamiento con fertilizante mineral. Ambos están corregidos por la extracción de nitrógeno en el tratamiento control,  $N_{\text{ceb.}}(\text{C})$ .

La eficiencia agronómica (AE, *Agronomic Efficiency*) se calcula como la cantidad de grano producido por cada unidad de nitrógeno añadido (Mengel y Kirkby, 2001):

$$AE (\text{kg grano kg}^{-1} \text{ N}) = \frac{RG_{\text{TRAT}} - RG_{\text{C}}}{N_{\text{apl.}}(\text{TRAT})}$$

siendo RG el rendimiento de grano obtenido en cada tratamiento, mineral, orgánico o control, y  $N_{\text{apl.}}(\text{TRAT})$  el nitrógeno añadido.

En las tablas IV.2.30., IV.2.31 y IV.2.32 se muestran los índices obtenidos en 1998, 2001 y 2004 (primer, cuarto y séptimo año del experimento). Cada índice se calcula teniendo en cuenta el año considerado y todos los anteriores del experimento en su conjunto. De esta forma, los resultados de 1998 representan el efecto a corto plazo (un año) de la fertilización con purín, mientras que los obtenidos en 2001 y 2004 constituyen una estimación de la eficacia del purín a más largo plazo cuando se aplica una sola vez (efecto residual) y cuando se repiten las adiciones anualmente (efecto acumulativo). A su vez, las figuras IV.2.6., IV.2.7. y IV.2.8. presentan la evolución de los índices calculados durante los siete años del experimento, en los tratamientos con 30, 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín, tanto residuales como acumulativos, y en la fertilización mineral.

En el primer año de estudio, la eficacia aparente en el uso del nitrógeno (NUE) del purín alcanza valores significativamente menores al de la fertilización mineral, detectándose una tendencia a incrementar con la cantidad de residuo añadido, excepto para la dosis máxima, que disminuye. Por otra parte, los valores de MFE indican que los tratamientos con 60, 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> son equivalentes a la fertilización mineral empleada, mientras que el de 120 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> lo duplica. Sin embargo, la eficiencia agronómica resulta similar en todos los tratamientos.

Tres años después de la aplicación de la enmienda, la utilización del nitrógeno por el cultivo respecto al añadido en los tratamientos con purín no difiere significativamente del valor obtenido en los tratamientos con fertilización mineral anual. El índice MFE aumenta con la dosis de purín, siendo en los suelos que recibieron 90, 120 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> equivalente al tratamiento mineral. Por otra parte, la eficiencia agronómica, aunque aumenta en todos los tratamientos respecto al primer año, no difiere significativamente entre ellos.

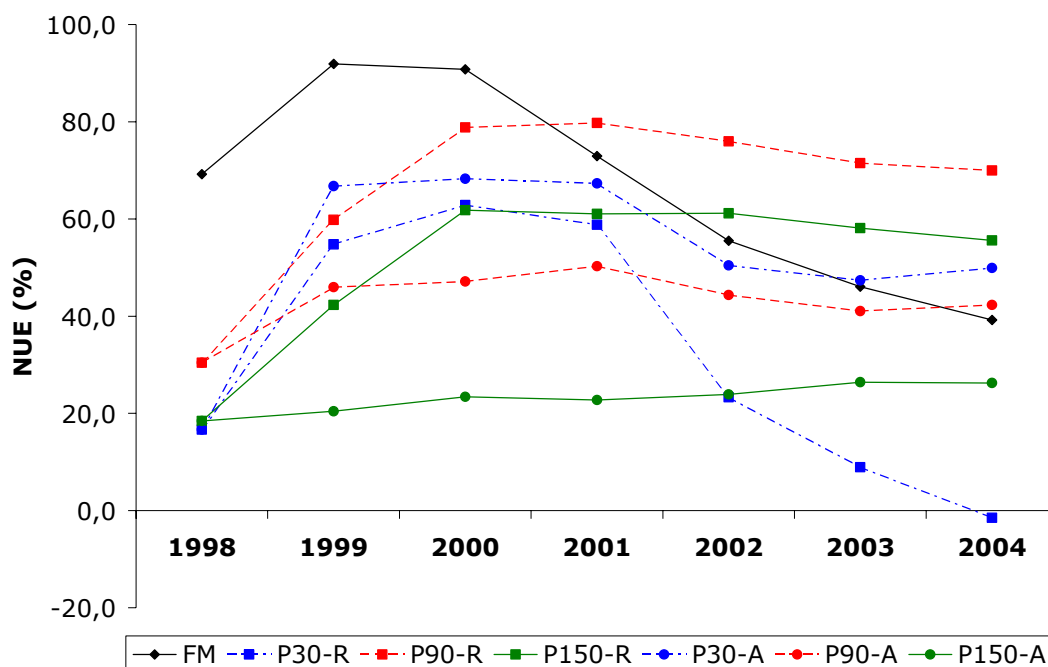
En 2004 se observa un importante descenso de la utilización de nitrógeno y de la eficiencia agronómica en el tratamiento mineral, indicativo de que la respuesta del cultivo se ve afectada negativamente por el mantenimiento del monocultivo durante siete años. La eficiencia agronómica de la fertilización con purín no se diferencia significativamente de la del tratamiento mineral. Una única aplicación de purín a dosis superiores a 90 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> produce un mayor porcentaje de utilización del nitrógeno aplicado, de manera que la adición de purín una vez a las dosis altas es equivalente a la fertilización mineral anual, considerando globalmente el rendimiento y extracción de nitrógeno producidos en siete años. En cambio, una sola aplicación de 30 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> se muestra claramente ineficaz a tan largo plazo.

**Tabla IV.2.30. Eficiencia en la utilización del nitrógeno (NUE, %) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	1998	Residual		Acumulativo	
		2001	2004	2001	2004
<b>FM</b>	69.2 a	72.9	39.2 c	72.9 a	39.2 b
<b>P30</b>	16.7 b	58.8	-1.5 d	67.3 ab	49.9 a
<b>P60</b>	18.2 b	72.3	50.2 bc	44.6 c	40.5 ab
<b>P90</b>	30.4 b	79.8	70.0 a	50.3 bc	42.3 ab
<b>P120</b>	39.8 b	80.3	69.7 ab	38.8 cd	37.4 b
<b>P150</b>	18.5 b	61.0	55.6 abc	22.7 d	26.2 c
<b>Valor p</b>	***	ns	***	***	***

\*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).



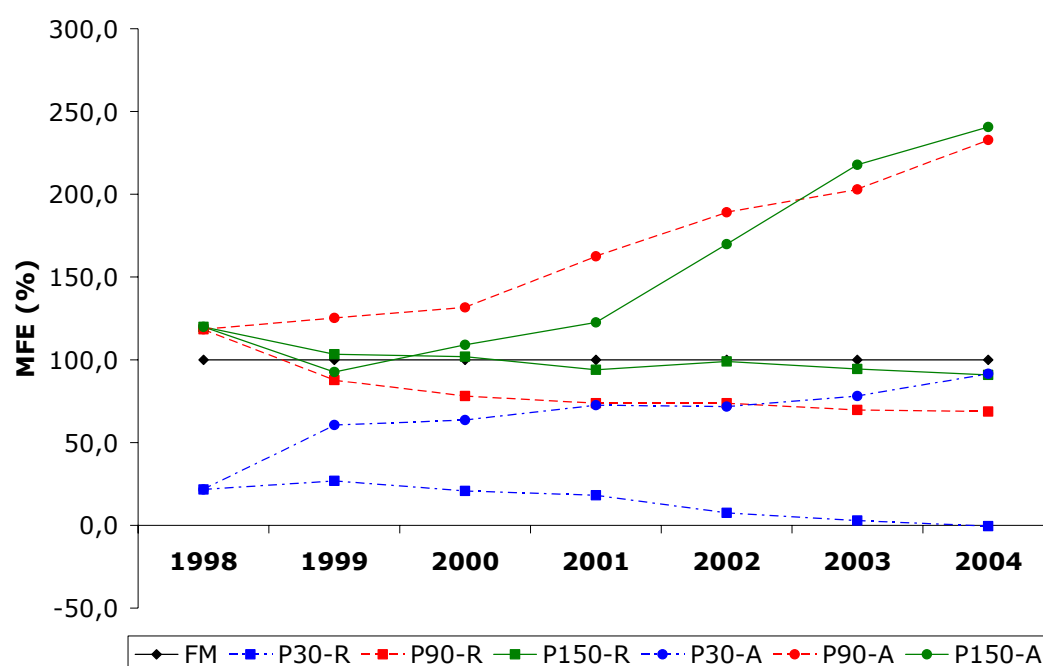
**Figura IV.2.6.** Evolución de la eficiencia en el uso de nitrógeno (NUE) del tratamiento con fertilizante mineral (FM) y de los suelos enmendados con 30, 90, y 150  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$  de purín de cerdo (P30, P90 y P150, respectivamente) una vez al inicio del experimento (efecto residual, R) o anualmente (efecto acumulativo, A).

**Tabla IV.2.31. Equivalencia respecto al fertilizante mineral (MFE, %) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	1998	Residual		Acumulativo	
		2001	2004	2001	2004
<b>FM</b>	100 b	100 a	100 a	100 bc	100 d
<b>P30</b>	22 c	18 b	0 d	73 c	92 d
<b>P60</b>	47 bc	45 b	33 c	96 b	149 c
<b>P90</b>	118 b	74 a	69 b	163 a	233 b
<b>P120</b>	207 a	99 a	91 a	167 a	274 a
<b>P150</b>	120 b	94 a	91 a	123 ab	241 ab
<b>Valor p</b>	***	***	***	***	***

\*\*\*  $p \leq 0.001$ .

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).



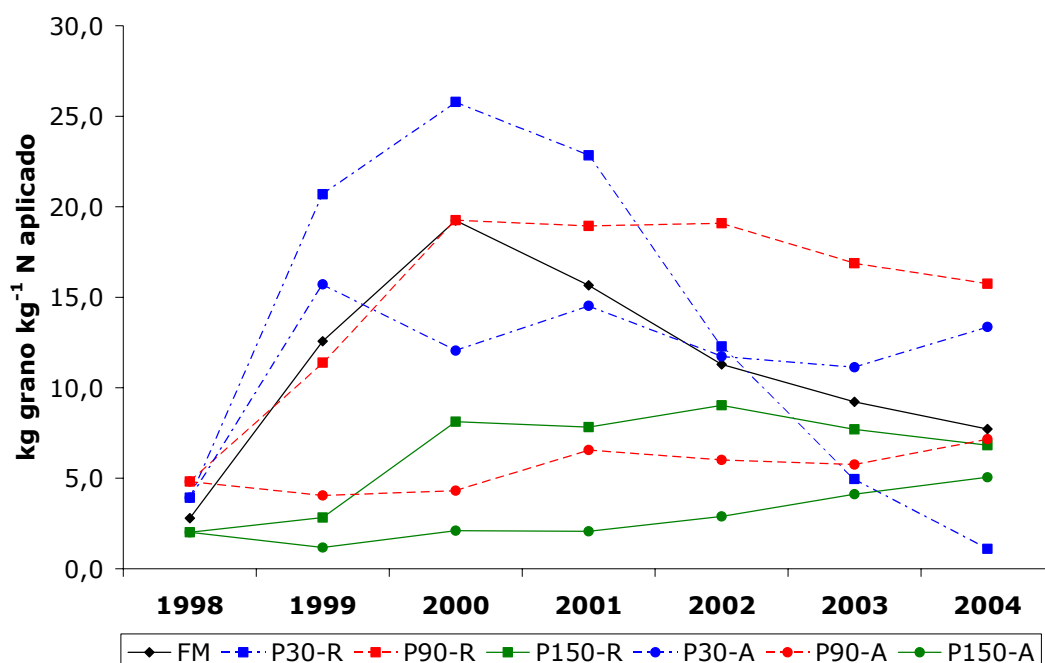
**Figura IV.2.7.** Equivalencia respecto al fertilizante mineral (MFE) del tratamiento con fertilizante mineral (FM) y de los suelos enmendados con 30, 90, y 150  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$  de purín de cerdo (P30, P90 y P150, respectivamente) una vez al inicio del experimento (efecto residual, R) o anualmente (efecto acumulativo, A).

**Tabla IV.2.32. Eficiencia agronómica (AE, kg grano kg<sup>-1</sup> N aplicado) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	1998	Residual		Acumulativo	
		2001	2004	2001	2004
<b>FM</b>	2.8	15.7	7.7	15.7 a	7.7 b
<b>P30</b>	3.9	22.8	1.1	14.5 a	13.4 a
<b>P60</b>	2.2	23.4	14.0	7.2 b	8.7 ab
<b>P90</b>	4.8	18.9	15.7	6.6 b	7.2 b
<b>P120</b>	4.2	11.8	7.7	4.5 b	6.9 b
<b>P150</b>	2.0	7.8	6.8	2.1 b	5.1 b
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	***	**

\*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura IV.2.8.** Evolución de la eficiencia agronómica del tratamiento con fertilizante mineral (FM) y de los suelos enmendados con 30, 90, y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P30, P90 y P150, respectivamente) una vez al inicio del experimento (efecto residual, R) o anualmente (efecto acumulativo, A).

Cuando los suelos reciben purín cuatro años consecutivos, la utilización de nitrógeno y la eficiencia agronómica disminuyen con la dosis de purín; únicamente el tratamiento con la más baja no muestra diferencias significativas en estos parámetros en relación a la fertilización mineral. Respecto al índice MFE, su valor es significativamente superior a 100% en las parcelas tratadas con 90 y 120 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín.

Tras siete años de aplicación consecutiva de purín, el índice NUE también disminuye con la cantidad aplicada, aunque sólo los tratamientos con la dosis mínima y máxima se diferencian significativamente de la fertilización mineral. Aunque la eficiencia agronómica sigue la misma tendencia, se observa que el tratamiento con 30 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín supera al fertilizante mineral. Según los valores de MFE, todos los tratamientos, excepto con la dosis mínima, extraen mayor cantidad total de nitrógeno que la fertilización mineral, llegando casi a triplicarla en el caso de la adición de 120 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>.

En el primer año, la respuesta de los cultivos a la aplicación de residuos orgánicos respecto a la cantidad de nitrógeno añadido no es tan elevada como se esperaría si se aplicara la misma dosis de fertilizante mineral (Mooleki et al., 2004). Con los fertilizantes minerales se obtienen porcentajes de utilización aparente del nitrógeno del orden del 70-80% (Gutser et al., 2005). En el caso del purín de cerdo, este porcentaje disminuye sensiblemente, siendo del 30-40% según Daudén y Quílez (2004) en un cultivo de maíz bajo regadío en condiciones de clima mediterráneo. Por su parte, Mooleki et al. (2002), en un estudio bajo rotación colza-trigo-cebada-colza, obtuvieron un aprovechamiento del 10-40%, menor cuanto mayor fue la dosis de purín, mientras que para el estiércol sólido la utilización del nitrógeno fue incluso menor, del 7-10% (Mooleki et al., 2004).

Como señalan Gutser et al. (2005), el nitrógeno derivado de los residuos orgánicos actúa principalmente a través del *pool* de este elemento en el suelo. Su disponibilidad a corto plazo depende de la cantidad de nitrógeno mineral aportado comparado con el orgánico. Además, parte de la fracción amoniacal del purín es inmovilizado en el suelo debido a la presencia de compuestos orgánicos fácilmente degradables (Sørensen y Amato, 2002). Como consecuencia, la utilización directa en el año de aplicación es relativamente reducida. En años posteriores, el nitrógeno orgánico es mineralizado y se encuentra disponible para las cosechas siguientes, por lo que aumenta su utilización y la eficiencia agronómica de los tratamientos residuales. Sin embargo, cada vez se libera menor cantidad de nitrógeno inorgánico así que el efecto positivo sobre el cultivo disminuye en los últimos años del experimento (Mooleki et al., 2004). Este efecto depende de la dosis inicial de purín, de manera que el tratamiento con 30 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> fue deficitario en nitrógeno disponible para el cultivo.

Por otra parte, en los tratamientos de aplicación acumulada, el nitrógeno inmovilizado en forma orgánica influye sobre el rendimiento del cultivo en años sucesivos (Mooleki et al., 2004). Además del aporte anual con el purín, parte del nitrógeno disponible para la planta procede del inmovilizado anteriormente (Schröder, 2005). La continua mineralización del nitrógeno inmovilizado mejora la disponibilidad de este elemento a lo largo del año y por tanto, los rendimientos de años siguientes, como se refleja en los valores de MFE de los tratamientos acumulativos. No obstante, sin marcaje previo con  $^{15}\text{N}$  es imposible diferenciar el nitrógeno mineral que procede del residuo aportado en el año en curso del que proviene del anterior (Dittert et al., 1998).

La aplicación de mayor cantidad de purín de cerdo no coincide con una mejor respuesta del cultivo en términos de extracción de nitrógeno y producción de grano, es decir mayores NUE y AE (Mooleki et al., 2002). La disminución de estos índices al aumentar la dosis de purín puede deberse a varios factores. Uno de ellos es la capacidad limitada de las plantas para asimilar el nitrógeno aplicado y producir mayor cantidad de grano y compuestos asimilados (proteínas). Otro motivo puede ser la posible inhibición de la mineralización de nitrógeno orgánico debido a la abundancia del mineral (Zaman et al., 1998). Tampoco hay que olvidar que las pérdidas por volatilización del amonio pueden ser importantes (Misselbrook et al., 2005). Por último, hay que considerar que aunque la mineralización del nitrógeno supone una fuente de nutrientes para las plantas, también representa una fuente potencial de pérdidas del mismo, cuando su disponibilidad no coincide con los requerimientos de nitrógeno del cultivo. El tratamiento acumulativo con la dosis máxima exhibe un NUE bajo en todos los años, cercano al 20%, encontrándose un exceso de nitrógeno aplicado, respecto al extraído por el cultivo de cebada, de  $1279 \text{ kg N ha}^{-1}$  al cabo de los siete años estudiados. Este exceso supone que más del 50% del nitrógeno aplicado a lo largo de los siete años no es aprovechado por el cultivo.

### **IV.3. EFECTOS SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL SUELO**

#### **IV.3.1. pH**

El pH del suelo se encuentra entre los factores más importantes capaces de condicionar los procesos que tienen lugar en el mismo, ya que afecta a sus diversas propiedades y a su comportamiento, como movilidad y biodis-

ponibilidad de elementos tóxicos, disponibilidad de nutrientes, dinámica de la materia orgánica, poblaciones microbiológicas, fijación de nitrógeno, etc. (Porta et al., 2003).

La tabla IV.3.1. y la figura IV.3.1 muestran el pH después de cada cosecha en el suelo control, en el abonado con fertilizante mineral y en los enmendados con purín de cerdo.

El suelo control, el del tratamiento mineral y los correspondientes a los tratamientos residuales presentan pH ligeramente ácido en todos los años estudiados, sin que se encuentren diferencias significativas, excepto en 2002. Como ya señaló Plaza (2002), el efecto residual del purín de cerdo sobre el pH del suelo fue efímero, ya que desapareció un año después de la enmienda. En cambio, la adición de purín de cerdo durante cinco, seis y siete años consecutivos provoca un aumento significativo del pH en los suelos fertilizados con dosis altas (igual o superior a  $90 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ ) con respecto al control y a la fertilización mineral, similar al observado en años anteriores.

El aumento de pH en suelos ligeramente ácidos tratados con purín de cerdo y con otros residuos orgánicos ya ha sido señalado por distintos autores, tanto en experimentos de campo como de laboratorio (Whalen et al., 2000; Mokolobate y Haynes, 2002; Castillo et al., 2003; Gagnon, 2004). Sin embargo, en algunos casos se ha observado una disminución significativa tras la aplicación de purín, vinculado a la cantidad de residuo aplicado, tanto en suelos básicos (Saviozzi et al., 1997) como en ligeramente ácidos (Liu et al., 1998). En cualquier caso, parece claro que el purín de cerdo es capaz de alterar el pH del suelo, y que la magnitud y la persistencia de estas modificaciones varían con la composición del residuo, con la frecuencia y dosis de aplicación del mismo y con las características del suelo.

Los mecanismos que regulan el pH del suelo son múltiples y complejos debido a la interrelación entre unos y otros. No obstante, las razones que explican su aumento tras la enmienda con purín no son claras y se han propuesto diversos mecanismos (Mokolobate y Haynes, 2002). El aporte de carbonato cálcico y de otros cationes básicos, presentes en cantidades relativamente altas en el purín, parece ejercer una fuerte influencia sobre el pH de suelos ácidos enmendados con estiércol (Whalen et al., 2000; Castillo et al., 2003). Por otra parte, otros compuestos, tales como aniones de ácidos orgánicos con carboxilos e hidroxilos fenólicos, desempeñan un papel importante en el tamponamiento de la acidez del suelo, bien debido al consumo de protones de los grupos funcionales asociados a los materiales orgánicos (Wong et al., 1998) o bien durante la descarboxilación de ácidos orgánicos (Yan y Schubert, 2000). Otros mecanismos, como la liberación de iones hidróxido debida a la adsorción específica de moléculas orgánicas por



intercambio de ligandos y durante reacciones de reducción en zonas anaerobias localizadas (Haynes y Mokolobate, 2001), parecen ejercer una influencia mínima en las condiciones de estudio.

**Tabla IV.3.1. pH en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

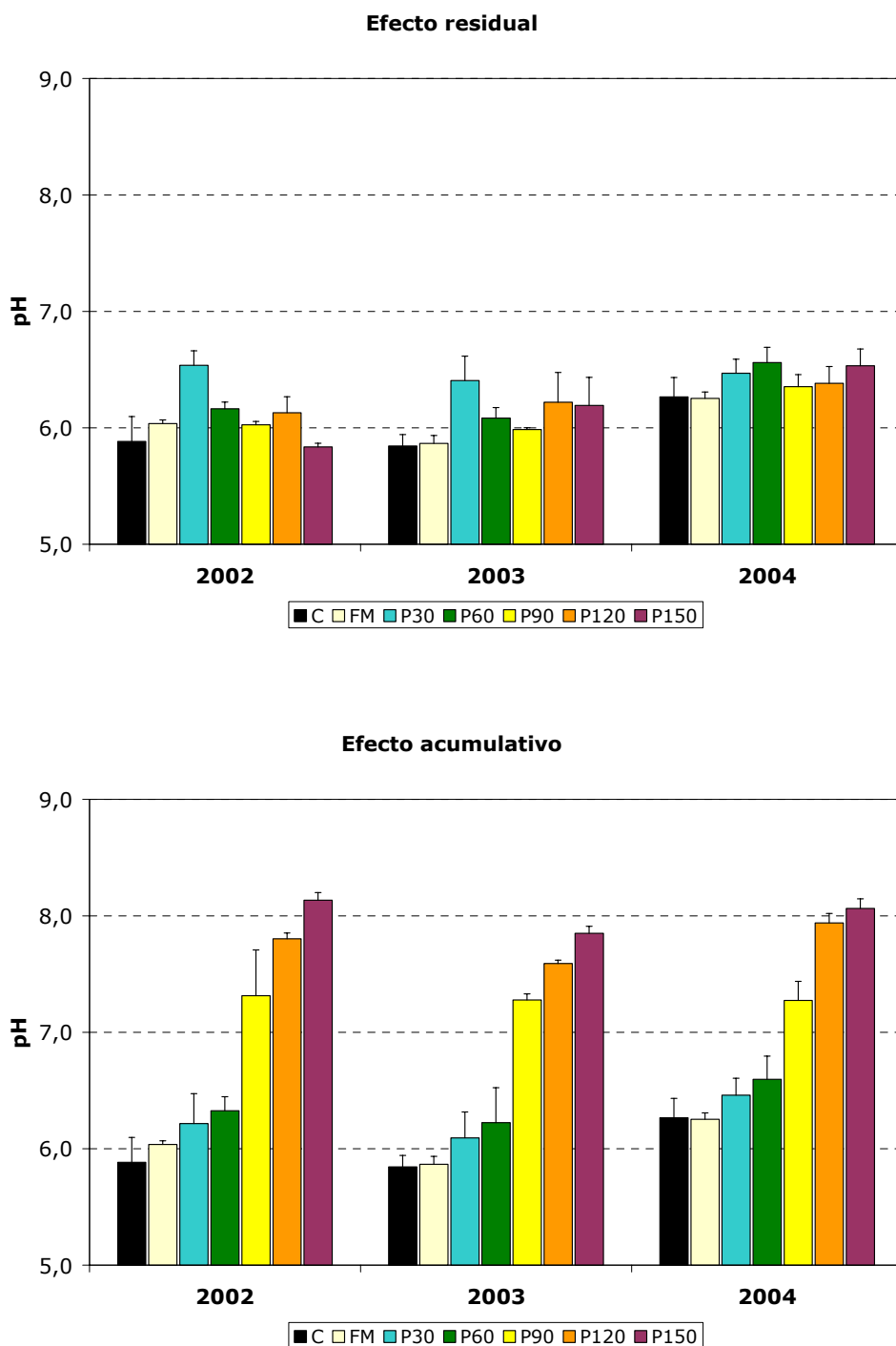
Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	5.82 c	5.84	6.27	5.82 d	5.84 b	6.27 d
<b>FM</b>	6.04 abc	5.87	6.25	6.04 cd	5.87 b	6.25 d
<b>P30</b>	6.35 a	6.27	6.47	6.05 cd	6.16 b	6.46 d
<b>P60</b>	6.16 ab	6.08	6.56	6.33 c	6.32 b	6.60 cd
<b>P90</b>	6.03 abc	5.99	6.35	7.31 b	7.28 a	7.27 bc
<b>P120</b>	6.13 abc	6.09	6.38	7.80 a	7.59 a	7.94 ab
<b>P150</b>	5.84 bc	6.06	6.53	8.13 a	7.85 a	8.06 a
<b>Valor p</b>	***	ns	ns	***	***	***

\*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

Por otra parte, se han citado anteriormente algunos estudios en los que se halló una cierta acidificación del suelo tras la enmienda orgánica. En un experimento de incubación llevado a cabo por Plaza (2002), realizado con el mismo suelo de este experimento y con un purín de características similares, se observó una disminución progresiva del pH en los suelos enmendados tras un aumento inicial, aunque al final de la incubación los valores pH fueron superiores a los del suelo sin enmendar. Se estima que tras la aplicación de este tipo de residuo se dan procesos responsables de la acidificación del suelo, como descarbonatación, nitrificación del amonio (Saviozzi et al., 1997; Liu et al., 1998) y mineralización de la materia orgánica (García-Gil, 2001), con lo cual parece claro que la interacción entre las características del residuo, la dosis del mismo, las propiedades tampón del suelo y el tiempo transcurrido desde la aplicación condicionaría la extensión y el sentido de los procesos de alteración del pH del suelo, resultando finalmente un aumento de este parámetro en los tratamientos acumulativos con las dosis más elevadas.

Como consecuencia del incremento de pH del suelo obtenido tras la adición de purín de cerdo, se mejora la fertilidad del suelo, ya que aumenta



**Figura IV.3.1.** pH del suelo control (C), del abonado con fertilizante mineral (FM) y de los enmendados con 30, 60, 90, 120 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P30, P60, P90, P120 y P150, respectivamente) una vez al inicio del experimento (efecto residual) o anualmente (efecto acumulativo). Las barras indican el error estándar de la media (n=3).

la disponibilidad para la planta de los nutrientes (Whalen et al., 2002), y se reduce la solubilidad de otros elementos fitotóxicos, como el aluminio soluble o intercambiable (Haynes y Mokolobate, 2001), aumentando el rendimiento del cultivo (Liu et al., 2004).

Finalmente, hay que indicar que la cebada tolera un pH comprendido entre 5.5 y 8.8, siendo el crecimiento óptimo para un valor próximo a 7 (Porta et al., 2003), de manera que la enmienda con dosis moderadas de purín (alrededor de  $90 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ ) mejoraría las condiciones de desarrollo del cultivo.

### **IV.3.2. CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA**

Un impacto significativo de la agricultura sobre la calidad del suelo y de los recursos hídricos en ambientes mediterráneos es el incremento de conductividad eléctrica del suelo y la salinización asociada. La acumulación de sales en suelos mediterráneos es un proceso natural favorecido por las condiciones ecológicas de la región (Zalidis et al., 2002). Debido a que el purín de cerdo presenta una elevada concentración de sales, la aplicación de este tipo de productos conlleva un mayor riesgo de salinización de los suelos cuando se incorpora de manera continuada, especialmente en condiciones como las de este estudio, ya que el drenaje está limitado por la escasez de lluvias y la elevada evapotranspiración (Hao y Chang, 2003).

En la tabla IV.3.2 y la figura IV.3.2 se muestra la evolución de los valores de conductividad eléctrica en el suelo durante los tres años. En el control se mantienen niveles de conductividad similares a los del inicio del experimento, a excepción de un ligero incremento el último año. Por su parte, en el tratamiento con fertilizante mineral aumentan levemente, aunque sólo en 2003 es significativamente superior a la del control.

En los suelos de tratamiento residual se encuentra un ligero aumento respecto al control en 2002, mientras que en 2003 y 2004 no se observan diferencias entre ellos. Posiblemente la mineralización de restos orgánicos vegetales haya aportado sales solubles responsables del incremento de conductividad eléctrica en estos suelos (Saviozzi et al., 1997).

En cambio, los suelos que han continuado recibiendo purín anualmente aumentan sus niveles de conductividad eléctrica, en especial en los tratamientos enmendados con las dosis altas, registrándose los valores más elevados en la última campaña. Este incremento de la conductividad eléctrica en suelos enmendados con cantidades crecientes de purín se atribuye a las grandes cantidades de sales solubles aportadas por el residuo.

**Tabla IV.3.2. Conductividad eléctrica ( $\text{dS m}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

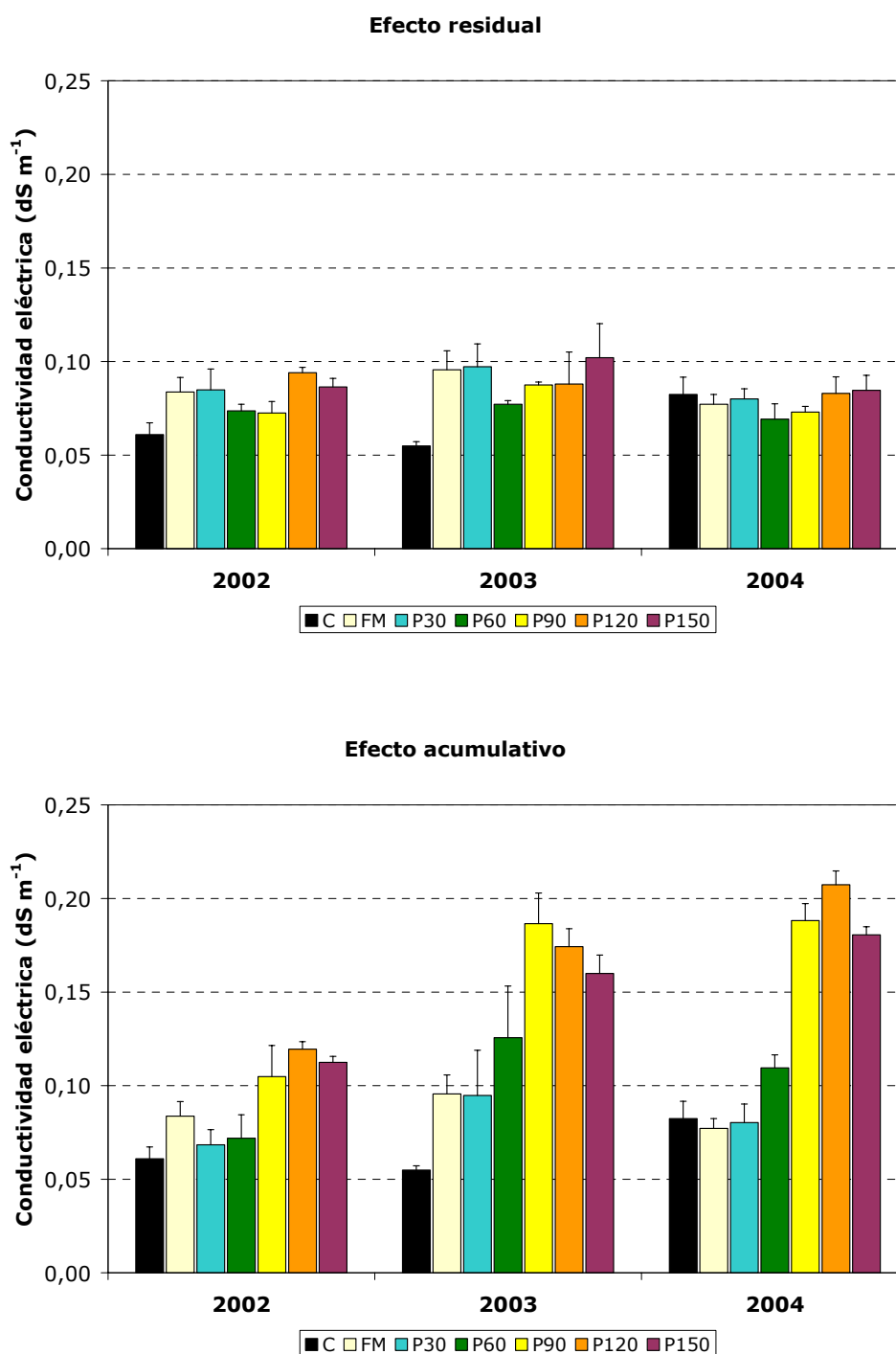
Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	0.061 b	0.055	0.082	0.061 d	0.055 d	0.082 b
<b>FM</b>	0.084 ab	0.096	0.077	0.084 bcd	0.096 cd	0.077 b
<b>P30</b>	0.085 ab	0.097	0.080	0.068 d	0.105 bcd	0.080 b
<b>P60</b>	0.074 ab	0.077	0.069	0.072 cd	0.126 abc	0.110 b
<b>P90</b>	0.073 ab	0.087	0.073	0.105 abc	0.177 a	0.188 a
<b>P120</b>	0.094 a	0.088	0.083	0.120 a	0.174 a	0.207 a
<b>P150</b>	0.086 ab	0.102	0.085	0.112 ab	0.160 ab	0.181 a
<b>Valor p</b>	*	ns	ns	***	***	***

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

Los resultados expuestos se muestran de acuerdo con lo señalado por otros autores (Saviozzi et al., 1997; Hao y Chang, 2003; Díez et al., 2004) que encontraron un aumento de la salinidad en suelos tratados con purín de cerdo, en consonancia con la dosis y la acumulación de las aplicaciones. Debido a la alta movilidad de las sales, los valores de conductividad eléctrica en el suelo se ven afectados no sólo por la aplicación de purín sino también por el movimiento del agua en el mismo. Así, de acuerdo con Hao y Chang (2003), el aumento de conductividad eléctrica de los suelos enmendados con purín es menor en cultivos irrigados que sin riego, pero en cambio este parámetro se eleva en horizontes subsuperficiales, lo que puede comprometer la calidad de las aguas subterráneas (Díez et al., 2004).

La salinización del suelo es un factor importante que reduce su calidad y su productividad (Paranychianakis y Chartzoulakis, 2005). Una salinidad elevada aumenta la presión osmótica de la solución del suelo, dificultando la absorción de agua por las plantas y provocándoles estrés hídrico. Además, se retarda la nascencia y se reduce la capacidad fotosintética del cultivo, lo que conlleva un menor crecimiento y por tanto una productividad más baja de las cosechas (Munns, 2002; Sudhir y Murthy, 2004; Shabala et al., 2005).



**Figura IV.3.2.** Conductividad eléctrica del suelo control (C), del abonado con fertilizante mineral (FM) y de los enmendados con 30, 60, 90, 120 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P30, P60, P90, P120 y P150, respectivamente) una vez al inicio del experimento (efecto residual) o anualmente (efecto acumulativo). Las barras indican el error estándar de la media (n=3).

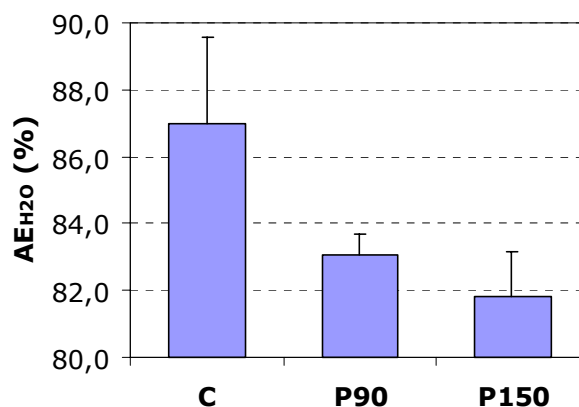
El cultivo de cebada es muy resistente a la salinidad, ya que es capaz de soportar niveles de conductividad eléctrica de hasta  $8 \text{ dS m}^{-1}$ , medido en extracto de pasta saturada (Porta et al., 2003). Aún así, es posible que los niveles de conductividad eléctrica de los tratamientos estudiados hayan sido más elevados a lo largo del ciclo de cultivo, ya que los muestreos se han realizado ocho meses después de la aplicación del purín. Díez et al. (2001) encontraron que la conductividad eléctrica se incrementó a los pocos días de la aplicación del purín, pero disminuyó posteriormente debido al aporte de agua a través de las precipitaciones y el riego. A pesar de ello, los tratamientos con mayor conductividad eléctrica coinciden con los que obtuvieron una producción de cebada más elevada, por lo que se puede afirmar que en este estudio la fertilización con las dosis elevadas de purín no ha supuesto problemas para el desarrollo y crecimiento normal del cultivo.

### **IV.3.3. ESTABILIDAD DE AGREGADOS**

La estructura del suelo ejerce una influencia primordial sobre las condiciones edáficas y ambientales, pudiendo ser sustancialmente modificada a través de las diferentes prácticas de manejo, incluida la adición de residuos orgánicos (Haynes y Naidu, 1998). El índice más empleado para su evaluación es el grado de estabilidad de agregados, referido habitualmente a la fracción comprendida entre 1 y 2 mm (Nimmo y Perkins, 2002). Se distingue de forma general entre microagregados ( $<250 \mu\text{m}$ ) y macroagregados ( $>250 \mu\text{m}$ ), siendo estos últimos más sensibles a cambios en el uso del suelo o de su manejo (Bronick y Lal, 2005). Ya que las alteraciones de los parámetros físicos tienen lugar de manera más lenta y se considera que son más permanentes en el tiempo (Ros, 2000), sólo se ha realizado el análisis de los mismos al final del experimento. Los resultados obtenidos se muestran en la figura IV.3.3. A pesar de que la aplicación de purín produce una cierta disminución del porcentaje de agregados que son estables al agua, el análisis estadístico realizado no demuestra diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre los tres tratamientos estudiados.

Numerosos autores señalan una mejora de la estabilidad de los agregados tras la aplicación de residuos orgánicos (Mbagwu et al., 1994; Haynes y Naidu, 1998; Ros, 2000; Albiach et al., 2001b; Bronick y Lal, 2005); sin embargo, en algunos casos fueron necesarios tratamientos continuados o con dosis elevadas para la consecución de resultados significativos. Deboz et al. (2002) no apreciaron ninguna diferencia en la estabilidad de agregados tras tres años de aplicación continua de compost de residuos urbanos y de lodo de depuradora. Por su parte, Albiach et al. (2001a), en un experimento de diez años de duración en el que se aplicaron

al suelo dosis relativamente elevadas de lodos (hasta 1200 kg N ha<sup>-1</sup>), tampoco detectaron una mejora significativa de este parámetro.



**Figura IV.3.3.** Porcentaje de agregados estables al agua (>250 μm) en la fracción de suelo entre 1 y 2 mm (corregido por la fracción arena, >250 μm), en el suelo control (C) y en los enmendados anualmente con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P90 y P150, respectivamente) durante siete años consecutivos. Las barras indican el error estándar de la media (n=3).

De acuerdo con Mbagwu et al. (1994), la adición de estiércol de cerdo mejoró la resistencia de los macroagregados, hecho atribuido al incremento en el contenido de carbono orgánico total. En general, el aumento de carbono orgánico del suelo se relaciona con el incremento de la agregación (Bronick y Lal, 2005). En este proceso se desarrollan distintos mecanismos físicos, químicos y biológicos en los cuales participan de manera relevante diferentes fracciones orgánicas como carbohidratos y sustancias húmicas. La ligera disminución observada para la estabilidad de agregados en los suelos enmendados con purín podría estar relacionada con la mineralización de la materia orgánica lábil procedente de este residuo y con modificaciones cuantitativas y cualitativas de las distintas fracciones de carbono presentes en el suelo (Haynes y Naidu, 1998).

#### IV.3.4. CAPACIDAD DE RETENCIÓN HÍDRICA.

La capacidad de retención hídrica del suelo es uno de los factores a tener en cuenta en el estudio de las relaciones suelo-planta, especialmente en ambientes semiáridos donde el agua es un factor limitante, debido a las bajas precipitaciones y a la alta evapotranspiración (Ros, 2000). Este parámetro se define como la cantidad de agua que contiene el suelo cuando se somete a diferentes presiones. Desde el punto de vista de su uso por las plantas hay dos niveles de presión entre los cuales las raíces son capaces

de obtener agua: capacidad de campo (porcentaje de humedad retenida a 1/3 atm, pF 2.5) y punto de marchitamiento (porcentaje de humedad retenida a 15 atm, pF 4.2). El porcentaje de agua útil corresponde a la diferencia entre ambos.

Del examen de los resultados obtenidos (tabla IV.3.3 y figura IV.3.4), se señala que la capacidad de retención hídrica del suelo control es baja, debido probablemente al carácter textural arenoso y al escaso contenido de materia orgánica. También se pone de manifiesto que la aplicación continuada de purín de cerdo no ejerce efectos significativos sobre la capacidad de campo, mientras que en el punto de marchitamiento el tratamiento con la dosis más alta posee una capacidad de retención hídrica significativamente más elevada que la correspondiente al suelo control y al enmendado con 90 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>. Sin embargo, aunque el porcentaje de agua útil se incrementa ligeramente en los tratamientos con purín, las diferencias no son estadísticamente significativas.

**Tabla IV.3.3. Capacidad de campo y punto de marchitamiento (%) en 2004, en el suelo control y en los suelos enmendados anualmente con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo. En cursiva, error estándar de la media (n=3).**

Tratamiento	Capacidad de campo (% humedad a 1/3 atm)	Punto de marchitamiento (% humedad a 15 atm)
<b>C</b>	12.6	6.3 b
<b>P90</b>	13.9	6.1 b
<b>P150</b>	15.0	7.8 a
<b>Valor p</b>	ns	*

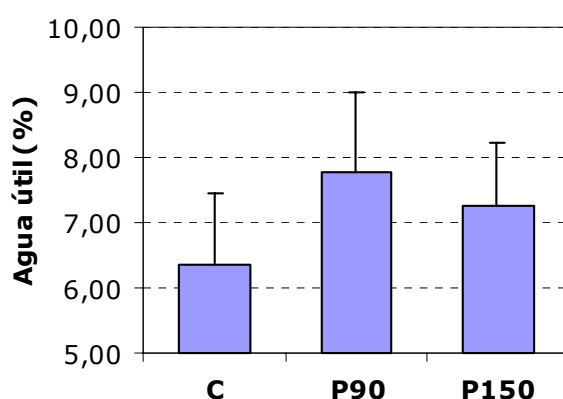
\*  $p \leq 0.05$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

Cuando un suelo recibe enmiendas orgánicas su capacidad de retención hídrica puede alterarse bien de forma inmediata, debido a las propiedades coloidales de los residuos orgánicos aplicados, o bien de forma indirecta, a través de las modificaciones que se puedan producir sobre otras propiedades (Ros, 2000). La incorporación de residuos orgánicos al suelo generalmente produce una mejora en la capacidad de retención hídrica del mismo (Barzegar et al., 2002), consiguiendo un mayor rendimiento de las cosechas (Arriaga y Lowery, 2003) y una menor erosionabilidad (Ros, 2000). Bernal et al. (1992) observaron un aumento de la capacidad de retención de agua de un suelo calcáreo que fue abonado con purín de cerdo, aunque la dosis de residuo a partir de la cual se apreció un efecto significativo fue superior (200 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> por año) a las estudiadas en la



presente experiencia. Mbagwu et al. (1994) también detectaron una mayor capacidad de retención hídrica del suelo con la adición de estiércol porcino a todos los potenciales estudiados, pero no mejoró la cantidad de agua disponible para las plantas. Por último, cabe destacar que Dorado et al. (2003) señalaron la influencia de la adición de nitrógeno sobre la capacidad de retención hídrica, ya que explicaron el aumento de esta propiedad, tras la aplicación de enmiendas orgánicas complementadas con nitrógeno, en función de los cambios inducidos en las características de la fracción húmica, los cuales conducirían a una estabilización de los microagregados.



**Figura IV.3.4.** Porcentaje de agua útil en el suelo control (C) y en los enmendados anualmente con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P90 y P150, respectivamente) durante siete años consecutivos. Las barras indican el error estándar de la media (n=3).

#### IV.4. EFECTOS SOBRE EL ESTADO NUTRICIONAL DEL SUELO

Uno de los mayores beneficios que se pueden obtener de la utilización en agricultura del purín de cerdo es el aporte de nitrógeno al suelo, con el fin de satisfacer los requerimientos nutricionales de los cultivos. Además, este tipo de residuo contiene el resto de macro y micronutrientes que son esenciales para las plantas en proporciones variables. Por ello, se estudia la evolución del nitrógeno en el suelo anualmente y se ha estimado el contenido de otros elementos en el suelo al final del experimento.

### IV.4.1. NITRÓGENO

En la tabla IV.4.1. se muestra el contenido de nitrógeno total en el suelo control y en los enmendados con fertilizante mineral y con purín en el momento de cada cosecha. Si se comparan los resultados con los obtenidos en años anteriores, se observa un ligero descenso en todos los tratamientos, indicando un empobrecimiento del suelo en nutrientes atribuido a la continuidad del sistema de monocultivo. Igualmente, los contenidos en los suelos con tratamientos residuales fueron muy similares a las acumulativas, y dentro de éstas, aunque la concentración de nitrógeno total se eleva ligeramente con la dosis de purín, sólo se produce un aumento significativo respecto al control en los que recibieron la dosis máxima en la cosecha de 2002, a pesar de la elevada cantidad de nitrógeno aportada por las sucesivas incorporaciones de purín.

El hecho de que no se detecten aumentos importantes del contenido de nitrógeno total tras siete años de aplicación continua de purín indica que las pérdidas globales de este elemento a lo largo del ciclo de cultivo pueden ser elevadas, principalmente mediante absorción por el cultivo (Mooleki et al., 2002; Gutser et al., 2005), volatilización de amonio (Misselbrook et al., 2005), lixiviación de nitratos (Dauden y Quílez, 2004; Díez et al., 2004) o desnitrificación (Vallejo et al., 2005). Como se mencionó en la discusión de la eficiencia fertilizante del purín de cerdo (apartado IV.2.4.), la aplicación de la dosis máxima durante siete años consecutivos se traduce en una menor eficacia en el uso del nitrógeno, ya que aproximadamente la mitad del total aplicado no es empleado por el cultivo. A pesar de que en este estudio las pérdidas por lixiviación están limitadas por la baja pluviometría, que la incorporación inmediata del residuo tras la aplicación reduce las pérdidas por volatilización de amonio y que la predominancia de condiciones aerobias minimiza la desnitrificación, no se puede descartar una participación más o menos intensa de los procesos de pérdida de nitrógeno mencionados.

Como se puede observar en la tabla IV.4.2., la concentración de nitratos de los tratamientos residuales no se diferencia significativamente de los niveles medidos en el suelo control y en el de fertilizante mineral. Sin embargo, cuando se repiten las aplicaciones de purín anualmente se produce un claro incremento de esta fracción de nitrógeno, siendo en 2003 significativo para todos los tratamientos acumulativos, a excepción de la dosis de  $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ . Aunque en el último año se repite la misma tendencia, sólo se observan diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos con  $90$  y  $120 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  respecto al control y a la fertilización mineral. En lo que respecta al nitrógeno amoniacal, los niveles medidos son muy bajos y no experimentan diferencias significativas entre los distintos tratamientos y años de experimentación.

**Tabla IV.4.1. Concentración de nitrógeno total ( $\text{g kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	0.92	1.02	0.69	0.92 b	1.02	0.69
<b>FM</b>	1.00	1.14	0.72	1.00 ab	1.14	0.72
<b>P30</b>	0.91	1.11	0.75	1.03 ab	1.04	0.74
<b>P60</b>	0.90	1.11	0.75	1.02 ab	1.15	0.75
<b>P90</b>	1.07	1.14	0.76	1.09 ab	1.19	0.89
<b>P120</b>	0.93	1.16	0.73	1.13 ab	1.26	0.91
<b>P150</b>	0.96	1.09	0.87	1.27 a	1.24	0.97
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	*	ns	ns

\*  $p \leq 0.05$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

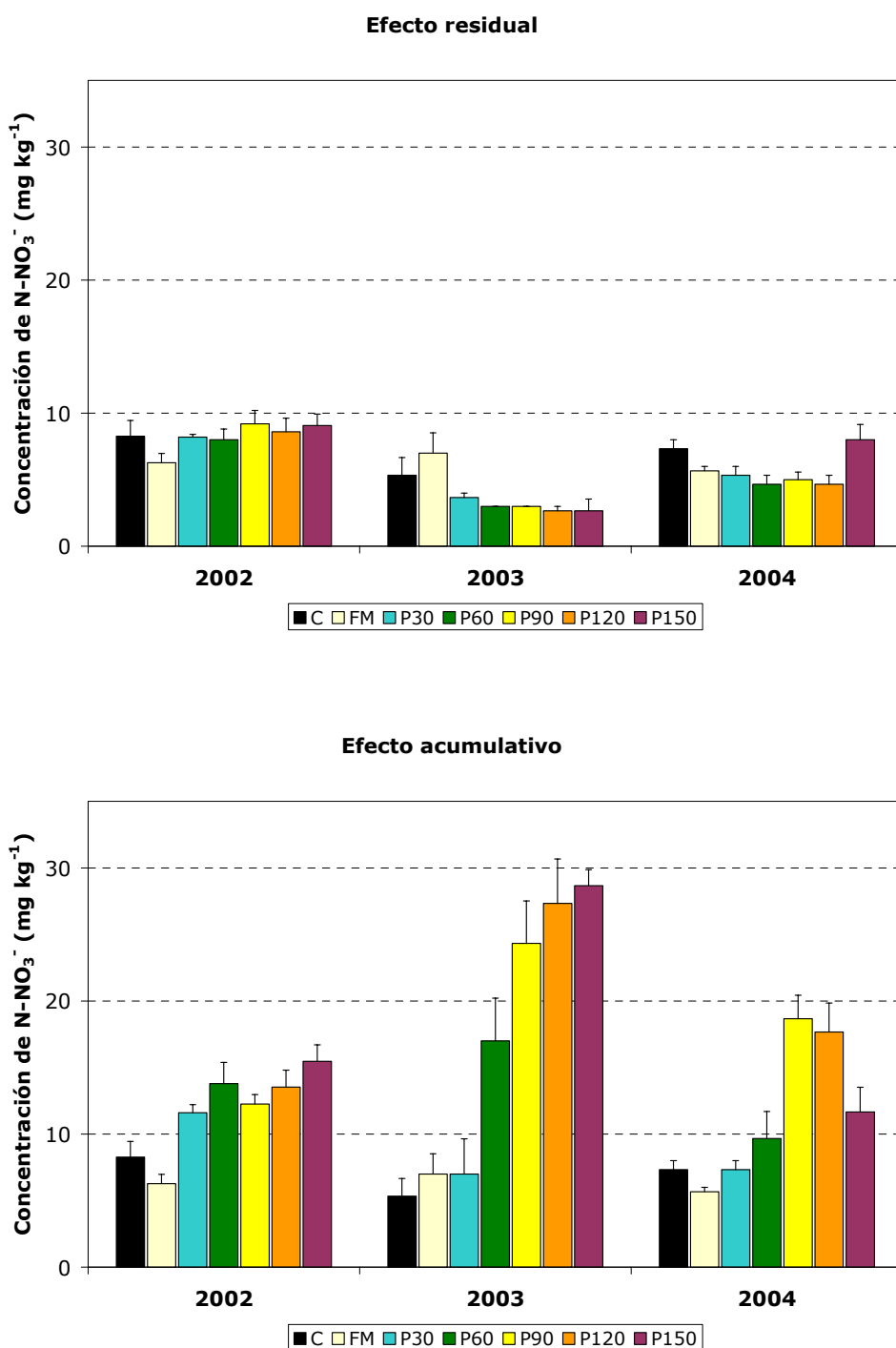
Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.4.2. Concentración de nitrógeno nítrico ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	8	5	7	8 bc	5 b	7 b
<b>FM</b>	6	7	6	6 c	7 b	6 b
<b>P30</b>	8	4	5	12 abc	7 b	7 b
<b>P60</b>	8	3	5	14 ab	17 ab	10 b
<b>P90</b>	9	3	5	12 ab	24 a	19 a
<b>P120</b>	9	3	5	14 ab	27 a	18 a
<b>P150</b>	9	3	8	15 a	29 a	12 ab
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	***	***	***

\*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura IV.4.1.** Concentración de nitrógeno nítrico del suelo control (C), del abonado con fertilizante mineral (FM) y de los enmendados con 30, 60, 90, 120 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P30, P60, P90, P120 y P150, respectivamente) una vez al inicio del experimento (efecto residual) o anualmente (efecto acumulativo). Las barras indican el error estándar de la media (n=3).

Estudios previos de campo muestran un aumento del nitrógeno disponible en suelos enmendados con purín. Mooleki et al. (2002) hallaron un aumento tras la aplicación continuada de dosis crecientes de purín de cerdo durante cuatro años, mientras que cuando las enmiendas se realizaron una única vez, los efectos desaparecieron al segundo año. Daudén y Quílez (2004) señalaron que, aunque la fertilización con purín incrementó la concentración de nitratos del suelo en un ambiente mediterráneo en condiciones de regadío, su contribución a la lixiviación de los mismos no fue superior a la de la fertilización mineral, a pesar de que la cantidad de nitrógeno total aplicado fue más elevada en los tratamientos con purín.

Aunque el principal aporte de nitrógeno se encuentra en forma de amonio, éste se nitrifica rápidamente y como consecuencia aumentan los niveles de nitrógeno nítrico. En 2003 se obtiene un incremento en los contenidos de nitratos de los tratamientos acumulativos con dosis altas, debido a una menor precipitación que limitaría el lavado de los mismos, unido a una menor producción del cultivo que por tanto extrae menor cantidad total de este elemento. Por último, es importante señalar que una parte importante del nitrógeno del purín es inmovilizado por los microorganismos del suelo como consecuencia del aporte de compuestos orgánicos inmediatamente disponibles para la microbiota del suelo (Sørensen y Amato, 2002), constituyendo una reserva en el suelo que tenderá a mineralizarse con el tiempo.

#### **IV.4.2. MACROELEMENTOS ASIMILABLES**

La tabla IV.4.4 muestra la concentración de fósforo y potasio asimilables en el suelo después de la última cosecha, mientras que los resultados correspondientes al calcio, magnesio y sodio se exponen en la tabla IV.4.5.

Se detecta una mayor concentración del fósforo asimilable con los tratamientos de efecto residual que recibieron 120 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>, similar al que se puso de manifiesto a los cuatro años de la adición de purín (Plaza, 2002). Los suelos enmendados de manera consecutiva muestran un aumento significativo de la concentración de fósforo con la dosis de purín, tal y como han señalado otros autores (Liu et al., 1998; Anderson y Wu, 2001; Whalen y Chang, 2001). La elevada disponibilidad del fósforo en los suelos que han recibido mayores cantidades de purín depende, por una parte, de la contribución directa del residuo a través de formas solubles, de la mineralización del fósforo orgánico aportado y del inmovilizado por los microorganismos y, por otra, de la alteración de la capacidad del suelo para adsorberlo y de la presencia de calcio, hierro y aluminio que puedan ligarse al mismo (Gagnon, 2004; Murphy et al., 2005).

**Tabla IV.4.4. Concentración de fósforo y potasio asimilables ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en 2004.**

Tratamiento	P		K	
	Residual	Acumulativo	Residual	Acumulativo
<b>C</b>	108 b	108 b	313 c	313
<b>FM</b>	85 b	85 b	368 bc	368
<b>P30</b>	110 b	100 b	387 abc	328
<b>P60</b>	108 b	238 ab	425 ab	430
<b>P90</b>	133 ab	365 ab	437 ab	493
<b>P120</b>	212 a	510 a	467 ab	410
<b>P150</b>	208 a	502 a	475 a	313
<b>Valor p</b>	*	***	***	ns

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.4.5. Concentración de calcio, magnesio y sodio asimilables en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en 2004.**

Tratamiento	Ca		Mg		Na	
	Residual	Acumulativo	Residual	Acumulativo	Residual	Acumulativo
<b>C</b>	1613	1613 b	219	219	13	13 b
<b>FM</b>	2117	2117 b	321	321	13	13 b
<b>P30</b>	2470	1417 b	340	188	15	18 ab
<b>P60</b>	1660	1450 b	336	204	13	23 ab
<b>P90</b>	1987	2043 b	324	218	17	27 ab
<b>P120</b>	1587	3627 ab	253	203	12	28 ab
<b>P150</b>	1903	4610 a	300	197	12	32 a
<b>Valor p</b>	ns	**	ns	ns	ns	**

\*\*  $p \leq 0.01$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

Respecto al resto de macroelementos estudiados, en los suelos de efecto residual se encuentran concentraciones de potasio significativamente más elevadas que el control en los tratamientos con dosis igual o superior a  $60 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ ; sin embargo, los análisis realizados tras la cosecha de 2001 no mostraron diferencias significativas debidas al tratamiento en la concentración de dicho elemento (Plaza, 2002). Por el contrario, el empleo de purín no afecta a la concentración en el suelo de ninguno de los demás elementos después de siete años.

Cuando la aplicación de purín se realizó de manera consecutiva durante siete años, las diferencias encontradas en los contenidos de potasio y magnesio asimilables en el suelo no son significativas. En cambio, se incrementan de manera importante las fracciones de calcio y sodio asimilables al aumentar la dosis de purín, debido al aporte de estos elementos con el residuo (Whalen et al., 2000) y que, especialmente en el caso del sodio, se asocian al aumento de la conductividad eléctrica del suelo (Díez et al., 2004). En cambio, aunque el purín suministra gran cantidad de potasio, no se detecta una acumulación del mismo en el suelo, posiblemente debido a la absorción de este elemento por el cultivo ya en el purín se encuentra en formas inmediatamente asimilables por la planta.

### **IV.4.3. MICROELEMENTOS**

#### **IV.4.3.1. Microelementos totales**

Un indicador que, pese a sus limitaciones, sigue proporcionando información valiosa es el contenido total de cada metal pesado en el suelo. Aunque esta determinación no proporciona información sobre la movilidad en el mismo, ni sobre la biodisponibilidad para las plantas, un análisis periódico de los contenidos totales sirve para hacer un seguimiento de contaminación (López y Grau, 2004).

Al igual que los macronutrientes asimilables, sólo se han analizado los contenidos en los suelos recogidos tras la última cosecha. Las tablas IV.4.6. y IV.4.7 muestran la concentración total de hierro, manganeso, zinc y cobre correspondientes a los suelos enmendados con purín, así como los de los tratamientos control y fertilización mineral. En los suelos que recibieron una única aplicación de purín, los contenidos de los microelementos analizados no experimentan variaciones significativas.

Cuando los suelos recibieron aportes consecutivos de purín de cerdo, los contenidos totales de hierro, manganeso y zinc apenas se incrementan al aumentar la dosis de residuo, dado que las cantidades incorporadas con el purín, en comparación con el contenido inicial del suelo, fueron muy bajas (L'Herroux et al., 1997). Únicamente la cantidad de cobre de los suelos

enmendados con las dosis más altas (mayor o igual a  $90 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ ) es significativamente superior a la detectada en el control y en la fertilización mineral, aunque en ningún caso alcanza niveles que pudieran suponer un riesgo de fitotoxicidad (Kabata-Pendias y Pendias, 2001) ni supera los contenidos medios encontrados por López y Grau (2004) en suelos de la provincia de Toledo ( $9.8 \text{ mg kg}^{-1}$  de cobre).

#### **IV.4.3.2. Microelementos potencialmente asimilables**

La concentración de microelementos extraíbles con DTPA se considera como la fracción potencialmente asimilable, ligada débilmente a la materia orgánica del suelo, y permite evaluar la movilidad y biodisponibilidad de cada elemento en el suelo.

La tabla IV.4.8. refleja los contenidos potencialmente asimilables de hierro y manganeso, transcurridos siete años desde el inicio del experimento, mientras la concentración de zinc y cobre extraíble con DTPA se recoge en la tabla IV.4.9. La figura IV.4.2. representa la evolución de los micronutrientes potencialmente asimilables durante todo el experimento.

En los suelos en las que se estudia el efecto residual de la aplicación de purín, ninguno de los microelementos estudiados muestra diferencias significativas debidas a los diversos tratamientos, con la excepción del zinc. En este caso las diferencias se reducen a una mayor concentración en el tratamiento de fertilización mineral con respecto al que recibió  $60 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  de purín. Según los resultados correspondientes a los suelos de efecto acumulativo, se comprueba cómo las concentraciones de hierro y manganeso extraíbles con DTPA al cabo de siete años experimentan variaciones debidas a la dosis de purín en sentido contrario a las que se observan para los contenidos de cobre y zinc. La concentración de hierro extraíble en los suelos que recibieron las dosis más elevadas de purín experimentan un marcado descenso respecto al resto de tratamientos, similar a las variaciones detectadas en la fracción de manganeso. El aumento de pH debido a la adición de purín favorece la oxidación de formas disponibles, disminuyendo la fracción fácilmente asimilable de hierro y manganeso en las parcelas que han sido enmendadas (Gagnon, 2004; Moreno-Caselles et al., 2005). Los niveles de manganeso son equivalentes a los observados en años anteriores, en contraste con los valores encontrados para el hierro, ya que incluso el tratamiento control disminuye respecto a análisis previos (figura IV.4.2).

Al contrario de lo ocurrido con el hierro y el manganeso, tanto el zinc como el cobre potencialmente asimilables experimentan un ligero aumento respecto al suelo control y al fertilizante mineral, que únicamente alcanza a



**Tabla IV.4.6. Concentración total de hierro y manganeso ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en 2004.**

Tratamiento	Fe		Mn	
	Residual	Acumulativo	Residual	Acumulativo
<b>C</b>	10565	10565	170	170
<b>FM</b>	12762	12762	159	159
<b>P30</b>	12562	9674	147	183
<b>P60</b>	13531	8250	168	161
<b>P90</b>	13422	9478	169	181
<b>P120</b>	11118	10974	164	191
<b>P150</b>	10835	12240	169	204
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	ns

ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.4.7. Concentración total de zinc y cobre ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en 2004.**

Tratamiento	Zn		Cu	
	Residual	Acumulativo	Residual	Acumulativo
<b>C</b>	23	23	5	5 b
<b>FM</b>	27	27	5	5 b
<b>P30</b>	26	22	5	6 ab
<b>P60</b>	29	23	7	7 ab
<b>P90</b>	29	30	7	9 a
<b>P120</b>	27	31	6	9 a
<b>P150</b>	25	35	7	9 a
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	***

\*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.4.8. Concentración de hierro y manganeso extraíbles con DTPA ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en 2004.**

Tratamiento	Fe		Mn	
	Residual	Acumulativo	Residual	Acumulativo
<b>C</b>	30	30 ab	25	25 a
<b>FM</b>	33	33 a	19	19 a
<b>P30</b>	36	28 a	15	30 a
<b>P60</b>	37	23 a	15	27 a
<b>P90</b>	38	13 bc	18	17 ab
<b>P120</b>	33	2 c	20	4 bc
<b>P150</b>	32	2 c	20	3 c
<b>Valor p</b>	ns	*	ns	**

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

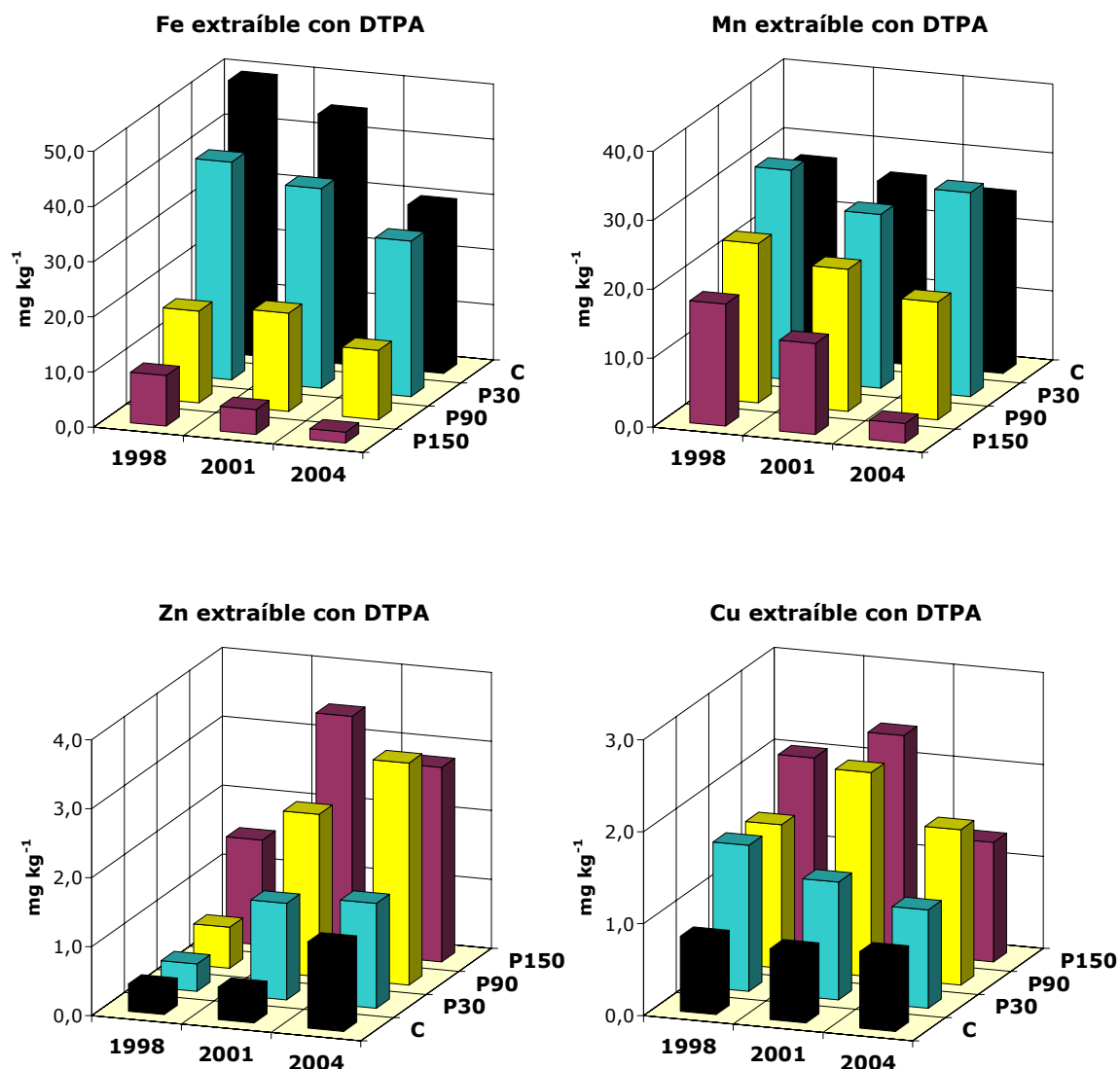
Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.4.9. Concentración de zinc y cobre extraíbles con DTPA ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en 2004.**

Tratamiento	Zn		Cu	
	Residual	Acumulativo	Residual	Acumulativo
<b>C</b>	1.3 ab	1.3	0.8	0.8 ab
<b>FM</b>	2.0 a	2.0	0.6	0.6 b
<b>P30</b>	1.2 ab	1.5	0.6	1.1 ab
<b>P60</b>	0.6 b	3.0	0.8	1.5 a
<b>P90</b>	1.0 ab	3.2	0.8	1.7 a
<b>P120</b>	1.3 ab	2.9	0.8	1.3 ab
<b>P150</b>	1.0 ab	2.8	0.9	1.3 ab
<b>Valor p</b>	*	ns	ns	**

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura IV.4.2.** Concentración de hierro, manganeso, zinc y cobre potencialmente asimilables del suelo control (C) y de los enmendados anualmente una, cuatro o siete veces consecutivas con 30, 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P30, P90 y P150, respectivamente).

ser significativo en el caso del cobre. Tampoco tiene lugar una acumulación de ninguno de estos dos metales respecto a los contenidos detectados en años anteriores (figura IV.4.2). El incremento de la cantidad de cobre y zinc extraíble con DTPA se relaciona con la concentración de dichos elementos en el purín y también con cambios en las propiedades de la materia orgánica de los suelos enmendados (Gagnon, 2004), potenciando su biodisponibilidad. Por otra parte, el incremento de cobre y zinc asimilables

en el suelo puede ser responsable de su aumento en la planta y de su acumulación en el grano, indicando la existencia de una notable traslocación de estos elementos (Antolín et al., 2005).

## **IV.5. EFECTOS SOBRE LA MATERIA ORGÁNICA**

En este apartado se estudia la evolución de distintas fracciones de carbono que forman parte de la materia orgánica del suelo, una vez incorporado el purín de cerdo. Se ha determinado el contenido de carbono orgánico total después de la cosecha en los tres años estudiados. También se ha analizado el carbono de las sustancias húmicas (ácidos húmicos y fúlvicos) y se ha llevado a cabo la caracterización estructural y funcional de los mismos. Por último, se ha evaluado la fracción fácilmente biodegradable integrada por el carbono hidrosoluble, carbohidratos y fenoles.

### **IV.5.1. CARBONO ORGÁNICO TOTAL**

La tabla IV.5.1 presenta la evolución de los contenidos de carbono orgánico total en el suelo en los tres años objeto de estudio. No se ponen de manifiesto variaciones importantes en este parámetro debidas a los tratamientos, a excepción de un incremento significativo en los residuales correspondientes a las dosis de 120 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> en 2002. En esta campaña y en la de 2003 se detecta un menor contenido en carbono orgánico total en los suelos enmendados anualmente con la dosis más alta, aunque las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas. Por el contrario, en 2004 los resultados sugieren un aumento del carbono orgánico total con la aplicación consecutiva de purín, aunque no es significativo.

En cualquier caso, no es de esperar un aumento importante de la cantidad total de materia orgánica del suelo debido al aporte escaso de carbono con el purín: de 162 (dosis 30 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) a 810 kg C ha<sup>-1</sup> (dosis 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) en 2002, de 93 a 465 kg C ha<sup>-1</sup> en 2003, y de 81 a 405 kg C ha<sup>-1</sup> en 2004. Supondría, en el caso de la dosis más alta, un incremento de entre 1.3% y 2.5% respecto al contenido de carbono del suelo control.

Por otra parte, en este tipo de estudios de campo no se puede olvidar que existen otras fuentes potenciales de carbono, como la incorporación de masa radicular de cosechas anteriores (proporcional al rendimiento de cosecha del año anterior) y, en algunos casos, de restos de paja en cantidades variables, así como de exudados radiculares a lo largo del ciclo

de cultivo. Esta influencia se hace evidente en los tratamientos residuales en 2002, debido a que el año anterior se obtuvo un rendimiento de cosecha escaso y no se retiraron completamente los restos de paja de las parcelas. Igualmente, la elevada producción vegetal en la cosecha de 2002 explicaría el incremento de carbono orgánico total registrado en todos los tratamientos en el momento de la cosecha de 2003, ya que la cantidad de restos radiculares en el suelo sería consecuentemente elevada.

**Tabla IV.5.1. Contenido de carbono orgánico total ( $\text{g kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

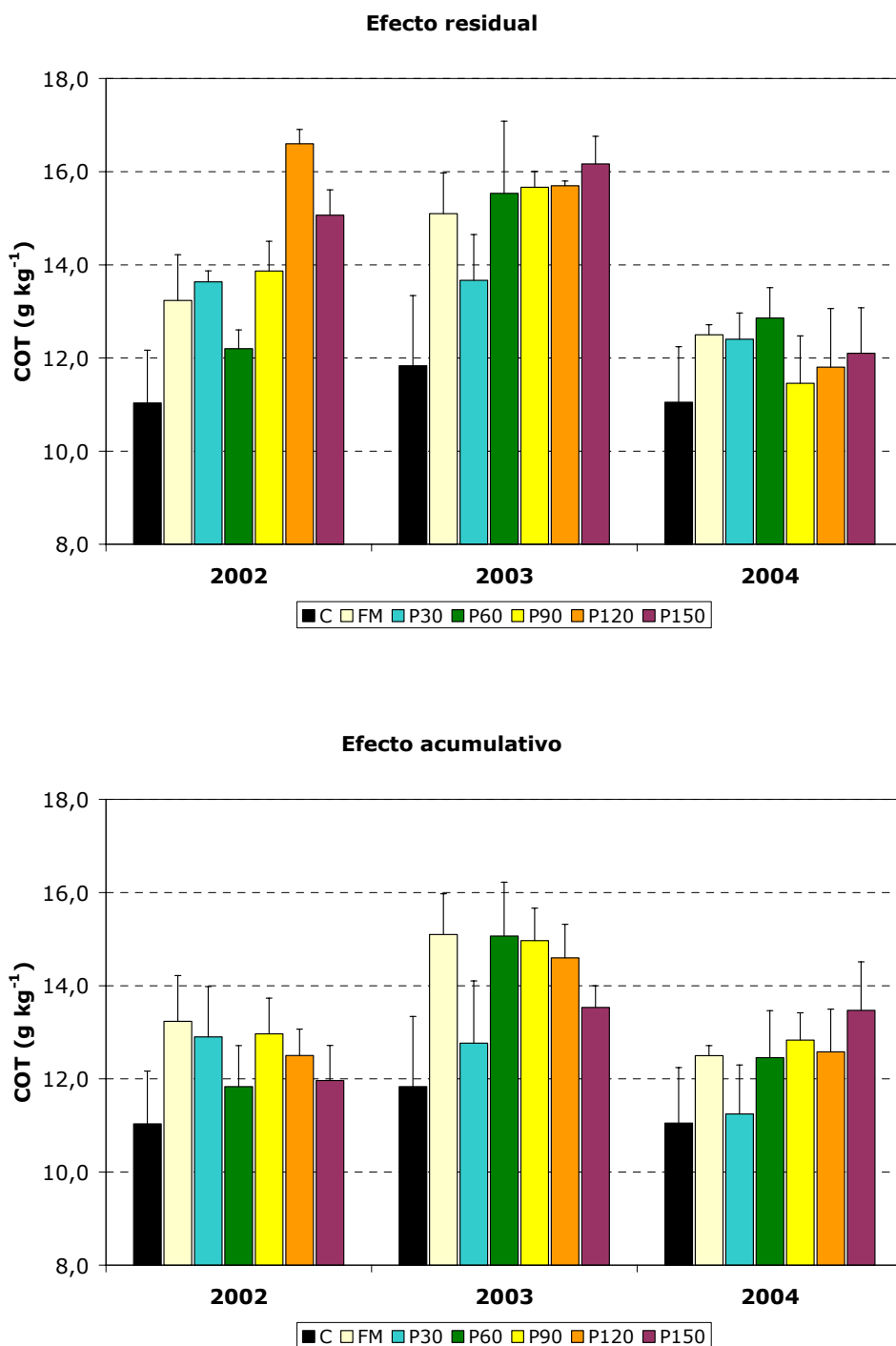
Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	11.0 c	11.8	11.1	11.0	11.8	11.1
<b>FM</b>	13.2 abc	15.1	12.5	13.2	15.1	12.5
<b>P30</b>	13.6 abc	13.7	12.4	12.9	12.8	11.2
<b>P60</b>	12.2 bc	15.5	12.9	11.8	15.1	12.5
<b>P90</b>	13.9 abc	15.7	11.5	13.0	15.0	12.8
<b>P120</b>	16.6 a	15.7	11.8	12.5	14.6	12.6
<b>P150</b>	15.1 ab	16.2	12.1	12.0	13.5	13.5
<b>Valor p</b>	**	ns	ns	ns	ns	ns

\*\*  $p \leq 0.01$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

Rochette et al. (2000) no encontraron aumentos significativos del contenido total de carbono tras 19 años consecutivos de aplicación de estiércol a dosis de 60 y 120  $\text{t ha}^{-1} \text{año}^{-1}$ . Glaser et al. (2001) obtuvieron un ligero aumento del carbono orgánico total, aunque no significativo, en parcelas enmendadas con 50  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$  de estiércol líquido, equivalente al aporte de 11  $\text{kg C ha}^{-1}$ . Por el contrario, Martínez y Peu (2000) lograron un incremento del contenido de carbono en un experimento de ocho años de duración, en el que el suelo fue enmendado con purín de cerdo, aunque el aporte de carbono fue muy superior al de este experimento (23  $\text{t C ha}^{-1} \text{año}^{-1}$ ).

Por otra parte, es interesante señalar que a pesar de que el contenido total de carbono no se altere, la estabilidad de la materia orgánica nativa puede variar con la aplicación de nitrógeno, presente en elevadas cantidades en el purín de cerdo. Como señalaron Neff et al. (2002), la



**Figura IV.5.1.** Contenido de carbono orgánico total (COT) del suelo control (C), del abonado con fertilizante mineral (FM) y de los enmendados con 30, 60, 90, 120 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P30, P60, P90, P120 y P150, respectivamente) una vez al inicio del experimento (efecto residual) o anualmente (efecto acumulativo). Las barras indican el error estándar de la media (n=3).

fertilización nitrogenada aceleró la descomposición de fracciones ligeras de carbono (polisacáridos y otros residuos vegetales) y aumentó la estabilización de algunas formas de carbono en fracciones más pesadas asociadas a la fracción mineral, sin que se advirtieran cambios significativos en el contenido total de carbono.

En este sentido, la elevada disponibilidad de nitrógeno en el residuo unida a una materia orgánica poco estabilizada y a condiciones ambientales y de manejo del suelo que favorecen la mineralización frente a la humificación motiva que la aplicación de elevadas cantidades de purín pueda originar un descenso significativo del contenido de carbono orgánico total. Este efecto se observó en los primeros años del experimento (Plaza, 2002), como consecuencia de la estimulación de la mineralización (*priming effect*) de la materia orgánica nativa (Kuzyakov et al., 2000; Fontaine et al., 2004).

#### **IV.5.2. CARBONO DE LAS SUSTANCIAS HÚMICAS**

En este estudio, el carbono de las sustancias húmicas se refiere al extraíble con pirofosfato sódico 0.1 M. A la fracción orgánica de este extracto precipitada a pH 1 se ha considerado como ácidos húmicos, mientras que la no precipitada se ha calificado como ácidos fúlvicos, si bien en ambos casos se encuentran otras sustancias orgánicas que no poseen las características propias de estos compuestos.

En las tablas IV.5.2, IV.5.3 y IV.5.4 se presentan respectivamente los contenidos de carbono de las sustancias húmicas, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, en el suelo control y en los enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en el momento de cada cosecha.

Sólo se encuentran diferencias significativas en los niveles de carbono de las sustancias húmicas entre los tratamientos residuales en la cosecha de 2002. Cabe señalar un ligero descenso, no significativo, de esta variable en los tratamientos acumulativos con las dosis más altas (figura IV.5.2), en los tres años estudiados. También resulta llamativo que en 2003 aumente este parámetro en los tratamientos acumulativos y en las parcelas control y de fertilización mineral, respecto a los niveles registrados en años anteriores, volviendo a descender al año siguiente.

Según los resultados obtenidos, el carbono de las sustancias húmicas refleja la misma dinámica que el total, mostrando una correlación significativa positiva entre ambas variables en 2002 y 2003 (tablas IV.8.7. y IV.8.8.). El incremento generalizado en los suelos en 2003 está posiblemente relacionado con elevado aporte de restos vegetales proce-

dentos de la cosecha del año anterior (García-Gil, 2001), aunque este incremento sea transitorio.

**Tabla IV.5.2. Contenido de carbono de las sustancias húmicas ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	2143 c	2543	2217	2143	2543	2217
<b>FM</b>	2256 bc	2684	2344	2256	2684	2344
<b>P30</b>	2015 c	2567	2471	2567	2796	2479
<b>P60</b>	2822 ab	2863	2380	2601	2892	2580
<b>P90</b>	3091 a	2906	2346	2683	2712	2755
<b>P120</b>	3171 a	2794	2599	2472	2756	2403
<b>P150</b>	3303 a	2861	2709	2262	2428	2246
<b>Valor p</b>	***	ns	ns	ns	ns	ns

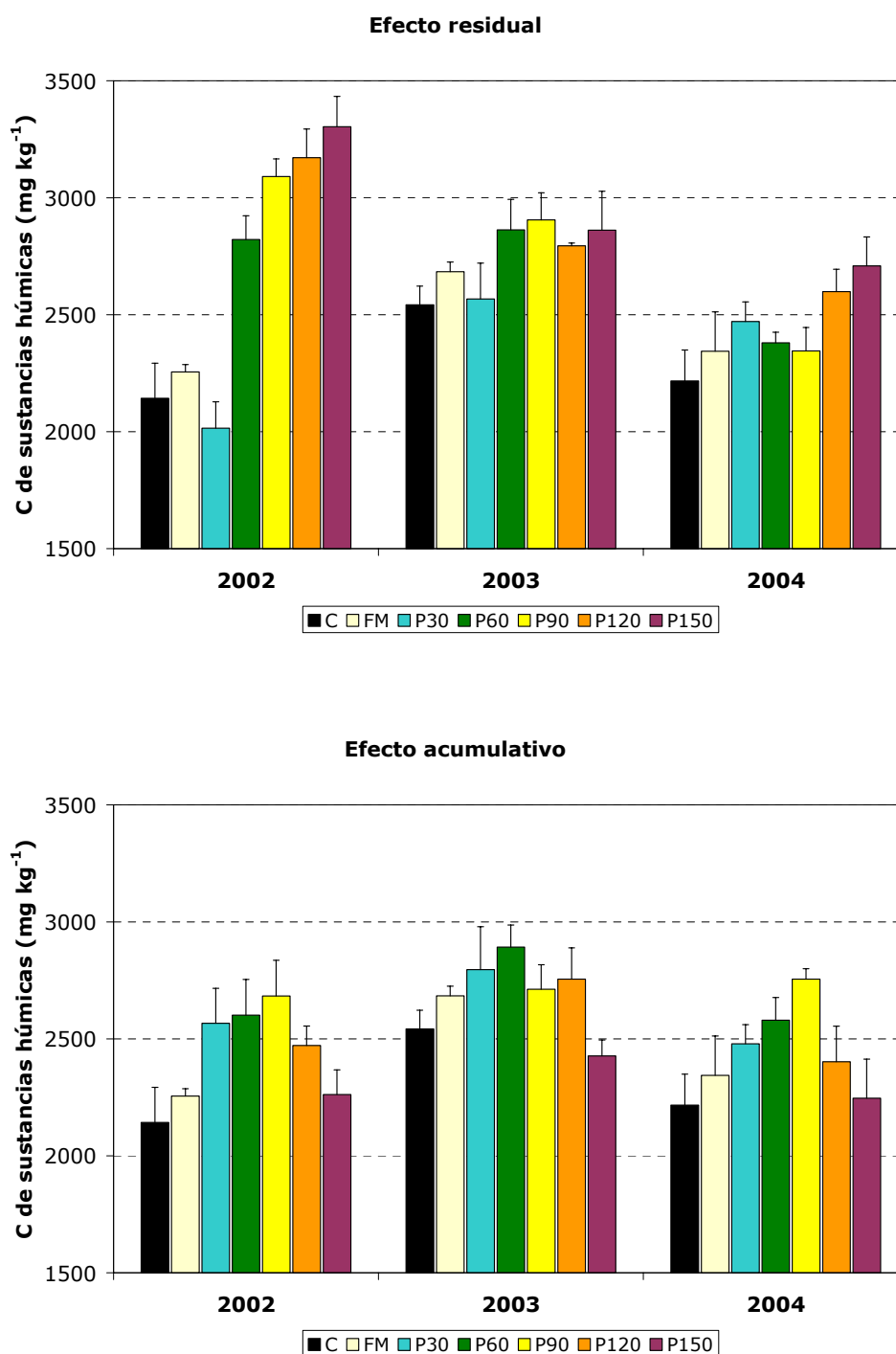
\*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

Respecto al contenido de carbono de los ácidos húmicos (tabla IV.5.3), el análisis estadístico muestra un aumento significativo en 2002, tanto en los suelos de efecto residual como en los de efecto acumulativo. Dentro de éstos, se alcanza la máxima concentración en el tratamiento con  $90 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ , descendiendo ligeramente a dosis superiores. Tanto en 2003 como en 2004 el contenido mínimo se registra en los suelos que recibieron la dosis máxima de purín de manera consecutiva, indicando una posible mineralización de las sustancias húmicas nativas.

En lo que se refiere al carbono de los ácidos fúlvicos (tabla IV.5.4.), los resultados obtenidos en 2002 revelan un aumento de este parámetro en los tratamientos residuales y un descenso con la dosis en los acumulativos. En las siguientes cosechas, las diferencias entre ambos bloques se atenúan. Además, los tratamientos con dosis altas acumulativas incrementan ligeramente el contenido medio de ácidos fúlvicos. El análisis de los tratamientos acumulativos ((tablas IV.8.7., IV.8.8. y IV.8.9.) muestra correlaciones significativas y positivas entre el carbono de las sustancias húmicas y el de ácidos húmicos, mientras que el de los ácidos fúlvicos no correlaciona con ninguna otra fracción húmica, y únicamente en 2004 con el total.





**Figura IV.5.2.** Contenido de carbono de las sustancias húmicas del suelo control (C), del abonado con fertilizante mineral (FM) y de los enmendados con 30, 60, 90, 120 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P30, P60, P90, P120 y P150, respectivamente) una vez al inicio del experimento (efecto residual) o anualmente (efecto acumulativo). Las barras indican el error estándar de la media (n=3).

**Tabla IV.5.3. Contenido de carbono de los ácidos húmicos (mg kg<sup>-1</sup>) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	1189 bc	1639	1289	1189 bc	1639	1289 ab
<b>FM</b>	1104 c	1776	1493	1104 c	1776	1493 ab
<b>P30</b>	903 c	1472	1631	1600 abc	1798	1707 ab
<b>P60</b>	1655 ab	1560	1533	1802 ab	2023	1691 ab
<b>P90</b>	1825 a	1603	1472	1886 a	1758	1830 a
<b>P120</b>	1966 a	1677	1773	1752 ab	1718	1598 ab
<b>P150</b>	2127 a	1799	1854	1508 abc	1362	1071 b
<b>Valor p</b>	***	ns	ns	**	ns	**

\*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.5.4. Contenido de carbono de los ácidos fúlvicos (mg kg<sup>-1</sup>) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	954 b	904 b	927	954 abc	904	927 b
<b>FM</b>	1152 ab	908 b	851	1152 a	908	851 b
<b>P30</b>	1113 ab	1095 ab	840	967 ab	998	773 b
<b>P60</b>	1166 ab	1303 a	847	800 bcd	869	888 b
<b>P90</b>	1265 a	1303 a	874	797 bcd	954	925 b
<b>P120</b>	1204 a	1118 ab	826	721 d	1038	804 b
<b>P150</b>	1177 a	1063 ab	855	754 cd	1065	1176 a
<b>Valor p</b>	**	***	ns	***	ns	*

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

Estudios previos han revelado una reducción significativa de la fracción húmica en suelos cultivados (Spaccini et al., 2001; Piccolo et al., 2005), lo cual se atribuye a la oxidación microbiana de compuestos orgánicos parcialmente descompuestos o de complejos arcillo-húmicos que anteriormente se encontraban protegidos por los agregados del suelo pero que han sido alterados por las prácticas de cultivo (Piccolo et al., 2005). Los resultados obtenidos sugieren que a dosis moderadas, la aplicación de purín favorece un incremento, o al menos mantenimiento, del contenido de carbono de los ácidos húmicos del suelo. Sin embargo, también se insinúa la existencia de procesos de mineralización más intensos en los suelos enmendados con la dosis alta de purín, debido a la disminución de la concentración de ácidos húmicos, que se corresponde a su vez con un aumento de la fracción fúlvica en 2003 y 2004, la cual posiblemente englobe productos de la descomposición parcial de los primeros.

A pesar de todo, hay que tener en cuenta una posible sobreestimación del carbono extraíble de las sustancias húmicas, especialmente de los ácidos fúlvicos. Cuando se extraen estos compuestos con extractantes alcalinos, también se solubilizan otros componentes orgánicos cuya estructura y propiedades no son estrictamente de tipo húmico, (Iakimenko et al., 1996). Estos incluyen residuos de lignina, quinonas, polifenoles, ácidos dibenzocarboxílicos y otros residuos de tipo alifático, como ácidos carboxílicos, ácidos grasos, polisacáridos, péptidos sencillos, etc. (Sánchez-Monedero et al., 1999).

### **IV.5.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS SUSTANCIAS HÚMICAS**

Las sustancias húmicas son los componentes más abundantes de la materia orgánica y muestran una heterogeneidad física y química muy alta, debido a la diversidad de sustratos y de procesos que intervienen en su génesis (Stevenson, 1994; Piccolo, 2002; Sutton y Sposito, 2005). Los ácidos húmicos y fúlvicos ejercen un papel crucial en numerosos procesos geoquímicos, agronómicos y ambientales (Stevenson, 1994; Piccolo, 1996; Senesi y Loffredo, 1999; Tipping, 2002; Huang, 2004). Por ello, el estudio de las características moleculares, estructurales, funcionales y reactivas de la fracción húmica de los residuos orgánicos y de los suelos enmendados con ellos constituye un potente indicador de la madurez de las enmiendas y de las posibles modificaciones inducidas sobre el estado, calidad y reactividad de los ácidos húmicos y fúlvicos nativos del suelo (Senesi et al., 2005).

Los objetivos de esta parte del trabajo fueron determinar y discutir comparativamente la composición y las características estructurales y funcionales de los ácidos húmicos y fúlvicos del purín de cerdo con respecto los nativos del suelo, e investigar el efecto sobre las sustancias húmicas de

los suelos enmendados durante siete años consecutivos, prestando especial atención a las propiedades ácido-base y a la capacidad para formar complejos con los iones cobre(II) y zinc(II).

#### **IV.5.3.1. Composición elemental**

En la tabla IV.5.5 se muestra la composición elemental de los ácidos húmicos extraídos del purín de cerdo, del suelo control y de los suelos enmendados con este residuo. En general, los resultados obtenidos concuerdan con los de estudios previos sobre ácidos húmicos de enmiendas orgánicas similares en comparación con los de los suelos enmendados y sin enmendar (Senesi et al., 2005). El purín de cerdo presenta una composición claramente diferente a la de los ácidos húmicos nativos del suelo y a la de los procedentes de los suelos enmendados. Los ácidos húmicos del purín se distinguen por tener mayores contenidos de carbono, hidrógeno, nitrógeno, azufre y relación C/N, y por un menor contenido de oxígeno y menores relaciones C/H y O/C, que los de los suelos estudiados.

La composición elemental de los ácidos húmicos de los suelos enmendados con purín difiere ligeramente de la del control, siendo intermedia entre la de éstos y la de los ácidos húmicos del purín. En comparación con los del suelo control, los extraídos de los suelos enmendados poseen un porcentaje similar o ligeramente mayor de carbono, hidrógeno y azufre, un contenido levemente menor de nitrógeno y oxígeno, una relación C/N más elevada y unas relaciones C/H y O/C similares. También hay que destacar el hecho de que tras siete años de aplicación de purín, las diferencias entre la composición elemental de los ácidos húmicos del suelo control y la de los de los suelos enmendados son ligeramente más marcadas que a los cuatro años (Plaza et al., 2002).

Como es de esperar, la composición de los ácidos fúlvicos de purín de cerdo es visiblemente diferente de la de los del suelo sin enmendar y de los suelos tratados con este material (tabla IV.5.6). Los ácidos fúlvicos del purín contienen mayor proporción de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre y menor contenido de oxígeno que los procedentes de los suelos. Además, la relación C/N es mayor y las relaciones C/H y O/C son menores o similares a las de los suelos estudiados.

Si se compara la composición de los ácidos fúlvicos del suelo control con la de los suelos enmendados, se aprecia en éstos un contenido más elevado de carbono y un contenido menor de oxígeno. Los niveles de nitrógeno y azufre son ligeramente superiores a los del suelo control. La relación C/N es similar o levemente superior y las relaciones C/H y O/C son semejantes a las de los del suelo control. Las diferencias en la composición elemental entre los ácidos fúlvicos de los suelos enmendados y los del suelo control

generalmente tienden a aumentar con el incremento del número de enmiendas (Plaza et al., 2003).

**Tabla IV.5.5. Composición elemental y relaciones atómicas ( $\pm$  error estándar de tres repeticiones de laboratorio) de los ácidos húmicos (AHs) extraídos del purín (P), del suelo control (C) y de los suelos enmendados anualmente con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P90 y P150, respectivamente) durante siete años.**

Origen de la muestra de AH	C	H <sup>a</sup>	N <sup>a</sup>	S <sup>a</sup>	O	C/N <sup>a</sup>	C/H <sup>a</sup>	O/C <sup>a</sup>
	(g kg <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>					(Relación atómica)		
<b>P</b>	655 $\pm$ 5	90	54	14	188 $\pm$ 4	14.3	0.6	0.2
<b>C</b>	566 $\pm$ 9	49	48	3	334 $\pm$ 9	13.8	1.0	0.4
<b>P90</b>	570 $\pm$ 3	51	47	5	328 $\pm$ 3	14.1	0.9	0.4
<b>P150</b>	571 $\pm$ 3	52	47	5	325 $\pm$ 2	14.2	0.9	0.4

<sup>a</sup> Error estándar < 1.

<sup>b</sup> Sobre peso seco y libre de cenizas

**Tabla IV.5.6. Composición elemental y relaciones atómicas ( $\pm$  error estándar de tres repeticiones de laboratorio) de los ácidos fúlvicos (AFs) extraídos del purín (P), del suelo control (C) y de los suelos enmendados anualmente con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P90 y P150, respectivamente) durante siete años.**

Origen de la muestra de AF	C	H <sup>a</sup>	N <sup>a</sup>	S <sup>a</sup>	O	C/N <sup>a</sup>	C/H <sup>a</sup>	O/C <sup>a</sup>
	(g kg <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>					(Relación atómica)		
<b>P</b>	585 $\pm$ 1	110	44	35	226 $\pm$ 2	15.5	0.4	0.3
<b>C</b>	474 $\pm$ 3	77	37	7	405 $\pm$ 1	14.9	0.5	0.6
<b>P90</b>	501 $\pm$ 3	80	39	8	372 $\pm$ 2	15.0	0.5	0.6
<b>P150</b>	507 $\pm$ 4	80	39	9	365 $\pm$ 5	15.1	0.5	0.5

<sup>a</sup> Error estándar < 1.

<sup>b</sup> Sobre peso seco y libre de cenizas

#### IV.5.3.2. Contenido de grupos funcionales ácidos

La composición de grupos funcionales ácidos de los ácidos húmicos del purín y de los de los suelos se muestran en la tabla IV.5.7. Los ácidos húmicos del purín presentan menor acidez total y un contenido inferior de grupos carboxilo e hidroxilo fenólico que los de los suelos, coincidiendo con

los resultados obtenidos en estudios similares (Senesi et al., 2005). Los de los suelos enmendados presentan una acidez total menor y un contenido de grupos carboxilo e hidroxilo fenólico más bajo que los del suelo nativo. En general, los contenidos de grupos funcionales ácidos tienden a disminuir con la dosis de purín de cerdo y con el número de enmiendas recibidas, en comparación con los resultados obtenidos en los primeros años del experimento (Plaza, 2002; Plaza et al., 2002).

En general, los contenidos de acidez total y de grupos carboxilo e hidroxilo fenólico de los ácidos fúlvicos (tabla IV.5.8.) son mayores que los de los ácidos húmicos de su misma procedencia. Los ácidos fúlvicos del purín de cerdo presentan una acidez total y un contenido de grupos funcionales ácidos menor que los del suelo control, aunque las diferencias entre ambos no son tan marcadas como en el caso de los ácidos húmicos. Los valores de acidez total y de contenido de grupos carboxilo e hidroxilo fenólico de los ácidos fúlvicos de los suelos enmendados son inferiores a los valores obtenidos de los del suelo control, acentuándose las diferencias entre ellos con la dosis recibida de residuo (Plaza et al., 2003).

### **IV.5.3.3. Relación $E_4/E_6$**

Los ácidos húmicos del purín tienen el valor más bajo de la relación  $E_4/E_6$  (tabla IV.5.7.), mientras que los del suelo control presentan el más alto. La relación  $E_4/E_6$  de los ácidos húmicos obtenidos de los suelos enmendados es menor que la de los nativos del suelo y tiende a disminuir ligeramente con la dosis de purín, aunque los valores obtenidos tras siete años de enmiendas no se diferencian apreciablemente de los obtenidos a los cuatro años (Plaza, 2002).

Respecto a los ácidos fúlvicos (tabla IV.5.8.), los valores de la relación  $E_4/E_6$  son, en general, más altos que los de los correspondientes ácidos húmicos. Los ácidos fúlvicos del purín presentan una relación  $E_4/E_6$  menor a la de cualquier ácido fúlvico extraído de los suelos. Los valores de  $E_4/E_6$  de los ácidos fúlvicos de los suelos enmendados son más bajos que los de los del suelo control, disminuyendo con la dosis de purín y, en menor medida, con el número de aplicaciones (Plaza, 2002).

La relación  $E_4/E_6$  se ha relacionado con el nivel de condensación de las sustancias húmicas de los suelos, decreciendo con el peso molecular y el grado de aromaticidad y aumentando con la acidez total (Chen et al., 1977). Por lo tanto, las relaciones  $E_4/E_6$  más bajas medidas en los ácidos húmicos y fúlvicos de los suelos enmendados con purín, con respecto a los del suelo control, sugieren una contribución mayor de partículas de alto peso molecular en los primeros.

**Tabla IV.5.7. Contenidos de grupos funcionales ácidos y relaciones E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> (± error estándar de tres repeticiones de laboratorio) de los ácidos húmicos (AHs) extraídos del purín (P), del suelo control (C) y de los suelos enmendados anualmente con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P90 y P150, respectivamente) durante siete años.**

Origen de la muestra de AH	Acidez total	COOH	OH fenólicos	Relación E <sub>4</sub> /E <sub>6</sub>
	(mmol g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>			
<b>P</b>	3.49 ± 0.03	2.34 ± 0.01	1.15 ± 0.02	3.9
<b>C</b>	6.26 ± 0.09	4.74 ± 0.02	1.52 ± 0.02	4.9
<b>P90</b>	5.32 ± 0.05	3.93 ± 0.02	1.39 ± 0.01	4.4
<b>P150</b>	4.89 ± 0.06	3.59 ± 0.05	1.30 ± 0.04	4.3

<sup>a</sup> Sobre peso seco y libre de cenizas.

**Tabla IV.5.8. Contenidos de grupos funcionales ácidos y relaciones E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> (± error estándar de tres repeticiones de laboratorio) de los ácidos fúlvicos (AFs) extraídos del purín (P), del suelo control (C) y de los suelos enmendados anualmente con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P90 y P150, respectivamente) durante siete años.**

Origen de la muestra de AF	Acidez total	COOH	OH fenólicos	Relación E <sub>4</sub> /E <sub>6</sub>
	(mmol g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>			
<b>P</b>	7.53 ± 0.09	6.22 ± 0.04	1.31 ± 0.02	14.1
<b>C</b>	8.82 ± 0.07	7.10 ± 0.05	1.72 ± 0.03	18.0
<b>P90</b>	8.42 ± 0.07	6.81 ± 0.03	1.61 ± 0.01	15.2
<b>P150</b>	8.24 ± 0.02	6.72 ± 0.03	1.52 ± 0.04	14.9

<sup>a</sup> Sobre peso seco y libre de cenizas.

#### IV.5.3.4. Espectros infrarrojos

La espectroscopía infrarroja permite caracterizar las sustancias húmicas al poner de manifiesto la existencia de diversos grupos funcionales. Esta técnica ha sido empleada para dilucidar las estructuras orgánicas y entre ellas las de las sustancias húmicas (MacCarthy y Rice, 1984; Stevenson, 1994; Senesi y Loffredo, 1999; Abbt-Braun et al., 2004; Lumsdon y Fraser, 2005). Del mismo modo, se ha utilizado en el estudio de las transformaciones de la estructura de los ácidos húmicos y fúlvicos del suelo some-

tido a distintas técnicas de manejo agrícola (Senesi et al., 2003; Antil et al., 2005) o en tratamientos de aplicación de residuos orgánicos (García-Gil et al., 2004b). Por analogía con los ácidos húmicos del suelo, también se ha usado en el esclarecimiento de la estructura química de las sustancias húmicas formadas durante el compostaje de los residuos orgánicos (Senesi, 1989).

Los espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR) de los ácidos húmicos extraídos del purín, del suelo control y de los suelos enmendados con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo durante 7 años se muestran en la figura IV.5.3. Existen diferencias notables entre el espectro FT-IR de los ácidos húmicos del purín y los de los suelos. Las características principales de estos espectros y sus asignaciones correspondientes, de acuerdo con Bellamy (1975), MacCarthy y Rice (1984) y Stevenson (1994), son las siguientes:

- (1) Una banda amplia intensa aproximadamente a 3400 cm<sup>-1</sup> atribuida generalmente a la tensión O-H y, en segundo lugar, a la tensión N-H de varios grupos funcionales.
- (2) Dos bandas agudas a 2930-2920 cm<sup>-1</sup> y 2860-2850 cm<sup>-1</sup> correspondientes a las tensiones C-H de grupos alifáticos, siendo de mayor intensidad relativa en el ácido húmico del purín de cerdo que en los ácidos húmicos de los suelos.
- (3) Un hombro aproximadamente a 1700 cm<sup>-1</sup> asociado a la tensión C=O de COOH y otros grupos carbonilos, y que únicamente es evidente en el ácido húmico del purín de cerdo.
- (4) Una banda amplia en la región entre 1660 y 1600 cm<sup>-1</sup>, que se considera generalmente como un solapamiento de picos sin resolver debidos principalmente a la tensión de C=C aromáticos, C=O de grupos amida (banda amida I), C=O quinónicos y/o C=O de cetonas conjugadas con enlaces de H, que es menos intenso en el ácido húmico del purín que en los ácidos húmicos de los suelos.
- (5) Una banda de intensidad media próxima a 1540 cm<sup>-1</sup> asociada a la presencia de compuestos nitrogenados, fundamentalmente a la deformación N-H y a la tensión C=N de amidas (banda amida II), y que es patente sólo para el ácido húmico del purín de cerdo.
- (6) Una banda de intensidad media aproximadamente a 1460 cm<sup>-1</sup> debida a C-H alifáticos, que es muy afilada en el ácido húmico del purín de cerdo, pero sólo un hombro débil en los ácidos húmicos de los suelos.



(7) Una banda amplia de intensidad media centrada entre 1410 y 1380  $\text{cm}^{-1}$  en los ácidos húmicos de suelos, fundamentalmente adscrita a la deformación O-H y a la tensión C-O de OH fenólicos, a la deformación C-H de grupos  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  y/o a la tensión antisimétrica de grupos  $\text{COO}^-$ , que aparece como un pico débil y estrecho en el ácido húmico del purín de cerdo.

(8) Una banda ancha de intensidad media-fuerte centrada a 1260  $\text{cm}^{-1}$  en los ácidos húmicos de los suelos, asignada generalmente a la tensión C-O y a la deformación O-H de carboxilos y a la tensión C-O de aril éteres.

(9) Un pico a 1225  $\text{cm}^{-1}$ , atribuido a la tensión C-O y a la flexión O-H de carboxilos, que aparece sólo en el ácido húmico del purín.

(10) Una banda de absorción aproximadamente a 1040  $\text{cm}^{-1}$ , asociada generalmente a la tensión C-O de polisacáridos o sustancias parecidas a los polisacáridos, o vinculado a Si-O de impurezas de silicatos, que es de intensidad media en el ácido húmico del purín y sólo un hombro en los ácidos húmicos de los suelos.

Los espectros FT-IR de los ácidos húmicos extraídos de los suelos enmendados con purín son más parecidos al espectro del ácido húmico del control que al del ácido húmico del purín. Los espectros de los ácidos húmicos de los suelos enmendados se distinguen del correspondiente al suelo control en el leve incremento de las intensidades relativas de las bandas situadas aproximadamente a 2930-2920  $\text{cm}^{-1}$  y a 2860-2850  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a la tensión C-H de grupos alifáticos, y del hombro cercano a 1040  $\text{cm}^{-1}$ , atribuido a la tensión C-O de sustancias de tipo polisacárido o a impurezas de silicatos, y que a su vez que tienden a aumentar ligeramente con la dosis de residuo.

Aunque los espectros FT-IR de los ácidos fúlvicos (figura IV.5.4) difieren notablemente de los de los ácidos húmicos correspondientes, las diferencias entre aquellos son menos marcadas. Las principales características comunes y diferentes del ácido fúlvico del purín, en comparación con el del suelo control, y sus asignaciones correspondientes son:

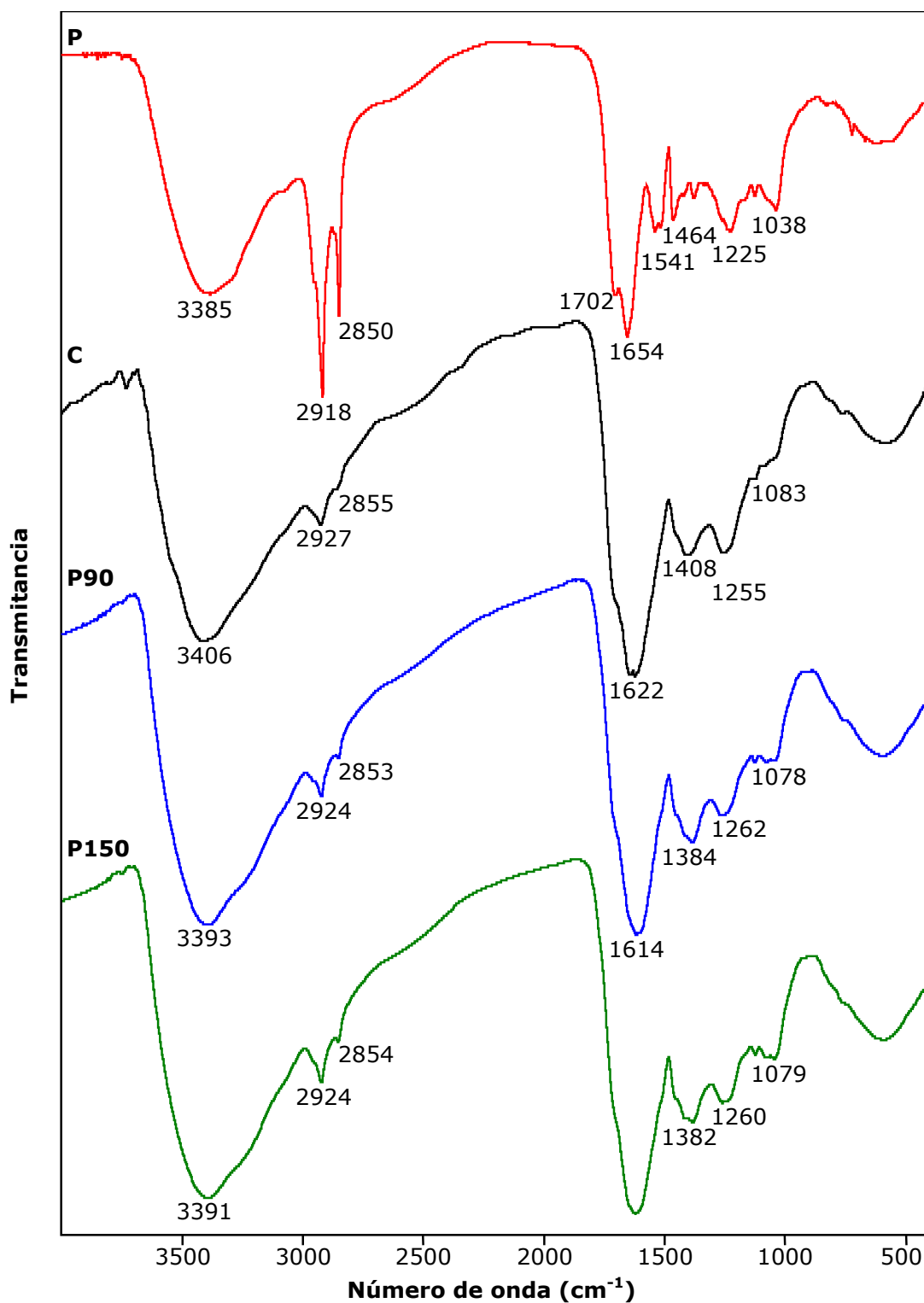
(1) Una banda amplia intensa aproximadamente a 3400-3420  $\text{cm}^{-1}$  atribuida generalmente a la tensión O-H y, en segundo lugar, a la tensión N-H de varios grupos funcionales.

(2) Una banda a 2930-2940  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a las tensiones C-H de grupos alifáticos, siendo de mayor intensidad relativa en el ácido fúlvico del purín de cerdo que en los ácidos fúlvicos de los suelos.

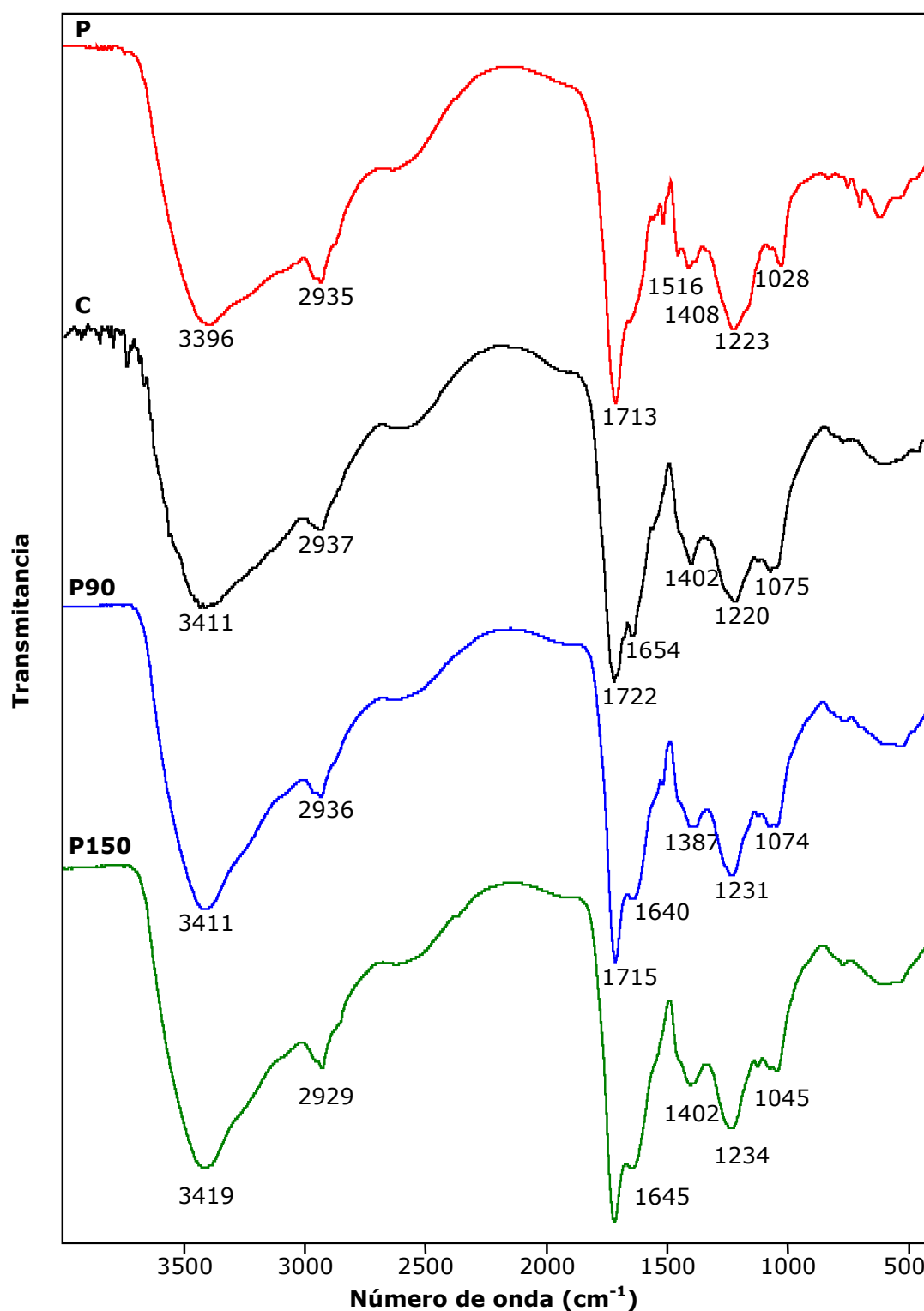
- (3) Una banda afilada intensa próxima a  $1715\text{ cm}^{-1}$  asociada a la tensión C=O de COOH y otros grupos carbonilos.
- (4) Un hombro débil aproximadamente a  $1640\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ , que generalmente se atribuye a las vibraciones de varios grupos, incluyendo C=C, la tensión C=O de grupos amida (banda amida I), C=O quinónicos y/o C=O de cetonas conjugadas con enlaces de H, que es más intenso en los ácidos fúlvicos de los suelos.
- (5) Una banda de intensidad débil próxima a  $1515\text{ cm}^{-1}$  asociada a la presencia de compuestos nitrogenados, fundamentalmente a la deformación N-H y a la tensión C=N de amidas (banda amida II), y que es más evidente en el ácido fúlvico del purín de cerdo.
- (6) un pico débil situado a  $1455\text{ cm}^{-1}$  comúnmente atribuida a la deformación de grupos C-H alifáticos, que sólo se encuentra presente en el espectro del ácido fúlvico del purín.
- (7) Una banda común de intensidad media centrada entre  $1390$  y  $1410\text{ cm}^{-1}$  que generalmente se asocia a la deformación O-H y a la tensión C-O de OH fenólicos.
- (8) Una absorción situada entre  $1230$  y  $1220\text{ cm}^{-1}$ , fundamentalmente asociada a la tensión C-O y a la deformación O-H de carboxilos y a la tensión C-O de aril éteres, cuya intensidad relativa es mayor para el ácido fúlvico del purín que para el del suelo control.
- (9) Una banda situada a  $1030\text{ cm}^{-1}$  en el ácido fúlvico del purín y entre  $1050$  y  $1080\text{ cm}^{-1}$  para los ácidos fúlvicos de los suelos, generalmente atribuida a la tensión C-O de polisacáridos o sustancias parecidas a los polisacáridos.

En general, los espectros FT-IR de los ácidos fúlvicos procedentes de los suelos enmendados son muy parecidos al espectro del ácido fúlvico del suelo control y, a su vez, muy similares entre sí. Los rasgos distintivos que los caracterizan son un aumento de la intensidad relativa de la banda a  $2930\text{-}2940\text{ cm}^{-1}$  debida a la tensión de grupos C-H alifáticos, y un pico menos intenso a  $1715\text{ cm}^{-1}$ , atribuido a la tensión C=O de grupos carboxílicos.

Los resultados aportados por la espectroscopía de FT-IR confirman la existencia de diferencias estructurales y funcionales entre las sustancias húmicas del purín de cerdo y las del suelo control, mostrando aquéllas un carácter alifático predominante y un contenido mayor de grupos nitrogenados y compuestos de tipo polisacárido. Además, aunque los ácidos



**Figura IV.5.3.** Espectros FT-IR de los ácidos húmicos extraídos del purín (P), del suelo control (C) y de los suelos enmendados anualmente con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P90 y P150, respectivamente) durante siete años.



**Figura IV.5.4.** Espectros FT-IR de los ácidos fúlvicos extraídos del purín (P), del suelo control (C) y de los suelos enmendados anualmente con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P90 y P150, respectivamente) durante siete años.

húmicos y fúlvicos de los suelos enmendados son más semejantes a los del suelo control que a los del purín, se diferencian ligeramente de los primeros, lo que indica que la incorporación del residuo al suelo afecta la estructura molecular y la funcionalidad de las sustancias húmicas, posiblemente debido a una incorporación parcial de la fracción húmica del purín en la del suelo nativo.

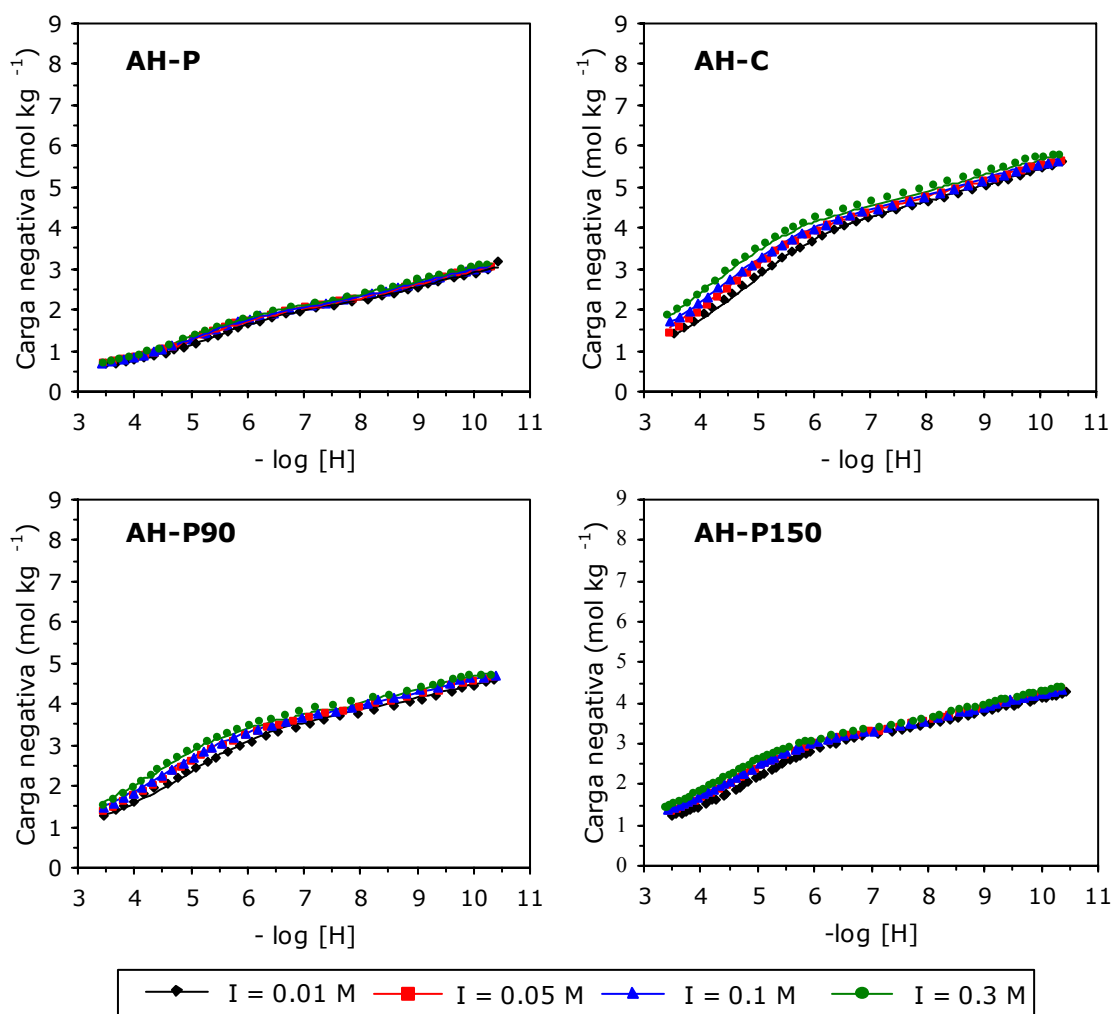
#### **IV.5.3.5. Características ácido-base**

Los ácidos húmicos son polielectrolitos débiles en los que la ionización de los grupos funcionales ácidos está controlada por el pH del medio, influyendo así en la disponibilidad de los mismos para formar complejos con otros elementos del medio edáfico. El comportamiento ácido-base de las sustancias húmicas proporciona una información muy útil para comprender cuáles son los mecanismos que influyen en la formación de estos complejos (Kinniburgh et al., 1999; Senesi y Loffredo, 1999; Tipping, 2002; Dudal y Gérard, 2004; García-Gil et al., 2004a; Plaza et al., 2005a).

Una descripción detallada de las propiedades ácido-base de las sustancias húmicas requiere el empleo de un modelo que explique satisfactoriamente la mezcla extremadamente heterogénea de grupos funcionales ácidos involucrados en las reacciones de protonación y los efectos debidos a la variación de fuerza iónica como consecuencia de la naturaleza polielectrolítica de las mismas (De Wit et al., 1993; Avena et al., 1999; Kinniburgh et al., 1999; Koopal et al., 2001). En los últimos años, se han desarrollado varios modelos para estudiar las propiedades ácido-base de las sustancias húmicas (Tipping, 2002; Dudal y Gérard, 2004), entre los cuales se encuentra el modelo de adsorción competitiva no ideal NICA-Donnan (Milne et al., 2001; Koopal et al., 2005). Éste es una combinación del modelo NICA (Koopal et al., 2001), que describe la unión específica de cationes a las sustancias húmicas asumiendo una distribución continua de puntos de enlace, y el modelo Donnan (Benedetti et al., 1996a), el cual explica las interacciones electrostáticas entre los iones en solución y las sustancias húmicas. El modelo NICA-Donnan ha sido usado satisfactoriamente para describir las reacciones de protonación de un gran número de sustancias húmicas de diferente origen y naturaleza (Christensen et al., 1998; Christl y Kretzschmar, 2001; Milne et al., 2001; Benedetti et al., 2002; Domingos et al., 2004; Koopal et al., 2005; Plaza et al., 2005a; Plaza et al., 2005c).

##### **IV.5.3.5.1. Isotermas de protonación**

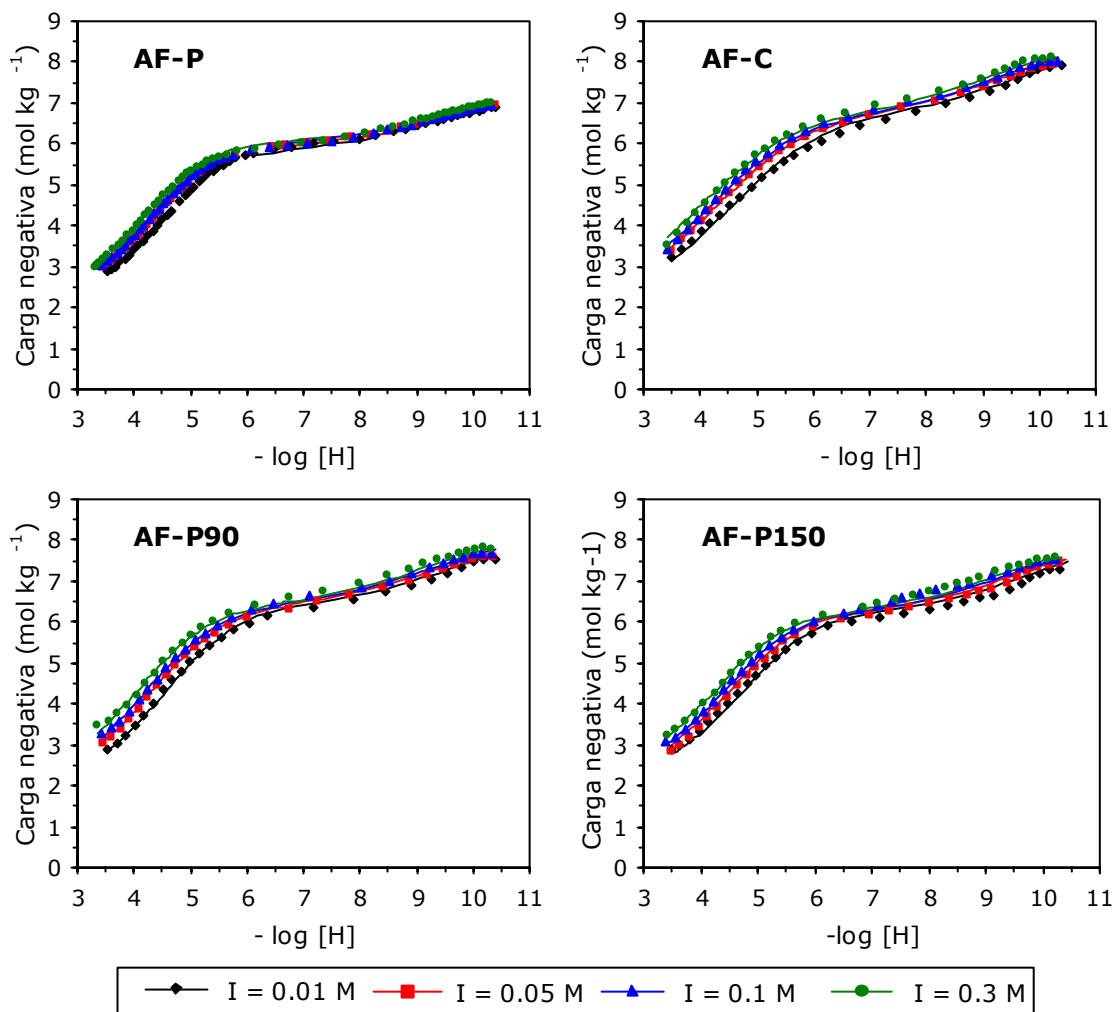
Las figuras IV.5.5. y IV.5.6. muestran los resultados experimentales, obtenidos mediante valoraciones potenciométricas, de la carga negativa de



**Figura IV.5.5.** Cargas negativas de los ácidos húmicos (AHs) extraídos del purín (P), del suelo control (C) y de los suelos enmendados anualmente con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P90 y P150, respectivamente) durante siete años, en función de la concentración de protones y de la fuerza iónica (I). Los símbolos representan los datos experimentales obtenidos de las valoraciones potenciométricas (sólo se muestran la mitad de los datos obtenidos) y las líneas continuas representan los ajustes con el modelo NICA-Donnan.

cada una de las sustancias húmicas examinadas en función de la concentración de protones y de la fuerza iónica. De acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores en sustancias húmicas de origen diverso (Bartschat et al., 1992; Milne et al., 1995; Benedetti et al., 1996a; Christensen et al., 1998; Avena et al., 1999; Christl y Kretzschmar, 2001; Plaza et al., 2005c), la carga negativa de los ácidos húmicos y fúlvicos estudiados aumenta con el pH y la fuerza iónica. Además, las curvas de valoración para cada valor de la fuerza iónica son casi paralelas hasta pH 7

y tienden a aproximarse ligeramente a pH superior, indicando que la carga desarrollada por las sustancias húmicas es más dependiente de la fuerza iónica a pH ácido que básico. Igualmente, los ácidos húmicos presentan densidades de carga menores que los fúlvicos correspondientes, en todo el rango de concentración de protones y de fuerza iónica (Milne et al., 2001; Ritchie y Perdue, 2003; Plaza et al., 2005c).



**Figura IV.5.6.** Cargas negativas de los ácidos fúlvicos (AFs) extraídos del purín (P), del suelo control (C) y de los suelos enmendados anualmente con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P90 y P150, respectivamente) durante siete años, en función de la concentración de protones y de la fuerza iónica ( $I$ ). Los símbolos representan los datos experimentales obtenidos de las valoraciones potenciométricas (sólo se muestran la mitad de los datos obtenidos) y las líneas continuas representan los ajustes con el modelo NICA-Donnan.

Las densidades de carga de los ácidos húmicos del purín son mucho menores que las correspondientes a los extraídos de los suelos, a cualquier valor de pH y de fuerza iónica, mientras que las diferencias entre los ácidos fúlvicos son menos evidentes. Las cargas de las sustancias húmicas de los suelos enmendados son menores que las de aquellas extraídas del purín de cerdo, y tienden a disminuir con el aumento de la dosis, especialmente en el caso de los ácidos húmicos. El comportamiento desigual del desarrollo de cargas de las sustancias húmicas estudiadas puede atribuirse a diferencias en los contenidos y afinidades protónicas de los grupos carboxilo e hidroxilo fenólico, cuya disociación se considera que es la principal responsable de las cargas negativas de las sustancias húmicas (Perdue, 1985; Stevenson, 1994; Masini et al., 1998; Koopal et al., 2005). En general, los desarrollos de cargas más elevados medidos en los ácidos húmicos y fúlvicos de los suelos respecto a los extraídos del purín se relacionan con unas condiciones de mayor aireación durante la formación de los primeros, favoreciendo las reacciones de oxidación y la formación de grupos funcionales ácidos oxigenados.

#### **IV.5.3.5.2. Parámetros del modelo NICA-Donnan**

Las tablas IV.5.9. y IV.5.10. muestran los parámetros del ajuste del modelo NICA-Donnan a los datos experimentales obtenidos a partir de los ácidos húmicos y fúlvicos (figuras IV.5.5. y IV.5.6.), considerando una distribución bimodal de los puntos de protonación. Conforme a resultados previos en sistemas similares (Benedetti et al., 1996a; Benedetti et al., 1996b; Kinniburgh et al., 1996; Christensen et al., 1998; Christl y Kretzschmar, 2001; Milne et al., 2001; Benedetti et al., 2002; Domingos et al., 2004) los valores elevados de los coeficientes de determinación y bajos de los errores cuadráticos medios (RECM) demuestran que el modelo NICA-Donnan describe adecuadamente los resultados experimentales obtenidos. De acuerdo con la interpretación habitual de las propiedades ácido-base de las sustancias húmicas (Perdue, 1985; Stevenson, 1994; Masini et al., 1998; Koopal et al., 2005), se asume que los dos tipos de grupos funcionales ácidos con baja y alta afinidad protónica son, respectivamente, grupos de tipo carboxílico y de tipo fenólico.

##### **• Parámetro b**

Los valores del parámetro b de los ácidos húmicos y fúlvicos estudiados se encuentran dentro de los rangos de valores especificados por Milne et al. (2001) para sustancias húmicas genéricas y los valores de b de los ácidos húmicos son menores que los de los ácidos fúlvicos del mismo origen. Las sustancias húmicas extraídas del purín de cerdo presentan valores de b superiores a las de los suelos, siendo los de los ácidos húmicos y fúlvicos procedentes de los tratamientos enmendados mayores que los valores de b



de las sustancias húmicas del suelo control. Según Christl y Kretzschmar (2001), el parámetro  $b$  se correlaciona negativamente con el tamaño de partícula y el peso molecular, por lo que los valores más elevados en los ácidos húmicos  $y$ , especialmente, en los fúlvicos extraídos del purín, comparados con los de los suelos, sugiere una contribución mayor de partículas de bajo peso molecular en los primeros. Este resultado concuerda con la distribución de pesos moleculares obtenida en análisis previos mediante cromatografía en gel de sustancias húmicas de sistemas semejantes (Trubetskaya et al., 2001).

### • Contenido de grupos funcionales ácidos

La acidez total y el contenido de grupos ácidos ( $Q_{\max,1} + Q_{\max,2}$  y  $Q_{\max,1}$ , respectivamente) de los ácidos húmicos es marcadamente menor que los de los ácidos fúlvicos, mientras que el contenido de grupos hidroxilo fenólicos ( $Q_{\max,2}$ ) es similar o ligemente mayor. De acuerdo con los resultados de Milne et al. (2001), los grupos carboxilo constituyen entre el 54% y el 61% de la acidez total de los ácidos húmicos obtenidos de los suelos, y entre el 70% y el 73% para los ácidos fúlvicos de cualquier origen, lo que indica que la mayor parte de la acidez de estas sustancias húmicas se atribuye a los grupos carboxilo. Por el contrario, el ácido húmico del purín presenta un contenido de grupos hidroxilo fenólicos relativamente elevado (54%). Según Ritchie y Perdue (2003), las sustancias húmicas formadas en sistemas acuáticos o poco aireados pueden tener contenidos de grupos fenólicos significativamente superiores que en sistemas terrestres. La acidez total y el contenido de grupos carboxilo e hidroxilo fenólico de las sustancias húmicas del purín de cerdo son menores que los del suelo control; como consecuencia, los contenidos de grupos funcionales ácidos de los ácidos húmicos y fúlvicos de los suelos enmendados disminuyen respecto a los del tratamiento control.

### • Constantes de afinidad protónica

Los valores de la mediana de las constantes de afinidad protónica de los grupos de tipo carboxílico y fenólico ( $\log \tilde{K}_{H,1}$  y  $\log \tilde{K}_{H,2}$ , respectivamente) derivados de los ácidos húmicos y fúlvicos examinados se corresponden con los resultados obtenidos por otros autores para sustancias húmicas (Benedetti et al., 1996a; Benedetti et al., 1996b; Kinniburgh et al., 1996; Christensen et al., 1998; Pinheiro et al., 1999; Christl y Kretzschmar, 2001; Milne et al., 2001; Plaza et al., 2005c) y son muy parecidos a las constantes de afinidad protónica de ácidos mono y policarboxílicos y fenoles (Christensen et al., 1998; Christl y Kretzschmar, 2001). Este resultado apoya la afirmación de que la disociación de los grupos carboxilo e hidroxilo fenólico determina la protonación de las sustancias húmicas.

**Tabla IV.5.9. Parámetros estimados según el modelo NICA-Donnan para la protonación de ácidos húmicos (AHs) extraídos del purín (P), del suelo control (C) y de los suelos enmendados anualmente con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P90 y P150, respectivamente) durante siete años.**

Parámetro <sup>a</sup>	Origen de la muestra de AH			
	P	C	P90	P150
<b>r<sup>2</sup></b>	0.9997	0.9980	0.9982	0.9997
<b>RECM</b>	0.0111	0.0551	0.0420	0.0159
<b>b</b>	0.70	0.56	0.59	0.63
<b>Q<sub>max,1</sub> (mol kg<sup>-1</sup>)<sup>b</sup></b>	1.36	3.59	2.75	2.23
<b>log<math>\tilde{K}_{H,1}</math></b>	4.44	3.06	3.34	3.52
<b>m<sub>1</sub></b>	0.82	0.63	0.64	0.77
<b>Q<sub>max,2</sub> (mol kg<sup>-1</sup>)<sup>b</sup></b>	1.58	2.28	1.89	1.86
<b>log<math>\tilde{K}_{H,2}</math></b>	8.11	7.58	7.87	7.88
<b>m<sub>2</sub></b>	0.41	0.31	0.31	0.33
<b>Q<sub>max,1</sub>+Q<sub>max,2</sub></b>	2.93	5.88	4.64	4.10

<sup>a</sup>r<sup>2</sup>, coeficiente de determinación; RECM, raíz del error cuadrático medio; b, parámetro empírico que describe como varía el volumen de Donnan con la fuerza iónica; Q<sub>max,1</sub>, contenido de grupos carboxilo;  $\tilde{K}_{H,1}$ , mediana de la constante de afinidad protónica de grupos carboxilo; m<sub>1</sub>, amplitud de la distribución de afinidad protónica de grupos carboxilo; Q<sub>max,2</sub>, contenido de grupos OH fenólicos;  $\tilde{K}_{H,2}$ , mediana de la constante de afinidad protónica de grupos OH fenólicos; m<sub>2</sub>, amplitud de la distribución de afinidad protónica de grupos OH fenólicos.

<sup>b</sup>sobre peso seco y libre de cenizas

En todos los casos, los valores correspondientes a la protonación de grupos carboxilo de los ácidos húmicos son más elevados que los de los correspondientes ácidos fúlvicos, lo que confirma el carácter más ácido de los grupos carboxilo de éstos últimos (Milne et al., 2001; Ritchie y Perdue, 2003). Los valores de log $\tilde{K}_{H,1}$  de las sustancias húmicas procedentes del purín son superiores a los correspondientes del suelo control, los cuales a su vez son menores que los de los suelos enmendados.

De acuerdo con los resultados de Milne et al. (2001), el valor de la mediana de las constantes de afinidad para la protonación de los grupos de tipo fenólico (log $\tilde{K}_{H,2}$ ) es más pequeño para los ácidos húmicos del purín y del suelo control que para los fúlvicos correspondientes. La aplicación de

purín parece causar un ligero descenso de la acidez de los grupos fenólicos de los ácidos húmicos y fúlvicos de los suelos.

**Tabla IV.5.10. Parámetros de ajuste del modelo NICA-Donnan para la protonación de ácidos húmicos (AFs) extraídos del purín (P), del suelo control (C) y de los suelos enmendados anualmente con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P90 y P150, respectivamente) durante siete años.**

Parámetro <sup>a</sup>	Origen de la muestra de AF			
	P	C	P90	P150
<b>r<sup>2</sup></b>	0.9986	0.9983	0.9980	0.9964
<b>RECM</b>	0.0481	0.0607	0.0655	0.0892
<b>b</b>	0.76	0.63	0.66	0.66
<b>Q<sub>max,1</sub> (mol kg<sup>-1</sup>)<sup>b</sup></b>	3.94	4.89	4.75	4.27
<b>log<math>\tilde{K}_{H,1}</math></b>	3.33	2.88	2.96	3.23
<b>m<sub>1</sub></b>	0.96	0.60	0.77	0.82
<b>Q<sub>max,2</sub> (mol kg<sup>-1</sup>)<sup>b</sup></b>	1.46	1.91	1.87	1.85
<b>log<math>\tilde{K}_{H,2}</math></b>	8.13	7.80	7.82	7.95
<b>m<sub>2</sub></b>	0.45	0.45	0.43	0.46
<b>Q<sub>max,1</sub>+Q<sub>max,2</sub></b>	5.40	6.80	6.62	6.12

<sup>a</sup>r<sup>2</sup>, coeficiente de determinación; RECM, raíz del error cuadrático medio; b, parámetro empírico que describe como varía el volumen de Donnan con la fuerza iónica; Q<sub>max,1</sub>, contenido de grupos carboxilo;  $\tilde{K}_{H,1}$ , mediana de la constante de afinidad protónica de grupos carboxilo; m<sub>1</sub>, amplitud de la distribución de afinidad protónica de grupos carboxilo; Q<sub>max,2</sub>, contenido de grupos OH fenólicos;  $\tilde{K}_{H,2}$ , mediana de la constante de afinidad protónica de grupos OH fenólicos; m<sub>2</sub>, amplitud de la distribución de afinidad protónica de grupos OH fenólicos.

<sup>b</sup>sobre peso seco y libre de cenizas

### • Amplitud de las distribuciones de afinidad

Los valores de m<sub>1</sub> de todas las sustancias húmicas examinadas son mucho mayores que los de m<sub>2</sub>, lo que se muestra de acuerdo con estudios previos (Benedetti et al., 1996a; Benedetti et al., 1996b; Kinniburgh et al., 1996; Pinheiro et al., 1999; Christl y Kretzschmar, 2001; Plaza et al., 2005a; Plaza et al., 2005c). Como se considera que m refleja la homogeneidad aparente del tipo de punto de enlace (Koopal et al., 2005), estos resultados indican que los puntos de baja afinidad protónica (grupos

de tipo carboxílico) presentan menor heterogeneidad aparente que los sitios de alta afinidad (grupos de tipo fenólico).

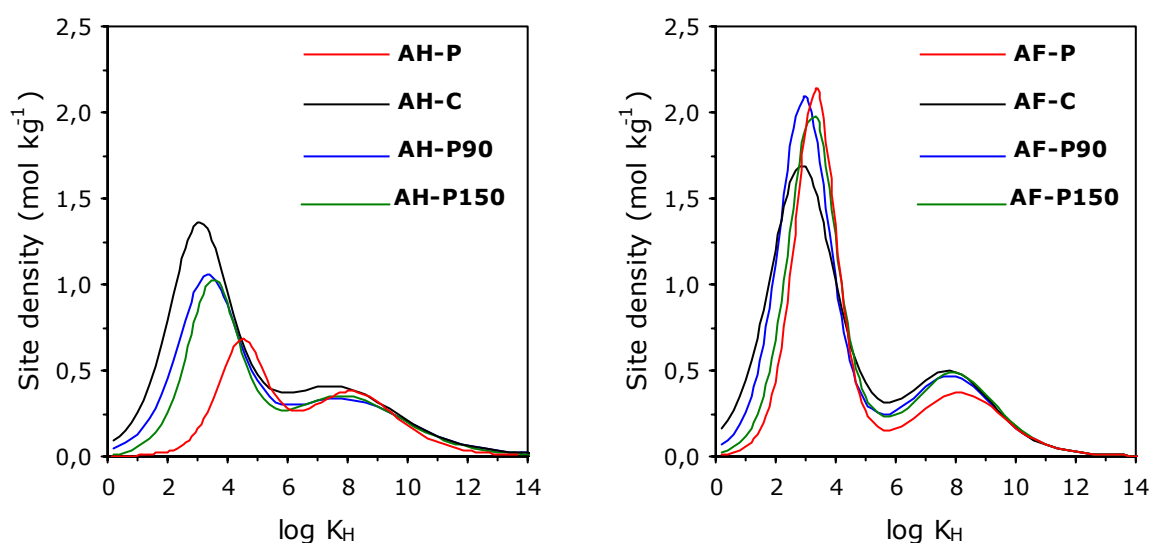
Con la excepción de los ácidos húmicos del suelo control, que muestra un valor de  $m_1$  ligeramente superior que los de los correspondientes fúlvicos, los valores de  $m_1$  y  $m_2$  de los ácidos húmicos son menores que los de los fúlvicos del mismo origen, lo que sugiere una heterogeneidad mayor de los grupos funcionales ácidos en los primeros. Además las sustancias húmicas del purín presentan valores de  $m_1$  superiores a los de las extraídas de los suelos, lo que indica una mayor homogeneidad en grupos carboxilo de las fracciones húmica y fúlvica del purín de cerdo que en los suelos. Asimismo, el valor de  $m_2$  de los ácidos húmicos del purín es mayor que los de los suelos, mientras que los de los ácidos fúlvicos son similares. Por tanto, la aplicación de purín induce un descenso de la heterogeneidad de los grupos de tipo carboxílico (aumento de  $m_1$ ), mientras que no parece afectar sustancialmente la homogeneidad de los grupos de tipo fenólico de los ácidos húmicos y fúlvicos procedentes de suelos enmendados.

#### • Distribuciones de afinidad protónica

La figura IV.5.7. muestra las distribuciones de afinidad protónica asociadas con las descripciones del modelo NICA-Donnan discutidas previamente. La distribución de los puntos de protonación de los ácidos húmicos y fúlvicos del purín se diferencia claramente de las de las sustancias húmicas nativas. Además la aplicación de purín modifica estas distribuciones en los ácidos húmicos y fúlvicos de los suelos enmendados. Este efecto, que es más evidente para los húmicos que para los fúlvicos y que tiende a incrementarse con la dosis de enmienda, sugiere una incorporación parcial de las sustancias húmicas del purín al suelo.

#### **IV.5.3.6. Capacidad para formar complejos con los iones cobre(II) y zinc(II) mediante espectroscopía de fluorescencia**

La espectroscopía de fluorescencia es un potente método, sensible y relativamente sencillo, que se ha mostrado útil para el estudio de las propiedades estructurales de las sustancias húmicas y de las interacciones entre éstas y los iones metálicos (Senesi, 1992; Tipping, 2002). La obtención de espectros de fluorescencia en forma de matrices de excitación-emisión (*Excitation-Emission Matrix*, EEM) permite extraer información más detallada acerca de las propiedades generales de las sustancias húmicas y de la formación de complejos metálicos que la derivada de espectros convencionales monodimensionales (Fukushima et al., 1997; Provenzano et al., 2004; Wu et al., 2004a; Wu et al., 2004b; Plaza et al., 2005b; Sierra et al., 2005). Varios iones metálicos, especialmente los paramagnéticos, son



**Figura IV.5.7.** Distribuciones de afinidad protónica derivadas de los valores de los parámetros del modelo NICA-Donnan de los ácidos húmicos (AHs) y de los ácidos fúlvicos (AFs) extraídos del purín (P), del suelo control (C) y de los suelos enmendados anualmente con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P90 y P150, respectivamente) durante siete años.

capaces de atenuar la intensidad de fluorescencia intrínseca de las sustancias húmicas, dependiendo de la fracción de puntos de enlace ocupados por iones metálicos y de la concentración de metal (Senesi, 1992). El análisis de los cambios en los espectros de fluorescencia de las sustancias húmicas en presencia de iones metálicos como cobre(II) y zinc(II) permite calcular las capacidades complejantes de las sustancias húmicas y las constantes de estabilidad de los complejos metálicos formados (Luster et al., 1996). Estos dos parámetros, que permiten predecir el comportamiento de los metales estudiados en el suelo, pueden calcularse mediante el modelo matemático propuesto por Ryan y Weber (1982). Este método se basa en la suposición de una estequiometría 1:1 para la unión metal-ligando y en la existencia de una relación lineal entre la fracción de ligando unido y la intensidad de fluorescencia.

#### IV.5.3.6.1. Espectros de fluorescencia

La figura IV.5.8 representa el espectro de fluorescencia tridimensional de excitación-emisión (EEM) de los ácidos húmicos extraídos del purín de cerdo, del suelo control y de los suelos enmendados durante siete años consecutivos. En general, las características de los espectros de fluorescencia de los ácidos húmicos analizados concuerdan con los de origen similar (Mobed et al., 1996; Bertoncini et al., 2005; Plaza et al., 2006). El

espectro de fluorescencia EEM de los ácidos húmicos del purín es muy diferente del de los procedentes de los suelos y se caracteriza por un único fluoróforo centrado en el par de longitudes de onda de excitación/emisión (*excitation/emission wavelength pair*, EEWP) a 325/437 nm. Las características principales de los espectros de fluorescencia EEM de los ácidos húmicos aislados de los suelos son una banda común amplia con el máximo de intensidad relativa centrado en un valor de EEWP de 440/508 nm, y un hombro ancho a longitudes de onda más cortas cuya intensidad relativa, respecto al pico principal, tiende a incrementarse con el aumento de la dosis de purín.

De acuerdo con Senesi et al. (1991), la existencia de bandas y picos de fluorescencia con intensidades relativas altas a longitudes de onda cortas, como las registradas para el pico de los ácidos húmicos del purín, se relacionan con la presencia de componentes estructurales sencillos de elevada heterogeneidad molecular y bajo peso molecular, además de un grado de policondensación aromática, un nivel de cromóforos conjugados y un grado de humificación bajos. Por el contrario, el predominio de bandas de fluorescencia de elevada intensidad a longitudes de onda más largas se puede atribuir a la presencia de una red de anillos aromáticos linealmente condensados y otros sistemas de enlaces insaturados con un elevado grado de conjugación en unidades de gran peso molecular y de alto grado de humificación. Este parece ser el caso de los ácidos húmicos del control y, en menor medida, de los suelos enmendados con purín.

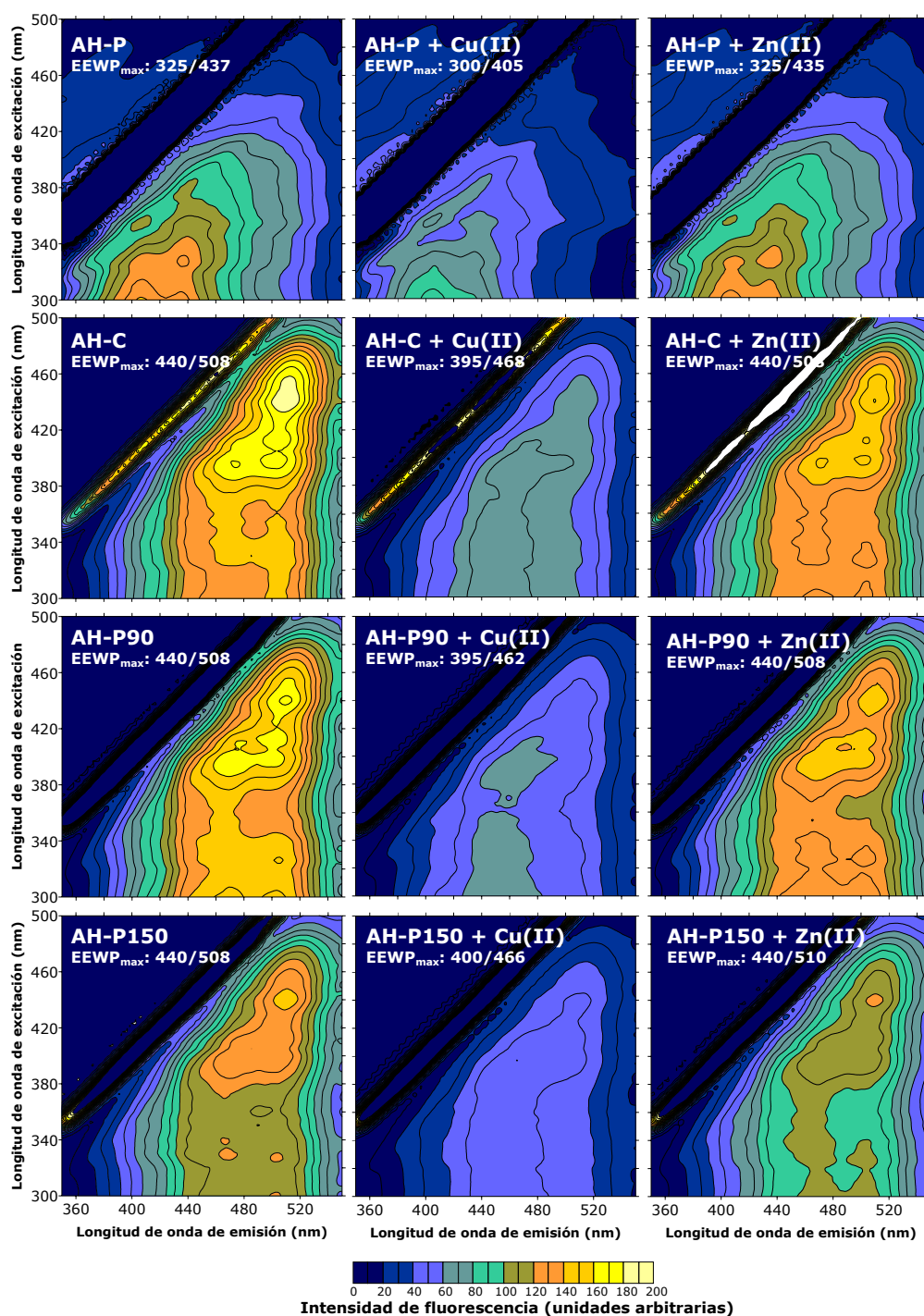
El valor de intensidad relativa de fluorescencia, expresado en unidades arbitrarias, del pico principal del espectro de los ácidos húmicos extraído del purín es menor que el procedente del suelo control. Este resultado sugiere una presencia relativamente menor de sustituyentes electrodonadores, como grupos hidroxilo y metoxilo (Senesi et al., 1991) en los ácidos húmicos del purín, respecto al suelo control. El contenido de carbohidratos relativamente más elevado también puede ser responsable de las intensidades de fluorescencia menores observadas para los ácidos húmicos del purín (Chen et al., 2003). Los picos principales de ácidos húmicos de los suelos enmendados presentan valores de intensidad de fluorescencia comprendidos entre los correspondientes al purín y el suelo control y tienden a descender con el aumento de la dosis. Estos resultados sugieren una incorporación parcial de componentes sencillos con menor grado de humificación de los ácidos húmicos del purín en los del suelo nativo.

La adición de zinc(II) y de cobre(II) causa un descenso evidente de la intensidad de fluorescencia de todos los ácidos húmicos, especialmente de los extraídos de los suelos, respecto a la obtenida en ausencia de iones metálicos. Este efecto es más destacado en el caso del cobre(II), con el que también se observa una disminución importante de las longitudes de onda máximas de excitación y emisión, probablemente debido a la mayor

atenuación que provoca el ion cobre(II) sobre la fluorescencia de los ácidos húmicos a longitudes de onda largas. Por el contrario, los máximos de longitud de onda de excitación y emisión permanecen prácticamente constantes cuando se adiciona zinc(II). Estos resultados indican una modificación patente de la estructura electrónica de los ácidos húmicos cuando interaccionan con el zinc(II) y, especialmente, con el cobre(II) (Wu et al., 2004a; Wu et al., 2004b). La distinta extensión de las modificaciones observadas puede atribuirse a las diferencias en la fuerza de los enlaces formados entre el cobre(II) o el zinc(II) y los ácidos húmicos, dependiendo de la naturaleza de los ligandos, la relación metal:ácido húmico, los grupos funcionales involucrados en la complejación de los metales y la disposición tridimensional de la sustancia húmica.

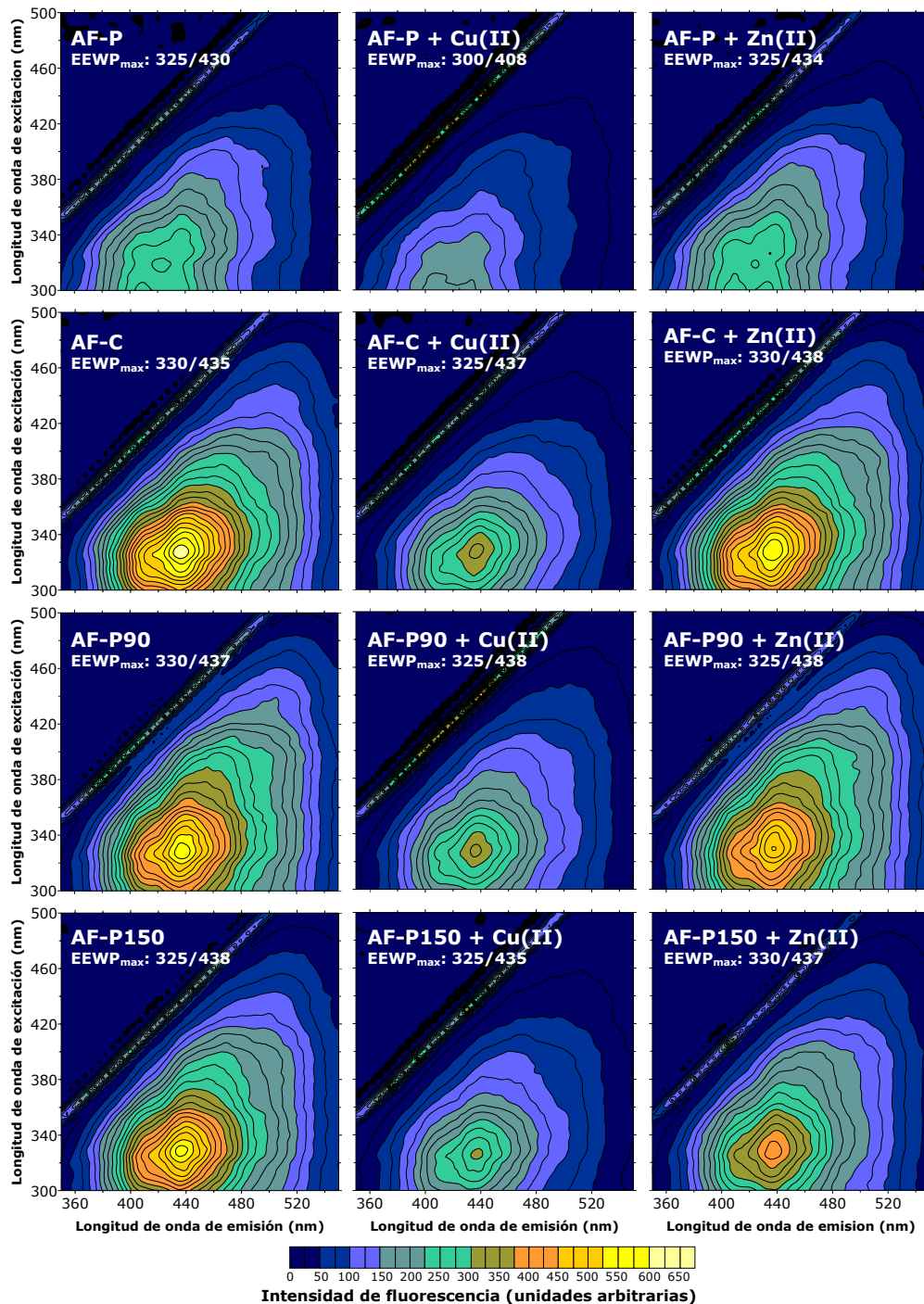
Los espectros EEM de los ácidos fúlvicos aislados del purín, del suelo control y de los suelos enmendados durante siete años consecutivos se representan en la figura IV.5.9. En general, estos espectros y los de los ácidos húmicos del mismo origen son notablemente distintos, presentando intensidades relativas de fluorescencia mucho mayores; sin embargo las diferencias entre los espectros de los ácidos fúlvicos son menos acentuadas que las detectadas entre los húmicos. Los ácidos fúlvicos del purín presentan un máximo de intensidad relativa a 325/430 nm, mientras que en los espectros de los de los suelos el máximo se localiza a longitudes de onda más largas (325-330/435-438 nm). Este resultado sugiere la presencia de componentes estructurales simples con un grado de humificación y de policondensación aromática menores y una heterogeneidad molecular más elevada en los primeros (Senesi et al., 1991). Asimismo, la intensidad relativa del pico principal de los ácidos fúlvicos del purín es menor que la del suelo control, lo que se atribuye a su contenido mayor de carbohidratos y de grupos carboxílicos (Senesi et al., 1991; Chen et al., 2003). Por otra parte, la intensidad relativa de fluorescencia tiende a disminuir en los ácidos fúlvicos de los suelos enmendados respecto al control, lo que apunta a una incorporación parcial de componentes poco humificados de los ácidos fúlvicos del purín en los del suelo nativo.

De acuerdo con estudios previos (Ryan y Weber, 1982; Fukushima et al., 1997; Elkins y Nelson, 2001; Wu et al., 2004b) la intensidad de fluorescencia de todos los ácidos fúlvicos experimenta una atenuación patente en presencia de zinc(II) y, especialmente, de cobre(II) frente la medida en ausencia de iones metálicos. Además, la adición de cobre(II) provoca una disminución de las longitudes de onda de los pares EEWPs, siendo más acusada en el espectro de los ácidos fúlvicos del purín, probablemente debido a modificaciones en la estructura electrónica de los ácidos fúlvicos cuando interaccionan con los iones metálicos estudiados.



**Figura IV.5.8.** Espectros de fluorescencia de excitación-emisión (EEM) de los ácidos húmicos (AHs) extraídos del purín (P), del suelo control (C) y de los suelos enmendados anualmente con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P90 y P150, respectivamente) durante siete años, en ausencia o presencia de Cu(II) o Zn(II) a una concentración total de 40 μM. EEWP<sub>max</sub>: pares de longitudes de onda de excitación/emisión a la intensidad de fluorescencia máxima.





**Figura IV.5.9.** Espectros de fluorescencia de excitación-emisión (EEM) de los ácidos fúlvicos (AFs) extraídos del purín (P), del suelo control (C) y de los suelos enmendados anualmente con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P90 y P150, respectivamente) durante siete años, en ausencia o presencia de Cu(II) o Zn(II) a una concentración total de 40 μM. EEWP<sub>max</sub>: pares de longitudes de onda de excitación/emisión a la intensidad de fluorescencia máxima.

#### **IV.5.3.6.2. Determinación de capacidades complejantes y constantes de estabilidad**

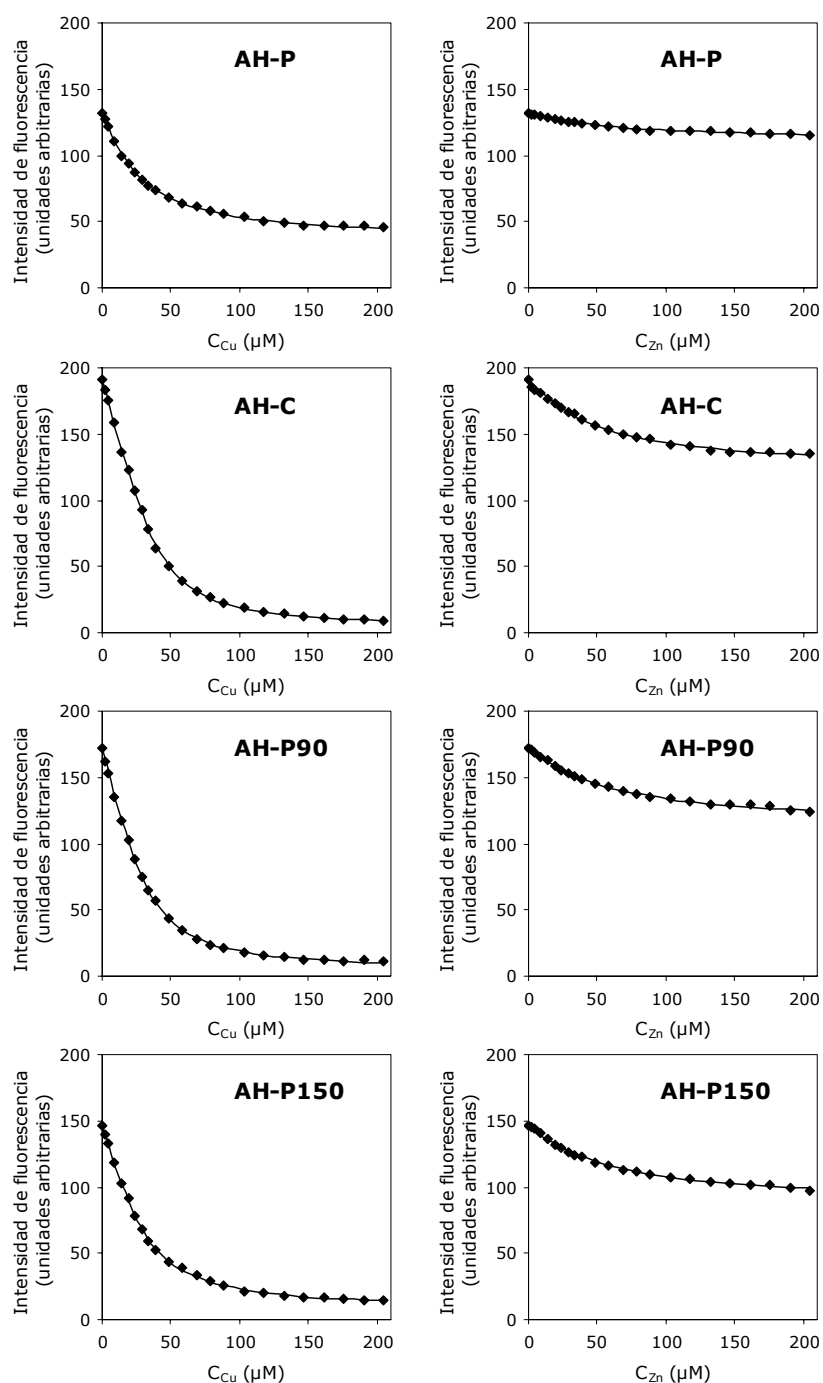
La capacidad de complejar metales es una de las propiedades físico-químicas más importantes de las sustancias húmicas, desempeñando un papel muy relevante desde el punto de vista agronómico y medioambiental, ya que influyen extraordinariamente en la biodisponibilidad de los micronutrientes y de los metales pesados tóxicos en los suelos. Dependiendo del pH, de la presencia de sales (efecto de la fuerza iónica) y del grado de saturación de los puntos de enlace, entre otros factores, las sustancias húmicas forman complejos solubles o insolubles con los elementos traza. Debido a su menor peso molecular y mayor contenido de grupos funcionales ácidos, los complejos metálicos de ácidos fúlvicos son más solubles que los de ácidos húmicos y presentan mayor movilidad y biodisponibilidad. Por tanto, los ácidos fúlvicos actúan como transportadores de metales en la solución del suelo, mientras que los ácidos húmicos tienden a inmovilizar y acumular los elementos traza en las fases sólidas (Stevenson, 1994; Tipping, 2002).

La capacidad de los ácidos húmicos y fúlvicos para formar complejos con elementos traza se debe a su contenido generalmente alto de grupos funcionales oxigenados, incluyendo grupos carboxilo, hidroxilo fenólico, enólicos y alcohólicos, y carbonilos (Stevenson, 1994). Los grupos amino, imino y los que contienen azufre y fósforo también pueden estar directamente involucrados (Senesi, 1992).

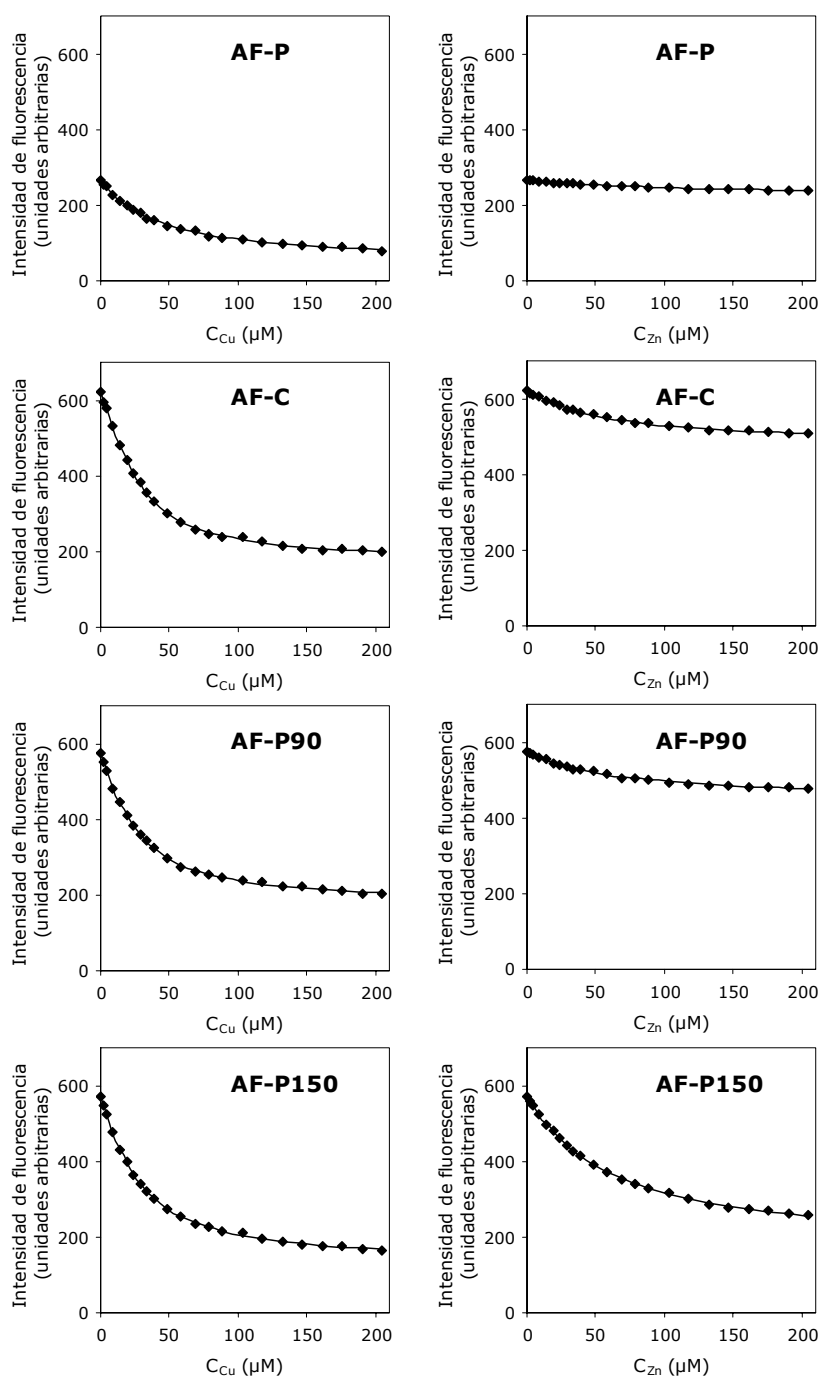
El objetivo de esta parte del experimento fue determinar y discutir comparativamente las capacidades complejantes de las sustancias húmicas frente al cobre(II) y al zinc(II) y las constantes de estabilidad de los complejos que dichos iones forman con las sustancias húmicas extraídas del purín, del suelo control y de los suelos enmendados. El método desarrollado para tal fin consistió en la valoración de una disolución de sustancia húmica, utilizando una solución de ion metálico como valorante y posterior determinación de la intensidad de fluorescencia. Antes de presentar y discutir los resultados obtenidos, se exponen una serie de consideraciones teóricas generales, los conceptos que han sido utilizados y los modelos empleados para analizar los resultados.

##### **• Constantes de estabilidad y capacidades complejantes**

La figura IV.5.10. muestra los valores experimentales de intensidad de fluorescencia del fluoróforo principal de los ácidos húmicos en función de la concentración de cobre(II) y zinc(II) y las regresiones no lineales que mejor se ajustan al modelo de Ryan y Weber (1982), mientras que los correspondientes a los ácidos fúlvicos se representan en la figura IV.5.11.



**Figura IV.5.10.** Valores experimentales (símbolos) y ajustes al modelo de Ryan y Weber (líneas) de la intensidad de fluorescencia del pico principal en los espectros EEM de los ácidos húmicos (AHs) extraídos del purín (P), del suelo control (C) y de los suelos enmendados anualmente con 90 y 150  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$  de purín de cerdo (P90 y P150, respectivamente) durante siete años, en función de la concentración de cobre(II) ( $C_{\text{Cu}}$ ) y de zinc(II) ( $C_{\text{Zn}}$ ).



**Figura IV.5.11.** Valores experimentales (símbolos) y ajustes al modelo de Ryan y Weber (líneas) de la intensidad de fluorescencia del pico principal en los espectros EEM de los ácidos fúlvicos (AFs) extraídos del purín (P), del suelo control (C) y de los suelos enmendados anualmente con 90 y 150  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$  de purín de cerdo (P90 y P150, respectivamente) durante siete años, en función de la concentración de cobre(II) ( $C_{\text{Cu}}$ ) y de zinc(II) ( $C_{\text{Zn}}$ ).

Los parámetros estimados según este modelo se exponen en las tablas IV.5.10. y IV.5.11. Los valores elevados de los coeficientes de correlación indican que el modelo se ajusta muy bien a los datos experimentales obtenidos con las sustancias húmicas estudiadas, como previamente se ha demostrado por otros autores en sistemas similares (Ryan y Weber, 1982; Luster et al., 1996; Elkins y Nelson, 2001; Wu et al., 2004b; Plaza et al., 2005b).

**Tabla IV.5.10. Parámetros estimados según el modelo de Ryan y Weber para la complejación de Cu(II) y de Zn(II) por los ácidos húmicos (AHs) extraídos del purín (P), del suelo control (C) y de los suelos enmendados anualmente con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P90 y P150, respectivamente) durante siete años.<sup>a</sup>**

Parámetro <sup>a</sup>	Origen de la muestra de AH			
	P	C	P90	P150
<b>r<sub>Cu</sub></b>	0.9996***	0.9998***	0.9999***	0.9998***
<b>I<sub>CuL</sub> (UA)</b>	36.0	2.9	2.9	6.9
<b>log K<sub>Cu</sub></b>	4.71	5.25	5.13	5.02
<b>CC<sub>Cu</sub> (mmol g<sup>-1</sup>)</b>	1.01	2.84	2.20	2.04
<b>r<sub>Zn</sub></b>	0.9977***	0.9986***	0.9987***	0.9992***
<b>I<sub>ZnL</sub> (UA)</b>	110.7	124.1	114.2	87.8
<b>log K<sub>Zn</sub></b>	4.24	4.49	4.37	4.36
<b>CC<sub>Zn</sub> (mmol g<sup>-1</sup>)</b>	0.66	1.86	1.72	1.40

<sup>a</sup>r<sub>M</sub>, coeficiente de correlación, I<sub>ML</sub>, intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias, UA) de complejos saturados de ion metálico; log K<sub>M</sub>, constante de estabilidad; CC<sub>M</sub>, capacidad complejante.

\*\*\* p ≤ 0.001.

Las constantes de estabilidad (log K) de los complejos de los ácidos húmicos y de los fúlvicos con el cobre(II) son en todos los casos superiores a las correspondientes de los complejos con el zinc(II), lo que es coherente con las series de Irving y Williams (1948), independientemente de la naturaleza del agente complejante. Las constantes de estabilidad de los complejos de los ácidos húmicos del purín con ambos metales son menores que las del suelo control, lo mismo que las de los ácidos húmicos de los suelos enmendados, las cuales tienden a disminuir ligeramente con el aumento de la dosis de residuo. Las constantes de estabilidad más elevadas registradas para los ácidos húmicos del purín pueden relacionarse con su carácter aromático, su grado de humificación elevado y la presencia mayor de grupos funcionales ácidos aromáticos, ya que un grupo carboxilo

aromático junto a un grupo hidroxilo fenólico, o dos grupos carboxilo aromáticos adyacentes son capaces de formar con iones metálicos estructuras muy estables como anillos de tipo salicilato o ftalato (Senesi, 1992; Stevenson, 1994; Tipping, 2002). Igualmente, las constantes de estabilidad de los complejos de los ácidos fúlvicos del purín con el cobre(II) y con el zinc(II) son menores que las de los suelos, aunque éstas tienden a disminuir con la dosis en los suelos enmendados respecto a las del suelo control.

**Tabla IV.5.11. Parámetros estimados según el modelo de Ryan y Weber para la complejación de Cu(II) y de Zn(II) por los ácidos fúlvicos (AFs) extraídos del purín (P), del suelo control (C) y de los suelos enmendados anualmente con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P90 y P150, respectivamente) durante siete años.<sup>a</sup>**

Parámetro <sup>a</sup>	Origen de la muestra de AF			
	P	C	P90	P150
<b>r<sub>Cu</sub></b>	0.9994 <sup>***</sup>	0.9998 <sup>***</sup>	0.9997 <sup>***</sup>	0.9999 <sup>***</sup>
<b>I<sub>CuL</sub> (UA)</b>	49.2	172.9	174.5	128.1
<b>log K<sub>Cu</sub></b>	4.45	4.94	4.80	4.74
<b>CC<sub>Cu</sub> (mmol g<sup>-1</sup>)</b>	0.67	1.90	1.27	1.22
<b>r<sub>Zn</sub></b>	0.9996 <sup>***</sup>	0.9992 <sup>***</sup>	0.9987 <sup>***</sup>	0.9998 <sup>***</sup>
<b>I<sub>ZnL</sub> (UA)</b>	223.7	480.9	451.7	172.3
<b>log K<sub>Zn</sub></b>	3.96	4.35	4.31	4.29
<b>CC<sub>Zn</sub> (mmol g<sup>-1</sup>)</b>	0.62	1.33	1.19	1.00

<sup>a</sup>r<sub>M</sub>, coeficiente de correlación, I<sub>ML</sub>, intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias, UA) de complejos saturados de ion metálico; log K<sub>M</sub>, constante de estabilidad; CC<sub>M</sub>, capacidad complejante.

\*\*\*  $p \leq 0.001$ .

Las capacidades complejantes de los ácidos húmicos presentan valores más elevados frente al cobre(II) que frente al zinc(II), siendo las correspondientes a los ácidos húmicos del purín menores que las de cualquiera de los procedentes los suelos. Además, el aumento de la dosis de purín está relacionado con una disminución de este parámetro. De forma similar, las capacidades complejantes de los ácidos fúlvicos son más altas frente al cobre(II) que frente al zinc(II), aunque las diferencias entre las correspondientes a ambos metales son menos acusadas que en el caso de los ácidos húmicos. Los ácidos fúlvicos del purín presentan las capacidades complejantes menores, mientras que los del suelo control tiene los valores más elevados, observándose una disminución con el aumento de la dosis.

La capacidad complejante con el cobre(II) y con el zinc(II) está correlacionada significativa y positivamente ( $p \leq 0.05$ ) con la acidez total, con el contenido de grupos carboxilo y con el de hidroxilo fenólicos (tabla IV.5.12.), los cuales son considerados los principales responsables de la formación de complejos de las sustancias húmicas con los iones metálicos (Stevenson, 1994). Sin embargo, las capacidades complejantes y las constantes de estabilidad de los ácidos fúlvicos son menores que las de los húmicos del mismo origen, a pesar de que aquellos poseen un contenido más alto de grupos funcionales ácidos. Por tanto, existen otros factores que afectan al comportamiento de las sustancias húmicas frente a los metales, como: (a) la participación de puntos de unión de tipo salicílico y ftálico; (b) la formación de complejos 2:1 con el ion metálico como puente entre dos moléculas de ácido húmico, y/o (c) la presencia de grupos carboxilo e hidroxilo fenólico que no se encuentran disponibles para la unión del ion debido a impedimentos estéricos, competición con protones o efectos electrostáticos (por ejemplo, la complejación de un metal en un punto de unión disminuye la capacidad de los grupos funcionales vecinos para unirse a otros iones). En definitiva, se considera que el grado de aromaticidad y de humificación influye de manera decisiva sobre la afinidad de las sustancias húmicas para la formación de complejos metálicos (Stevenson y Chen, 1991; Kaschl et al., 2002).

**Tabla IV.5.12. Coeficientes de correlación entre las capacidades complejantes ( $\text{mmol g}^{-1}$ ) frente al Cu(II) y al Zn(II) ( $\text{CC}_{\text{Cu}}$  y  $\text{CC}_{\text{Zn}}$ , respectivamente) frente al contenido de grupos funcionales ácidos ( $\text{mmol g}^{-1}$ ) de los ácidos húmicos y fúlvicos estudiados.**

	Acidez total	COOH	OH fenólicos
<b>Ácidos húmicos</b>			
$\text{CC}_{\text{Cu}}$	0.9970**	0.9982**	0.9807*
$\text{CC}_{\text{Zn}}$	0.9718*	0.9728*	0.9573*
<b>Ácidos fúlvicos</b>			
$\text{CC}_{\text{Cu}}$	0.9727*	0.9764*	0.9613*
$\text{CC}_{\text{Zn}}$	0.9915**	0.9865*	0.9979**

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ .

#### IV.5.4. MATERIA ORGÁNICA HIDROSOLUBLE

La materia orgánica lábil se corresponde con la parte más degradable de la edáfica, y por tanto, susceptible de mineralización, dando idea de los productos que actúan como fuente inmediata de energía para los microorganismos (García et al., 2000). Debido a su naturaleza dinámica, las

fracciones lábiles de materia orgánica, incluyendo la extraíble en agua o el carbono de la biomasa microbiana, son capaces de responder en periodos relativamente cortos de tiempo a las alteraciones producidas sobre el sistema, incluyendo cambios de manejo del suelo (Caravaca et al., 2002; Ghani et al., 2003) o incorporación de enmiendas orgánicas (Saviozzi et al., 1999; García-Gil, 2001; Parat et al., 2005).

A continuación se describe la influencia que ha ejercido la incorporación de purín de cerdo sobre el contenido de carbono hidrosoluble, y sobre dos de las fracciones de la materia orgánica lábil más significativas: carbohidratos y compuestos fenólicos. Aunque también se analizaron el contenido de proteínas en el suelo, no se detectaron cantidades apreciables de las mismas en el momento de cada cosecha. Estos resultados se atribuyen a la degradación de los compuestos proteicos solubles procedentes de la incorporación del purín o de los generados en el suelo a lo largo del ciclo de cultivo.

#### **IV.5.4.1. Carbono hidrosoluble**

A pesar de que el purín de cerdo aporta grandes cantidades de materia orgánica lábil (Moral et al., 2005a), en los tres años estudiados sólo se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos residuales en 2003 y entre los acumulativos en la cosecha de 2004 (tabla IV.5.13). En éstos, el tratamiento con la dosis más elevada registra el menor contenido de carbono hidrosoluble. Por otra parte, hay que destacar una reducción importante de los niveles de carbono hidrosoluble medidos en 2004 respecto a los años anteriores (figura IV.5.12.).

Otros estudios señalan que el empleo de diversos estiércoles incrementa de manera significativa e inmediata el contenido de carbono hidrosoluble del suelo (Zaman et al., 1998; Rochette et al., 2000; Bol et al., 2003), aunque los cambios no son permanentes en el tiempo. Según Chantigny (2003), este aumento se atribuye a la presencia de compuestos solubles en la enmienda, que sin embargo son rápidamente degradados, con lo que el suelo recupera en un periodo de tiempo relativamente corto el nivel inicial de materia orgánica hidrosoluble. Por otra parte, Bol et al. (1999) sugirieron que la aplicación de estiércol promovió la solubilización de carbono orgánico nativo, bien mediante la movilización de compuestos solubles a partir de la materia orgánica nativa, o bien mediante el desplazamiento o desorción de los compuestos orgánicos protegidos por la fase mineral del suelo.

En cualquier caso, se trata de una fracción con una dinámica muy activa y variable, constituyendo el vínculo entre la biomasa microbiana y otras fracciones orgánicas menos lábiles, ya que se considera que, por una parte, la biomasa microbiana emplea los sustratos biodisponibles para su



crecimiento y mantenimiento energético, y por otra, esta biomasa es responsable de los procesos de neoformación a través de la biodegradación de residuos orgánicos (Parat et al., 2005).

**Tabla IV.5.13. Contenido de carbono hidrosoluble ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

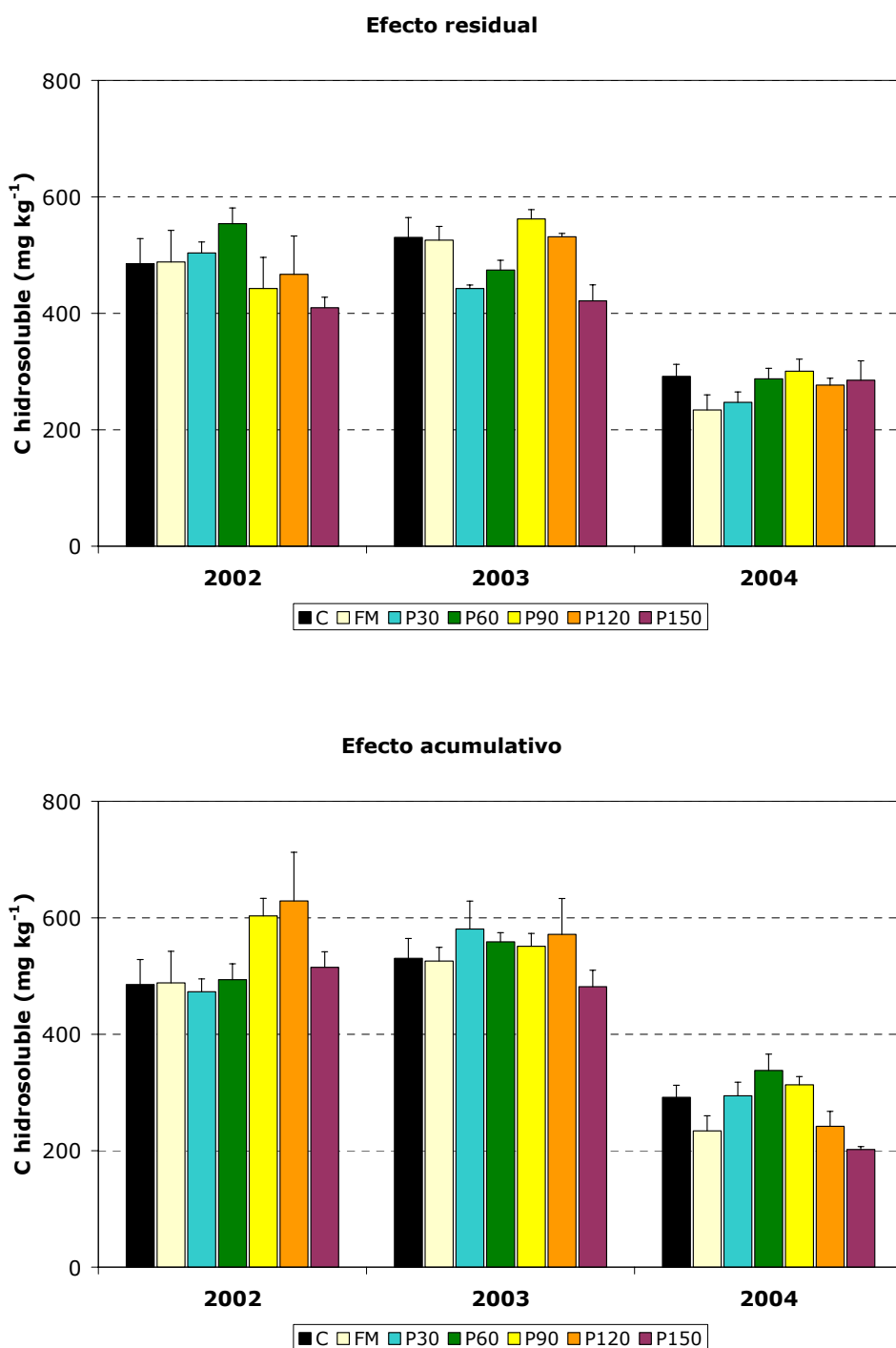
Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	485	531 abc	292	485	531	292 ab
<b>FM</b>	488	526 abs	234	488	526	234 ab
<b>P30</b>	504	443 bc	247	473	581	294 ab
<b>P60</b>	554	474 abc	288	494	559	338 a
<b>P90</b>	443	562 a	301	603	551	313 ab
<b>P120</b>	467	531 ab	277	629	572	242 ab
<b>P150</b>	410	422 c	285	515	482	202 b
<b>Valor p</b>	ns	**	ns	ns	ns	**

\*\*  $p \leq 0.01$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

#### IV.5.4.2. Carbohidratos hidrosolubles

El contenido de carbohidratos solubles, determinado como el carbono soluble en el reactivo antrona, refleja el nivel de azúcares libres, principalmente pentosas y hexosas (Sánchez-Monedero et al., 1999). Esta fracción de la materia orgánica hidrosoluble se considera un indicador sensible de la actividad microbiana y de las transformaciones bioquímicas que tienen lugar en el suelo (García et al., 2000; Ghani et al., 2003). A pesar del aporte de carbohidratos mediante residuos orgánicos o restos vegetales, la principal fuente de los mismos es la resíntesis microbiana (Stevenson, 1994). Como muestra la tabla IV.5.14., la aplicación de purín de cerdo prácticamente no promueve variaciones del contenido de carbohidratos solubles debidas al tratamiento, al menos en el momento de la toma de muestra. Únicamente en 2003, se encuentra un incremento significativo de esta fracción con la dosis acumulativa de purín. En cualquier caso, los resultados obtenidos indican una disminución progresiva en todos los suelos con el transcurso del experimento.



**Figura IV.5.12.** Contenido de carbono hidrosoluble del suelo control (C), del abonado con fertilizante mineral (FM) y de los enmendados con 30, 60, 90, 120 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P30, P60, P90, P120 y P150, respectivamente) una vez al inicio del experimento (efecto residual) o anualmente (efecto acumulativo). Las barras indican el error estándar de la media (n=3).

**Tabla IV.5.14. Contenido de carbohidratos hidrosolubles ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	78	45	31	78	45 b	31
<b>FM</b>	82	44	24	82	44 b	24
<b>P30</b>	72	40	32	39	45 b	24
<b>P60</b>	89	45	36	50	48 b	32
<b>P90</b>	73	56	34	61	62 ab	27
<b>P120</b>	86	54	31	42	83 a	22
<b>P150</b>	87	40	37	43	80 a	14
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	ns	***	ns

\*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

Al igual que el carbono soluble en agua, la fracción de carbohidratos solubles participa a lo largo del ciclo de cultivo de un gran dinamismo (García-Gil, 2001) y sus oscilaciones pueden estar más marcadas por variaciones estacionales que por la adición de restos orgánicos (Ros, 2000; Spaccini et al., 2000). Este hecho puede explicar las variaciones encontradas en la cosecha de 2003, en la que las temperaturas durante la toma de muestra fueron más elevadas, promoviendo una mayor actividad degradativa en combinación con la estimulación debida a la incorporación del purín, como apuntan los coeficientes de correlación entre el contenido de carbohidratos y otros parámetros indicativos de actividad biológica (tabla IV.8.8.).

#### IV.5.4.3. Compuestos fenólicos

La tabla IV.5.15. refleja la evolución del contenido de compuestos fenólicos en los distintos tratamientos y años de experimentación, observándose, de forma similar que los niveles de carbohidratos solubles, una disminución paulatina a lo largo de los años. Sin embargo, dentro de cada cosecha, sólo ofrecen diferencias significativas los niveles obtenidos en los tratamientos acumulativos en 2002 y 2004. En el último año, destaca una disminución en los suelos que recibieron las dosis más altas.

**Tabla IV.5.15. Contenido de compuestos fenólicos hidrosolubles (mg kg<sup>-1</sup>) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	61	51	37	61 ab	51	37 ab
<b>FM</b>	67	53	35	67 ab	53	35 ab
<b>P30</b>	74	48	36	47 b	51	42 ab
<b>P60</b>	69	44	38	55 b	52	50 a
<b>P90</b>	72	55	36	93 a	54	41 ab
<b>P120</b>	85	52	38	72 ab	54	29 b
<b>P150</b>	71	51	44	69 ab	45	28 b
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	**	ns	**

\*\*  $p \leq 0.01$ ; no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

Del mismo modo que los carbohidratos solubles, los compuestos fenólicos juegan un papel importante en la degradación de la materia orgánica, de forma que su contenido en el suelo se encuentra en continuo equilibrio como consecuencia de su degradación biológica y formación a partir de polímeros de mayor complejidad (Sánchez-Monedero et al., 1999). Concretamente, la presencia de estos compuestos en suelos es debida a la degradación de ligninas y sustancias húmicas por parte de la biomasa microbiana (García-Gil, 2001). Por otra parte, el purín contiene cantidades variables de sustancias fenólicas que son degradados con relativa facilidad una vez incorporados al suelo (Díez et al., 2001), evitando posibles problemas de fitotoxicidad (Saviozzi et al., 1997). De hecho, el ligero descenso con la dosis de purín en el último año puede relacionarse con una mayor actividad biológica (tabla IV.8.9.).

## **IV.6. ESTUDIO DE LA ABUNDANCIA DE ISÓTOPOS ESTABLES $\delta^{13}\text{C}$ Y $\delta^{15}\text{N}$ EN SUELO Y PLANTA**

En este apartado se estudia la composición isotópica de las muestras de purín, grano, paja y suelo recogidas en el último año de experimentación,

correspondientes al control y a los tratamientos acumulativos con 90 y 150  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$  de purín de cerdo. Concretamente, se han determinado los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$ , con el fin de estimar el destino del carbono y del nitrógeno añadidos con el residuo. En este punto se ha optado por alterar el orden expositivo seguido en este trabajo con el fin de obtener una visión global de la transferencia de carbono y de nitrógeno en el sistema purín-suelo-planta.

El análisis de la abundancia natural de isótopos estables en suelos y plantas se basa en que la composición isotópica de un compuesto particular está relacionada con su origen. Esta composición varía sustancialmente debido al fraccionamiento que tiene lugar durante la rotura o formación de enlaces, y por otros procesos dependientes de la masa atómica (por ejemplo, la difusión). De este modo, algunas sustancias se ven enriquecidas o empobrecidas en el isótopo minoritario, quedando caracterizadas por una *firma isotópica* (Hoefs, 1997).

Para estudiar la naturaleza y alcance de la influencia del purín de cerdo sobre el sistema suelo-planta, se deben tener en cuenta una serie de condicionantes. En primer lugar, se requiere que la composición isotópica del purín sea lo suficientemente contrastada con relación a los materiales estudiados. En segundo lugar, es necesario que se preserve el carácter diferenciado o marcador de la fuente isotópica, o al menos, conocer suficientemente los procesos que pudieran producir un fraccionamiento significativo (Robinson, 2001).

#### **IV.6.1. $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ EN EL PURÍN DE CERDO**

En el purín de cerdo analizado, los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  fueron, respectivamente,  $-14.39 \text{‰}$  y  $14.37 \text{‰}$  (tabla IV.1.1.). Por tanto se trata de un material que se encuentra significativamente enriquecido en ambos isótopos respecto a la composición del suelo original, asumiendo como tal la del control (tabla IV.6.3).

El valor de  $\delta^{13}\text{C}$  del purín lo identifica como una enmienda de tipo  $\text{C}_4$ . El principal proceso biológico de fraccionamiento isotópico del carbono es la fotosíntesis, estableciéndose claras diferencias en la composición del material vegetal en función de su ciclo fotosintético. Así, las plantas de tipo  $\text{C}_3$  tienen valores de  $\delta^{13}\text{C}$  entre  $-23$  y  $-30 \text{‰}$ , mientras que las  $\text{C}_4$  presentan mayor enriquecimiento, con valores de  $\delta^{13}\text{C}$  entre  $-9$  y  $19 \text{‰}$  (Staddon, 2004). Estas diferencias se transmiten a los residuos de origen animal, a través de la dieta, y a la materia orgánica del suelo, como consecuencia de la incorporación al mismo de restos vegetales (Balesdent y Mariotti, 1996). Por otra parte, el valor de  $\delta^{15}\text{N}$  se encuentra dentro del rango obtenido por Curt et al. (2004) para residuos ganaderos en España ( $10\text{-}30 \text{‰}$ ), aunque su proximidad al límite inferior podría indicar que el

tiempo de almacenamiento en la balsa fue relativamente bajo, ya que las condiciones anaerobias favorecen la volatilización de amonio, con el consiguiente enriquecimiento isotópico del residuo (Dittert et al., 1998).

#### IV.6.2. $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ EN EL GRANO Y LA PAJA DE CEBADA

La tabla IV.6.1. muestra los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  en el grano y en la paja de cebada. No se han encontrado diferencias significativas atribuibles al tratamiento en este parámetro en ninguna de las partes de la planta. Evidentemente, la fuente de carbono para la planta es la fijación fotosintética de  $\text{CO}_2$ , por lo que no es de esperar un efecto directo, o de fuente, debido a la enmienda con purín. Sin embargo, la utilidad de este análisis radica en que el  $\delta^{13}\text{C}$  se emplea como indicador de la eficiencia en el uso del agua (WUE) de la planta (Tambussi et al., 2005). En condiciones de estrés hídrico, las plantas presentan mayor  $\delta^{13}\text{C}$ , es decir, valores menos negativos, debido a que se produce el cierre de los estomas para minimizar las pérdidas de agua por transpiración, y como consecuencia, la discriminación contra la fijación de  $^{13}\text{CO}_2$  es menor (Sánchez-Díaz et al., 2002).

**Tabla IV.6.1. Valores de  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) del grano y de la paja de cebada cosechada en 2004, en el suelo control y en los suelos enmendados anualmente con 90 y 150  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$  de purín de cerdo.**

Tratamiento	$\delta^{13}\text{C}$ en grano	$\delta^{13}\text{C}$ en paja
<b>C</b>	-25.70	-27.68
<b>P90</b>	-25.99	-27.70
<b>P150</b>	-25.68	-27.88
<b>Valor p</b>	ns	ns

ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Respecto al  $\delta^{15}\text{N}$ , los resultados revelan (tabla IV.6.2.) un enriquecimiento en el grano de las parcelas tratadas con purín respecto al control, y un ligero descenso en la paja del tratamiento con 150  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$ . La mayor parte de la bibliografía consultada se refiere a experimentos en los que el residuo incorporado se enriqueció artificialmente con  $^{15}\text{N}$ , mediante adición al residuo de sulfato o nitrato amónico marcado (Petersen, 2003; Thomsen, 2005) o mediante enriquecimiento de la dieta del animal (Sørensen y Jensen, 1998; Chantigny et al., 2004). En este estudio no es posible el cálculo de la eficiencia fertilizante a partir de la abundancia isotópica, ya que sólo se disponen de datos del último año de aplicación. Otra limitación importante, común a los experimentos basados en medidas de abundancia

natural, es que se requiere que las diferencias en  $\delta^{15}\text{N}$  entre las fuentes potenciales de nitrógeno sean significativas para que compensen las incertidumbres introducidas por la mezcla de distintos *pools* de nitrógeno o por procesos biológicos o físico-químicos que produzcan fraccionamiento (Robinson, 2001), por lo que no es sencillo explicar las variaciones encontradas. A pesar de ello, se pueden interpretar los resultados obtenidos considerando el valor de  $\delta^{15}\text{N}$  como integrador de los procesos del ciclo del nitrógeno involucrados desde la aplicación del purín hasta el análisis de la planta (Robinson, 2001), por lo que el valor de  $\delta^{15}\text{N}$  en grano constituiría un indicador del empleo de purín de cerdo como fertilizante (Choi et al., 2003).

**Tabla IV.6.2. Valores de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) del grano y de la paja de cebada cosechada en 2004, en el suelo control y en los suelos enmendados anualmente con 90 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo.**

Tratamiento	$\delta^{15}\text{N}$ en grano	$\delta^{15}\text{N}$ en paja
<b>C</b>	2.41 b	5.45 a
<b>P90</b>	6.21 a	5.37 a
<b>P150</b>	5.81 a	4.35 b
<b>Valor p</b>	***	***

\*\*\*  $p \leq 0.001$ .

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

### IV.6.3. $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ EN EL SUELO

La diferencia en  $\delta^{13}\text{C}$  entre las plantas  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_4$  y, por extensión, entre los suelos tipo  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_4$  (debido a que el carbono orgánico del suelo tiende a presentar una firma isotópica próxima a la especie vegetal dominante) se ha usado ampliamente para seguir el origen del carbono del suelo y la dinámica de sus transformaciones (Balesdent y Mariotti, 1996; Staddon, 2004). Potencialmente, la introducción de enmiendas orgánicas cuya riqueza en  $^{13}\text{C}$  difiera de las del suelo y de los restos vegetales, permite trazar el destino del carbono derivado de enmienda en el carbono del suelo (Gerzabek et al., 2001; Glaser et al., 2001; Bol et al., 2003).

Según Balesdent y Mariotti (1996), la composición isotópica de la materia orgánica del suelo viene dada por el balance de masas de una mezcla de dos componentes:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{trat}} \times (\text{COT}_{\text{control}} + \text{COT}_{\text{purín}}) = \delta^{13}\text{C}_{\text{control}} \times \text{COT}_{\text{control}} + \delta^{13}\text{C}_{\text{purín}} \times \text{COT}_{\text{purín}}$$

donde  $\delta^{13}\text{C}_{\text{trat}}$ ,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{control}}$  y  $\delta^{13}\text{C}_{\text{purín}}$  representan la abundancia isotópica del suelo enmendado con purín, del suelo control y del purín, respectivamente.  $\text{COT}_{\text{control}}$  es el carbono orgánico total del suelo control y  $\text{COT}_{\text{purín}}$  representa la cantidad de carbono en el suelo enmendado que deriva del purín añadido a lo largo del experimento. Por tanto, se asume que el carbono orgánico total de los suelos enmendados equivale a la suma del carbono orgánico total del control más el incorporado del purín. También se supone que la composición isotópica del suelo control no varió significativamente a lo largo del experimento, ya que se mantuvo el mismo tipo de cultivo (Lynch et al., 2006).

A partir de la ecuación anterior, se puede calcular la fracción de carbono orgánico del suelo enmendado que deriva del purín de cerdo,  $F_{\text{C-purín}}$  (Staddon, 2004):

$$F_{\text{C purín}}(\%) = \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{trat}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{control}}}{\delta^{13}\text{C}_{\text{purín}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{control}}} \times 100$$

Los resultados de la tabla IV.6.3. reflejan un enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$  de los suelos enmendados con purín respecto al control, similar para las dos dosis estudiadas. Ese enriquecimiento equivale a una incorporación del 11.2% y del 13.4% del carbono total suministrado al suelo por la aplicación acumulativa de purín de cerdo, en los tratamientos con 90 y 150  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$ , respectivamente, sin que los porcentajes se diferencien significativamente. Teniendo en cuenta que en estos tratamientos no se observan variaciones significativas del contenido de carbono orgánico total (apartado IV.5.1), se deduce que la incorporación de carbono del purín ha tenido lugar a costa de la mineralización de la materia orgánica nativa del suelo, aunque no se observe una reducción neta del contenido de carbono (Kuzyakov et al., 2000; Neff et al., 2002).

**Tabla IV.6.3. Valores de  $\delta^{13}\text{C}$  (‰),  $F_{\text{C-purín}}$  (%) y  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) en 2004, en el suelo control y en los suelos enmendados anualmente con 90 y 150  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$  de purín de cerdo.**

Tratamiento	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$F_{\text{C-purín}}$ (%)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
<b>C</b>	-26.01 b	0.0 b	4.36 b
<b>P90</b>	-24.71 a	11.2 a	4.98 a
<b>P150</b>	-24.46 a	13.4 a	5.39 a
<b>Valor p</b>	*	*	**

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ .

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).



Lynch et al. (2006) observaron un enriquecimiento del suelo en  $^{13}\text{C}$  a los dos años de enmendarlo con diferentes tipos de residuos orgánicos, mayor cuanto más elevada era la diferencia entre los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  del suelo receptor y del residuo. Por otra parte, Glaser et al. (2001) hallaron que la contribución del estiércol líquido al carbono del suelo fue del 36% dos semanas después de añadirlo.

Una limitación del modelo simple de mezcla es el posible fraccionamiento isotópico del carbono de la enmienda y su acumulación preferencial en distintas fracciones de la materia orgánica, en función de la estabilidad de los compuestos orgánicos introducidos. Durante la mineralización microbiana se produce una pérdida preferencial de  $^{12}\text{C}$ , mientras que aquellos compuestos orgánicos menos disponibles para la degradación biológica se enriquecen en el isótopo pesado (Gerzabek et al., 2001), provocando que el valor calculado de  $F_{\text{C-purín}}$  sea más elevado que el porcentaje de carbono efectivamente incorporado a la materia orgánica del suelo. Neff et al. (2002) mostraron además que la fertilización nitrogenada, sin aporte de una fuente adicional de carbono, variaba la estabilidad del carbono orgánico del suelo, alterando el enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$  de las diversas fracciones de materia orgánica. A pesar de estas limitaciones, Gerzabek et al. (2001) concluyeron que el manejo agrícola, específicamente el uso de enmiendas orgánicas, tiene un impacto más significativo sobre la abundancia natural de  $^{13}\text{C}$  del suelo que las condiciones ambientales o el tipo de suelo.

En lo que se refiere a la abundancia de  $^{15}\text{N}$ , hay que señalar que la composición isotópica de los suelos no sólo refleja la composición inicial del nitrógeno desde su origen, es decir, si se trata de nitrógeno fijado biológicamente o procedente de fertilizantes sintéticos o de enmiendas orgánicas (Curt et al., 2004), sino que dicha composición puede estar influenciada por el fraccionamiento isotópico durante el transporte y la transformación química y biológica del nitrógeno (Dittert et al., 1998). Procesos como la volatilización de amonio, nitrificación, desnitrificación o lixiviación que controlan la dinámica del ciclo del nitrógeno, discriminan contra el isótopo pesado y dan lugar a empobrecimiento en  $^{15}\text{N}$  del producto y un enriquecimiento del sustrato (Robinson, 2001).

Tal y como muestra la tabla IV.6.3., en los suelos que han recibido enmiendas continuadas con purín aumenta de manera significativa el  $\delta^{15}\text{N}$  respecto al suelo control, sin que haya diferencias entre las dos dosis estudiadas. En general, la aplicación de residuos orgánicos, normalmente enriquecidos en  $^{15}\text{N}$  (Curt et al., 2004), produce un incremento de los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  del suelo, respecto a los suelos sin enmendar o a los abonados con fertilizantes minerales (Lynch et al., 2006), lo que sugiere una contribución significativa del nitrógeno procedente del residuo al nitrógeno del suelo (Glaser et al., 2001). Sin embargo, el cálculo de la

fracción de nitrógeno del suelo que puede considerarse derivado del purín está limitado por las incertidumbres señaladas acerca del fraccionamiento natural del  $^{15}\text{N}$ . A pesar de ello, Glaser et al. (2001) encontraron que un enriquecimiento del 9 ‰ en el valor de  $\delta^{15}\text{N}$  del estiércol respecto al del suelo permitía un cálculo aproximado de esta fracción. En esta experiencia, la diferencia entre el purín y el suelo original supone el 10‰  $\delta^{15}\text{N}$ , y el porcentaje de nitrógeno procedente del purín alcanza los valores: 4.3 % y 7.1% en los tratamientos con 90 y 150  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$ , respectivamente. Como en todo caso los procesos de fraccionamiento ocasionan un aumento de  $\delta^{15}\text{N}$  en el suelo, estos cálculos suponen una estimación de la máxima proporción de nitrógeno derivado de purín que ha sido incorporado al nitrógeno del suelo.

Por último, se encuentra una elevada correlación significativa entre la dosis de purín y los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  ( $r=0.85$ ,  $p\leq 0.01$ ) y  $\delta^{15}\text{N}$  ( $r=0.93$ ,  $p\leq 0.001$ ), lo que significa que dichos parámetros son marcadores más fiables y sensibles de la influencia del purín en el suelo que el contenido total de carbono y nitrógeno.

## **IV.7. EFECTOS SOBRE PROPIEDADES BIOLÓGICAS**

La dinámica de las distintas fracciones de carbono en el suelo está directamente ligada a la actividad de los microorganismos presentes en el mismo (García-Gil, 2001), por lo que el estudio de los parámetros biológicos puede ayudar a entender los procesos que se están induciendo sobre la biota del suelo como consecuencia de la adición de enmiendas orgánicas. Estas propiedades permiten, debido a su sensibilidad, conocer de una manera rápida los cambios que se producen en la calidad del suelo (Sparling, 1997; García et al., 2000; Insam, 2001; Anderson, 2003).

En este estudio se analizan dos propiedades biológicas cuyo análisis está ampliamente extendido: el carbono de biomasa microbiana y la respiración basal del suelo. También se han calculado dos índices derivados de éstos: la relación  $C_{\text{BIO}}/C_{\text{OT}}$ , es decir, la proporción de carbono orgánico total que representa el carbono de la biomasa microbiana (también denominado cociente microbiano; Sparling, 1997) y el cociente metabólico  $q\text{CO}_2$ , definido como la tasa respiratoria por unidad de carbono de biomasa (Anderson y Domsch, 1985).

### IV.7.1. CARBONO DE LA BIOMASA MICROBIANA

Los microorganismos del suelo, a pesar de representar un pequeño porcentaje de la materia orgánica, son los componentes más activos del mismo. El carbono de la biomasa microbiana puede utilizarse de manera más efectiva que la materia orgánica en general, o el carbono orgánico total en particular, como indicador de las variaciones experimentadas en la calidad de un suelo, ya que responde de forma más rápida y sensible a los cambios que se puedan producir en éste (García et al., 2000). Sparling (1997) sugirió que los cambios de la biomasa microbiana pueden predecir la tendencia a largo plazo de la dinámica de la materia orgánica.

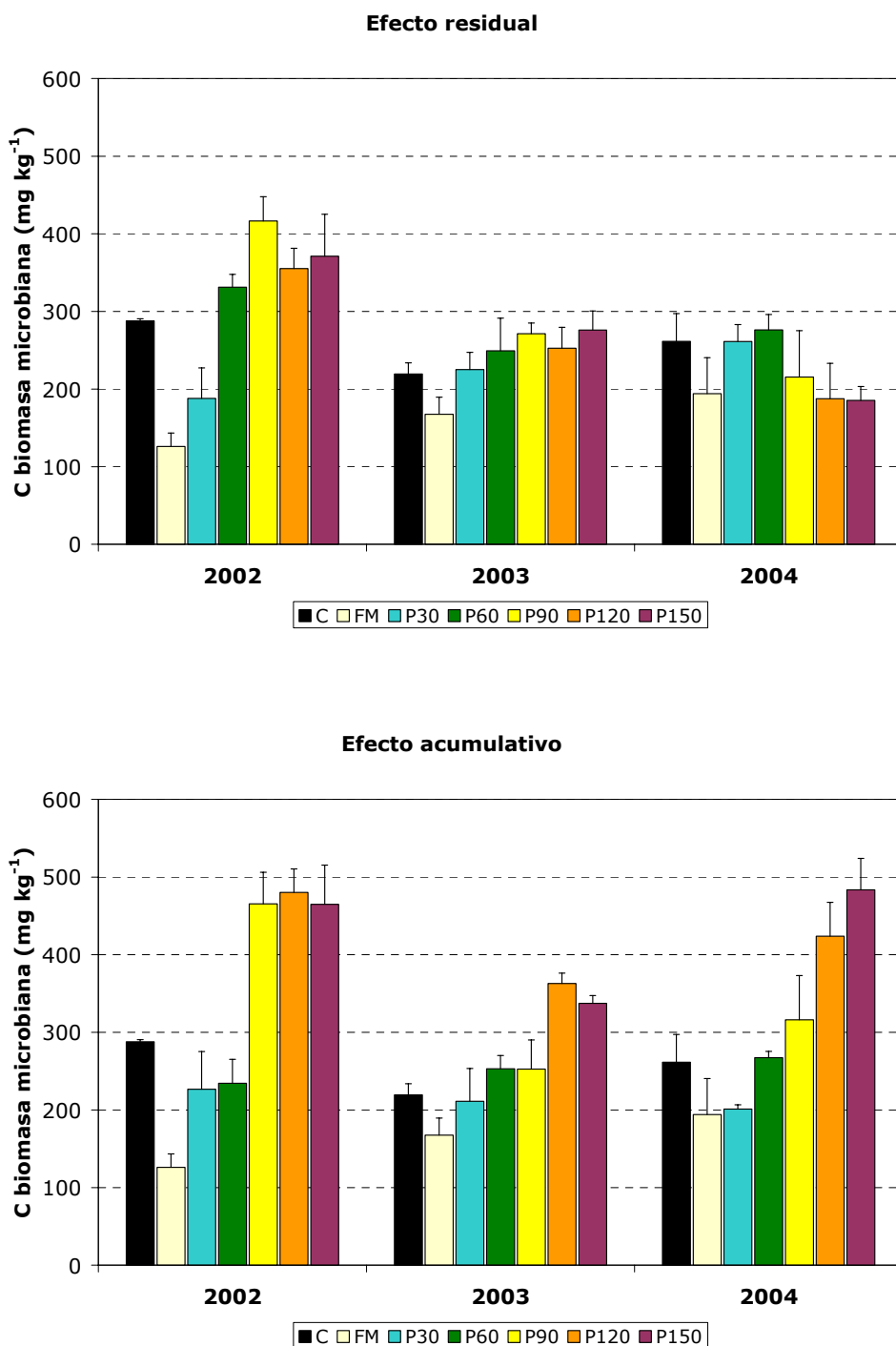
La tabla IV.7.1. muestra la evolución de los contenidos de carbono de la biomasa microbiana en los diversos tratamientos y años de estudio. En el suelo control, los niveles de este parámetro son bajos en comparación con los valores hallados en otros sistemas naturales o agrícolas (Sparling, 1997; García et al., 2000; Leirós et al., 2000). Análogamente, los contenidos del tratamiento con fertilizante mineral son reducidos en todos los años y no se diferencian estadísticamente de los del control. En definitiva, el contenido de carbono de la biomasa en estos suelos refleja el grado de degradación al que se ve sujeto el suelo debido a las condiciones ambientales y al mantenimiento del monocultivo.

**Tabla IV.7.1. Contenido de carbono de la biomasa microbiana ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	288 abc	219	261	288 bc	219 bc	261 bc
<b>FM</b>	126 c	167	194	126 c	167 c	194 c
<b>P30</b>	188 bc	225	261	227 c	211 bc	201 c
<b>P60</b>	331 ab	249	276	234 c	253 abc	267 bc
<b>P90</b>	416 a	271	215	466 ab	253 abc	316 abc
<b>P120</b>	355 a	253	187	480 a	363 a	424 ab
<b>P150</b>	371 a	276	185	465 ab	337 ab	483 a
<b>Valor p</b>	***	ns	ns	***	***	***

\*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura IV.7.1.** Contenido de carbono de biomasa microbiana del suelo control (C), del abonado con fertilizante mineral (FM) y de los enmendados con 30, 60, 90, 120 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P30, P60, P90, P120 y P150, respectivamente) una vez al inicio del experimento (efecto residual) o anualmente (efecto acumulativo). Las barras indican el error estándar de la media (n=3).

En los tratamientos residuales, se detecta un aumento del contenido de carbono de la biomasa microbiana únicamente en 2002, significativamente superior al fertilizante mineral a todas las dosis estudiadas, excepto la de  $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ . Este efecto positivo se atribuye al aporte de materia orgánica a través de restos de paja y exudados radiculares y a las condiciones ambientales favorables de ese año, ya que la influencia de la incorporación de purín en los suelos de efecto residual fue temporal (Plaza, 2002). De hecho, en 2003 y 2004 no se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos y los niveles registrados tienden a disminuir con el tiempo (figura IV.7.1.). Por el contrario, en todos los años se advierte un incremento altamente significativo del contenido de carbono de la biomasa microbiana con la dosis de purín en los suelos que recibieron aplicaciones consecutivas, encontrándose una correlación significativa y positiva entre este parámetro y la cantidad de purín aplicada (tablas IV.8.7., IV.8.8. y IV.8.9.).

En general, la aplicación de enmiendas orgánicas se relaciona con un aumento del contenido de carbono de la biomasa microbiana (Lalande et al., 2000; Rochette et al., 2000; García-Gil, 2001; Dilly et al., 2003; Ros et al., 2003; Parat et al., 2005; Böhme y Böhme, 2006). El efecto detectado está íntimamente relacionado con las propiedades del residuo empleado, concretamente con el grado de estabilidad de la materia orgánica incorporada, además de con la repetición de las aplicaciones (Deboz et al., 2002; García-Gil et al., 2004b; Sánchez-Monedero et al., 2004). El purín de cerdo contiene un porcentaje importante de materia orgánica poco estabilizada (Moral et al., 2005a), por lo que el aumento del carbono de la biomasa en los suelos que han recibido aplicaciones consecutivas, con respecto al control, se puede atribuir a que la incorporación de sustratos orgánicos en formas biodisponibles para los microorganismos y de otros nutrientes ha estimulado el crecimiento de la población autóctona del suelo (Rochette et al., 2004), resultado que se ha mantenido hasta el verano, nueve meses después de la adición de purín. Sin embargo, el empobrecimiento relativamente rápido en componentes orgánicos lábiles conlleva que el efecto residual sobre este parámetro sea transitorio (Bol et al., 2003).

#### **IV.7.2. RELACIÓN $C_{\text{BIO}}/C_{\text{OT}}$**

El carbono de la biomasa microbiana representa entre el 1 y el 5% del total presente en el suelo y es la fracción más activa de la materia orgánica (Sparling, 1997). Sin embargo, se ha criticado la validez del valor absoluto del contenido de carbono de biomasa microbiana como indicador de calidad de suelo, debido a los diferentes valores que puede adquirir en función del tipo de suelo, de la vegetación y de las condiciones climáticas, por lo que se necesitaría establecer valores de referencia con los que comparar (Gil-

Sotres et al., 2005). Por ello, la relación entre el carbono de la biomasa microbiana y el carbono orgánico total (relación  $C_{\text{BIO}}/\text{COT}$ ) se ha propuesto como un índice sensible a los cambios que experimenta la materia orgánica, permitiendo comparar entre suelos con diferentes contenidos de ésta (Sparling, 1997; Speir et al., 2003).

La relación  $C_{\text{BIO}}/\text{COT}$  experimenta un incremento en los tratamientos residuales en 2002, disminuyendo en los años posteriores (tabla IV.7.2.). Cuando las aplicaciones se repiten anualmente, se observa un aumento de este parámetro con la dosis de purín, aunque en 2004 las diferencias no son significativas. Hay que destacar que el valor mínimo se encuentra en el suelo que recibió la fertilización mineral, en línea con la tendencia descrita para el carbono de la biomasa microbiana. La correlación entre ambos parámetros es significativa y elevada en los tres años estudiados, contrastando con la ausencia de relación con el carbono orgánico total (tablas IV.8.7., IV.8.8. y IV.8.9.).

**Tabla IV.7.2. Relación  $C_{\text{BIO}}/\text{COT}$  ( $\text{g kg}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	27 ab	19	25	27 abcd	19 ab	25
<b>FM</b>	9 c	11	15	9 d	11 b	15
<b>P30</b>	14 bc	17	21	18 cd	17 ab	18
<b>P60</b>	27 ab	16	22	20 bcd	17 ab	22
<b>P90</b>	30 a	17	18	36 abc	17 ab	25
<b>P120</b>	21 abc	16	15	39 ab	25 a	34
<b>P150</b>	25 ab	17	15	40 a	25 a	36
<b>Valor p</b>	***	ns	ns	***	***	ns

\*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

Un aumento de la relación  $C_{\text{BIO}}/\text{COT}$  se debe habitualmente a una menor estabilidad de la materia orgánica del suelo (Sparling, 1997). Los niveles generalmente superiores mostrados por los suelos enmendados con purín pueden reflejar una mayor vulnerabilidad de la materia orgánica al ataque de los microorganismos como consecuencia del aumento de la fracción activa y de la presencia de compuestos orgánicos biodisponibles (Plaza et al., 2004). La desaparición de estas variaciones cuando las parcelas se

dejan de abonar pone de manifiesto que el incremento de la relación  $C_{\text{BIO}}/\text{COT}$  es un efecto transitorio.

Por último, hay que considerar que en las condiciones semiáridas en las que se desarrolla el experimento, la biomasa microbiana está sujeta a grandes fluctuaciones estacionales que influyen en esta relación, por lo que su interpretación requiere cierta precaución (García-Gil, 2001).

### **IV.7.3. RESPIRACIÓN BASAL**

La respiración basal del suelo constituye un parámetro ampliamente utilizado para realizar el seguimiento de la descomposición de la materia orgánica y de la actividad biológica en los suelos (Sparling, 1997), pero también es variable y presenta fluctuaciones naturales dependiendo de la disponibilidad de sustratos orgánicos y de las condiciones de humedad y temperatura. La velocidad de desprendimiento de dióxido de carbono, bajo condiciones controladas de humedad y temperatura, puede indicar si la materia orgánica del suelo está sujeta a condiciones propicias para los procesos de descomposición.

En los suelos estudiados, la respiración basal es baja independientemente del tratamiento recibido (tabla IV.7.3.) y concuerda con resultados previos obtenidos para suelos degradados semiáridos (García et al., 2000; Pascual et al., 2001; García-Gil et al., 2004b). Las únicas diferencias significativas se producen entre los tratamientos acumulativos en 2003, cuando se observa un incremento general de los niveles respecto a años anteriores. El desprendimiento de dióxido de carbono en los suelos abonados con purín tiende a aumentar con la dosis, siendo máximo en el tratamiento con  $90 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ . Existe una correlación entre la respiración basal y el COT en 2003; sin embargo, no se encuentra ninguna correlación significativa con ninguna fracción de materia orgánica (tablas IV.8.7., IV.8.8. y IV.8.9.), a excepción de los compuestos fenólicos en 2003.

El hecho de que los suelos tratados con purín mantengan, en el momento de la cosecha, niveles de respiración basal similares a los de los no enmendados se relaciona con el contenido similar de carbono total y de sus fracciones hidrosolubles, y se puede atribuir a la mineralización relativamente rápida de la mayor parte del carbono orgánico incorporado con el purín en una primera fase, durante la cual se incrementa la actividad microbiana (Plaza et al., 2004; Rochette et al., 2004). El incremento observado en 2003 puede estar relacionado con las elevadas temperaturas registradas, acrecentando la actividad degradativa del suelo. Por otra parte, no se encuentra una correlación significativa entre la respiración basal y el carbono de la biomasa microbiana en ninguno de los tres años. Según Wang

et al. (2003), ambos parámetros son proporcionales sólo si hay disponibilidad suficiente de sustratos orgánicos, bien mediante la adición de materia orgánica exógena o bien gracias a la reposición de los compuestos fácilmente oxidables a través de la reserva de carbono del suelo. Se estima que en condiciones normales sólo un 15% de los microorganismos son activos (Wang et al., 2003), ya que los requerimientos energéticos de los mismos no pueden ser sustentados por las condiciones en las que se encuentra el sistema (García-Gil, 2001).

#### **IV.7.4. COCIENTE METABÓLICO $qCO_2$**

De acuerdo con la teoría ecológica de Odum (1969), los ecosistemas evolucionan hacia una mayor optimización energética durante la sucesión, ya que a medida que el ecosistema gana en madurez y diversidad, hay mayor competencia por los recursos energéticos y una presión selectiva más fuerte hacia un uso eficiente de los recursos disponibles. Aplicado a la comunidad microbiológica del suelo, la tasa respiratoria por unidad de biomasa, o cociente metabólico  $qCO_2$ , tiende a disminuir en sistemas maduros (Anderson, 2003). Sin embargo, la interpretación de este índice debe ser cuidadosa (Gil-Sotres et al., 2005), ya que un valor elevado de  $qCO_2$  también puede indicar una situación de estrés ambiental (Wardle y Ghani, 1995) o la existencia de gran cantidad de sustratos fácilmente biodegradables (Sparling, 1997).

La tabla IV.7.4. muestra el cociente metabólico después de cada cosecha en el suelo control, en el abonado con fertilizante mineral y en los enmendados con purín de cerdo. Los valores del control y, especialmente, de la fertilización mineral son elevados, al igual que los de los tratamientos residuales. Con la aplicación anual del purín este parámetro tiende a disminuir. En general, las diferencias encontradas se encuentran relacionadas con las fluctuaciones del carbono de la biomasa (tablas IV.8.7., IV.8.8. y IV.8.9.). En 2003, los valores hallados en todos los tratamientos son comparativamente mayores a los de otros años debido al aumento generalizado de la respiración basal.

Un valor alto de  $qCO_2$  puede indicar que los microorganismos del suelo están sometidos a condiciones de estrés metabólico, ya que se ven obligados a incrementar las necesidades energéticas para su mantenimiento, lo que significa que disminuye la eficacia en la utilización microbiana del carbono. Este parece ser el caso del suelo con fertilización mineral, del control y de los tratamientos residuales, en los que ocurre una competición más intensa por los recursos nutricionales y energéticos. Por otra parte, al haber menos biomasa vegetal, la aportación de sustratos mediante los exudados radiculares también es más reducida. Además, el



**Tabla IV.7.3. Respiración basal ( $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	39	59	46	39	59 b	46
<b>FM</b>	45	65	41	45	65 b	41
<b>P30</b>	55	62	56	36	64 b	51
<b>P60</b>	56	60	53	38	81 ab	57
<b>P90</b>	42	66	38	40	94 a	51
<b>P120</b>	53	60	51	42	81 ab	47
<b>P150</b>	50	59	47	35	68 ab	42
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	ns	**	ns

\*\*  $p \leq 0.01$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla IV.7.4. Cociente metabólico ( $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ C}_{\text{BIO}} \text{ h}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	5.7 ab	11.1 ab	7.6	5.7 ab	11.1 ab	7.6 ab
<b>FM</b>	14.6 a	16.8 a	9.4	14.6 a	16.8 a	9.4 ab
<b>P30</b>	13.8 a	11.5 ab	9.1	7.5 ab	13.4 ab	10.8 a
<b>P60</b>	7.0 ab	10.6 ab	8.0	6.6 ab	13.3 ab	8.9 ab
<b>P90</b>	4.3 b	10.1 ab	7.8	3.5 b	16.1 ab	7.0 ab
<b>P120</b>	6.3 ab	10.0 ab	12.8	3.7 b	9.3 b	4.6 b
<b>P150</b>	6.0 ab	9.0 b	10.8	3.2 b	8.5 b	3.6 b
<b>Valor p</b>	**	*	ns	***	*	*

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

régimen de monocultivo en secano contribuye a una situación en la que los microorganismos aumentan su actividad específica para adaptarse a unas condiciones adversas. La disminución del  $qCO_2$  en los suelos enmendados con mayores dosis de purín posiblemente indique una mejora de las circunstancias desfavorables para el mantenimiento de los microorganismos, bien directamente gracias al aporte de sustratos o bien por un aumento de pH del suelo y de la disponibilidad de nutrientes (Wang et al., 2003). De acuerdo con esto, el  $qCO_2$  observado en 2003 es indicativo de una situación de estrés más acusado que en otros años, posiblemente debido a temperaturas más altas (Böhme et al., 2005).

Otra explicación al descenso de  $qCO_2$  en los suelos enmendados con purín puede ser la alteración de la composición de las poblaciones microbianas, predominando especies adaptadas a una mejor utilización de los recursos existentes (estrategia K) en detrimento de microorganismos oportunistas, cuyo crecimiento se caracteriza por un gasto energético más elevado e ineficiente (estrategia r). Así, un aumento de la proporción de biomasa fúngica en suelos enmendados con purín (Huysman et al., 1994) puede conducir a un descenso del cociente metabólico.

En definitiva, la relativa persistencia en este sistema de circunstancias adversas impuestas por el manejo del suelo y las condiciones ambientales desfavorables subraya la importancia de la adición de materiales orgánicos capaces de aliviar, al menos temporalmente, la situación de estrés a la que están sujetas las comunidades microbiológicas del suelo.

## **IV.8. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DEL SUELO**

Las enzimas son catalizadores de la mayor parte de las funciones que desempeña el suelo, incluyendo la descomposición de los aportes orgánicos, la transformación de la materia orgánica nativa y la liberación de nutrientes para las plantas. Por tanto, tienen una influencia directa sobre la estabilidad y productividad de los ecosistemas (Nannipieri et al., 2002). La determinación de las actividades enzimáticas del suelo constituye una herramienta empleada en la evaluación de la diversidad funcional microbiana, de la capacidad del suelo para llevar a cabo procesos bioquímicos concretos, en la investigación de relaciones ecológicas en el suelo y como indicadores de calidad del mismo (Filip, 2002; Caldwell, 2005). En este sentido, son parámetros capaces de ofrecer una respuesta

rápida y sensible ante alteraciones naturales o inducidas por el hombre, incluyendo las prácticas agrícolas o el empleo de enmiendas orgánicas (Dick, 1997; García et al., 2000).

Ciertas enzimas existen únicamente en células viables, estando íntimamente relacionadas con la actividad biológica del suelo. Otras muchas pueden hallarse en microorganismos activos o aparecer como enzimas extracelulares o abióticas, en la solución del suelo y/o formando complejos con la matriz mineral y los coloides húmicos del suelo, mostrando en éstos una resistencia destacable a la desnaturalización proteolítica y térmica (Tabatabai y Dick, 2002).

La interpretación y comparación de los resultados que generan los análisis enzimáticos requiere tener en cuenta una serie de factores, señalados por Nannipieri et al. (2002). La actividad enzimática generalmente presenta especificidad de sustrato, por lo que la relación de una enzima con la actividad biológica global del suelo debe establecerse con precaución. Por ejemplo, la síntesis de una enzima concreta puede inhibirse por la presencia de un compuesto sin que la actividad biológica o productividad vegetal se vean afectadas. También hay que considerar la variedad de localizaciones que puede presentar una enzima en el suelo, ya que generalmente la actividad de las inmovilizadas puede no ser tan sensible a factores ambientales como las asociadas a células vivas. Por otra parte, hay que considerar que los métodos empleados proporcionan la actividad enzimática potencial en condiciones óptimas de pH, temperatura y sustrato, y no la actividad real en el suelo. Finalmente, son parámetros que muestran una variabilidad muy grande debido a las características del suelo, variaciones estacionales y climáticas, localización geográfica, etc. por lo que los rangos encontrados en suelos naturales son muy amplios (Nannipieri et al., 2002), aunque este inconveniente se puede superar estableciendo comparaciones con un suelo de referencia.

En consecuencia, se prefiere manejar la combinación de varias actividades enzimáticas o de índices bioquímicos, ya que el empleo de una sola puede conducir a resultados contradictorios en función de las características del suelo o las condiciones ambientales (Gil-Sotres et al., 2005). El análisis simultáneo de varias enzimas es más válido para estimar la actividad microbiana global y su respuesta a prácticas de manejo del suelo, situaciones de estrés ambiental y cambios de condiciones ambientales que la determinación de la actividad de una única enzima.

En este trabajo se han determinado las actividades de varias enzimas incluidas en dos grandes grupos: oxidoreductasas (deshidrogenasa y catalasa) e hidrolasas de ciclo del nitrógeno (ureasa y proteasa-BAA), fósforo (fosfatasa ácida) y del carbono ( $\beta$ -glucosidasa). Las oxidoreductasas dependen fundamentalmente del estado metabólico del suelo,

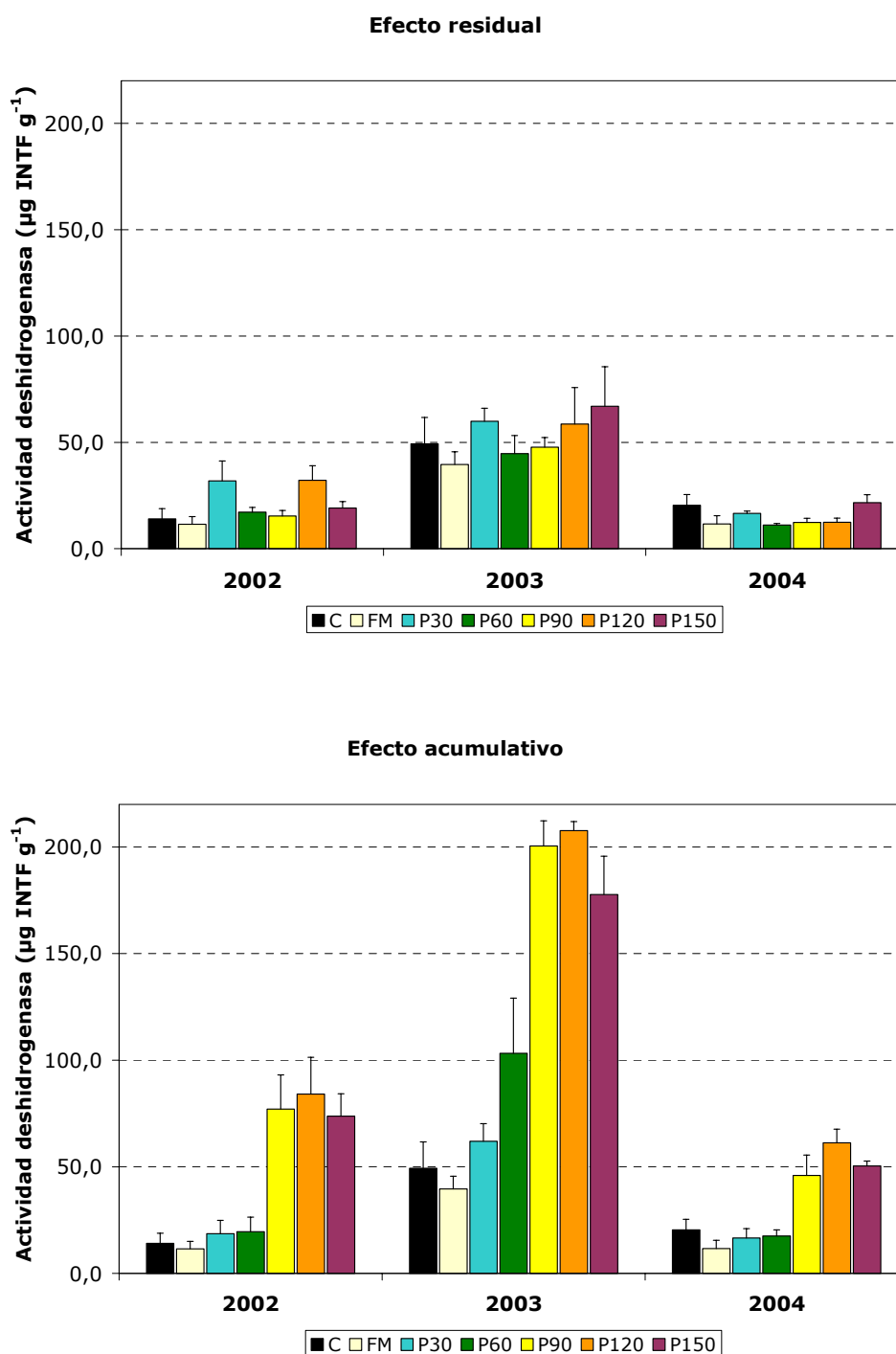
indicador endógeno de la actividad microbiana del suelo. Las hidrolasas están implicadas en los ciclos de los elementos y actúan sobre procesos fundamentales de la mineralización de la materia orgánica (Sinsabaugh et al., 2002).

### **IV.8.1. ACTIVIDAD DESHIDROGENASA**

La actividad deshidrogenasa engloba varios sistemas enzimáticos intracelulares implicados en la oxidación de compuestos orgánicos y se asume que únicamente existen en el suelo como parte integral de células vivas e intactas (Nannipieri et al., 1990). Por ello, se considera que es más dependiente del estado metabólico que cualquiera de las demás enzimas presentes en el suelo (Insam, 2001) y por tanto, un indicador apropiado de la actividad microbiológica global (Dick, 1997; Filip, 2002), especialmente en suelos semiáridos (García et al., 2000).

Mientras que en los suelos en los que se estudia el efecto residual de la aplicación de purín de cerdo no se aprecian diferencias significativas respecto al control y a la fertilización mineral (tabla IV.8.1.), los enmendados anualmente con una dosis igual o superior a  $90 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  muestran un incremento altamente significativo en todos los años estudiados. Además, hay que destacar los niveles elevados de 2003 (figura IV.8.1.) en consonancia con los ya señalados de respiración basal y de cociente metabólico. Según el análisis de correlaciones, este parámetro se relaciona, entre otros, con la dosis de purín, con el carbono de la biomasa microbiana y, en menor medida, con la respiración basal (tablas IV.8.7., IV.8.8 y IV.8.9.).

La adición de enmiendas orgánicas, incluido el purín de cerdo (Lalande et al., 2000), generalmente incrementa la actividad deshidrogenasa (Albiach et al., 2000; García-Gil et al., 2000; Ros et al., 2003; Zaller y Köpke, 2004), lo que se asocia a una recuperación de la actividad microbiana del suelo. La correlación alta y significativa con el carbono de la biomasa encontrada todos los años sugiere que esta revitalización se produce a través del crecimiento de las poblaciones microbiológicas y que dicha biomasa se mantiene activa en el momento de la cosecha, todo ello inducido por el aporte de sustratos orgánicos biodegradables con el purín (Plaza et al., 2004). Sin embargo, la actividad deshidrogenasa puede verse afectada por otros factores como el pH (Nannipieri et al., 1990), con el que también se correlaciona significativamente en este estudio (tablas IV.8.7., IV.8.8 y IV.8.9.), por lo que es conveniente confirmar los resultados obtenidos con la determinación simultánea de otras propiedades biológicas.



**Figura IV.8.1.** Actividad deshidrogenasa del suelo control (C), del abonado con fertilizante mineral (FM) y de los enmendados con 30, 60, 90, 120 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P30, P60, P90, P120 y P150, respectivamente) una vez al inicio del experimento (efecto residual) o anualmente (efecto acumulativo). Las barras indican el error estándar de la media (n=3).

**Tabla IV.8.1. Actividad deshidrogenasa ( $\mu\text{g INTF g}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	14	49	20	14 c	49 b	20 b
<b>FM</b>	11	40	12	11 c	40 b	12 b
<b>P30</b>	32	60	17	19 bc	62 b	17 b
<b>P60</b>	17	45	11	20 bc	103 b	17 b
<b>P90</b>	15	48	14	77 a	200 a	46 a
<b>P120</b>	32	59	13	84 a	208 a	61 a
<b>P150</b>	19	67	22	74 a	178 a	50 a
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	***	***	***

\*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

## IV.8.2. ACTIVIDAD CATALASA

La enzima catalasa forma parte del grupo de las oxidorreductasas. Su actividad es intracelular y se encuentra en todas las bacterias aerobias y en la mayor parte de las anaerobias facultativas. Por ello, su determinación en suelos ha sido asociada al número de microorganismos aerobios y se considera un indicador de su actividad metabólica (García y Hernández, 1997).

La tabla IV.8.2. muestra los valores de actividad catalasa después de cada cosecha en el suelo control, en el abonado con fertilizante mineral y en los tratados con purín de cerdo. El aumento de esta actividad enzimática en los suelos enmendados anualmente, en comparación con los niveles bajos del control, de la fertilización mineral y de los tratamientos residuales, propios de suelos semiáridos degradados, y la correlación significativa con el carbono de la biomasa y con la actividad deshidrogenasa (tablas IV.8.7., IV.8.8 y IV.8.9.) corrobora la revitalización del crecimiento y de la actividad microbiana en los suelos sujetos a una aplicación continuada de purín de cerdo (Plaza et al., 2004).

**Tabla IV.8.2. Actividad catalasa ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	9	4	11	14 bc	4 d	11 abc
<b>FM</b>	16	6	5	11 abc	6 cd	5 c
<b>P30</b>	16	7	7	7 c	6 cd	7 bc
<b>P60</b>	15	5	6	10 bc	7 cd	8 bc
<b>P90</b>	20	5	6	17 abc	9 bc	16 ab
<b>P120</b>	16	6	7	22 ab	12 ab	14 ab
<b>P150</b>	13	6	6	25 a	14 a	19 a
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	**	***	***

\*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

### IV.8.3. ACTIVIDAD UREASA

La enzima ureasa es una de las hidrolasas implicadas en el ciclo del nitrógeno y cataliza la hidrólisis de la urea dando lugar a dióxido de carbono y amoníaco. Su origen en el suelo es principalmente microbiano, aunque también puede proceder de las raíces y restos vegetales, y en su mayor parte se encuentra como enzima extracelular, formando complejos estables con los componentes orgánicos y minerales del suelo (Tabatabai y Dick, 2002).

Como se observa en la tabla IV.8.3., no se detectan diferencias significativas entre los valores de actividad ureasa de los distintos tratamientos, aunque sugieren un descenso al aumentar la dosis de purín, que únicamente alcanza a ser significativo en la última cosecha. El análisis de correlaciones muestra una relación significativa y negativa entre esta enzima y la dosis de purín en 2002 y 2004 (tablas IV.8.7. y IV.8.9.).

La actividad ureasa se incrementa a corto plazo tras la aplicación de purín (Plaza, 2002; Bol et al., 2003), lo que se atribuye no sólo al aporte de sustratos de tipo urea capaces de activar la síntesis microbiana de la enzima, sino también a la contribución de la ureasa contenida en el residuo (Bol et al., 2003).

**Tabla IV.8.3. Actividad ureasa ( $\mu\text{mol NH}_4^+ \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	1.35	1.61	0.84	1.35	1.61	0.84 ab
<b>FM</b>	1.18	1.54	0.69	1.18	1.54	0.69 ab
<b>P30</b>	1.21	1.30	0.86	1.08	1.39	0.80 ab
<b>P60</b>	1.34	1.25	0.81	1.15	1.59	0.96 a
<b>P90</b>	1.34	1.21	0.83	1.05	1.79	0.96 a
<b>P120</b>	1.66	1.20	0.89	0.98	1.40	0.66 ab
<b>P150</b>	1.26	1.16	0.95	0.75	1.25	0.55 b
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	ns	ns	*

\*  $p \leq 0.05$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

En cambio, otros resultados obtenidos en experimentos de larga duración son, en ocasiones, contradictorios, dependiendo del tipo y la cantidad de residuo, de las prácticas de manejo del suelo y de las condiciones experimentales. En general, el empleo de fertilizantes orgánicos incrementa la actividad ureasa (Kandeler et al., 1999; Lalande et al., 2000; Fernandes et al., 2005), posiblemente debido a una mayor persistencia de la enzima en los suelos enmendados, especialmente con materiales compostados (Pascual et al., 2002). Sin embargo, Marschner et al. (2003) observaron que la actividad ureasa no se vio afectada tras veinte años de aplicación de diferentes tratamientos orgánicos, entre ellos estiércol, lo que atribuyeron a la adición de dosis relativamente bajas. En otras ocasiones, la actividad ureasa disminuyó tras la enmienda debido a la incorporación de metales pesados con el residuo (García-Gil et al., 2000).

El moderado efecto encontrado en las condiciones experimentales de este estudio puede estar explicado por la inhibición de la síntesis de la enzima debido a la incorporación de grandes cantidades de nitrógeno amoniacal con el purín. McCarty et al. (1992) afirman que la producción microbiana de ureasa se inhibe en suelos enmendados con glucosa, pero su síntesis no está directamente reprimida a causa de la presencia de amonio o de nitrato, sino por los productos formados tras la asimilación microbiana de estas formas nitrogenadas. Además, hay que considerar que la



estabilidad de la enzima ureasa en el suelo depende de la capacidad de sus constituyentes para proporcionar la protección necesaria contra la degradación y otros procesos bioquímicos, tarea en la que las sustancias húmicas desempeñan un papel primordial (Pascual et al., 2002; Tabatabai y Dick, 2002). La pérdida significativa de actividad ureasa en 2004 en los suelos enmendados podría estar relacionada, al menos en parte, con el descenso del contenido de carbono de las sustancias húmicas, según la correlación positiva existente entre ambos (tabla IV.8.9.).

#### **IV.8.4. ACTIVIDAD PROTEASA-BAA**

Las enzimas proteasas hidrolizan las proteínas a polipéptidos, oligopéptidos y aminoácidos. La actividad que se ha estudiado es la correspondiente a la enzima que hidroliza la N- $\alpha$ -benzoyl-L-argininamida (BAA), actuando sobre péptidos sencillos y dipéptidos que son productos de degradación derivados de otras actividades proteolíticas. En el suelo, la actividad proteasa-BAA suele durar poco tiempo debido a que la estabilidad de la forma extracelular es baja (Dick, 1997; García et al., 2000).

En los tratamientos residuales, las diferencias entre los niveles de actividad proteasa-BAA no resultan significativas (tabla IV.8.4.), a excepción de un incremento con la dosis de purín en 2003. En cambio, los suelos que reciben aportes continuados de purín experimentan un aumento de la actividad cuanto mayor es la dosis, siendo significativamente superior al control y a la fertilización mineral a partir de  $90 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ , exceptuando el último año en el que sólo el tratamiento con  $120 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  se diferencia estadísticamente del suelo control. Por otra parte, la actividad de proteasa-BAA muestra una correlación alta con la dosis de purín y con otros parámetros indicativos de actividad biológica, como las enzimas oxidorreductasas (tablas IV.8.7., IV.8.8 y IV.8.9.).

Se considera que las proteasas dependen estrechamente de la actividad microbiológica. Consecuentemente las variaciones inducidas por la enmienda afectan a las transformaciones biológicas de los sustratos nitrogenados (García-Gil, 2001). Böhme y Böhme (2006), que obtuvieron resultados similares a los de este estudio en suelos abonados con estiércol, sugirieron que la aplicación del residuo orgánico provocó un incremento de la actividad y el crecimiento microbianos, lo que dio lugar a una mayor demanda de carbono y niveles más elevados de proteasa.

Por otra parte, los exudados radiculares y restos vegetales pueden suponer una fuente de compuestos nitrogenados fácilmente disponibles, capaces de inducir la síntesis de la enzima proteasa, por lo que es posible que el cultivo contribuya de manera relevante al mantenimiento o incremento de dicha actividad (Ros et al., 2003).

**Tabla IV.8.4. Actividad proteasa-BAA ( $\mu\text{mol NH}_4^+ \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	1.16	0.38 c	0.81	1.16 b	0.38 c	0.81 bc
<b>FM</b>	1.16	0.42 bc	0.63	1.16 b	0.42 c	0.63 c
<b>P30</b>	1.22	0.60 abc	0.56	1.19 b	0.46 c	0.82 bc
<b>P60</b>	1.07	0.71 ab	0.48	1.66 ab	0.58 bc	0.88 ab
<b>P90</b>	1.10	0.68 ab	0.73	1.98 a	0.93 a	1.48 bc
<b>P120</b>	1.65	0.76 a	0.61	1.94 a	0.94 a	1.59 a
<b>P150</b>	1.31	0.79 a	1.06	2.09 a	0.84 ab	1.40 ab
<b>Valor p</b>	ns	***	ns	***	***	***

\*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

#### IV.8.5. ACTIVIDAD FOSFATASA

Las enzimas fosfatasas desempeñan un papel trascendental en la mineralización del fósforo orgánico, ya que son responsables de la hidrólisis de compuestos orgánicos e inorgánicos de fósforo, capaces de actuar sobre un gran número de sustratos de estructura muy variada (Chen, 2003). Pueden encontrarse en el suelo en estado libre, asociadas a coloides orgánicos e inorgánicos, en células metabólicamente activas o en restos de ellas (Tabatabai y Dick, 2002). La actividad fosfatasa ácida (pH óptimo 4.5-6) es una de las más frecuentemente utilizadas para estimar alteraciones de la calidad del suelo debido al manejo, a la incorporación de residuos orgánicos o a la presencia de contaminantes (Dick et al., 2000; Gil-Sotres et al., 2005).

La tabla IV.8.5. muestra los valores de actividad fosfatasa después de cada cosecha en el suelo control, en el abonado con fertilizante mineral y en los tratados con purín de cerdo. No se detectan diferencias significativas en los tratamientos residuales respecto a los niveles del control y de la fertilización mineral. Por el contrario, se produce una disminución notoria de la actividad fosfatasa al aumentar la cantidad de purín recibida anualmente, sin que se aprecien diferencias destacables de un año a otro (figura IV.8.2.).

**Tabla IV.8.5. Actividad fosfatasa ( $\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

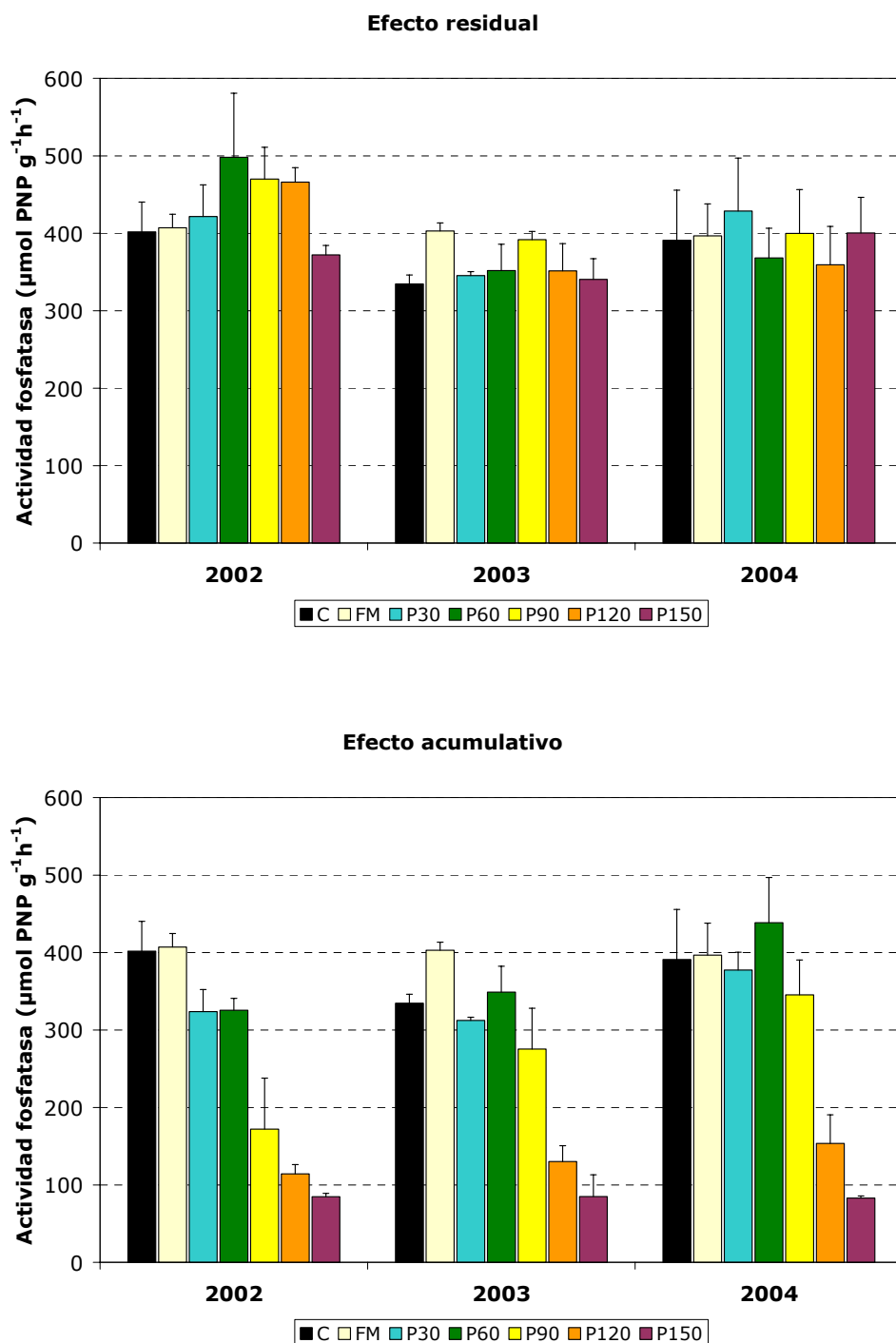
Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	402	335	391	402 a	335 a	391 a
<b>FM</b>	407	403	397	407 a	403 a	397 a
<b>P30</b>	422	345	429	324 ab	312 a	377 ab
<b>P60</b>	498	352	368	326 ab	349 a	438 a
<b>P90</b>	470	392	400	172 bc	275 ab	345 ab
<b>P120</b>	466	351	359	114 c	130 bc	153 bc
<b>P150</b>	372	341	400	85 c	85 c	83 c
<b>Valor p</b>	ns	ns	ns	***	***	***

\*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

Existen varias causas que pueden justificar este comportamiento. Algunos estudios describen una disminución de la fosfatasa ácida debido a la introducción de metales pesados en el sistema, como Cu(II), Zn(II) que interfieren al complejarse con el sustrato o se combinan con el grupo activo de la enzima (Dick, 1997). Teniendo en cuenta los contenidos de dichos metales en los suelos estudiados, esta explicación parece poco probable. La actividad fosfatasa es muy dependiente del pH del suelo (Dick et al., 2000), en concreto se correlaciona negativamente con esta propiedad (tablas IV.8.7., IV.8.8 y IV.8.9.); sin embargo, en el método analítico seguido se ajusta el pH a 6.5 para minimizar la influencia del mismo sobre la determinación de la actividad.

La explicación más plausible a la disminución de la fosfatasa es la existencia de una cantidad suficiente del producto final de la reacción enzimática, es decir, una concentración elevada de fósforo asimilable es capaz de reducir la actividad fosfatasa mediante inhibición *feedback* (Chen, 2003). De hecho, se encuentra una elevada correlación negativa entre el fósforo asimilable y la actividad fosfatasa en 2004 ( $r=0.80$ ,  $p \leq 0.001$ ). Diferentes estudios han mostrado que esta enzima aumenta como consecuencia de la aplicación de enmiendas orgánicas cuando mejora el contenido de materia orgánica del suelo (García-Gil et al., 2004b; Antolín et



**Figura IV.8.2.** Actividad fosfatasa del suelo control (C), del abonado con fertilizante mineral (FM) y de los enmendados con 30, 60, 90, 120 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P30, P60, P90, P120 y P150, respectivamente) una vez al inicio del experimento (efecto residual) o anualmente (efecto acumulativo). Las barras indican el error estándar de la media (n=3).

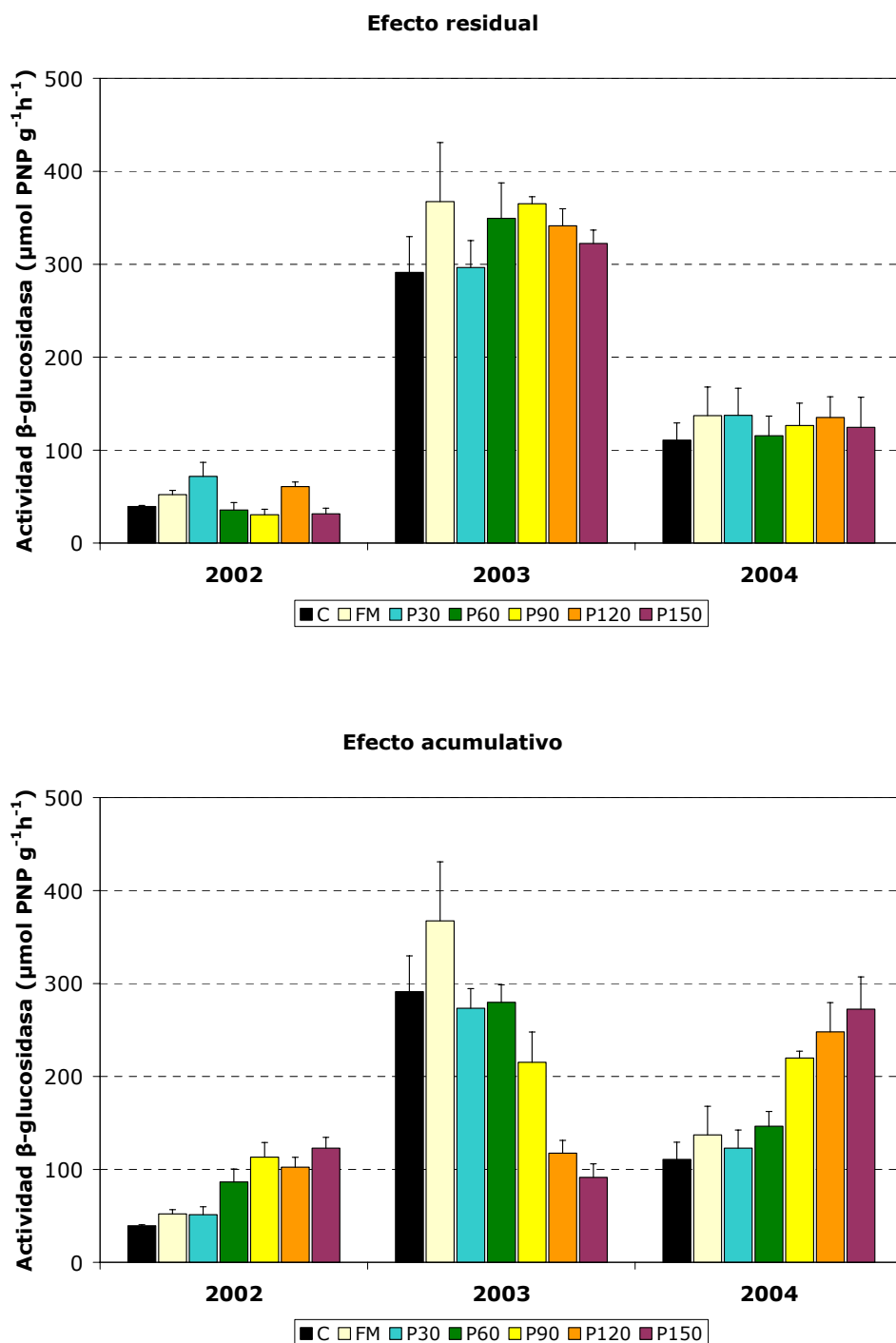
al., 2005) o si existe deficiencia de fósforo cuando aumentan los requerimientos por parte del cultivo y de los microorganismos (Böhme y Böhme, 2006) mientras que desciende si la disponibilidad de fósforo es elevada (Lalande et al., 2000; Bol et al., 2003).

#### **IV.8.6. ACTIVIDAD $\beta$ -GLUCOSIDASA**

Con respecto a las enzimas involucradas en el ciclo del carbono, la  $\beta$ -glucosidasa ha sido una de las más usadas en la evaluación de la calidad de suelos sujetos a diferentes condiciones de manejo (Gil-Sotres et al., 2005). Cataliza la hidrólisis de  $\beta$ -D-glucósidos para formar glucosa, siendo la enzima limitante en la degradación microbiana de la celulosa y por tanto en la obtención de energía para los microorganismos. Parece ser mayoritariamente de origen fúngico (Nannipieri et al., 1990) y la forma enzimática abiótica, estabilizada como consecuencia de su adsorción a sustancias húmicas y minerales, contribuye significativamente a la actividad encontrada en el suelo (Knight y Dick, 2004).

La tabla IV.8.6. muestra la evolución de la actividad  $\beta$ -glucosidasa en los diversos suelos y años de estudio. En primer lugar hay que destacar que los resultados obtenidos son muy variables de un año a otro, tal y como refleja la figura IV.8.3. En 2002 los niveles de actividad del suelo control fueron muy bajos, aumentando drásticamente en 2003 para volver a descender al año siguiente. En cuanto a los tratamientos residuales, las diferencias encontradas dentro de cada año no resultan significativas, excepto en 2002, y se limitan a una mayor actividad del suelo que recibió  $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  frente a los de  $90$  y  $150 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ . Respecto a los suelos enmendados anualmente, la actividad  $\beta$ -glucosidasa aumenta con la dosis de purín en 2002 y 2004. En cambio, los estudiados en 2003 mostraron la tendencia contraria, disminuyendo significativamente cuanto mayor fue la cantidad de purín recibida.

En general, la incorporación de residuos orgánicos al suelo estimula la síntesis de enzima  $\beta$ -glucosidasa, activándose la dinámica del ciclo del carbono en los suelos enmendados y los procesos de mineralización asociados al mismo (García-Gil, 2001; Bol et al., 2003; Ros et al., 2003; Antolín et al., 2005; Böhme y Böhme, 2006). Excepto en 2003, hay una correlación significativa positiva entre la actividad  $\beta$ -glucosidasa y las enzimas oxidorreductasas en los tratamientos acumulativos (tablas IV.8.7. y IV.8.9.). Como consecuencia, la mineralización de la materia orgánica puede proporcionar sustratos para la enzima  $\beta$ -glucosidasa, estimulando el crecimiento microbiano y, por tanto, aumentan las actividades deshidrogenasa y catalasa en los suelos enmendados (García-Gil et al., 2000).



**Figura IV.8.3.** Actividad  $\beta$ -glucosidasa del suelo control (C), del abonado con fertilizante mineral (FM) y de los enmendados con 30, 60, 90, 120 y 150  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$  de purín de cerdo (P30, P60, P90, P120 y P150, respectivamente) una vez al inicio del experimento (efecto residual) o anualmente (efecto acumulativo). Las barras indican el error estándar de la media ( $n=3$ ).

**Tabla IV.8.6. Actividad  $\beta$ -glucosidasa ( $\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) en el suelo control y en los suelos enmendados con fertilizante mineral y con purín de cerdo en cada año.**

Tratamiento	Residual			Acumulativo		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
<b>C</b>	39 ab	291	111	39 c	291 ab	111 c
<b>FM</b>	52 ab	367	137	52 bc	367 a	137 bc
<b>P30</b>	72 a	296	138	51 bc	273 ab	123 bc
<b>P60</b>	36 ab	349	115	87 abc	280 ab	147 abc
<b>P90</b>	31 b	365	127	113 a	215 abc	220 abc
<b>P120</b>	61 ab	341	135	102 ab	118 bc	248 ab
<b>P150</b>	32 b	322	125	123 a	92 c	272 a
<b>Valor p</b>	*	ns	ns	***	***	**

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según el test de Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

Una vez mineralizados los sustratos orgánicos aportados por el purín, la contribución de los exudados radiculares de la cebada es determinante para el mantenimiento de la actividad en el suelo en el momento de la cosecha, ya que coincide que aquellos tratamientos con mayor crecimiento de biomasa vegetal presentan una actividad más elevada (Ros et al., 2003; Plaza et al., 2004).

La tendencia anómala encontrada en 2003, que no coincide con los resultados obtenidos en los otros seis años de experimento (Plaza, 2002), puede estar relacionada con el aumento en ese año de los carbohidratos solubles en los suelos enmendados, existiendo una correlación negativa entre ambos parámetros (tabla IV.8.8.). Además, los niveles de actividad más elevados encontrados ese año podrían estar relacionados con una situación de estrés ocasionado por temperaturas más altas, ocasionando que la competencia por los recursos disponibles haya conducido a una estimulación de la síntesis microbiana. Esta situación estaría atenuada en los suelos enmendados con dosis altas, gracias a la contribución de los exudados radiculares del cultivo, en los que los niveles de actividad no se diferencian tan drásticamente de los de otros años.

### IV.8.7. DIAGRAMAS *SUN-RAY*

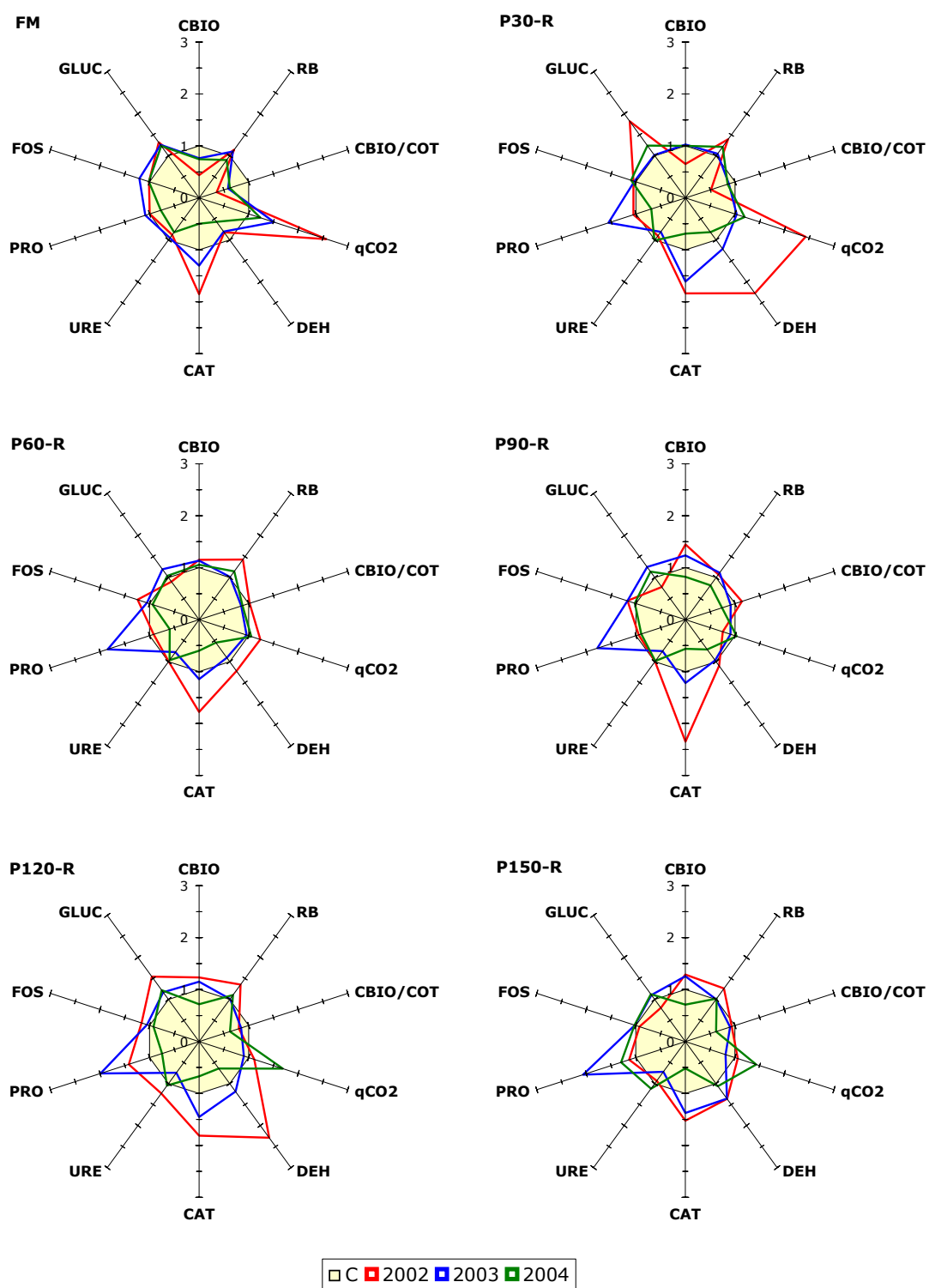
Como se mencionó anteriormente, la medida de una sola propiedad no resulta satisfactoria para reflejar la actividad biológica del suelo, por lo que es más recomendable el análisis conjunto de la información proporcionada por varios parámetros (Nannipieri et al., 2002). Una primera opción consiste en la integración de medidas simultáneas de propiedades biológicas y actividades enzimáticas en un índice simple, expresado como la relación entre dos propiedades. Los más ampliamente usados son los ya comentados cociente metabólico  $qCO_2$  y la relación  $C_{BIO}/COT$ , aunque también son de uso común la actividad enzimática específica, expresada por unidad de carbono microbiano (Kandeler y Eder, 1993; García-Gil, 2001) o el índice de potencial metabólico propuesto por Masciandaro et al. (1998). También se encuentran en la bibliografía expresiones complejas en las que intervienen más de dos propiedades bioquímicas (Trasar-Cepeda et al., 1998; Nannipieri et al., 2002; Sinsabaugh et al., 2002).

Estas estrategias son útiles para valorar de manera global la funcionalidad microbiológica del sistema edáfico y con ello establecer indicadores cuantitativos de calidad del suelo; sin embargo, parte de la información relativa a procesos enzimáticos específicos queda enmascarada. Dilly y Blume (1998) propusieron una aproximación intermedia, que consiste en la elección de un conjunto representativo de parámetros y su representación en diagramas *sun-ray*, o diagramas de estrella, en los cuales el área y la forma de la estrella proporcionan una interpretación visual e integrada de las propiedades analizadas. Para ello, se necesita adaptar la escala de cada propiedad al rango de todos los datos y recalcular éstos, refiriéndolos a los valores de un suelo de referencia, en este caso el suelo control, al que se le asigna el valor de 1. Cada eje de la estrella corresponde a una de las propiedades representadas. Estos gráficos se han empleado para evaluar la sostenibilidad de distintos usos del suelo con respecto a sus propiedades biológicas (Dilly y Blume, 1998), para comparar la actividad enzimática de suelos de tres tipos de bosque diferentes (Sinsabaugh et al., 2002) o para evaluar el grado de recuperación de un suelo contaminado con metales pesados en función de sus actividades enzimáticas (Hinojosa et al., 2004).

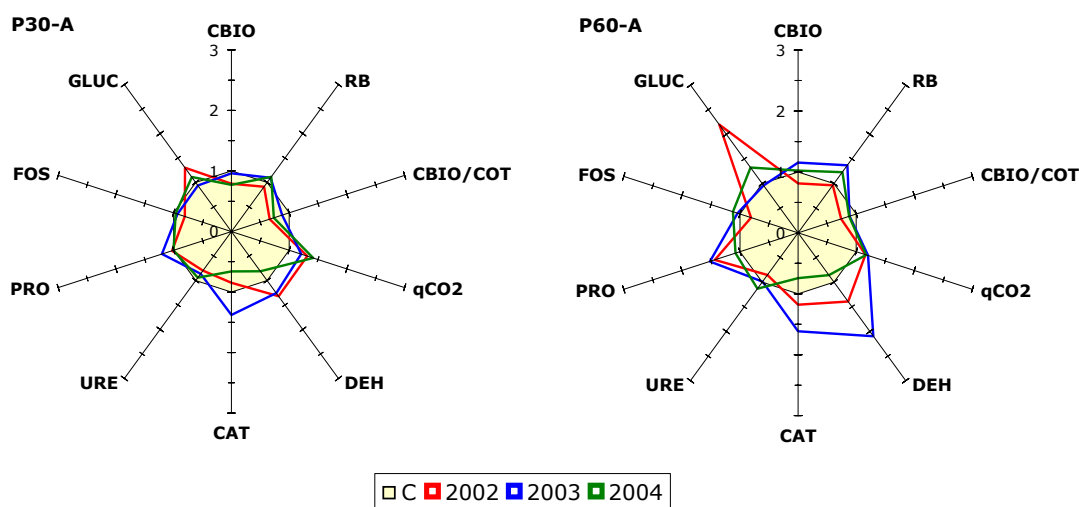
Los diagramas *sun-ray* obtenidos para el conjunto de propiedades biológicas y bioquímicas de cada suelo se muestran en las figuras IV.8.4., IV.8.5 y IV.8.6. Cada diagrama corresponde a un tratamiento y en cada uno se representan simultáneamente los resultados obtenidos en los tres años de estudio.

Como se aprecia en la figura IV.8.4., el suelo abonado con fertilizante mineral ofrece mucha semejanza con el control, a excepción de los picos del





**Figura IV.8.4.** Diagramas *sun-ray* derivados de las propiedades biológicas y bioquímicas del suelo abonado con fertilizante mineral (FM) y de los enmendados con purín de cerdo una vez al inicio del experimento (efecto residual, R).  $C_{\text{BIO}}$ : C de la biomasa microbiana; RB: respiración basal;  $q\text{CO}_2$ : cociente metabólico, DEH: deshidrogenasa, CAT: catalasa; URE: ureasa; PRO: proteasa-BAA; FOS: fosfatasa; GLUC:  $\beta$ -glucosidasa.

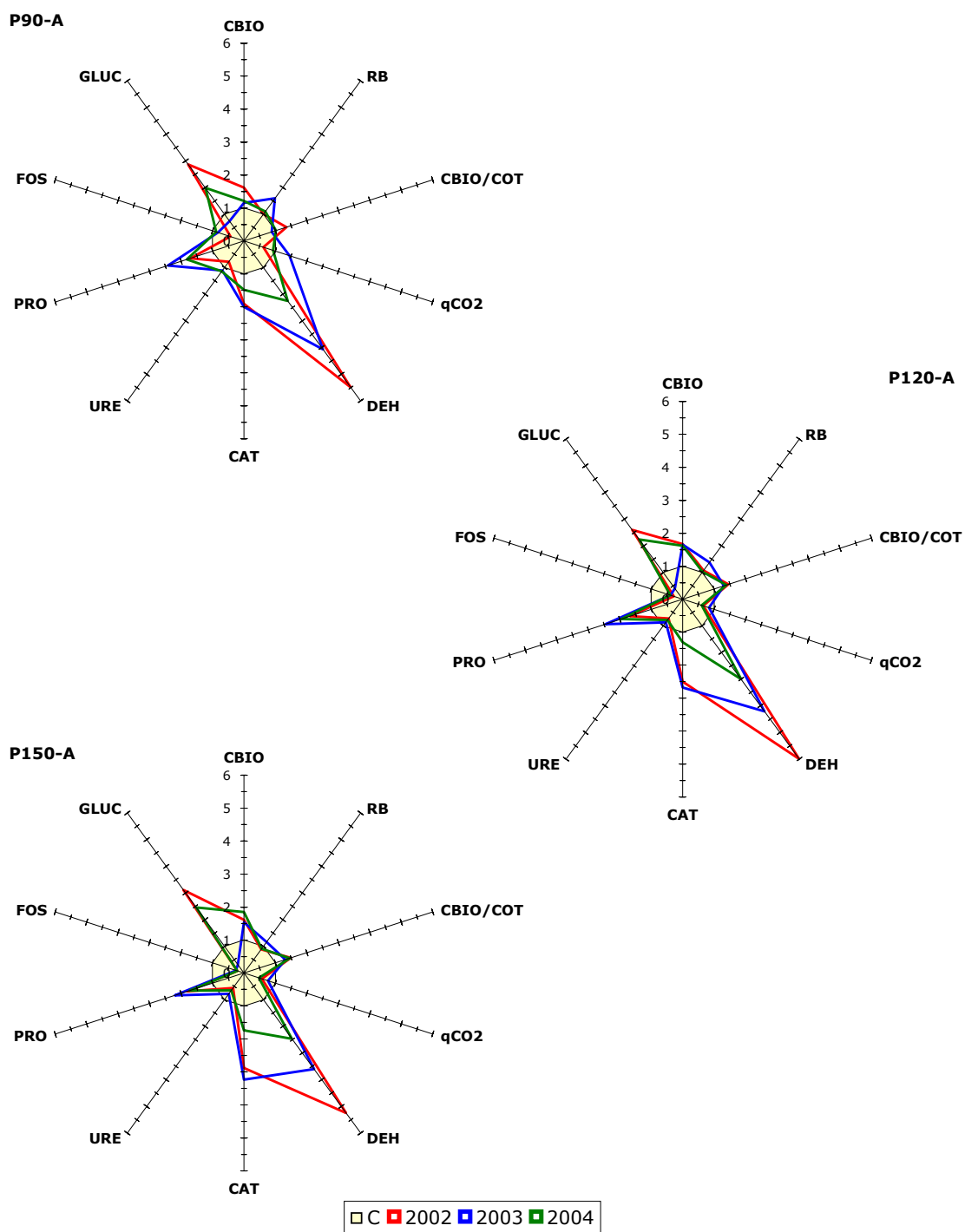


**Figura IV.8.5.** Diagramas *sun-ray* derivados de las propiedades biológicas y bioquímicas de los suelos enmendados anualmente (efecto acumulativo, A) con 30 y 60 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P30 y P60). Las abreviaturas tienen el mismo significado que en la figura IV.8.4.

cociente metabólico y actividad catalasa, así como un menor carbono de biomasa microbiana y relación  $C_{\text{BIO}}/\text{COT}$ . También se aprecia claramente como el área de la estrella se reduce en la cosecha de 2004, indicando una disminución continua de la calidad biológica del suelo de este tratamiento.

Respecto a los tratamientos residuales, destaca la actividad oxidativa elevada de los mismos respecto al control en 2002 (aparecen picos de actividad catalasa, deshidrogenasa, cociente metabólico y, en menor medida, respiración basal). Estos efectos se atribuyen, más que a una consecuencia a largo plazo de la aplicación del purín, a la incorporación de restos de cosecha comentada anteriormente (apartado IV.5.1.). De forma similar al tratamiento con fertilizante mineral, se advierte una reducción del área de la figura que con el transcurso de los años se aproxima al contorno del control. Esto significa que después de siete años de la aplicación de purín el mantenimiento del régimen de cultivo es insostenible en términos de calidad biológica del suelo, de forma similar a la fertilización mineral anual.

En la figura IV.8.5. se muestran los diagramas *sun-ray* de los tratamientos acumulativos con dosis bajas de purín (30 y 60 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>). En el primero, la representación obtenida es bastante próxima a la del control, lo que sugiere que la adición de purín a 30 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> no es suficiente para compensar los procesos de degradación a los que se ve sujeto el suelo de forma natural. La aplicación de una cantidad más elevada de purín supone.



**Figura IV.8.6.** Diagramas *sun-ray* derivados de las propiedades biológicas y bioquímicas de los suelos enmendados anualmente (efecto acumulativo, A) con 90, 120 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P90, P120 y P150, respectivamente). Las abreviaturas tienen el mismo significado que en la figura IV.8.4.

una mejora leve del conjunto de parámetros estudiados, aunque según los resultados obtenidos al término del séptimo año desaparece la recuperación inducida por la enmienda

Los diagramas de los suelos enmendados anualmente con 90, 120 y 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> se representan en la figura IV.8.6. En primer lugar, resulta llamativa la forma tan irregular que toman las figuras, lo que da idea de las transformaciones profundas que estos tratamientos ejercen sobre las propiedades biológicas y bioquímicas del suelo. El efecto más marcado se produce sobre la actividad deshidrogenasa, aumentando en 2002 entre 5 y 6 veces respecto al control. Además, se originan picos importantes en los ejes correspondientes a las actividades catalasa, proteasa, β-glucosidasa (excepto en 2003) y, menos claramente, en el eje del carbono de biomasa microbiana. También es visible la reducción de actividad fosfatasa en los suelos enmendados respecto al tratamiento control. Al igual que en los demás tratamientos, las representaciones de 2004 tienen menor área que las de los años anteriores, lo que significa que a pesar de que la enmienda con estas dosis de purín revitalice la actividad biológica de los suelos, se advierte igualmente cómo la continuidad del régimen de monocultivo compromete la calidad de los suelos estudiados.

#### **IV.8.8. ANÁLISIS DE CORRELACIONES.**

Las tablas IV.8.7, IV.8.8. y IV.8.9. muestran las matrices de correlación (coeficientes de correlación de Pearson) obtenidas a partir de la dosis de purín, las variables físico-químicas, las fracciones de materia orgánica, las propiedades biológicas y las actividades enzimáticas que han sido analizadas después de cada cosecha. Los análisis estadísticos se han realizado de cada año por separado, dividiendo los datos en dos bloques, residual y acumulativo, e incluyendo en cada bloque el suelo control (n=18). No se exponen las matrices obtenidas a partir de los resultados del bloque residual, ya que en escasas ocasiones la correlación entre variables ha resultado significativa.

**Tabla IV.8.7. Matriz de correlación entre parámetros estudiados en el suelo control y en los suelos enmendados con purín de cerdo anualmente (efecto acumulado) tras la cosecha de 2002 (n=18).**

	pH	CE	Nt	N-NO <sub>3</sub>	COT	CSH	CAH	CAF	CHS	CHD	CFEN	CBIO	CBIO/ COT	RB	qCO <sub>2</sub>	DEH	CAT	URE	PRO	FOS	GLU		
Dosis	0.97***	0.87***	0.74***	0.71**								0.74***	0.67**		-0.58*	0.78***	0.82***	-0.68**	0.82***	-0.90***	0.84***		
pH		0.94***	0.75***	0.61**							0.57*	0.82***	0.75***		-0.58*	0.86***	0.88***	-0.65**	0.85***	-0.93***	0.85***		
CE			0.78***	0.54*						0.61**	0.83***	0.69**			-0.55*	0.84***	0.80***	-0.51*	0.85***	-0.88***	0.79***		
Nt				0.72***	0.54*					0.53*						0.58*	0.66**		0.81***	-0.74**	0.60**		
N-NO <sub>3</sub>						0.47*				-0.48*									-0.47*	0.70**	-0.63*	0.53*	
COT						0.82***	0.74***																
CSH							0.93***																
CAH									-0.56*		-0.46*	-0.65**	-0.62**			-0.66**	-0.68**		-0.67**	0.65**	-0.76***		
CAF														0.50*									
CHS										0.72***	0.58*	0.55*			0.79***	0.50*					0.48*		
CHD																					0.68**		
CFEN												0.61**	0.52*		0.75***					0.61**	0.59*		
CBIO													0.95***		-0.77***	0.83***	0.76***			0.68**	-0.80***	0.69**	
CBIO/COT																							
RB																-0.75***	0.78***	0.73***		0.56*	-0.69**	0.61**	
qCO <sub>2</sub>																						-0.51*	
DEH																	0.80***			0.78***	-0.78***	0.77***	
CAT																				-0.58*	0.76***	-0.80***	0.77***
URE																					0.64**	-0.58*	
PRO																						-0.81***	0.83***
FOS																							-0.85***

CE: conductividad eléctrica; Nt: nitrógeno total; COT: carbono orgánico total; CSH: carbono de las sustancias húmicas; CAH: carbono de los ácidos húmicos; CAF: carbono de los ácidos fúlvicos; CHS: carbono hidrosoluble; CHD: carbohidratos; CFEN: compuestos fenólicos; CBIO: carbono de la biomasa microbiana; RB: respiración basal; qCO<sub>2</sub>: cociente metabólico; DEH: deshidrogenasa; CAT: catalasa; URE: ureasa; PRO: proteasa; FOS: fosfatasa; GLU: β-glucosidasa.  
\* p≤0.05; \*\* p≤0.01; \*\*\* p≤0.001.

**Tabla IV.8.8. Matriz de correlación entre parámetros estudiados en el suelo control y en los suelos enmendados con purín de cerdo anualmente (efecto acumulativo) tras la cosecha de 2003 (n=18).**

	pH	CE	Nt	N-NO3	COT	CSH	CAH	CAF	CHS	CHD	CFEN	CBIO	CBIO/ COT	RB	qCO <sub>2</sub>	DEH	CAT	URE	PRO	FOS	GLU	
Dosis	0.95***	0.83***	0.54*	0.90***						0.86***	0.75***	0.60**			0.84***	0.94***			0.82***	-0.82***	-0.86***	
pH		0.87***	0.66**	0.94***			0.54*			0.87***	0.79***	0.60**	0.47*		0.92***	0.93***			0.81***	-0.80***	-0.81***	
CE			0.61**	0.88***	0.53*					0.73***	0.61**	0.69**	0.69**		0.89***	0.74***			0.77***	-0.53*	-0.63**	
Nt				0.70**	0.80***					0.53*	0.58*	0.55*	0.55*		0.62**	0.55*						
N-NO <sub>3</sub>					0.52*				0.80***	0.78***	0.54*	0.57*	0.57*		0.90***	0.88***			0.81***	-0.72***	-0.73***	
COT						0.58*				0.57*	0.78***	0.53*	0.53*									
CSH							0.90***		0.66**	0.72***	-0.50*	-0.50*	0.49*									
CAH								-0.51*		0.58*						0.58*	-0.67**					
CAF									0.52*		0.61**	-0.62**	0.59*									
CHS										0.77***												
CHD											0.71**	0.67**	0.51*		0.76***	0.81***			0.74***	-0.83***	-0.84***	
CFEN													0.51*									
CBIO											0.82***	0.83***	-0.69**		-0.69**	0.73***	0.83***	-0.47*	0.64**	-0.73***	-0.62**	
CBIO/COT																0.67**			0.55*			
RB															-0.86***	0.48*	0.69**	-0.48*	0.52*	-0.75***	-0.67**	
qCO <sub>2</sub>																-0.50*	0.57*				0.56*	
DEH																	0.80**		0.86***	-0.59*	-0.64**	
CAT																		-0.47*	0.73***	-0.86***	-0.82***	
URE																						
PRO																					-0.70**	-0.72***
FOS																						0.91***

CE: conductividad eléctrica; Nt: nitrógeno total; COT: carbono orgánico total; CSH: carbono orgánico total; CAF: carbono de las sustancias húmicas; CAH: carbono de los ácidos húmicos; CBIO: carbono de los ácidos fúlvicos; CHS: carbono hidrosoluble; CHD: carbohidratos; CFEN: compuestos fenólicos; RB: respiración basal; qCO<sub>2</sub>: cociente metabólico; DEH: deshidrogenasa; CAT: catalasa; URE: ureasa; PRO: proteasa; FOS: fosfatasa; GLU: β-glucosidasa.

\* p≤0.05; \*\* p≤0.01; \*\*\* p≤0.001.

**Tabla IV.8.9. Matriz de correlación entre parámetros estudiados en el suelo control y en los suelos enmendados con purín de cerdo anualmente (efecto acumulativo) tras la cosecha de 2004 (n=18).**

	pH	CE	Nt	N-NO <sub>3</sub>	COT	CSH	CAH	CAF	CHS	CHD	CFEN	CBIO	CBIO/ COT	RB	qCO <sub>2</sub>	DEH	CAT	URE	PRO	FOS	GLU
Dosis	0.93***	0.87***	0.63**	0.59*	0.49*	-0.57*	-0.57*	-0.48*	0.80***	0.59**	-0.65**	0.78***	0.68**	-0.49*	0.75***	-0.77***	0.87***				
pH		0.88***	0.58*	0.62**		-0.67**	-0.61**	-0.63**	0.81***	0.65**	-0.67**	0.86***	0.73***	-0.62**	0.72***	-0.86***	0.86***				
CE			0.62**	0.82***				0.73***	0.56*		-0.57*	0.90***	0.73***	0.82***	-0.68**	0.83***					
Nt				0.56*				-0.51*			0.68**	0.72***	0.66**	-0.49*	0.73***						
N-NO <sub>3</sub>											0.79***	0.57*	0.84***	0.71***							
COT							0.67**														
CSH						0.55*								0.55*							
CAH																					
CAF						0.61**								0.57*							
CHS									0.73***	0.91***	-0.60**	-0.54*		-0.50*	0.78***	0.77***	-0.57*				
CHD								0.67**						-0.58*	0.56*	0.70**	-0.51*				
CFEN														-0.60	-0.67**	0.69**	0.75***	-0.54*			
CBIO													0.92***	-0.78***	0.75***	0.53*	-0.50*	0.58*	-0.76***	0.61**	
CBIO/COT													0.67**								
RB														-0.74***	0.61**						-0.65**
qCO <sub>2</sub>															-0.63**						-0.55*
DEH															0.76***						0.82***
CAT																					0.68**
URE																					0.71***
PRO																					-0.51*
FOS																					0.81***
																					-0.63**

CE: conductividad eléctrica; Nt: nitrógeno total; COT: carbono orgánico total; CSH: carbono orgánico total; CSH: carbono de las sustancias húmicas; CAH: carbono de los ácidos húmicos; CAF: carbono de los ácidos fúlvicos; CHS: carbono hidrosoluble; CHD: carbohidratos; CFEN: compuestos fenólicos; CBIO: carbono de la biomasa microbiana; RB: respiración basal; qCO<sub>2</sub>: cociente metabólico; DEH: deshidrogenasa; CAT: catalasa; URE: ureasa; PRO: proteasa; FOS: fosfatasa; GLU: β-glucosidasa.  
\* p≤0.05; \*\* p≤0.01; \*\*\* p≤0.001.

## IV.9. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Dado el elevado número de variables estudiadas, el análisis de correlaciones genera un gran volumen de coeficientes difícil de manejar e interpretar si se pretende identificar relaciones entre las propiedades del suelo. El análisis de componentes principales es una técnica de reducción de datos que sirve para encontrar grupos homogéneos de variables que sean capaces de explicar el máximo de información con el menor número de dimensiones necesarias (Wold et al., 1987).

A partir de un grupo de variables, de las que pueden correlacionarse algunas, el análisis de componentes principales las transforma en un nuevo grupo de variables no correlacionadas, llamados componentes. Cada uno se define como una combinación lineal de las variables originales y explican sucesivamente la máxima variación residual de los datos originales. La influencia relativa de cada variable en los componentes resultantes se indica mediante el coeficiente de saturación o carga, que es la correlación entre la variable original y cada uno de los componentes. Además, se puede estimar las puntuaciones de cada sujeto de análisis en las nuevas dimensiones, las cuales indican las relaciones entre los tratamientos estudiados de acuerdo con la variación extraída por los componentes principales (Wold et al., 1987). La principal ventaja de este análisis es que permite una visualización gráfica de la estructura funcional subyacente debida a las relaciones existentes entre las variables estudiadas (Stenberg et al., 2000). El análisis de componentes principales se ha empleado para discriminar los efectos de diferentes prácticas agrícolas sobre las propiedades del suelo (Sena et al., 2002), como herramienta para la definición de índices de calidad de suelo (Sharma et al., 2005), para identificar las interrelaciones existentes entre las propiedades físicas, químicas y bioquímicas de los suelos (Trasar-Cepeda et al., 2000) o para clasificar diferentes ecosistemas según las propiedades biológicas de los suelos (Bentham et al., 1992).

Como se vio en el apartado IV.8.8., muchas de las propiedades de los tratamientos acumulativos se encuentran fuertemente correlacionadas entre sí. Para realizar el análisis de componentes principales se han seleccionado las fracciones de materia orgánica (carbono de sustancias húmicas, carbono de ácidos húmicos, carbono de ácidos fúlvicos, carbono hidrosoluble, carbohidratos y compuestos fenólicos), las propiedades biológicas (carbono de la biomasa microbiana y respiración basal) y las actividades enzimáticas (deshidrogenasa, catalasa, ureasa, proteasa-BAA, fosfatasa y  $\beta$ -glucosidasa). Se han excluido la relación  $C_{\text{BIO}}/COT$  y el cociente metabólico, ya que al calcularse a partir de dos variables incluidas en el análisis podría dar lugar a errores en la interpretación de los resultados (Bentham et al., 1992; Stenberg et al., 2000). Los valores de los coeficientes de saturación obtenidos mediante el análisis de componentes principales y el porcentaje



de varianza explicada por cada uno de ellos, se muestran en la tabla IV.9.1. También se representan los gráficos de saturaciones correspondientes, en los que se estudia la estructura de las variables y la relación existente entre cada una y los componentes obtenidos (figura IV.9.1.). Las variables que aparecen próximas entre sí están relacionadas positivamente, mientras que las que están en posiciones opuestas correlacionan negativamente.

**Tabla IV.9.1. Coeficiente de saturación de cada propiedad en los ejes definidos por el análisis de componentes principales.**

Variable <sup>a</sup>	Componente			
	CP1	CP2	CP3	CP4
<b>CAT</b>	0.87			
<b>CBIO</b>	0.89			
<b>FOS</b>	-0.85			
<b>PRO</b>	0.74		-0.50	
<b>CHD</b>		0.87		
<b>CHS</b>		0.85		
<b>CFEN</b>		0.78		
<b>URE</b>	-0.44	0.57	0.41	
<b>GLUC</b>		-0.51	0.43	0.49
<b>RB</b>			0.77	
<b>DEH</b>		0.42	0.75	
<b>CAF</b>			0.66	
<b>CAH</b>				0.94
<b>CSH</b>				0.84
<b>% varianza explicada</b>	23.8	21.3	18.3	17.0
<b>% varianza acumulada</b>	23.8	45.1	63.3	80.4

<sup>a</sup> CAT: catalasa; CBIO: C de la biomasa microbiana; FOS: fosfatasa; PRO: proteasa; CHD: carbohidratos; CHS: C hidrosoluble; CFEN: compuestos fenólicos; URE: ureasa; GLUC:  $\beta$ -glucosidasa; RB: respiración basal; DEH: deshidrogenasa; CAF: C de los ácidos fúlvicos; CAH: C de los ácidos húmicos; CSH: C de las sustancias húmicas.

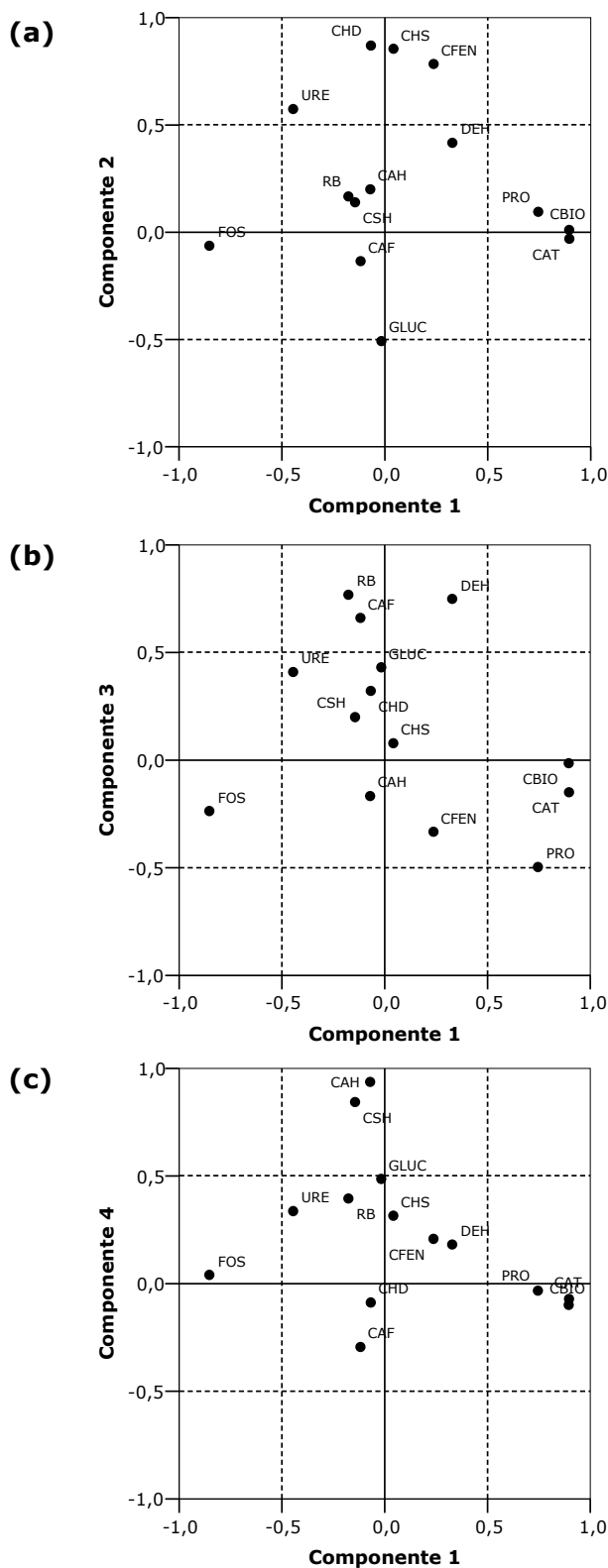
No figuran coeficientes de valor absoluto menor que 0.4

El análisis de componentes principales permite extraer cuatro ejes de variación que explican el 80% de la varianza total (tabla IV.9.1.). El primer componente (CP1), que absorbe el 24%, viene determinado por el carbono de la biomasa y las actividades catalasa, proteasa, fosfatasa y en menor medida, ureasa. El segundo de los ejes (CP2), que explica el 21%, aparece

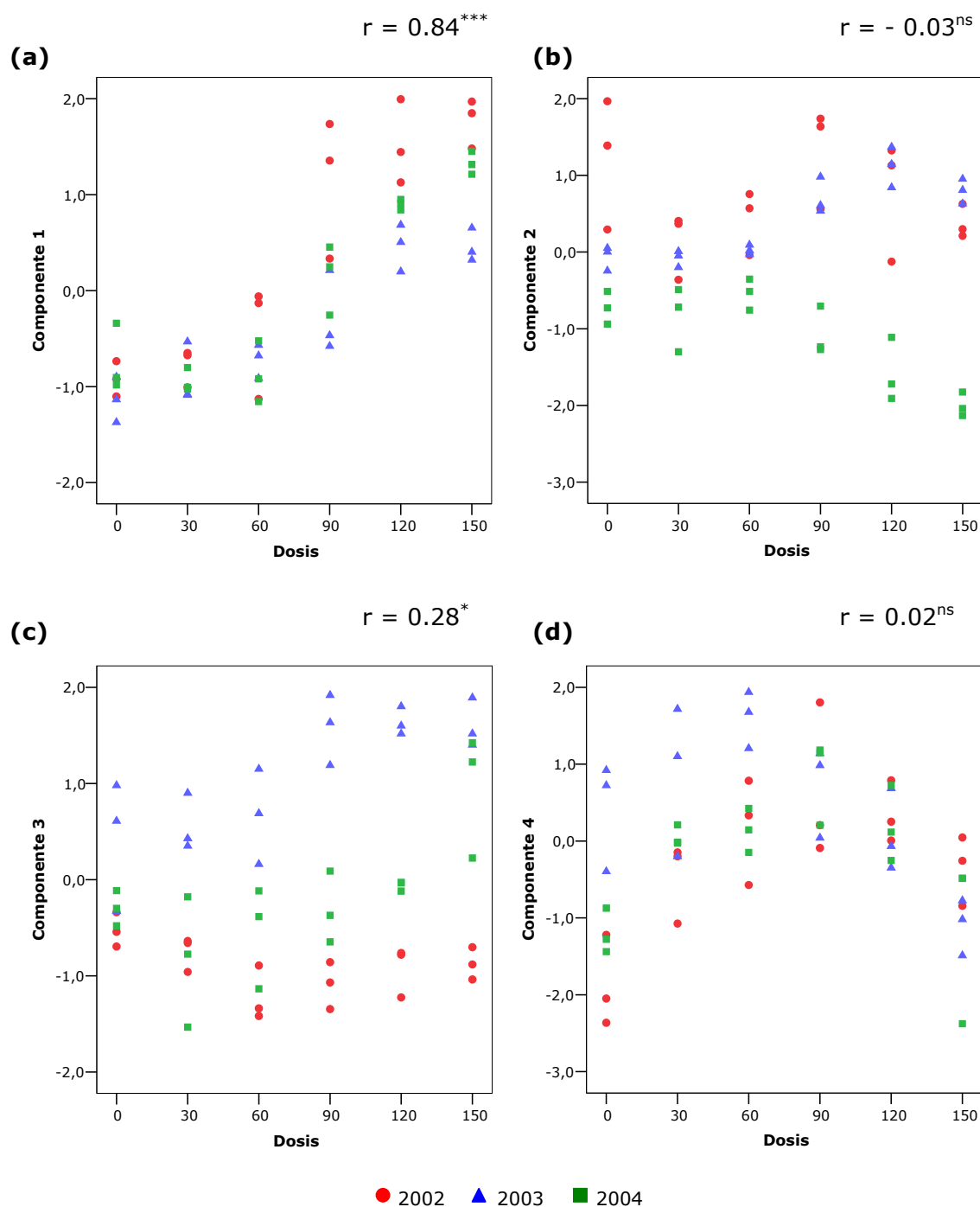
relacionado con las tres fracciones de materia orgánica hidrosoluble y, en menor medida, con las actividades ureasa,  $\beta$ -glucosidasa y deshidrogenasa. El tercer componente (CP3), que explica el 18% de la varianza, se correlaciona principalmente con la deshidrogenasa, la respiración basal y el carbono de los ácidos fúlvicos. El cuarto eje (CP4) está asociado al carbono de las sustancias húmicas y de los ácidos húmicos.

A partir de la figura IV.9.1. se puede realizar un análisis más detallado de las relaciones existentes entre las variables. CP1 separa claramente el carbono de la biomasa y las actividades catalasa y fosfatasa respecto al resto de variables, ya que no aparecen asociadas a ningún otro componente (su saturación en CP2, CP3 y CP4 es próxima a cero). CP2 describe la disponibilidad de sustratos orgánicos, al estar definido principalmente por las fracciones de materia orgánica hidrosoluble (figura IV.9.1.a.). La correlación positiva entre la actividad ureasa y este componente se atribuye a que la presencia de compuestos orgánicos lábiles estimula la síntesis de la enzima para la obtención del nitrógeno necesario para el crecimiento celular. En consecuencia, el metabolismo microbiano se activa, lo que explicaría la correlación con la deshidrogenasa. Por otra parte, esta enzima aparece fuertemente asociada a la respiración basal en el eje definido por CP3 (figura IV.9.1.b.) y, más débilmente, a todas las hidrolasas, excepto la fosfatasa, por lo que este componente representa la capacidad degradativa de las poblaciones microbianas para la adquisición de nutrientes. Además, destaca que las actividades ureasa y proteasa-BAA aparecen en posiciones opuestas, indicando posiblemente una alternancia de la participación de estas enzimas en la asimilación del nitrógeno por parte de la microbiota. También hay que señalar la asociación con el carbono de los ácidos fúlvicos, lo que confirma su menor resistencia a procesos de degradación. Finalmente, CP4 representa el grado de humificación de la materia orgánica del suelo, al separar de forma evidente el carbono de las sustancias húmicas y de los ácidos húmicos (figura IV.9.1.c.).

La figura IV.9.2 muestra las puntuaciones asignadas por el modelo a cada uno de los suelos analizados en función del año de estudio, e indican la relación de los tratamientos con la variación extraída por el análisis (Stenberg et al., 2000). En la figura IV.9.2.a. se representa las puntuaciones respecto a CP1 frente la dosis de purín recibida anualmente, siendo la correlación entre ambos parámetros altamente significativa. Por tanto, este componente permite distinguir los tratamientos dependiendo de la cantidad de purín que se aplica, ya que así se estimula el crecimiento microbiano, como sugieren los coeficientes de saturación del carbono de la biomasa y de las actividades catalasa y proteasa, y aporta gran cantidad de fósforo asimilable, lo que explica la saturación negativa de la actividad fosfatasa. Además, esta relación es independiente del año de estudio. El



**Figura IV.9.1.** Diagramas de saturación de las fracciones de materia orgánica y de las propiedades biológicas y bioquímicas en los ejes del análisis de componentes principales. Las abreviaturas tienen el mismo significado que en la tabla IV.9.1.



**Figura IV.9.2.** Gráficos de dispersión de las puntuaciones del suelo control y de los enmendados con purín anualmente en cada uno de los componentes, frente a la dosis anual de purín ( $m^3 ha^{-1}$ ). Se indican los coeficientes de correlación entre las puntuaciones de cada componente y la dosis de purín ( $n=54$ ;  $p \leq 0.05$ ;  $*** p \leq 0.001$ ;  $^{ns} p > 0.05$ ).

CP2 (figura IV.9.2.b.), asociado a la materia orgánica hidrosoluble, no se correlaciona con la dosis de purín; sin embargo, permite diferenciar el año 2004 de los anteriores, debido a la disminución observada de estas fracciones. El CP3 (figura IV.9.2.c.), representativo de la capacidad hidrolítica de la microbiota, separa claramente el año 2003 y se correlaciona débilmente con la dosis de purín. Como se ha comentado anteriormente, este año se caracteriza por unas temperaturas más elevadas, confirmando que esta circunstancia aumenta la actividad degradativa del suelo. Por último, en la figura IV.9.2.d. se aprecia que las puntuaciones asociadas al CP4, es decir, al grado de humificación de la materia orgánica, se incrementan con la dosis de purín hasta el tratamiento con  $90 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  y disminuyen en los suelos que recibieron mayor cantidad de enmienda, indicio de que el aporte de cantidades elevadas de purín incentiva la mineralización de la materia orgánica nativa.

## IV.10. EVOLUCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PATÓGENOS

La enumeración de grupos de bacterias indicadoras de contaminación fecal es utilizada para valorar la calidad sanitaria de alimentos, suelos y aguas destinados al consumo humano, la agricultura, la industria y la recreación. Los estiércoles en general, y el purín de cerdo en particular, contienen cantidades apreciables de microorganismos patógenos, entre los que cabe citar bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp., *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* spp. y *Listeria monocytogenes*, protozoos como *Cryptosporidium parvum* o diversos tipos de virus (Bicudo y Goyal, 2003; Hutchison et al., 2005a). En consecuencia, un riesgo de la aplicación de purín de cerdo al suelo con fines agronómicos es la posibilidad de que se introduzcan patógenos en las aguas o en la cadena alimentaria, especialmente en el caso de cosechas cuyo consumo sea preferentemente en crudo.

El estudio de la presencia y persistencia de los microorganismos patógenos se efectúa habitualmente mediante el análisis de una serie de organismos indicadores de contaminación fecal. Éstos se seleccionan entre aquellas especies comensales que viven exclusivamente en el tracto intestinal de animales de sangre caliente. Se encuentran siempre, y de forma natural, en las heces, por lo que su presencia en el suelo, aguas o alimentos indica sin duda que la muestra ha entrado en contacto con

materias fecales. Dentro del rango de los microorganismos indicadores se encuentra el grupo de bacterias coliformes, entre ellas *Escherichia coli*, estreptococos fecales, *Clostridium* sulfito-reductores y *Salmonella* spp.

El estudio de la evolución de los patógenos en los suelos se ha realizado mediante el seguimiento del número de microorganismos de cada uno de los grupos investigados durante un año en un suelo enmendado con 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín, en comparación con un tratamiento control sin residuo, ambos sin cultivo. La composición microbiana del purín aplicado se muestra en la tabla IV.10.1. Estos niveles se encuentran dentro de los intervalos habituales para este tipo de residuos (Bicudo y Svoboda, 1995; Placha et al., 2001; Hutchison et al., 2005a) y son ligeramente inferiores, aunque del mismo orden de magnitud, a los de los purines aplicados en cada cosecha (tabla IV.1.1). Las cantidades de microorganismos patógenos que pueden aparecer en los residuos ganaderos son variables, ya que dependen de diversos factores, además de la especie, como la localización geográfica de la explotación, el tipo de dieta, la edad de los animales, la composición físico-química del residuo, el estado del mismo (sólido o líquido), y la forma y la duración del almacenamiento antes de la aplicación al suelo (Hutchison et al., 2005a).

**Tabla IV.10.1. Contenido de microorganismos patógenos (media  $\pm$  error estándar de tres repeticiones) en el purín de cerdo empleado.**

Patógenos	UFC L <sup>-1</sup>
Coliformes fecales	$1.5 \cdot 10^7 \pm 0.5 \cdot 10^7$
Estreptococos fecales	$3.9 \cdot 10^6 \pm 0.9 \cdot 10^6$
<i>Clostridium</i> sulfito-reductores	$2.5 \cdot 10^5 \pm 0.7 \cdot 10^5$
<i>Salmonella</i> spp.	presencia

La evolución de los coliformes fecales, los estreptococos fecales y los *Clostridium* sulfito-reductores se muestra en las figuras IV.10.1., IV.10.2. y IV.10.3., respectivamente. Inmediatamente después de la aplicación del purín (día 0) se hallan en el suelo colonias viables de todos los grupos analizados, incluida *Salmonella* spp. En el día 3 este último grupo deja de detectarse; sin embargo, Turpin et al. (1993) señalaron que puede persistir en el suelo durante periodos de tiempo más largos pero sin ser cultivable, por lo que no sería detectable según técnicas tradicionales. Según Bicudo y Goyal (2003), *Salmonella* spp. puede sobrevivir en el suelo en condiciones ambientales adversas (hasta 45°C). Así, Nicholson et al. (2005) hallaron que este grupo permanecía en el suelo hasta un mes después de la

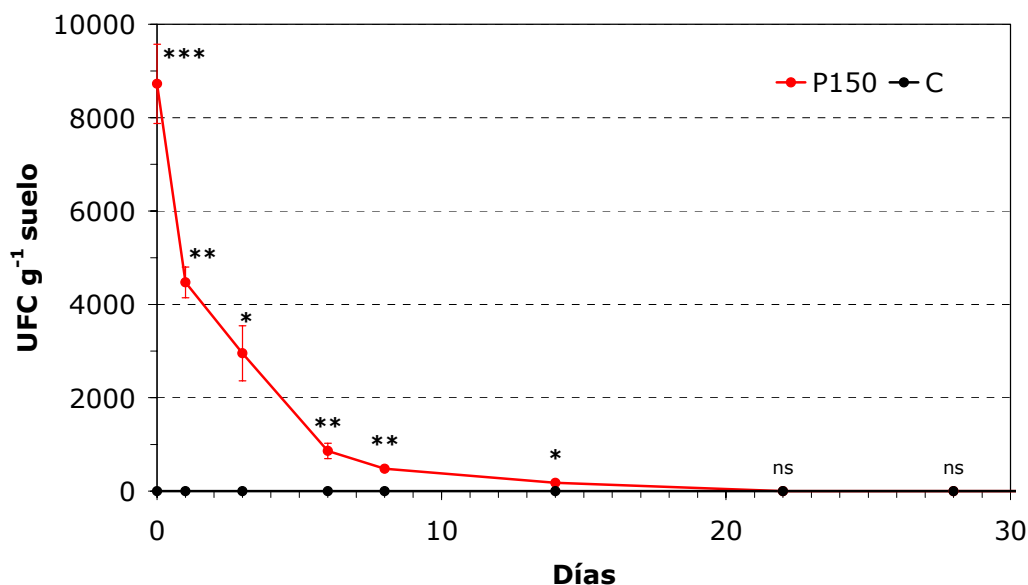
aplicación del residuo, tanto en un suelo arable arenoso como en uno de pradera franco-arcilloso, mientras que según Hutchison et al. (2005b) la supervivencia máxima de *Salmonella* spp. fue de 16 días.

La figura IV.10.1 muestra cómo la población de coliformes fecales se reduce rápidamente en el suelo enmendado, desapareciendo después de 22 días de la aplicación del purín, mientras que este grupo no se detecta en ningún momento en el suelo control. En un experimento de incubación a diferentes condiciones de temperatura y humedad, Cools et al. (2001) hallaron que la supervivencia de *Escherichia coli* (principal especie del grupo de coliformes fecales) oscilaba entre 17 y 80 días después de la aplicación de purín, resultados que son similares a los descritos por Trevisan et al. (2002); por el contrario Jiang et al. (2002) indican una supervivencia máxima de *Escherichia coli* de 193 días. En un experimento de campo sin cultivo en el que se aplicaron tres tipos de lodos (Soler-Rovira, 1998), se observó que los coliformes fecales desaparecieron entre 1 y 30 semanas después de la incorporación de la enmienda, según el tipo de lodo y la dosis recibida. Estrada et al. (2004) indicaron que al cabo de 80 días la población de coliformes fecales y de *Escherichia coli* disminuyó considerablemente o no fue detectada en ensayos llevados a cabo con mezclas de suelo y lodo, tanto en condiciones al aire libre como en laboratorio.

La evolución de estreptococos fecales en el suelo enmendado y en el control aparece en la figura IV.10.2. A lo largo del experimento se detectan colonias de este grupo en el suelo sin enmendar, lo que indica que los estreptococos fecales están más capacitados para sobrevivir en el suelo que los coliformes. La aplicación de purín ocasiona un aumento significativo de las colonias cultivables, triplicando las halladas en el suelo nativo al inicio del experimento. Las diferencias entre ambos dejan de ser significativas a partir del día 42, cuando se aproximan a 4000 UFC g<sup>-1</sup>, aunque entre los días 195 y 293 se encuentra un ligero incremento de estreptococos en el tratamiento con purín respecto al control.

La figura IV.10.3. muestra la variación del número de *Clostridium* sulfito-reductores. En la misma se aprecia que el suelo control presenta a lo largo del tiempo una población de este grupo prácticamente constante en torno a las 100-200 UFC g<sup>-1</sup>, incrementándose ligeramente al final del experimento. En cambio, en el suelo tratado con purín se observa inmediatamente después de la aplicación un aumento significativo respecto al control, disminuyendo al día siguiente. Posteriormente la población de *Clostridium* se incrementa con el tiempo hasta un máximo de 4800 UFC g<sup>-1</sup> en el día 28. En días sucesivos los niveles descienden y se estabilizan alrededor de las 1000 UFC g<sup>-1</sup> desde el día 69. A pesar de que la población de *Clostridium* tiende a disminuir transcurrido un tiempo después de la enmienda, sólo al cabo de un año deja de diferenciarse significativamente

## Evolución de coliformes fecales



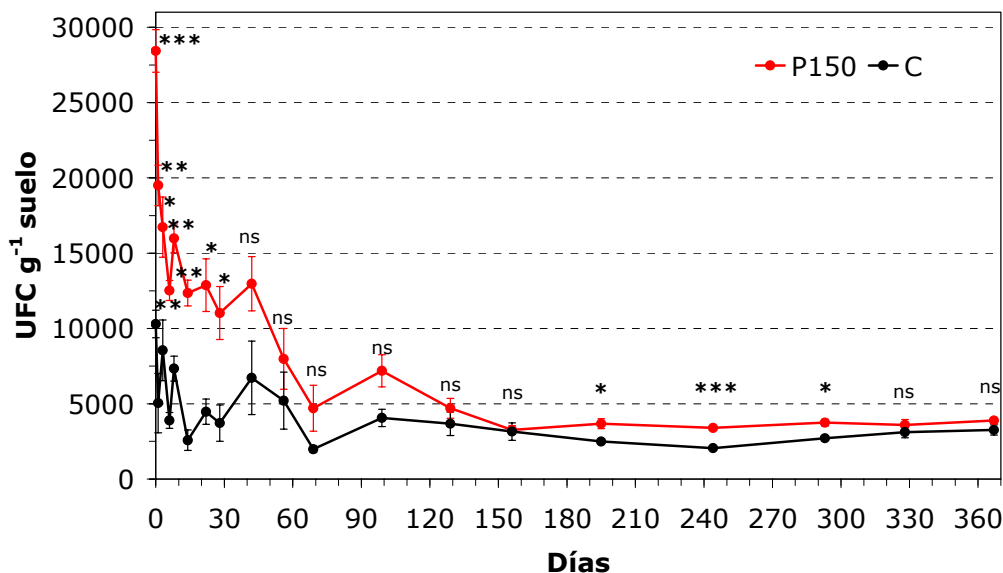
**Figura IV.10.1.** Evolución de coliformes fecales del suelo control (C) y del enmendado con 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de purín de cerdo (P150). Las barras indican el error estándar de la media (n=3). Los tratamientos se compararon en cada día mediante un test *t* de Student: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

de los valores de fondo del suelo control, dada la capacidad esporulante de los *Clostridium* y su resistencia elevada a condiciones adversas (Soler-Rovira, 1998).

Cuando se aplican residuos ganaderos al suelo, los microorganismos que contienen están expuestos a las condiciones ambientales y su supervivencia depende del tipo de estiércol (sólido o líquido), el tratamiento previo que ha recibido, la época del año, la presencia o ausencia de plantas, antagonismos con la flora microbiana del suelo, el contenido de agua en el suelo, y otras propiedades del mismo como pH, temperatura, contenido de materia orgánica y permeabilidad (Bicudo y Goyal, 2003). Se sabe que en condiciones de temperatura baja y humedad alta se beneficia la supervivencia de los microorganismos patógenos (Cools et al., 2001; Turner, 2002; Guan y Holley, 2003). La temperatura del suelo no sólo afecta al desarrollo bacteriano, sino que también determina la competición con otros microorganismos y la predación, principalmente debida al

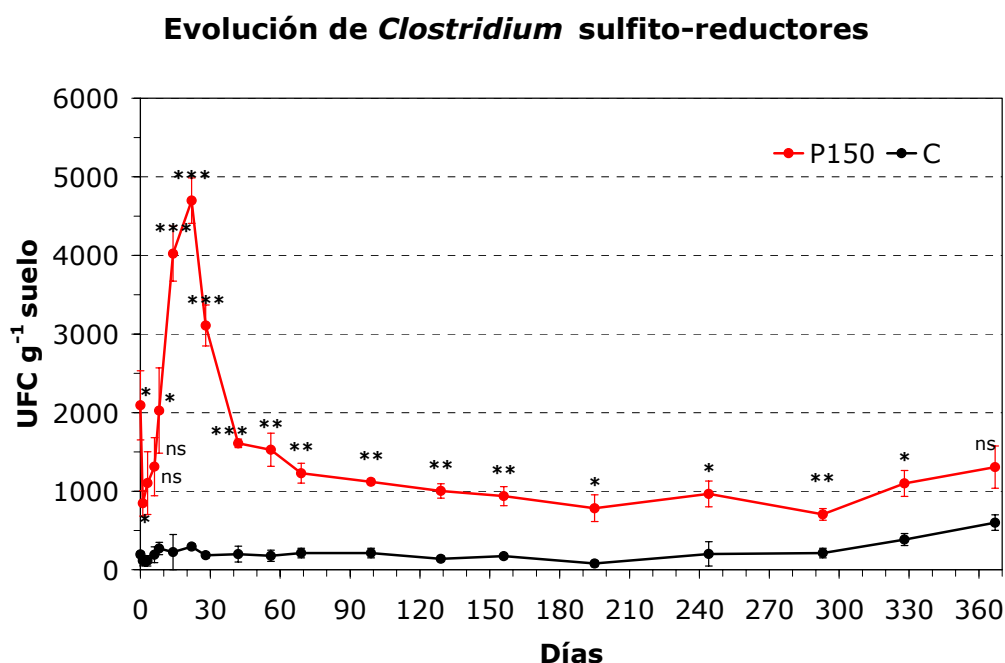


## Evolución de estreptococos fecales



**Figura IV.10.2.** Evolución de estreptococos fecales del suelo control (C) y del enmendado con  $150 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  de purín de cerdo (P150). Las barras indican el error estándar de la media ( $n=3$ ). Los tratamientos se compararon en cada día mediante un test  $t$  de Student: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

crecimiento de protozoos. Una combinación de efectos debido a la temperatura más elevada y el aumento de actividad de la microflora edáfica explica la reducción de bacterias patógenas con el aumento de temperatura, mientras que hay menos actividad antagonista en condiciones más frías (Cools et al., 2001; Trevisan et al., 2002). El contenido de materia orgánica y la textura del suelo son factores que también tienen una fuerte influencia en la supervivencia de microorganismos patógenos en el suelo, ya que condicionan la retención de agua, la estabilización de agregados y la formación de microhabitats (Nicholson et al., 2005). Igualmente, la vegetación ejerce un efecto protector sobre los microorganismos, ya que evita la exposición directa de los mismos a la radiación ultravioleta (Trevisan et al., 2002). En relación con este aspecto hay que señalar que la aplicación del purín mediante aspersión aumenta el riesgo de generación de aerosoles y hay mayor diseminación de los patógenos que cuando se inyecta al terreno o se agrega mediante surcos. Con la incorporación al



**Figura IV.10.3.** Evolución de *Clostridium* sulfito-reductores del suelo control (C) y del enmendado con  $150 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  de purín de cerdo (P150). Las barras indican el error estándar de la media ( $n=3$ ). Los tratamientos se compararon en cada día mediante un test  $t$  de Student: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

terreno el residuo se seca más lentamente y está menos expuesto a la radiación ultravioleta, aumentando las posibilidades de su supervivencia (Nicholson et al., 2005).

En las condiciones en las que se desarrolla esta experiencia, la persistencia de microorganismos patógenos está perjudicada por temperaturas relativamente elevadas y una humedad del suelo reducida en las semanas posteriores a la aplicación del purín, así como por la ausencia de vegetación que atenúe el efecto bactericida de la radiación solar. Además, la incorporación de nutrientes y de materia orgánica fácilmente biodisponible incentiva la actividad de los microorganismos nativos, aumentando su capacidad para competir con los alóctonos. En consecuencia, los patógenos añadidos con el purín son menos resistentes debido a una mayor vulnerabilidad a las condiciones ambientales adversas y al desarrollo de una microbiota autóctona más competitiva. Las diferencias entre los microorganismos patógenos estudiados en cuanto a su supervivencia en el suelo se atribuyen a la capacidad de resistencia de cada

grupo; así, los *Clostridium* sulfito-reductores son los más persistentes gracias a su capacidad de formar esporas resistentes a condiciones extremas.

Finalmente, Trevisan et al. (2002) desaconsejan una sola aplicación de residuo a dosis altas y recomiendan suministrar la misma cantidad de enmienda en varias aplicaciones. Con ello, se consigue desecar el residuo incorporado más rápidamente y que la penetración de la radiación ultravioleta sea más efectiva, además de que la incorporación gradual de materia orgánica favorece el mantenimiento de la actividad biológica autóctona; en definitiva, se logra una mejor respuesta depuradora del sistema.



## **V. CONCLUSIONES**

---



## V. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio permiten obtener las siguientes conclusiones principales:

- 1. La aplicación anual de purín de cerdo aumenta la producción de cebada en comparación con el control y con la fertilización mineral. Aunque el efecto depende del año, en términos generales se mejora la respuesta del cultivo frente a la variabilidad interanual impuesta por la disponibilidad de agua y la influencia del régimen de monocultivo continuo. Además, no se detectan problemas por acumulación de cobre y zinc en planta. El estudio de los índices de eficiencia fertilizante revela que el empleo de dosis moderadas consigue un aprovechamiento más eficaz del nitrógeno aplicado. También se pone de manifiesto la desaparición del efecto residual sobre el cultivo a partir de los cuatro años de la aplicación del purín.*
- 2. La fertilización anual con purín produce un aumento notorio del pH y de la conductividad eléctrica de los suelos. Por el contrario, no se aprecian mejoras en la estabilidad de los agregados ni en la capacidad de retención hídrica después de siete años de aplicación.*
- 3. Los suelos enmendados con purín experimentan un incremento del contenido de nitratos, fósforo, calcio y sodio asimilables. La concentración total y potencialmente asimilable de cobre aumenta respecto al suelo control después de siete años, pero sin que se aprecien riesgos de contaminación.*
- 4. Los contenidos de carbono orgánico total y de las sustancias húmicas no se muestran significativamente afectados por la incorporación anual de purín de cerdo, lo que se atribuye a la baja estabilidad de la materia orgánica adicionada, sin olvidar que ha influido*

*de manera importante el aporte procedente de la vegetación. El empleo del purín de cerdo no parece ser una práctica efectiva para la recuperación a largo plazo de una materia orgánica estabilizada en las condiciones de este estudio. Esto concuerda con la incorporación significativa de  $^{13}\text{C}$  procedente del purín en la materia orgánica de los suelos enmendados, a costa de la mineralización de parte del carbono nativo*

5. *Los ácidos húmicos y fúlvicos del purín se caracterizan por poseer contenidos más elevados de grupos azufrados y nitrogenados, mayor carácter alifático, menores grados de humificación y de policondensación aromática, menor contenido de grupos funcionales ácidos, mayor afinidad protónica y menor capacidad para formar complejos con el cobre(II) y el zinc(II) que los de los suelos sin enmendar. La aplicación de purín durante siete años consecutivos provoca modificaciones en la composición, la estructura molecular, el comportamiento ácido-base y la capacidad para formar complejos con el cobre(II) y el zinc(II) de las sustancias húmicas de los suelos enmendados, que sugieren una incorporación parcial de la fracción húmica del purín en la del suelo nativo.*

6. *La incorporación de purín de cerdo promueve una estimulación del crecimiento y de la actividad de la biomasa microbiana, como indica el aumento con la dosis del carbono de la biomasa microbiana y de las actividades oxidorreductasas (deshidrogenasa y catalasa) en los tratamientos acumulativos. Además, el aumento del cociente metabólico en los suelos enmendados anualmente indica una mejora de la situación de estrés a la que están sujetos los microorganismos en los suelos degradados. Respecto a las enzimas hidrolasas, la actividad fosfatasa se inhibe y la ureasa apenas varía debido a que la disponibilidad de fósforo y nitrógeno en los suelos enmendados hace innecesaria la síntesis de estas enzimas. En cambio, las actividades proteasa-BAA y  $\beta$ -glucosidasa se estimulan como respuesta a la incorporación de sustratos orgánicos.*

7. *A partir del análisis de componentes principales se deduce que la información relativa a las fracciones de materia orgánica y las propiedades biológicas y bioquímicas de los suelos enmendados anualmente se encuentra fuertemente estructurada. Se extraen cuatro componentes asociados, respectivamente, al crecimiento microbiano, a la materia orgánica hidrosoluble, a la actividad degradativa de la biomasa y al grado de humificación. De éstos, el primero se correlaciona significativamente con la dosis de purín, independientemente del año de estudio.*

8. *La evaluación de la supervivencia de los microorganismos patógenos en los suelos indica que los coliformes fecales aportados por*



*el purín desaparecen tres semanas después de su aplicación. Los niveles de estreptococos fecales descienden hasta los del control en seis semanas, mientras que la población de Clostridium sulfito-reductores es superior a la del suelo sin enmendar durante un año.*

En definitiva, la aplicación de purín de cerdo a un cultivo de cebada es capaz de sustituir satisfactoriamente a la fertilización mineral, ofreciendo una alternativa interesante desde el punto de vista ambiental y agronómico a la eliminación de este residuo. A pesar de que los efectos significativos de la aplicación de purín sobre las propiedades del suelo son transitorios, pueden ser importantes durante un intervalo de tiempo durante el cual se estimula intensamente el crecimiento y la actividad biológica, lo que conlleva un aumento de la disponibilidad de nutrientes que puede influir directamente sobre el desarrollo del cultivo. Sin embargo, no resulta tan eficaz para la recuperación de la materia orgánica del suelo en condiciones semiáridas, por lo que conviene resaltar que la combinación con otras prácticas agrícolas, como la rotación de cultivos o la incorporación de restos de cosecha, podría optimizar el aprovechamiento de su valor fertilizante.



## **VI. BIBLIOGRAFÍA**

---



## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abbt-Braun, G., Lankes, U., Frimmel, F. H. 2004. Structural characterization of aquatic humic substances – The need for a multiple method approach. *Aquatic Sciences* 66: 151-170.
- Agencia Europea de Medio Ambiente. 2004. Medio ambiente en Europa: tercera evaluación. Ministerio de Medio Ambiente, Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental, Madrid.
- Albiach, R., Canet, R., Pomares, F., Ingelmo, F. 2000. Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to a horticultural soil. *Bioresour. Technol.* 75: 43-48.
- Albiach, R., Canet, R., Pomares, F., Ingelmo, F. 2001a. Organic matter components, aggregate stability and biological activity in a horticultural soil fertilized with different rates of two sewage sludges during ten years. *Bioresour. Technol.* 77: 109-114.
- Albiach, R., Canet, R., Pomares, F., Ingelmo, F. 2001b. Organic matter components and aggregate stability after the application of different amendments to a horticultural soil. *Bioresour. Technol.* 76: 125-129.
- Anderson, R., Wu, Y. 2001. Phosphorus quantity-intensity relationships and agronomic measures of P in surface layers of soil from a long-term slurry. *Chemosphere* 42: 161-170.
- Anderson, T. H., Domsch, K. H. 1985. Determination of ecophysiological maintenance requirements of soil micro-organisms in a dormant state. *Biol. Fertil. Soils* 1: 81-89.

- Anderson, T.-H. 2003. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agric. Ecosyst. Environ.* 98: 285-293.
- Antil, R. S., Gerzabek, M. H., Haberhauer, G., Eder, G. 2005. Long-term effects of cropped vs. fallow and fertilizer amendments on soil organic matter I. Organic carbon. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168: 108-116.
- Antolín, M. C., Pascual, I., García, C., Polo, A., Sánchez-Díaz, M. 2005. Growth, yield and solute content of barley in soils treated with sewage sludge under semiarid Mediterranean conditions. *Field Crop Res.* 94: 224-237.
- APHA/AWWA/WPFC. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. APHA/AWWA/WPFC, Washington.
- Arriaga, F. J., Lowery, B. 2003. Soil physical properties and crop productivity of an eroded soil amended with cattle manure. *Soil Sci.* 168: 888-899.
- Avena, M. J., Koopal, L. K., van Riemsdijk, W. H. 1999. Proton binding to humic acids: electrostatic and intrinsic interactions. *J. Colloid Interface Sci.* 217: 37-48.
- Balesdent, J., Mariotti, A. 1996. Measurement of soil organic matter turnover using  $^{13}\text{C}$  natural abundance. En: Boutton, T. W. y Yamasaki, S. (Eds.), *Mass spectrometry of soils*. Marcel Dekker, New York, pp. 83-111.
- Barrie, A., Brookes, S. T., Prosser, S. J., Debney, S. 1995. High productivity analysis of  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  in soil plant research. *Fert. Res.* 42: 43-59.
- Bartschat, B. M., Cabaniss, S. E., Morel, F. M. M. 1992. Oligoelectrolyte model for cation binding by humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 26: 284-294.
- Barzegar, A. R., Yousefi, A., Daryashenas, A. 2002. The effect of addition of different amounts and types of organic materials on soil physical properties and yield of wheat. *Plant Soil* 247: 295-301.
- Béline, F., Martínez, J., Marol, C., Guiraud, G. 1998. Nitrogen transformations during anaerobically stored  $^{15}\text{N}$ -labelled pig slurry. *Bioresour. Technol.* 64: 83-88.
- Bellamy, L. J. 1975. *The Infrared Spectra of Complex Molecules*. Chapman and Hall, London.

- Benedetti, M. F., Milne, C. J., Kinniburgh, D. G., van Riemsdijk, W. H., Koopal, L. K. 1995. Metal ion binding to humic substances: application of the non-ideal competitive adsorption model. *Environ. Sci. Technol.* 29: 446-457.
- Benedetti, M. F., Ranville, J. F., Ponthieu, M., Pinheiro, J. P. 2002. Field-flow fractionation characterization and binding properties of particulate and colloidal organic matter from the Rio Amazon and Rio Negro. *Org. Geochem.* 33: 269-279.
- Benedetti, M. F., van Riemsdijk, W. H., Koopal, L. K. 1996a. Humic substances considered as a heterogeneous gel phase. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1805-1813.
- Benedetti, M. F., van Riemsdijk, W. H., Koopal, L. K., Kinniburgh, D. G., Dooggy, D. C., Milne, C. J. 1996b. Metal ion binding by natural organic matter: from the model to the field. *Geochim. Cosmochim. Acta* 60: 2503-2513.
- Bentham, H., Harris, J. A., Birch, P., Short, K. C. 1992. Habitat classification and soil restoration assessment using analysis of soil microbiological and physico-chemical characteristics. *J. Appl. Ecol.* 29: 711-718.
- Bernal, M. P., Roig, A., Lax, A., Navarro, A. F. 1992. Effects of the application of pig slurry on some physico-chemical and physical properties of calcareous soils. *Bioresour. Technol.* 42: 233-239.
- Bertoncini, E. I., D'Orazio, V., Senesi, N., Mattiazzo, M. E. 2005. Fluorescence analysis of humic and fulvic acids from two Brazilian oxisols as affected by biosolid amendment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381: 1281-1288.
- Bicudo, J. R., Goyal, S. M. 2003. Pathogens and manure management systems: a review. *Environ. Tech.* 24: 115-130.
- Bicudo, J. R., Svoboda, I. F. 1995. Effects of intermittent-cycle extended-aeration treatment on the fate of nutrients, metals and bacterial indicators in pig slurry. *Bioresour. Technol.* 54: 63-72.
- Böhme, L., Böhme, F. 2006. Soil microbiological and biochemical properties affected by plant growth and different long-term fertilisation. *Eur. J. Soil Biol.* 42: 1-12.
- Böhme, L., Langer, U., Böhme, F. 2005. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments. *Agric. Ecosyst. Environ.* 109: 141-152.

- Bol, R., Kandeler, E., Amelung, W., Glaser, B., Marx, M.-C., Preedy, N., Lorenz, K. 2003. Short-term effects of dairy slurry amendment on carbon sequestration and enzyme activities in a temperate grassland. *Soil Biol. Biochem.* 35: 1411-1421.
- Bol, R., Ostle, N. J., Friedrich, C., Amelung, W., Sanders, I. 1999. The influence of dung amendments on dissolved organic matter in grassland soil leachates-preliminary results from a lysimeter study. *Isot. Environ. Health Stud.* 35: 97-109.
- Bremner, J. M., Mulvaney, C. S. 1982. Nitrogen-total. En: Page, A. L., Miller, R. H. y Keeney, D. R. (Eds.), *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. Agronomy monograph No. 9.* 2nd ed. ASA/CSSA/SSSA, Madison, WI, pp. 595-624.
- Brink, R. H., Dubar, P., Linch, D. J. 1960. Measurement of carbohydrates in soil hydrolysates with anthrone. *Soil Sci.* 89: 157-166.
- Bronick, C. J., Lal, R. 2005. Soil structure and management: a review. *Geoderma* 124: 3-22.
- Burriel, F., Hernando, V. 1950. El fósforo en los suelos españoles. V. Nuevo método para determinar el fósforo asimilable en los suelos. *Anales de Edafología y Agrobiología* 9: 611-622.
- Cadahía, C., Lucena, J. J. 1998. Diagnóstico de nutrición y recomendaciones de abonado. En: Cadahía, C. (Ed.), *Fertirrigación. Cultivos hortícolas y ornamentales.* Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 173-246.
- Calace, N., Petronio, B. M., Picciolo, M., Pietroletti, M. 2002. Heavy metal uptake by barley growing in polluted soils: relationships with heavy metal speciation in soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 33: 103-115.
- Caldwell, B. A. 2005. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. *Pedobiologia* 49: 637-644.
- Cantero-Martínez, C., Angas, P., Lampurlanés, J. 2003. Growth, yield and water productivity of barley (*Hordeum vulgare L.*) affected by tillage and N fertilization in Mediterranean semiarid, rainfed conditions of Spain. *Field Crop Res.* 84: 341-357.
- Caravaca, F., Masciandaro, G., Ceccanti, B. 2002. Land use in relation to soil chemical and biochemical properties in a semiarid Mediterranean environment. *Soil Tillage Res.* 68: 23-30.



- Carballas, T., Díaz-Fierros, F. 1990. El purín de vacuno en Galicia. Caracterización, poder fertilizante y problemas ambientales. Xunta de Galicia, Santiago de Compostela.
- Carrasco, J. 1997. Influencia de diferentes sistemas de laboreo en las propiedades físicas y químicas de un Luvisol cálcico de la meseta central de España. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.
- Castillo, A. E., Benito, S. G., Fernández, J. A. 2003. Using organic manures as liming materials. *Agrochimica* 47: 14-20.
- Chantigny, M. H. 2003. Dissolved and water-extractable organic matter in soils: a review on the influence of land use and management practices. *Geoderma* 113: 357-380.
- Chantigny, M. H., Angers, D. A., Morvan, T., Pomar, C. 2004. Dynamics of pig slurry nitrogen in soil and plant as determined with  $^{15}\text{N}$ . *Soil Sci. Soc. Am. J.* 68: 637-643.
- Chen, H. 2003. Phosphatase activity and P fractions in soils of an 18-year-old Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) plantation. *Forest Ecol. Manage.* 178: 301-310.
- Chen, J., Le Boeuf, E. J., Dai, S., Gu, B. 2003. Fluorescence spectroscopic studies of natural organic matter fractions. *Chemosphere* 50: 639-647.
- Chen, Y., Senesi, N., Schnitzer, M. 1977. Information provided on humic substances by  $E_4/E_6$  ratios. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41: 325-358.
- Choi, W.-J., Ro, H.-M., Hobbie, E. A. 2003. Patterns of natural  $^{15}\text{N}$  in soils and plants from chemically and organically fertilized uplands. *Soil Biol. Biochem.* 35: 1493-1500.
- Christensen, J. B., Tipping, E., Kinniburgh, D. G., Grøn, C., Christensen, T. H. 1998. Proton binding by groundwater fulvic acids of different age, origins, and structure modeled with the Model V and NICA-Donnan model. *Environ. Sci. Technol.* 32: 2246-3355.
- Christl, I., Kretzschmar, R. 2001. Relation ion binding by fulvic and humic acids to chemical composition and molecular size. 1. Proton binding. *Environ. Sci. Technol.* 35: 2505-2511.
- Comisión Europea. DG ENV. 2001. Survey of wastes spread on land - Final report, Luxemburgo.

- Cools, D., Merckx, R., Vlassak, K., Verhaegen, J. 2001. Survival of *E. coli* and *Enterococcus* spp. derived from pig slurry in soils of different texture. *Appl. Soil Ecol.* 17: 53-62.
- Costa, F., García, C., Hernández, M. T., Polo, A. 1991. Residuos orgánicos urbanos. Manejo y utilización. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, CSIC, Murcia.
- Crooke, W. M., Simpson, W. E. 1971. Determination of ammonium in Kjeldahl digests of crops by an automated procedure. *J. Sci. Food Agric.* 22: 9-10.
- Curt, M. D., Aguado, P., Sánchez, G., Bigeriego, M., Fernández, J. 2004. Nitrogen isotope ratios of synthetic and organic sources of nitrate water contamination in Spain. *Water Air Soil Pollut.* 151: 135-142.
- Dane, J. H., Hopmans, J. W. 2002. Water retention and storage. En: Dane, J. H. y Topp, C. (Eds.), *Methods of soil analysis. Part 4. Physical Methods.* SSSA, Madison, pp. 671-796.
- Dauden, A., Quílez, D. 2004. Pig slurry versus mineral fertilization on corn yield and nitrate leaching in a Mediterranean irrigated environment. *Eur. J. Agron.* 21: 7-19.
- Davies, C. W. 1962. *Ion Associations.* Butterworths, London.
- De Alba, S. 1998. Procesos de degradación del suelo por erosión en ecosistemas agrícolas de condiciones ambientales mediterráneas en la región central de España. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- De Wit, J. C. M., Van Riemsdijk, W. H., Koopal, L. K. 1993. Proton binding by humic substances. 2. Chemical heterogeneity and adsorption models. *Environ. Sci. Technol.* 27: 2015-2022.
- Debosz, K., Petersen, S. O., Kure, L. K., Ambus, P. 2002. Evaluating effects of sewage sludge and household compost on soil physical, chemical and microbiological properties. *Appl. Soil Ecol.* 19: 237-248.
- Díaz-Ambrona, C. H., Mínguez, M. I. 2001. Cereal-legume rotations in a Mediterranean environment: biomass and yield production. *Field Crop Res.* 70: 139-151.
- Dick, R. P. 1997. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. En: Pankhurst, C. E., Doube, B. M. y Gupta, V. V. S. R. (Eds.), *Biological indicators of soil health.* CAB International, London, pp. 121-156.

- Dick, W. A., Cheng, L., Wang, P. 2000. Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biol. Biochem.* 32: 1915-1919.
- Díez, J. A., de la Torre, A. I., Cartagena, M. C., Carballo, M., Vallejo, A., Muñoz, M. J. 2001. Evaluation of the application of pig slurry to an experimental crop using agronomic and ecotoxicological approaches. *J. Environ. Qual.* 30: 2165-2172.
- Díez, J. A., Hernáiz, P., Muñoz, M. J., de la Torre, A. I., Vallejo, A. 2004. Impact of pig slurry on soil properties, water salinization, nitrate leaching and crop yield in a four-year experiment in Central Spain. *Soil Use Manage.* 20: 444-450.
- Dilly, O., Blume, H.-P. 1998. Indicators to assess sustainable land use with reference to soil microbiology. *Advances in GeoEcology* 31: 29-39.
- Dilly, O., Blume, H.-P., Munch, J. C. 2003. Soil microbial activities in Luvisols and Anthrosols during 9 years of region-typical tillage and fertilisation practices in northern Germany. *Biogeochemistry* 65: 319-339.
- Dittert, K., Goerges, T., Sattelmacher, B. 1998. Nitrogen turnover in soil after application of animal manure and slurry as studied by the stable isotope  $^{15}\text{N}$ : a review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 161: 453-463.
- Domingos, R. F., Benedetti, M. F., Croué, J. P., Pinheiro, J. P. 2004. Electrochemical methodology to study labile trace metal/natural organic matter complexation at low concentration levels in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 521: 77-86.
- Dorado, J., Zancada, M. C., Almendros, G., Lopez-Fando, C. 2003. Changes in soil properties and humic substances after long-term amendments with manure and crop residues in dryland farming systems. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 166: 31-38.
- Dudal, Y., Gérard, F. 2004. Accounting for natural organic matter in aqueous chemical equilibrium models: a review of the theories and applications. *Earth-Science Reviews* 66: 199-216.
- Dunjó, G., Pardini, G., Gispert, M. 2003. Land use change effects on abandoned terraced soils in a Mediterranean catchment, NE Spain. *Catena* 52: 23-37.
- Elkins, K. M., Nelson, D. J. 2001. Fluorescence and FT-IR spectroscopic studies of Suwanee river fulvic acid complexation with aluminium, terbium and calcium. *J. Inorg. Biochem.* 87: 81-96.

- Estrada, I. B., Aller, A., Aller, F., Gomez, X., Moran, A. 2004. The survival of *Escherichia coli*, faecal coliforms and enterobacteriaceae in general in soil treated with sludge from wastewater treatment plants. *Bioresour. Technol.* 93: 191-198.
- Fageria, N. K., Baligar, V. C., Clarck, R. B. 2002. Micronutrients in crop production. *Adv. Agron.* 77: 185-268.
- FAO/ISRIC/ISSS. 1998. World Reference Base for Soil Resources, World Soil Resources Rep. 84. FAO, Rome.
- Faz, A., Llona, M., Tortosa, J. L., Palop, A., Andújar, M., Lobera, J. B. 2003. Utilización de purines de cerdo para fertilización de cultivos hortícolas como sustitución de fertilización mineral en Lorca-Murcia. En: Bienes, R. y Marqués, M. J. (Eds.), I Simposio Nacional sobre Control y Degradación del Suelo, Madrid, Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria, pp. 263-266.
- Fernandes, S. A. P., Bettiol, W., Cerri, C. C. 2005. Effect of sewage sludge on microbial biomass, basal respiration, metabolic quotient and soil enzymatic activity. *Appl. Soil Ecol.* 30: 65-77.
- Filip, Z. 2002. International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agric. Ecosyst. Environ.* 88: 169-174.
- Fiol, S., López, R., Ramos, A., Antelo, J. M., Arce, F. 1999. Study of the acid-base properties of three fulvic acids extracted from different horizons of a soil. *Anal. Chim. Acta* 385: 443-449.
- Fontaine, S., Bardoux, G., Abbadie, L., Mariotti, A. 2004. Carbon input to soil may decrease soil carbon content. *Ecol. Lett.* 7: 314-320.
- Fukushima, M., Tanaka, S., Nakayasu, K., Sasaki, K., Nakamura, H., Tatsumi, K. 1997. Investigation of copper(II)-binding behavior of fulvic acids by three-dimensional fluorescence spectrometry. *Anal. Sci.* 13: 1011-1015.
- Gagnon, B. 2004. Contribution of on-farm and industrial composts to soil pH and enrichment in available nutrients and metals. *Can. J. Soil Sci.* 84: 439-445.
- García del Moral, L. F., Miralles, D. J., Slafer, G. A. 2002. Initiation and appearance of vegetative and reproductive structures throughout barley development. En: Slafer, G. A. (Ed.), *Barley Science: recent advances from molecular biology to agronomy on yield and quality*. Food Products Press, Nueva York, pp. 243-267.

- García, C., Hernández, M. T. 1997. Biological and biochemical indicators in derelict soils subject to erosion. *Soil Biol. Biochem.* 29: 171-177.
- García, C., Hernández, M. T., Pascual, J., Moreno, J. L., Ros, M. 2000. Actividad microbiana en suelos del sureste español sometidos a procesos de degradación y desertificación. Estrategias para su rehabilitación. En: García, C. y Hernández, T. (Eds.), *Investigación y perspectiva de la Enzimología de suelos en España*. CEBAS-CSIC, Murcia, pp. 43-92.
- García, C., Hernández, T., Costa, F., Ceccanti, B., Masciandaro, G. 1993. The dehydrogenase activity of soils as an ecological marker in processes of perturbed system regeneration. En: Gallardo-Lancho, J. (Ed.), *Proc. of the XI Int. Symp. of Environmental Biogeochemistry*, Salamanca, pp. 89-100.
- García-Gil, J. C. 2001. Efectos residuales y acumulativos producidos por la aplicación de compost de residuos urbanos y lodos de depuradoras sobre agrosistemas mediterráneos degradados. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- García-Gil, J. C., Ceppi, S. B., Velasco, M. I., Polo, A., Senesi, N. 2004a. Long-term effects of amendment with municipal solid waste compost on the elemental and acidic functional group composition and pH-buffer capacity of soil humic acids. *Geoderma* 121: 135-142.
- García-Gil, J. C., Plaza, C., Senesi, N., Brunetti, G., Polo, A. 2004b. Effects of sewage sludge amendment on humic acids and microbiological properties of a semiarid Mediterranean soil. *Biol. Fertil. Soils* 39: 320-328.
- García-Gil, J. C., Plaza, C., Soler-Rovira, P., Polo, A. 2000. Long-term effects of municipal solid waste compost application on soil enzyme activities and microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.* 32: 1907-1913.
- Gerzabek, M. H., Haberhauer, G., Kirchmann, H. 2001. Soil organic matter pools and carbon-13 natural abundances in particle-size fractions of a long-term agricultural field experiment receiving organic amendments. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 65: 352-358.
- Ghani, A., Dexter, M., Perrott, K. W. 2003. Hot-water extractable carbon in soils: a sensitive measurement for determining impacts of fertilisation, grazing and cultivation. *Soil Biol. Biochem.* 35: 1231-1243.
- Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M. C., Seoane, S. 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biol. Biochem.* 37: 877-887.

- Giusquiani, P. L., Concezzi, L., Businelli, M., Macchioni, A. 1998. Fate of pig sludge liquid fraction in calcareous soil: agricultural and environmental implications. *J. Environ. Qual.* 27: 364-371.
- Glaser, B., Bol, R., Preedy, N., McTiernan, K. B., Clark, M., Amelung, W. 2001. Short-term sequestration of slurry-derived carbon and nitrogen in temperate grassland soil as assessed by  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  natural abundance measurements. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164: 467-474.
- Grashoff, C., d'Antuono, L. F. 1997. Effect of shading and nitrogen application on yield, grain size distribution and concentrations of nitrogen and water soluble carbohydrates in malting spring barley (*Hordeum vulgare L.*). *Eur. J. Agron.* 6: 275-293.
- Gregorich, E. G., Wen, G., Voroney, R. P., Kachanoski, R. G. 1990. Calibration of a rapid direct chloroform extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 22: 1009-1011.
- Griffin, T. S., Honeycutt, C. W., He, Z. 2002. Effects of temperature, soil water status, and soil type on swine slurry nitrogen transformations. *Biol. Fertil. Soils* 36: 442-446.
- Guan, T. Y., Holley, R. A. 2003. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness-A review. *J. Environ. Qual.* 32: 383-392.
- Gutser, R., Ebertseder, T., Weber, A., Schraml, M., Schmidhalter, U. 2005. Short-term and residual availability of nitrogen after long-term application of organic fertilizers on arable land. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168: 439-446.
- Hao, X. Y., Chang, C. 2003. Does long-term heavy cattle manure application increase salinity of a clay loam soil in semi-arid southern Alberta? *Agric. Ecosyst. Environ.* 94: 89-103.
- Haynes, R. J., Mokolobate, M. S. 2001. Amelioration of Al toxicity and P deficiency in acid soils by additions of organic residues: a critical review of the phenomenon and the mechanisms involved. *Nutr. Cycl. Agroecosys.* 59: 47-63.
- Haynes, R. J., Naidu, R. 1998. Influence of lime, fertilizer and manure applications on soil organic matter content and soil physical conditions: a review. *Nutr. Cycl. Agroecosys.* 51: 123-137.
- Hernández, T., García, C. 2003. Estimación de la respiración microbiana del suelo. En: García, C., Gil, F., Hernández, T. y Trasar, C. (Eds.), *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades*

- enzimáticas y biomasa microbiana. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, pp. 311-346.
- Hinds, A., Lowe, L. E. 1980. Ammonium-N determination. Soil Nitrogen. Berthelot reaction. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 11: 469-475.
- Hinojosa, M. B., Carreira, J. A., García-Ruíz, R., Dick, R. P. 2004. Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soils. Soil Biol. Biochem. 36: 1559-1568.
- Hoefs, J. 1997. Stable isotope geochemistry. 4th. ed. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Huang, P. M. 2004. Soil mineral-organic matter-microorganism interactions: fundamentals and impacts. Adv. Agron. 82: 391-472.
- Hutchison, M. L., Walters, L. D., Avery, S. M., Munro, F., Moore, A. 2005a. Analyses of livestock production, waste storage, and pathogen levels and prevalences in farm manures. Appl. Environ. Microbiol. 71: 1231-1236.
- Hutchison, M. L., Walters, L. D., Moore, T., Thomas, D. J. I., Avery, S. M. 2005b. Fate of pathogens present in livestock wastes spread onto fescue plots. Appl. Environ. Microbiol. 71: 691-696.
- Huysman, F., Verstraete, W., Brookes, P. C. 1994. Effect of manuring practices and increased copper concentration on soil microbial populations. Soil Biol. Biochem. 26: 103-110.
- Hydrogeology Series. 1993. FIT User Guide (latest version 23 January 2000). Technical Report WD/93/23. British Geological Survey, Keyworth, UK.
- Iakimenko, O., Otabbong, E., Sadovnikova, L., Persson, J., Nilsson, I., Orlov, D., Ammosova, Y. 1996. Dynamic transformation of sewage sludge and farmyard manure components. 1. Content of humic substances and mineralisation of organic carbon and nitrogen in incubated soils. Agric. Ecosyst. Environ. 58: 121-126.
- Insam, H. 2001. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. Geoderma 100: 389-402.
- Irving, H. M. N. H., Williams, R. J. P. 1948. Order of stability of metal complexes. Nature 162: 746-747.

- Janzen, H. H. 2004. Carbon cycling in earth systems—a soil science perspective. *Agric. Ecosyst. Environ.* 104: 399-417.
- Jiang, X., Morgan, J., Doyle, M. P. 2002. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure-amended soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2605-2609.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H. 2001. Trace elements in soils and plants. 3rd ed. CRC Press, Boca Ratón.
- Kandeler, E., Eder, G. 1993. Effect of cattle slurry in grassland on microbial biomass and on activities of various enzymes. *Biol. Fertil. Soils* 16: 249-254.
- Kandeler, E., Stemmer, M., Klimanek, E. M. 1999. Response of soil microbial biomass, urease and xylanase within particle size fractions to long-term oil management. *Soil Biol. Biochem.* 31: 261-273.
- Kaschl, A., Römheld, V., Chen, Y. 2002. Cadmium binding by fractions of dissolved organic matter and humic substances from municipal solid waste compost. *J. Environ. Qual.* 31: 1885-1892.
- Keeney, D. R., Nelson, D. W. 1982. Nitrogen-inorganic forms. En: Page, A. L., Miller, R. H. y Keeney, D. R. (Eds.), *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. Agronomy monograph No. 9.* 2nd ed. ASA/CSSA/SSSA, Madison, WI, pp. 643-698.
- Kinniburgh, D. G., Milne, C. J., Benedetti, M. F., Pinheiro, J. P., Filius, J. D., Koopal, L. K., van Riemsdijk, W. H. 1996. Metal ion binding by humic acid: application of the NICA-Donnan model. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1687-1698.
- Kinniburgh, D. G., van Riemsdijk, W. H., Koopal, L. K., Borkovec, M., Benedetti, M. F., Avena, M. J. 1999. Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency. *Colloid Surfaces A* 151: 147-166.
- Knight, T. R., Dick, R. P. 2004. Differentiating microbial and stabilized  $\beta$ -glucosidase activity relative to soil quality. *Soil Biol. Biochem.* 36: 2089-2096.
- Koopal, L. K., Saito, T., Pinheiro, J. P., van Riemsdijk, W. H. 2005. Ion binding to natural organic matter: general considerations and the NICA-Donnan model. *Colloid Surfaces A* 265: 40-54.
- Koopal, L. K., van Riemsdijk, W. H., de Wit, J. C. M., Benedetti, M. F. 1994. Analytical isotherm equations for multicomponent adsorption to heterogeneous surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 166: 51-60.



- Koopal, L. K., van Riemsdijk, W. H., Kinniburgh, D. G. 2001. Humic matter and contaminants. General aspects and modeling ion binding. *Pure Appl. Chem.* 73: 2005-2016.
- Kuwatsuka, S., Shindo, H. 1973. Behavior of phenolic substances in the decaying process of plants. I. Identification and quantitative determination of phenolic acids in rice straw and its decayed product by gas chromatography. *Soil Sci. Plant Nutr.* 19: 219-227.
- Kuzyakov, Y., Friedel, J. K., Stahr, K. 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biol. Biochem.* 32: 1485-1498.
- Lal, R. 2004. Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma* 123: 1-22.
- Lalande, R., Gagnon, B., Simard, R. R., Côte, D. 2000. Soil microbial biomass and enzyme activity following liquid hog manure application in a long-term field trial. *Can. J. Soil Sci.* 80: 263-269.
- Leirós, M. C., Trasar-Cepeda, C., Seoane, S., Gil-Sotres, F. 2000. Biochemical properties of acid soils under climax vegetation (Atlantic oakwood) in an area of the European temperate-humid zone (Galicia, NW Spain): general parameters. *Soil Biol. Biochem.* 32: 733-745.
- Ley 10/1998, de 21 de abril, de Residuos. BOE núm. 96, 22 de abril de 1998.
- Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación. BOE núm. 157, 2 de julio de 2002.
- Ley 6/2001, de 8 de mayo, de modificación del Real Decreto legislativo 1302/1986, de 28 de junio, de evaluación de impacto ambiental. BOE núm. 111, 9 de mayo de 2001.
- L'Herroux, L., Le Roux, S., Appriou, P., Martínez, J. 1997. Behaviour of metals following intensive pig slurry applications to a natural field treatment process in Brittany (France). *Environ. Pollut.* 97: 119-130.
- Lindsay, W. L., Norwell, W. A. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42: 421-428.
- Liu, D. L., Helyar, K. R., Conyers, M. K., Fisher, R., Poile, G. J. 2004. Response of wheat, triticale and barley to lime application in semi-arid soils. *Field Crop Res.* 90: 287-301.

- Liu, F., Mitchell, C. C., Odum, K. J. W., Hill, D. T., Rochester, E. W. 1998. Effects of swine lagoon effluent application on chemical properties of a loamy sand. *Bioresour. Technol.* 63: 65-73.
- López, M., Grau, J. M. 2004. Metales pesados, materia orgánica y otros parámetros de la capa superficial de los suelos agrícolas y de pastos de la España peninsular. INIA, Madrid.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lumsdon, D. G., Fraser, A. 2005. Infrared spectroscopic evidence supporting heterogeneous site binding models for humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 39: 6624-6631.
- Luster, J., Lloyd, T., Sposito, G. 1996. Multi-wavelength molecular fluorescence spectrometry for quantitative characterization of copper(II) and aluminium(III) complexation by dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1565-1574.
- Lynch, D. H., Voroney, R. P., Warman, P. R. 2006. Use of  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  natural abundance techniques to characterize carbon and nitrogen dynamics in composting and in compost-amended soils. *Soil Biol. Biochem.* 38: 103-114.
- MacCarthy, P., Rice, J. A. 1984. Spectroscopic methods (other than NMR) for determining functionality in humic substances. En: Aiken, G. R., McKnight, D. M., Wershaw, R. L. y MacCarthy, P. (Eds.), *Humic Substances in Soil, Sediment and Water. Geochemistry, Isolation and Characterization.* Wiley-Interscience, New York, pp. 527-559.
- Marschner, P., Kandeler, E., Marschner, B. 2003. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biol. Biochem.* 35: 453-461.
- Martínez, J., Peu, P. 2000. Nutrient fluxes from a soil treatment process for pig slurry. *Soil Use Manage.* 16: 100-107.
- Masciandaro, G., Ceccanti, B., Gallardo-Lancho, J. F. 1998. Organic matter properties in cultivated versus set-aside arable soils. *Agric. Ecosyst. Environ.* 67: 267-274.
- Masini, C. J., Abate, G., Lima, E. C., Hahn, L. C., Nakurama, M. S., Lichtig, J., Nagatomy, H. R. 1998. Comparison of methodologies for determination of carboxylic and phenolic groups in humic acids. *Anal. Chim. Acta* 364: 223-233.

- Mbagwu, J. S. C., Unamba-Oparah, I., Nevoh, G. O. 1994. Physico-chemical properties and productivity of two tropical soils amended with dehydrated swine waste. *Bioresour. Technol.* 49: 163-171.
- McCarty, G. W., Shogren, D. R., Bremner, J. M. 1992. Regulation of urease production in soil by microbial assimilation of nitrogen. *Biol. Fertil. Soils* 12: 261-264.
- Mengel, K., Kirkby, E. 2001. Principles of plant nutrition. 5th ed. Kluwer Academic publishers, Dordrecht (The Netherlands).
- Midwood, A. J., Boutton, T. W. 1998. Soil carbonate decomposition by acid has little effect on  $\delta^{13}\text{C}$  of organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 30: 1301-1307.
- Milne, C. J., Kinniburgh, D. G., de Wit, J. C. M., van Riemsdijk, W. H., Koopal, L. K. 1995. Analysis of proton binding by a peat humic acid using a simple electrostatic model. *Geochim. Cosmochim. Acta* 59: 1101-1112.
- Milne, C. J., Kinniburgh, D. G., Tipping, E. 2001. Generic NICA-Donnan model parameters for proton binding by humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 35: 2049-2059.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 1994. Métodos Oficiales de Análisis. Secretaría General Técnica, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- Ministerio de Medio Ambiente. 2000. Guía para la elaboración de estudios del medio físico. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.
- Misselbrook, T. H., Nicholson, F. A., Chambers, B. J. 2005. Predicting ammonia losses following the application of livestock manure to land. *Bioresour. Technol.* 96: 159-168.
- Mobed, J. J., Hemmingsen, S. L., Autry, J. L., McGown, L. B. 1996. Fluorescence characterization of IHSS humic substances: total luminescence spectra with absorbance correction. *Environ. Sci. Technol.* 30: 3061-3065.
- Mokolobate, M., Haynes, R. 2002. Comparative liming effect of four organic residues applied to an acid soil. *Biol. Fertil. Soils* 35: 79-85.
- Molina, J. L. 1989. La cebada. Morfología, fisiología, genética, agronomía y usos industriales. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.

- Monturiol, F. 1984. Suelos. En: Instituto de Edafología y Biología Vegetal, C. (Ed.), Estudio agrobiológico de la provincia de Toledo. Instituto de Edafología y Biología Vegetal (CSIC) y Diputación Provincial de Toledo, pp. 19-146.
- Mooleki, S. P., Schoenau, J. J., Charles, J. L., Wen, G. 2004. Effect of rate, frequency and incorporation of feedlot cattle manure on soil nitrogen availability, crop performance and nitrogen use efficiency in east-central Saskatchewan. *Can. J. Soil Sci.* 84: 199-210.
- Mooleki, S. P., Schoenau, J. J., Hultgreen, G., Wen, G., Charles, J. L. 2002. Effect of rate, frequency and method of liquid swine manure application on soil nitrogen availability, crop performance and N use efficiency in east-central Saskatchewan. *Can. J. Soil Sci.* 82: 457-467.
- Moral, R., Moreno-Caselles, J., Perez-Murcia, M. D., Perez-Espinosa, A., Rufete, B., Paredes, C. 2005a. Characterisation of the organic matter pool in manures. *Bioresour. Technol.* 96: 153-158.
- Moral, R., Perez-Murcia, M. D., Perez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., Paredes, C. 2005b. Estimation of nutrient values of pig slurries in Southeast Spain using easily determined properties. *Waste Manage.* 25: 719-725.
- Moreno-Caselles, J., Moral, R., Perez-Murcia, M. D., Perez-Espinosa, A., Paredes, C., Agulló, E. 2005. Fe, Cu, Mn and Zn input and availability in calcareous soils amended with the solid phase of pig slurry. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 36: 525-534.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell Environ.* 25: 239-250.
- Murphy, P. N. C., Stevens, R. J., Christie, P. 2005. Long-term application of animal slurries to grassland alters soil cation balance. *Soil Use Manage.* 21: 240-244.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B., Cervelli, S., Matarese, E. 1980. Extraction of phosphatase, urease, protease, organic carbon, and nitrogen from soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44: 1011-1016.
- Nannipieri, P., Greco, S., Ceccanti, B. 1990. Ecological significance of the biological activity in soil. En: Bollag, J.-M. y Stotzky, G. (Eds.), *Soil Biochemistry*. Marcel Dekker, New York, 6, pp. 293-355.
- Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P. 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. En: Burns, R. G. y

- Dick, R. P. (Eds.), *Enzymes in the Environment. Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker, New York, pp. 1-34.
- Neff, J. C., Townsend, A. R., Gleixner, G., Lehmans, S. J., Turnbull, J., Bowman, W. D. 2002. Variable effects of nitrogen additions on the stability and turnover of soil carbon. *Nature* 419: 915-917.
- Nicholson, F. A., Chambers, B. J., Smith, K. A., Harrison, R. 1999. Spring applied organic manures as a source of nitrogen for cereal crops: experiments using field scale equipment. *J. Agric. Sci.* 133: 353-363.
- Nicholson, F. A., Groves, S. J., Chambers, J. 2005. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresour. Technol.* 96: 135-143.
- Nimmo, J. R., Perkins, K. S. 2002. Aggregate stability and size distribution. En: Dane, J. H. y Topp, C. (Eds.), *Methods of soil analysis. Part 4. Physical Methods*. SSSA, Madison, pp. 317-328.
- Odum, E. P. 1969. The strategy of ecosystem development. *Science* 164: 262-270.
- Pankhurst, C. E., Doube, B. M., Gupta, V. V. S. R. 1997. *Biological Indicators of Soil Health*. CAB International, London.
- Paranychianakis, N. V., Chartzoulakis, K. S. 2005. Irrigation of Mediterranean crops with saline water: from physiology to management practices. *Agric. Ecosyst. Environ.* 106: 171-187.
- Parat, C., Chaussod, R., Lévêque, J., Andreux, F. 2005. Long-term effects of metal-containing farmyard manure and sewage sludge on soil organic matter in a fluvisol. *Soil Biol. Biochem.* 37: 673-679.
- Pascual, J. A., Moreno, J. L., Hernández, M. T., García, C. 2002. Persistence of immobilised and total urease and phosphatase activities in a soil amended with organic wastes. *Bioresour. Technol.* 82: 73-78.
- Pascual, J. A., Ros, M., Hernández, M. T., García, C. 2001. Effect of long-term monoculture on microbiological and biochemical properties in semiarid soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 32: 537-552.
- Perdue, E. M. 1985. Acidic functional groups of humic substances. En: Aiken, G. R., McKnight, D. M., Wershaw, R. L. y MacCarthy, P. (Eds.), *Humic Substances in Soil, Sediment and Water. Geochemistry, Isolation, and Characterization*. Wiley-Interscience, New York, pp. 493-536.

- Petersen, J. 1996. Fertilization of spring barley by combination of pig slurry and mineral nitrogen fertilizer. *J. Agric. Sci.* 127: 151-159.
- Petersen, J. 2003. Weed: spring barley competition for applied nitrogen in pig slurry. *Weed Res.* 43: 33-39.
- Piccolo, A. 1996. *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, Amsterdam.
- Piccolo, A. 2002. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. Agron.* 75: 57-134.
- Piccolo, A., Conte, P., Spaccini, R., Mbagwu, J. S. C. 2005. Influence of land use on the characteristics of humic substances in some tropical soils of Nigeria. *Eur. J. Soil Sci.* 56: 343-352.
- Pinheiro, J. P., Mota, A. M., Benedetti, M. F. 1999. Effect of aluminum competition on lead and cadmium binding to humic acids at variable ionic strength. *Environ. Sci. Technol.* 33: 3398-3404.
- Placha, I., Venglovsky, J., Sasakova, N., Svoboda, I. F. 2001. The effect of summer and winter seasons on the survival of *Salmonella typhimurium* and indicator micro-organisms during the storage of solid fraction of pig slurry. *J. Appl. Microbiol.* 91: 1036-1043.
- Plaza, C. 2002. Aprovechamiento agrícola del purín de cerdo en agroecosistemas semiáridos: efectos sobre suelos y plantas. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Plaza, C., Brunetti, G., Senesi, N., Polo, A. 2005a. Proton binding to humic acids from organic amendments and amended soils by the NICA-Donnan model. *Environ. Sci. Technol.* 39: 6692-6697.
- Plaza, C., Brunetti, G., Senesi, N., Polo, A. 2006. Molecular and quantitative analysis of metal ion binding to humic acids from sewage sludge and sludge-amended soils by fluorescence spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 40: 917-923.
- Plaza, C., D'Orazio, V., Senesi, N. 2005b. Copper(II) complexation of humic acids from the first generation of EUROSOLS by total luminescence spectroscopy. *Geoderma* 125: 177-186.
- Plaza, C., Hernández, D., García-Gil, J. C., Polo, A. 2004. Microbial activity in pig slurry-amended soils under semiarid conditions. *Soil Biol. Biochem.* 36: 1577-1585.

- Plaza, C., Senesi, N., García-Gil, J. C., Brunetti, G., D'Orazio, V., Polo, A. 2002. Effects of pig slurry application on soils and soil humic acids. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4867-4874.
- Plaza, C., Senesi, N., Polo, A., Brunetti, G. 2005c. Acid-base properties of humic and fulvic acids formed during composting by the NICA-Donnan model. *Environ. Sci. Technol.* 39: 7141-7146.
- Plaza, C., Senesi, N., Polo, A., Brunetti, G., García-Gil, J. C., D'Orazio, V. 2003. Soil fulvic acid properties as a means to assess the use of pig slurry amendment. *Soil Tillage Res.* 74: 179-190.
- Porta, J. 2005. Información de suelos para una planificación territorial integrada. En: Jiménez, R. y Álvarez, A. (Eds.), *Control de la degradación de suelos*. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, pp. 13-19.
- Porta, J., López-Acevedo, M., Roquero, C. 2003. *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*. 3ª ed. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Provenzano, M. R., D'Orazio, V., Jerzykiewicz, M., Senesi, N. 2004. Fluorescence behaviour of Zn and Ni complexes of humic acids from different sources. *Chemosphere* 55: 885-892.
- Rad, J. C. 1992. *Materia orgánica residual urbana: extracción y caracterización de actividades enzimáticas de interés agrotecnológico*. Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid.
- Rashid, A., Ryan, J. 2004. Micronutrient constraints to crop production in soils with Mediterranean-type characteristics: a review. *J. Plant Nutr.* 27: 959-975.
- Real Decreto 261/1996, de 16 de febrero, sobre protección de las aguas contra la contaminación producida por los nitratos procedentes de fuentes agrarias. BOE núm. 61, 11 de marzo de 1996.
- Real Decreto 324/2000, de 3 de marzo, por el que se establecen normas básicas de ordenación de las explotaciones porcinas. BOE núm. 58, 8 de marzo de 2000.
- Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas. BOE núm. 176, 24 de julio de 2001.
- Real Decreto Legislativo 1302/1986, de 28 de junio, de evaluación de impacto ambiental. BOE núm. 155, 30 de junio de 1986.

- Richards, L. A. 1949. Methods of measuring soil moisture tension. *Soil Sci.* 68: 95-112.
- Ritchie, J. D., Perdue, E. M. 2003. Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter. *Geochim. Cosmochim. Acta* 67: 85-96.
- Robinson, D. 2001.  $\delta^{15}\text{N}$  as an integrator of the nitrogen cycle. *Trends Ecol. Evol.* 16: 153-162.
- Rochette, P., Angers, D. A., Chantigny, M. H., Bertrand, N., Côte, D. 2004. Carbon Dioxide and Nitrous Oxide Emissions following Fall and Spring Applications of Pig Slurry to an Agricultural Soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 68: 1410-1420.
- Rochette, P., Angers, D. A., Côte, D. 2000. Soil carbon and nitrogen dynamics following application of pig slurry for the 19th consecutive year: I. Carbon dioxide fluxes and microbial biomass carbon. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64: 1389-1395.
- Rodríguez-Kábana, R., Truelove, B. 1982. Effects of crop rotation and fertilization on catalase activity in a soil of the southeastern United States. *Plant Soil* 69: 97-104.
- Ros, M. 2000. Recuperación de suelos agrícolas abandonados mediante el reciclaje en los mismos de residuos orgánicos de origen urbano. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Ros, M., Hernández, M. T., García, C. 2003. Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. *Soil Biol. Biochem.* 35: 463-469.
- Ryan, D. K., Weber, J. H. 1982. Fluorescence quenching titration for determination of complexing capacities and stability constants of fulvic acid. *Anal. Chem.* 54: 986-990.
- Sánchez, M. 2001. Utilización agrícola del estiércol licuado de ganado porcino: método rápido de determinación del valor fertilizantes. Establecimiento de las bases para el diseño de un óptimo plan de fertilización. Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid.
- Sánchez, M., González, J. L. 2005. The fertilizer value of pig slurry. I. Values depending on the type of operation. *Bioresour. Technol.* 96: 117-123.
- Sánchez-Díaz, M., García, J. L., Antolín, M. C., Araus, J. L. 2002. Effects of soil drought and atmospheric humidity on yield, gas exchange, and



- stable carbon isotope composition of barley. *Photosynthetica* 40: 415-421.
- Sánchez-Monedero, M. A., Mondini, C., de Nobili, M., Leita, L., Roig, A. 2004. Land application of biosolids. Soil response to different stabilization degree of the treated organic matter. *Waste Manage.* 24: 325-332.
- Sánchez-Monedero, M. A., Roig, A., Cegarra, J., Bernal, M. P. 1999. Relationships between water-soluble carbohydrate and phenol fractions and the humification indices of different organic wastes during composting. *Bioresour. Technol.* 70: 193-201.
- Saviozzi, A., Biasci, A., Riffaldi, R., Levi-Minzi, R. 1999. Long-term effects of farmyard manure and sewage sludge on some soil biochemical characteristics. *Biol. Fertil. Soils* 30: 100-106.
- Saviozzi, A., Levi-Minzi, R., Riffaldi, R., Vanni, G. 1997. Laboratory studies on the application of wheat straw and pig slurry to soil and the resulting environmental implications. *Agric. Ecosyst. Environ.* 61: 35-43.
- Schnitzer, M. 1982. Organic Matter Characterization. En: Page, A. L., Miller, R. H. y Keeney, D. R. (Eds.), *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties.* Agronomy monograph No. 9. 2nd ed. ASA/CSSA/SSSA, Madison, WI, pp. 581-594.
- Schröder, J. 2005. Revising the agronomic benefits of manure: a correct assessment and exploitation of its fertilizer value spares the environment. *Bioresour. Technol.* 96: 253-261.
- Schulze, E. D., Freibauer, A. 2005. Carbon unlocked from soils. *Nature* 437: 205-206.
- Sena, M. M., Frighetto, R. T. S., Valarini, P. J., Tokeshi, H., Poppi, R. J. 2002. Discrimination of management effects on soil parameters by using principal component analysis: a multivariate analysis case study. *Soil Tillage Res.* 67: 171-181.
- Senesi, N. 1989. Composted materials as organic fertilizers. *Sci. Total Environ.* 81/82: 521-542.
- Senesi, N. 1992. Metal-humic substance complexes in the environment. Molecular and mechanistics aspects by multiple spectroscopic approach. En: Adriano, D. C. (Ed.), *Biogeochemistry of Trace Metals.* Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 429-496.

- Senesi, N., Brunetti, G., Plaza, C. 2005. Quality of organic amendment and effects on soil organic matter, with special emphasis on humic substances: a review of general aspects and most recent findings of the Bari group. En: Yang, J. E., Sa, T. M. y Kim, J. J. (Eds.), *Application of the Emerging Soil researches to the Conservation of Agricultural Ecosystems*. Korean Society of Soil Science and Fertilizer, Korean Society of Agriculture and Environment, Rural Development Administration, Seoul, Korea, pp. 95-129.
- Senesi, N., D'Orazio, V., Ricca, G. 2003. Humic acids in the first generation of EUROSOLS. *Geoderma* 116: 325-344.
- Senesi, N., Loffredo, E. 1999. The chemistry of soil organic matter. En: Sparks, D. L. (Ed.), *Soil Physical Chemistry*, 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 239-370.
- Senesi, N., Miano, T. M., Provenzano, M. R., Brunetti, G. 1991. Characterization, differentiation and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci.* 152: 259-271.
- Sengeløv, G., Agersø, Y., Halling-Sørensen, B., Baloda, S. B., Andersen, J. S., Jensen, L. B. 2003. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environ. Int.* 28: 587-595.
- Shabala, S., Shabala, L., van Volkenburgh, E., Newman, I. 2005. Effect of divalent cations on ion fluxes and leaf photochemistry in salinized barley leaves. *J. Exp. Bot.* 56: 1369-1378.
- Sharma, K. L., Mandal, U. K., Srinivas, K., Vittal, K. P. R., Mandal, B., Grace, J. K., Ramesh, V. 2005. Long-term soil management effects on crop yields and soil quality in a dryland Alfisol. *Soil Tillage Res.* 83: 246-259.
- Sierra, M. M. D., Giovanela, M., Parlanti, E., Soriano-Sierra, E. J. 2005. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere* 58: 715-733.
- Sims, J. R., Haby, V. A. 1971. Simplified colorimetric determination of soil organic matter. *Soil Sci.* 112: 137-141.
- Sinsabaugh, R. L., Carreiro, M. M., Repert, D. A. 2002. Allocation of extracellular enzymatic activity in relation to litter composition, N deposition, and mass loss. *Biogeochemistry* 60: 1-24.

- Smith, K. A., Charles, D. R., Moorhouse, D. 2000a. Nitrogen excretion by farm livestock with respect to land spreading requirements and controlling nitrogen losses to ground and surface waters. Part 2: pigs and poultry. *Bioresour. Technol.* 71: 183-194.
- Smith, K. A., Jackson, D. R., Misselbrook, T. H., Pain, B. F., Johnson, R. A. 2000b. Precision agriculture: reduction of ammonia emission by slurry application techniques. *J. Agric. Eng. Res.* 77: 277-287.
- Sogaard, H. T., Sommer, S. G., Hutchings, N. J., Huijsmans, J. F. M., Bussink, D. W., Nicholson, F. 2002. Ammonia volatilization from field-applied animal slurry—the ALFAM model. *Atmos. Environ.* 36: 3309-3319.
- Soil Survey Staff. 2003. Keys to soil taxonomy. 9th ed. Natural Resources Conservation Service, USDA, Washington.
- Soler-Rovira, P. 1998. Evaluación del impacto ambiental y riesgo de contaminación producidos por la aplicación agrícola de lodos de depuradora. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Sørensen, P., Amato, M. 2002. Remineralisation and residual effects of N after application of pig slurry to soil. *Eur. J. Agron.* 16: 81-95.
- Sørensen, P., Jensen, E. S. 1998. The use of  $^{15}\text{N}$  labelling to study the turnover and utilization of ruminant manure N. *Biol. Fertil. Soils* 28: 56-63.
- Spaccini, R., Piccolo, A., Haberhauer, G., Gerzabek, M. H. 2000. Transformation of organic matter from maize residues into labile and humic fractions of three European soils as revealed by  $^{13}\text{C}$  distribution and CPMAS-NMR spectra. *Eur. J. Soil Sci.* 51: 583-594.
- Spaccini, R., Zena, A., Igwe, C. A., Mbagwu, J. S. C., Piccolo, A. 2001. Carbohydrates in water-stable aggregates and particle size fractions of forested and cultivated soils in two contrasting tropical ecosystems. *Biogeochemistry* 53: 1-22.
- Sparling, G. P. 1997. Soil Microbial Biomass, Activity and Nutrient Cycling as Indicators of Soil Health. En: Pankhurst, C. E., Doube, B. M. y Gupta, V. V. S. R. (Eds.), *Biological Indicators of Soil Health*. CAB International, London, pp. 97-119.
- Speir, T. W., Schaik, A. P., Lloyd-Jones, A. R., Kettles, H. A. 2003. Temporal response of soil biochemical properties in a pastoral soil after cultivation following high application rates of undigested sewage sludge. *Biol. Fertil. Soils* 38: 377-385.

- SSSA. 1995. SSSA statement on soil quality. *Agronomy News*. June 7. SSSA, Madison.
- Staddon, P. L. 2004. Carbon isotopes in functional soil ecology. *Trends Ecol. Evol.* 19: 148-154.
- Stenberg, M., Stenberg, B., Rydberg, T. 2000. Effects of reduced tillage and liming on microbial activity and soil properties in a weakly-structured soil. *Appl. Soil Ecol.* 14: 135-145.
- Stevenson, F. J. 1994. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.
- Stevenson, F. J., Chen, Y. 1991. Stability constants of copper(II)-humate complexes determined by modified potentiometric titration. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 55: 1586-1591.
- Stoate, C., Boatman, N. D., Borralho, R. J., Rio Carvalho, C., de Snoo, G. R., Eden, P. 2001. Ecological impacts of arable intensification in Europe. *J. Environ. Manage.* 63: 337-365.
- Stockdale, E. A., Lampkin, N. H., Hovi, M., Keatinge, R., Lennartsson, E. K. M., Macdonald, D. W., Padel, S., Tattersall, F. H., Wolfe, M. S., Watson, C. A. 2001. Agronomic and environmental implications of organic farming systems. *Adv. Agron.* 70: 261-327.
- Strahler, A. N., Strahler, A. H. 1989. *Geografía física*. Omega, Barcelona.
- Sudhir, P., Murthy, S. D. S. 2004. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica* 42: 481-486.
- Sutton, R., Sposito, G. 2005. Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environ. Sci. Technol.* 39: 9009-9015.
- Tabatabai, M. A. 1994. Soil enzymes. En: Mickelson, S. H. y Bigham, J. M. (Eds.), *Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties*. SSSA, Madison, pp. 775-833.
- Tabatabai, M. A., Dick, W. A. 2002. Enzymes in Soil. Research and Developments in Measuring Activities. En: Burns, R. G. y Dick, R. P. (Eds.), *Enzymes in the Environment. Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker, New York.
- Tambussi, E. A., Nogués, S., Ferrio, P., Voltas, J., Araus, J. L. 2005. Does higher yield potential improve barley performance in Mediterranean conditions? A case study. *Field Crop Res.* 91: 149-160.

- Thomsen, I. K. 2005. Crop N utilization and leaching losses as affected by time and method of application of farmyard manure. *Eur. J. Agron.* 22: 1-9.
- Thorntwaite, C. W. 1948. An approach toward a rational classification of climate. *Geogr. Rev.* 38: 55-94.
- Tipping, E. 2002. *Cation Binding by Humic Substances*. Cambridge University Press, New York.
- Trasar-Cepeda, C., Leirós, M. C., Gil-Sotres, F. 2000. Biochemical properties of acid soils under climax vegetation (Atlantic oakwood) in an area of the European temperate-humid zone (Galicia, NW Spain): specific parameters. *Soil Biol. Biochem.* 32: 747-755.
- Trasar-Cepeda, C., Leirós, M. C., Gil-Sotres, F., Seoane, S. 1998. Towards a biochemical quality index for soils: an expression relating several biological and biochemical properties. *Biol. Fertil. Soils* 26: 100-106.
- Trevisan, D., Vansteelant, J. Y., Dorioz, J. M. 2002. Survival and leaching of fecal bacteria after slurry spreading on mountain hay meadows: consequences for the management of water contamination risk. *Water Res.* 36: 275-283.
- Trubetskaya, O. E., Trubetskoj, O. A., Ciavatta, C. 2001. Evaluation of the transformation of organic matter to humic substances in compost by coupling sec-page. *Bioresour. Technol.* 77: 51-56.
- Turner, C. 2002. The thermal inactivation of *E. coli* in straw and pig manure. *Bioresour. Technol.* 84: 57-61.
- Turpin, S. M., Maycroft, K. A., Rowlands, C. L., Wellington, E. M. H. 1993. Viable but non-culturable *Salmonellas* in soil. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 421-427.
- UNESCO-FAO. 1963. *Carte bioclimatique de la zone méditerranéene. Notice explicative. Recherches sur la zone aride*. UNESCO, París.
- Vallejo, A., García-Torres, L., Díez, J. A., Arce, A., López-Fernández, S. 2005. Comparison of N losses ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}$ ) from surface applied, injected or amended (DCD) pig slurry of an irrigated soil in a Mediterranean climate. *Plant Soil* 272: 313-325.
- Vance, E. D., Brookes, P. C., Jenkinson, D. S. 1987. Microbial biomass measurements in forest soils: determination of  $K_c$  values and test of hypothesis to explain the failure of the chloroform fumigation-incubation method in acid soils. *Soil Biol. Biochem.* 19: 381-387.

- Venglovsky, J., Sasakova, N., Vargova, M., Pacajova, Z., Placha, I., Petrovsky, M., Harichova, D. 2005. Evolution of temperature and chemical parameters during composting of the pig slurry solid fraction amended with natural zeolite. *Bioresour. Technol.* 96: 181-189.
- Wang, W. J., Dalal, R. C., Moody, P. W., Smith, C. J. 2003. Relationships of soil respiration to microbial biomass, substrate availability and clay content. *Soil Biol. Biochem.* 35: 273-284.
- Wardle, D. A., Ghani, A. 1995. A critique of the microbial metabolic quotient ( $qCO_2$ ) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development. *Soil Biol. Biochem.* 27: 1601-1610.
- Westerman, P. W., Bicudo, J. R. 2005. Management considerations for organic waste use in agriculture. *Bioresour. Technol.* 96: 215-221.
- Whalen, J. K., Chang, C. 2001. Phosphorus accumulation in cultivated soils from long-term annual applications of cattle feedlot manure. *J. Environ. Qual.* 30: 229-237.
- Whalen, J. K., Chang, C., Clayton, G. W. 2002. Cattle manure and lime amendments to improve crop production of acidic soils in northern Alberta. *Can. J. Soil Sci.* 82: 227-238.
- Whalen, J. K., Chang, C., Clayton, G. W., Carefoot, J. 2000. Cattle manure amendment can increase the pH of acid soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64: 962-966.
- Wold, S., Esbensen, K., Geladi, P. 1987. Principal component analysis. *Chemometrics Intel. Lab. Sys.* 2: 37-52.
- Wong, M. T. F., Nortcliff, S., Swift, R. S. 1998. Method for determining the acid ameliorating capacity of plant residue compost, urban waste compost, farmyard manure, and peat applied to tropical soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 29: 2927-2937.
- Wu, F. C., Cai, Y., Evans, D., Dillon, P. J. 2004a. Complexation between Hg(II) and dissolved organic matter in stream waters: an application of fluorescence spectroscopy. *Biogeochemistry* 71: 339-351.
- Wu, F. C., Mills, R. B., Evans, D., Dillon, P. J. 2004b. Kinetics of metal-fulvic acid complexation using a stopped-flow technique and three dimensional excitation and emission fluorescence spectrophotometer. *Anal. Chem.* 76: 110-113.
- Yan, F., Schubert, S. 2000. Soil pH changes after application of plant shoot materials of faba bean and wheat. *Plant Soil* 220: 279-287.

- Zalidis, G., Stamatiadis, S., Takavakoglou, V., Eskridge, K., Misopolinos, N. 2002. Impacts of agricultural practices on soil and water quality in the Mediterranean region and proposed assessment methodology. *Agric. Ecosyst. Environ.* 88: 137-146.
- Zaller, J. G., Köpke, U. 2004. Effects of traditional and biodynamic farmyard manure amendment on yields, soil chemical, biochemical and biological properties in a long-term field experiment. *Biol. Fertil. Soils* 40: 222-229.
- Zaman, M., Cameron, K. C., Hi, H. J., Noonan, M. J. 1998. Nitrogen mineralization rates from soil amended with dairy pond waste. *Aust. J. Soil Res.* 36: 217-230.