



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS  
EXPERIMENTALES  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
ANIMAL, BIOLOGÍA VEGETAL Y  
ECOLOGÍA**

**TESIS DOCTORAL  
CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE NITRÓGENO  
EN EL SUELO DE BOSQUES DE *Abies  
pinsapo Boiss.* CON DISTINTA  
DISPONIBILIDAD DE NITRÓGENO**

**PRESENTADA POR:  
PATRICIA TORRES CAÑABATE**

**DIRIGIDA POR:  
DR. D. JOSÉ A. CARREIRA DE LA FUENTE  
DR. D. ROBERTO GARCÍA RUIZ**

**JAÉN, 5 DE FEBRERO DE 2016**

**ISBN 978-84-16819-67-6**

**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  
Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y  
Ecología. Área de Ecología



**TESIS DOCTORAL**

**Capacidad de retención de Nitrógeno en el suelo de  
bosques de *Abies pinsapo* Boiss. con distinta  
disponibilidad de Nitrógeno**

Memoria presentada por  
**PATRICIA TORRES CAÑABATE**  
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Jaén

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección de:

VºBº Director  
Dr. Jose A. Carreira de la Fuente  
Profesor Titular de Ecología  
Universidad de Jaén

VºBº Director  
Dr. Roberto García Ruiz  
Catedrático de Ecología  
Universidad de Jaén

**Fdo. Patricia Torres Cañabate**  
**Jaén, noviembre de 2015**



D. JOSÉ ANTONIO CARREIRA DE LA FUENTE Y D. ROBERTO GARCÍA RUIZ,  
Profesores de Ecología de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de  
Jaén,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada **Capacidad de Retención de N en el suelo de bosques de *Abies pinsapo* Boiss. con distinta disponibilidad de N**, ha sido realizada bajo nuestra dirección. Y considerando que representa trabajo de Tesis, autorizamos su presentación y defensa para optar al grado de Doctor en Ciencias Ambientales.

Jaén, noviembre de 2015

Fdo. Dr. J. A. Carreira de la Fuente

Fdo. Dr. R. García Ruiz



## *Agradecimientos*

En primer lugar quiero agradecer a mis directores, Pepe Carreira y Roberto García la oportunidad brindada y haber hecho posible este trabajo. Muchas gracias también por la ayuda en la puesta a punto del experimento de fertilización *in situ*. Muchas gracias Pepe por tu buena disposición para retomar el proceso de escritura de la tesis años después. Sin tu ayuda no hubiese podido hacerlo.

Muchas gracias a Eric Davidson por acogerme en Woods Hole Research Center (WHRC, Massachusetts), y por enseñarme a escribir mi primer artículo científico. Muchas gracias también a Ekaterina Bulygina por su ayuda en el laboratorio. Aprendí muchísimo durante mi estancia en el WHRC, me siento muy afortunada por haber podido trabajar con Eric y con Kate. Gracias a los dos también por vuestra hospitalidad.

Gracias también a Tim Daniells por recibirme en el Scottish Crop Research Institute (SCRI) y darme la oportunidad de trabajar con ADN. Quiero agradecer especialmente a Belén Hinojosa su inestimable ayuda para desarrollar el experimento de estructura de la comunidad microbiana en el SCRI. Si no hubiese sido por su ayuda y sus consejos no hubiera podido hacer tanto en el poco tiempo de la estancia. Muchas gracias también por ser tan buena compañera de piso y amiga.

A mis compañeros del departamento, Belén, Teresa, Celia, Juan Carlos, Mamen, M<sup>a</sup> Carmen, Juan, Rafa, Jesús, Gemma, Fátima García, Andrea, José Manuel, Raquel, Pablo, Gracia, Samer, Gisela, M<sup>a</sup> Luz, Fátima Aguilera, Bea, Vicki, muchísimas gracias por vuestro apoyo y por vuestra ayuda en el campo. Pero también por las charlas, los cafés y las cañas. ¡Qué bien lo hemos pasado juntos!

Muchas gracias a mis buenas amigas Gloria, Carmen, M<sup>a</sup> José, M<sup>a</sup> Carmen y Lucía por apoyarme siempre y comprender mis ausencias. Mil gracias por tantas risas juntas. Gracias también a Miguelito por ser tan buen amigo y animarme tanto.

Dejo para el final a quienes más les debo. No tengo palabras para agradecer a mi familia, a mis padres, Chari y Rafa, a mis hermanas, Carolina y Ana, y a Fabio, el gran apoyo que han supuesto para mí durante estos años, y el aliento que me habéis dado para seguir adelante cuando tenía ganas de tirar la toalla. Gracias a mis padres por estar siempre ahí, por ayudarme en todo en lo que está en vuestra mano. Gracias a Fabio por su apoyo incondicional, por tantas horas de ‘terapia’ y por ser capaz de hacerme reír en los peores momentos. Gracias a todos por ayudarme tanto con la niña para que yo tuviese tiempo de escribir.

Gracias a mi niña, Carolina, porque tu sonrisa es mi verdadera fuente de energía.

Esta memoria ha sido realizada gracias a la concesión de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) y al proyecto REN2002-09509 del Ministerio de Educación y Ciencia.



*A mi familia*



## *Índice*



I. Introducción.....	1
I.1. El ciclo del N en los ecosistemas forestales.....	1
I.2. Alteración global del ciclo del N.....	5
I.3. Consecuencias generales del incremento en las tasas de deposición atmosférica de N .....	7
I.4. El síndrome de la Saturación de N.....	13
I.5. Factores que influyen sobre la capacidad de retención de N en ecosistemas forestales: Clima y Altitud .....	16
I.6. Factores que influyen sobre la capacidad de retención de N en ecosistemas forestales: Estructura de la comunidad microbiana del suelo.....	17
I.7. Factores que influyen sobre la capacidad de retención de N en ecosistemas forestales: Inmovilización abiótica de N en el suelo.....	19
I.8. El pinsapar como modelo experimental para el estudio de la respuesta de los bosques a la deposición de N. Antecedentes. ....	21
I.9. Hipótesis de trabajo y objetivos .....	23
II. Material y Métodos .....	29
II.1. Objeto de estudio: el pinsapo.....	31
II.2. Diseño experimental general y características de las parcelas de estudio .....	36
II.3. Métodos del Objetivo 1, “Evaluación general de la biogeoquímica y disponibilidad del N en el suelo de los pinsapares: fuentes de variación principales” .....	43
II.3.1. Concentraciones en distintas fracciones y tasas de transformación del N.....	43
II.3.2. Abundancia natural de <sup>15</sup> N.....	44
II.4. Métodos del Objetivo 2, “Efecto de la adición de fuentes de C y N fácilmente disponibles sobre la biogeoquímica del N y la actividad microbiana en el suelo de los pinsapares” .....	46
II.4.1. Montaje del experimento en laboratorio de adición de formas disponibles de C y N .....	46
II.4.2. Seguimiento del experimento y variables dependientes consideradas .....	47
II.5. Métodos del Objetivo 3, “Variabilidad en la estructura de las comunidades bacterianas del suelo de los pinsapares, y relaciones estructura/función” .....	50
II.5.1. Análisis de la comunidad microbiana del suelo.....	50
II.5.2. Análisis de relaciones entre estructura de las comunidades bacterianas y la funcionalidad biogeoquímica del suelo .....	51
II.6. Métodos del Objetivo 4, “Efecto del grado de saturación de N sobre la eficiencia de	

los mecanismos de retención del N en los pinsapares” .....	52
II.6.1. Diseño y montaje del experimento “in situ” de adición al suelo de N marcado con <sup>15</sup> N.....	52
II.6.2. Seguimiento del experimento: muestreo de aguas de trascolación y lixiviación, y de suelos .....	54
II.6.3. Entradas de N con el agua de trascolación .....	55
II.6.4. Pérdidas de N por lixiviación y señal de <sup>15</sup> N (% atómico <sup>15</sup> N/ <sup>14</sup> N) en los lixiviados .....	57
II.6.5. Cambios en la disponibilidad de N y en la señal δ <sup>15</sup> N en el suelo.....	60
II.7. Métodos del Objetivo 5, “Retención abiótica del nitrato: disipación de dudas metodológicas y de su operatividad en suelos Mediterráneos” .....	62
II.7.1. Muestreo, preparación y esterilización de las muestras de suelo.....	62
II.7.2. Adición de <sup>15</sup> N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	64
II.7.3. Determinación del enriquecimiento en <sup>15</sup> N.....	64
II.8. Especificaciones sobre el protocolo de los métodos analíticos empleados .....	67
II.8.1. Humedad de las muestras de suelo y hojarasca .....	67
II.8.2. Densidad aparente del suelo.....	67
II.8.3. Carbono y Nitrógeno totales .....	68
II.8.4. Amonio y Nitrato .....	68
II.8.5. N total disuelto (TDN) y N orgánico disuelto (DON) .....	70
II.8.6. Nitrificación potencial en ausencia de limitación por sustrato .....	70
II.8.7. Desnitrificación potencial en ausencia de limitación por aceptor o dador de electrones .....	71
II.8.8. Tasa de respiración.....	73
II.8.9. Tasas de mineralización neta del N (MNN) y de nitrificación neta (NN) .....	74
II.8.10. Estudio de la estructura de la comunidad microbiana del suelo mediante análisis de ADN (T-RFLP) .....	75
II.8.10.A. <i>Extracción de ADN del suelo</i> .....	75
II.8.10.B. <i>Amplificación de ADN bacteriano mediante PCR</i> .....	76
II.8.10.C. <i>Amplificación de ADN de bacterias desnitrificantes mediante PCR</i> .....	76
II.8.10.D. <i>Análisis de T-RFLP</i> .....	78
II.8.11. Análisis de <sup>15</sup> N en muestras líquidas.....	79
II. Resultados .....	81
III.1. Objetivo 1, “Evaluación general de la biogeoquímica y disponibilidad del N en el suelo de los pinsapares: fuentes de variación principales” .....	83
III.1.1. Abundancia natural de <sup>15</sup> N.....	83
III.1.2. Concentraciones en distintas fracciones y tasas de transformación del N .....	86

III.1.2.A. Nitrógeno y Carbono totales.....	86
III.1.2.B. Formas inorgánicas extraíbles de N.....	87
III.1.2.C. Tasa de desnitrificación potencial.....	91
III.1.2.D. Tasa potencial de nitrificación.....	92
III.1.2.E. Tasas de nitrificación neta y mineralización neta del N.....	94
III.1.2.F. Tasa de respiración.....	95
III.2. Objetivo 2, “Efecto de la adición de fuentes de C y/o de N fácilmente disponibles sobre la biogeoquímica del N y la actividad microbológica en el suelo de los pinsapares”.....	96
III.2.1. Respiración.....	96
III.2.1.A. Tasas de respiración.....	96
III.2.1.B. Cinética de las tasas acumuladas de respiración (muestras de primavera).....	100
III.2.2. Dinámica de las concentraciones de $\text{NH}_4^+$ y de $\text{NO}_3^-$ , y tasas netas de mineralización del nitrógeno (MNN) y de nitrificación (NN). ....	104
III.2.2.A. Concentraciones de $\text{NO}_3^-$ y de $\text{NH}_4^+$ .....	104
III.2.2.B. Tasas netas de mineralización del nitrógeno (MNN) y de nitrificación (NN).....	114
III.2.2.C. Cinética de la nitrificación.....	115
III.3. Objetivo 3, “Variabilidad en la estructura de las comunidades bacterianas del suelo de los pinsapares, y relaciones estructura/función”.....	117
III.3.1. Análisis de la comunidad microbiana del suelo.....	117
III.3.1.A. Diversidad ecológica.....	117
III.3.1.B. Estructura de la comunidad bacteriana.....	122
III.3.1.C. Estructura de la comunidad desnitrificante.....	127
III.3.2. Análisis de relaciones entre estructura de las comunidades microbianas y la funcionalidad biogeoquímica.....	133
III.4. Objetivo 4, “Efecto del grado de saturación de N sobre la eficiencia de los mecanismos de retención del N en los pinsapares”.....	141
III.4.1. Entradas de N con el agua de trascolación.....	141
III.4.1.A. Volumen de trascolación.....	141
III.4.1.B. Concentración de amonio y nitrato en el agua de trascolación.....	143
III.4.1.C. Tasas de deposición de amonio y nitrato con el agua de trascolación.....	145
III.4.2. Pérdidas de N por lixiviación y señal de $^{15}\text{N}$ en los lixiviados. Efecto de la fertilización con N.....	148
III.4.2.A. Volumen de lixiviación.....	148
III.4.2.B. Concentración de formas de N en el agua de lixiviación.....	150
III.4.2.C. Lixiviación acumulada de N.....	154
III.4.2.D. Retención neta del N añadido.....	158
III.4.2.E. Porcentaje del $^{15}\text{N}$ añadido recuperado en el agua de lixiviación.....	161

III.4.3. Cambios en la disponibilidad de N y en la señal $\delta^{15}\text{N}$ en el suelo. Efecto de la fertilización con N .....	163
<i>III.4.3.A. Concentraciones de N mineral</i> .....	163
<i>III.4.3.B. Concentración de N y relación C/N</i> .....	169
<i>III.4.3.C. Recuperación en el suelo del <math>^{15}\text{N}</math> añadido con los tratamientos de fertilización</i> .....	173
III.5. Objetivo 5, “Retención abiótica del nitrato: disipación de dudas metodológicas y de su operatividad en suelos Mediterráneos” .....	179
II.5.1. Destino del $^{15}\text{N}$ inorgánico añadido al suelo.....	179
III.5.2. Cuantificación del nitrato .....	180
IV. Discusión .....	185
IV.1. La mediterraneidad del pinsapar se manifiesta en su patrón estacional de cambios en la disponibilidad de nitrógeno.....	187
IV.1.1. Dinámica del N y estacionalidad climática en el pinsapar .....	187
IV.1.2. Diferencias en la disponibilidad de N en el suelo y la hojarasca entre pinsapares limitados o saturados por N .....	190
IV.1.3. Diferencias en las tasas de transformación neta del N del suelo entre pinsapares limitados o saturados por N .....	195
IV.1.4. Comparación de las pérdidas de N por lixiviación del suelo entre pinsapares limitados o saturados por N .....	197
IV.1.5. Pérdidas potenciales de N en forma gaseosa ( $\text{N}_2\text{O}$ ) en el suelo de los pinsapares .....	199
IV. 2. La mediterraneidad del pinsapar condiciona su capacidad para retener las entradas de N atmosférico.....	201
IV. 2. 1. Carácter abierto del ciclo del N en los pinsapares .....	201
IV.2.2. Influencia del grado de saturación de N sobre la eficacia de retención neta del N añadido.....	203
IV.2.3. Influencia del grado de saturación de N sobre la retención bruta del N en el suelo; aproximación isotópica- $\text{N}^{15}$ .....	205
IV.2.4. Influencia del grado de saturación de N sobre la lixiviación bruta del N; aproximación isotópica- $\text{N}^{15}$ .....	208
IV.3. Actividad y estructura de la comunidad microbiana del suelo de los pinsapares ..	210
IV.3.1. Efecto de la estacionalidad Mediterránea y la adición de sustratos lábiles de C y/o N en la respiración del suelo de los pinsapares .....	210
IV.3.2. Efecto de la adición de sustratos lábiles de C y/o N sobre las tasas netas de transformación del N del suelo de los pinsapares.....	212
IV.3.3. Variabilidad en la estructura de la comunidad bacteriana y relaciones estructura/función .....	213
IV.3.4. Variabilidad en la estructura de la comunidad bacteriana desnitrificante y	

relaciones estructura/función.....	220
IV.4. Mecanismos de retención abiótica del nitrato en bosques de <i>Abies pinsapo</i> .....	224
IV.4.1. Disipación de dudas metodológicas.....	224
IV.4.2. Destino del $^{15}\text{NO}_3^-$ añadido al suelo.....	225
IV.4.3. Factores que afectan a la retención abiótica de $\text{NO}_3^-$ .....	226
V. Conclusiones .....	229
VI. Referencias Bibliográficas .....	235
VII. Anexo-Material Suplementario.....	265

## **I. Introducción**

## I.1. El ciclo del N en los ecosistemas forestales

El nitrógeno, en su forma inerte  $N_2$ , es el elemento más abundante en la atmósfera terrestre pero, en esta forma, es prácticamente inutilizable para la gran mayoría de los organismos vivos. Por lo tanto, este elemento esencial para la vida, que forma parte de ácidos nucleicos, aminoácidos y proteínas, debe ser transformado en otras formas, llamadas en conjunto “nitrógeno reactivo” (Nr), para poder ser funcional desde el punto de vista biológico (UNEP y WHRC 2007). La producción de Nr ocurre tanto a través de procesos naturales como a través de intervenciones humanas. Bajo condiciones naturales, romper el triple enlace que une los dos átomos del  $N_2$  requiere la energía fotoquímica de los rayos o la actividad de microorganismos que sean capaces de llevar a cabo el proceso conocido como fijación biológica del  $N_2$ .

En ecosistemas forestales no perturbados, la principal vía de entrada de N es la fijación biológica del  $N_2$ , pero es un proceso que opera a tasas bajas debido a su alto coste energético y que además necesita de un ambiente anaeróbico (debido a la sensibilidad de la enzima *nitrogenasa* al oxígeno), lo que hace que la capacidad de los ecosistemas para fijar nitrógeno sea muy limitada (Vitousek y Howarth 1991). Sin embargo, las plantas demandan el N de forma muy elevada en comparación con otros nutrientes. Así, frente a requerimientos de concentración foliar de N en torno a  $10 \text{ mg g}^{-1}$  para que se alcancen tasas de crecimiento óptimo en especies forestales, sólo se requieren concentraciones de aproximadamente  $1 \text{ mg g}^{-1}$  para el caso del P, de 3.5 en el del K, de 1.5 para el Ca y de 0.8 para el Mg (Fisher y Binkley 2000). Esta elevada demanda de N, junto a su baja disponibilidad en ecosistemas no perturbados, hace que este nutriente sea frecuentemente el factor limitante de la productividad en ecosistemas forestales (Vitousek y Howarth 1991). Asimismo, el N también puede ser limitante para los microorganismos del suelo, como lo demuestran los cambios inmediatos en la cantidad y actividad microbiana tras una fertilización con N (Söderström *et al.* 1983; Kelly y Henderson 1978).

La investigación sobre el ciclado del N en los bosques ha estado en las últimas décadas muy sesgada hacia estudios en el hemisferio norte y con motivo de los síntomas de declive observados en muchos bosques Europeos y de Norteamérica desde los años 80

debido a tasas relativamente elevadas y crónicas de deposición atmosférica de N antropogénico, entre otros contaminantes. El ciclo biogeoquímico del N puede ser dividido en procesos de transformación externos e internos (Figura I.1). Los procesos externos incluyen rutas que añaden o eliminan N de la reserva del suelo, como son la deposición de N, la fijación biológica del  $N_2$ , la desnitrificación, la volatilización del amoníaco y la lixiviación del N (Aubert *et al.* 2005). Los microorganismos involucrados en las transformaciones externas del N suelen estar especializados en una determinada ruta fisiológica muy definida (Schimel *et al.* 2005). Por su lado, las transformaciones internas determinan la disponibilidad de N para las plantas y para la comunidad microbiana, e incluyen descomposición, mineralización, inmovilización, nitrificación y asimilación (Stevenson y Cole 1999). El proceso de nitrificación actúa como la “válvula” entre el ciclo del N interno y las vías de salida mediante desnitrificación y lixiviación (Schimel *et al.* 2005). Se ha postulado que las transformaciones internas del N son hasta cierto punto sensibles a la composición de la comunidad microbiana (Schimel 1995).

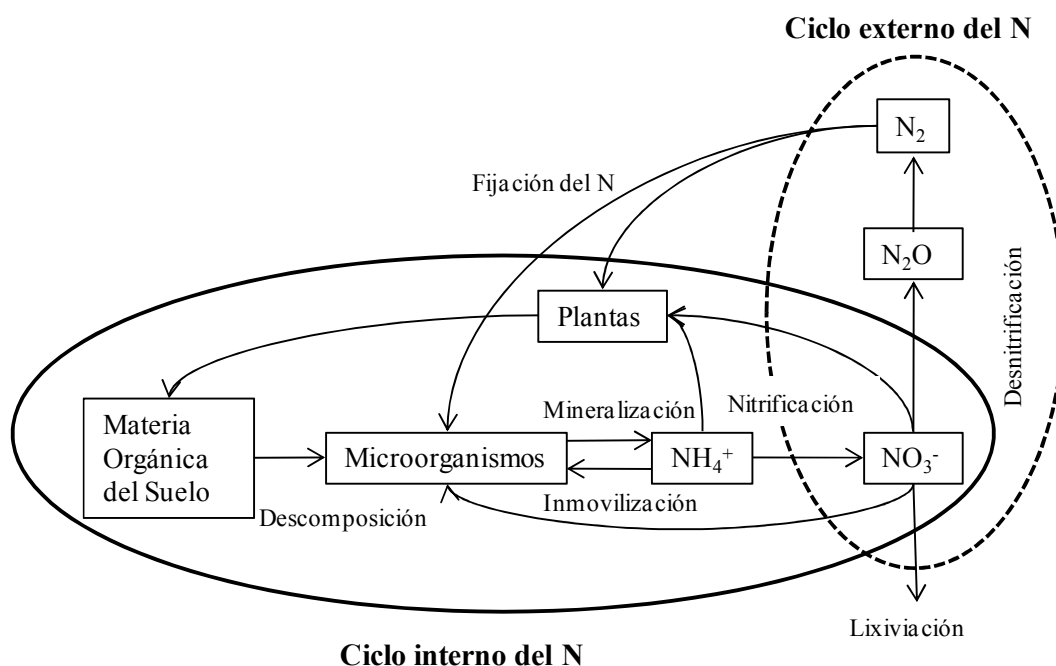
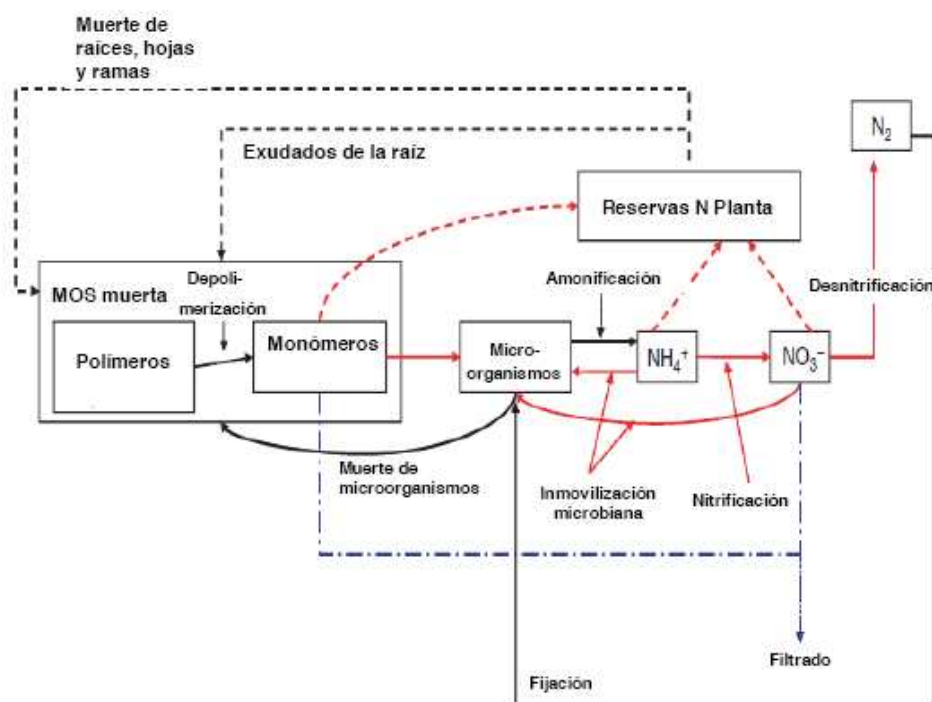


Figura I. 1. Vista clásica del ciclo del N. Adaptado de Schimel *et al.* (2005).

No todas las reacciones de transformación del N están mediadas por microorganismos del suelo. En suelos forestales, los procesos abióticos pueden contribuir a la inmovilización del N, aunque de modo muy variable, constituyendo entre el 6-90% de ésta (Johnson *et al.* 2000). Estos mecanismos de retención abiótica incluyen reacciones de sorción/desorción de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) a minerales de arcilla (Nommik y Vahtras 1982), reacciones de intercambio de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Cameron y Haynes 1986; Pérez *et al.* 1998), adsorción de compuestos de nitrógeno orgánico disuelto (DON) (Kaiser y Zech 2000), y reacciones de nitración/nitrosación del  $\text{NO}_3^-$  (Azhar *et al.* 1986; Davidson *et al.* 2003).

A lo largo de las pasadas décadas, nuestra visión del ciclo del N ha evolucionado de forma dramática (Schimel y Bennett 2004). Hasta hace poco, el ciclo terrestre del N se basaba en dos asunciones centrales: que las plantas sólo son capaces de asimilar N inorgánico y que son pobres competidoras por éste frente a los microorganismos del suelo. Por lo tanto, se pensaba que las plantas utilizaban el N que les ‘sobraba’ a los microorganismos, permitiendo dividir el ciclo del N en dos partes, el lado de la descomposición microbiana y el lado de la asimilación y uso por las plantas. Ambas partes se encontrarían ligadas a través del proceso de la mineralización. Los últimos descubrimientos han llevado a considerar ahora que el ciclo del N estaría controlado por la tasa de depolimerización de polímeros orgánicos nitrogenados, mediada por la acción de enzimas extracelulares microbianas (incluyendo las que tienen su origen en las micorrizas). Esta depolimerización libera monómeros orgánicos que contienen N y que pueden ser utilizados tanto por las plantas como por los microorganismos. Schimel *et al.* (2005) argumentan que esto supone dos cambios críticos en la visión del ciclo del N, reconociéndose ahora el papel esencial que juegan dos mecanismos antes subestimados: i) los procesos de hidrólisis enzimática extracelular de polímeros nitrogenados y, ii) la contribución de la dinámica espacio-temporalmente heterogénea entre micrositos del suelo a la regulación del ciclado del N a mayor escala.



**Figura I. 2. Ciclo del N según el nuevo paradigma propuesto por Schimel y Bennet (2004), modificado a partir de Rennenber (2009). Líneas discontinuas: procesos de la planta, líneas continuas: procesos microbianos; líneas rojas y continuas: procesos de competencia entre plantas y microorganismos. Líneas azules: vías de transporte hidrológico; MOS: materia orgánica del suelo.**

La mayor reserva de N en el suelo puede encontrarse en la materia orgánica del suelo (SOM) (Aber *et al.* 1998). La descomposición de esta fracción es el punto de partida de muchos procesos biológicos y químicos. La inclusión de procesos de depolimerización enzimática divide el ciclo interno del N en el suelo en dos partes fundamentales: el estado polimérico, que consiste en material orgánico macromolecular insoluble, y el estado de monómeros biodisponibles (Schimel y Bennett 2004) (Figura I.2). La depolimerización sería un paso crucial al menos en ecosistemas con baja disponibilidad de N (Rennenberg *et al.* 2009) ya que genera N biodisponible como sustrato para plantas y microorganismos, frente al paradigma clásico que considera el balance mineralización/inmovilización microbiana como el factor clave que determina la disponibilidad de N para las plantas

(Figura I.2). Está ampliamente demostrado que las plantas pueden usar el N orgánico como una fuente significativa de N en un amplio rango de ecosistemas forestales (Näsholm *et al.* 2009), y que las plantas son competitivas contra los microorganismos del suelo para conseguir el N disponible.

## **I.2. Alteración global del ciclo del N**

Hace alrededor de un siglo que los humanos comenzamos a utilizar las excreciones de los animales y las sales de nitrato como fertilizantes en la agricultura para sostener la producción de alimento. Hasta entonces la formación de Nr a partir del N<sub>2</sub> atmosférico mediante procesos naturales (fijación biológica del N<sub>2</sub>, rayos) había estado en equilibrio con la sedimentación profunda y la conversión del Nr de nuevo en N<sub>2</sub> por desnitrificación, oxidación anaerobia del amonio (anammox) y otros procesos (Galloway *et al.* 2004; Galloway *et al.* 2013), de forma que el Nr se reciclaba de forma eficiente a través de las redes tróficas del ecosistema, siendo a menudo el factor limitante para incrementar la producción tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos.

En 1850 sólo el 20% de la creación de Nr terrestre era antropogénica ya que el único proceso para crear nuevo Nr era el cultivo de leguminosas (Galloway *et al.* 2013). Sin embargo, a medida que crecía la población mundial y aumentaba la demanda por alimento se desarrollaron nuevos procesos como el de la reacción de Haber Bosch para la obtención de fertilizantes sintéticos amoniacales a partir de nitrógeno e hidrógeno gaseosos (Erisman *et al.* 2008). Además, el incremento en la quema de combustibles fósiles para atender la creciente demanda de energía de la Revolución Industrial también contribuyó a la creación de Nr. Este incremento fue tan grande que para el año 2010, el 75% del Nr generado en la tierra fue de origen antropogénico. Dicho de otra forma, en 2010, la producción de Nr por el hombre fue más de tres veces mayor que su producción terrestre natural (Fowler *et al.* 2013; Vitousek *et al.* 2013).

A medida que el Nr se deposita en los ecosistemas terrestres, los requerimientos de N adicional en el ecosistema se reducen. Una respuesta temprana del ecosistema es la reducción en las tasas de fijación biológica de N<sub>2</sub>, la cual demanda más energía que la

asimilación directa del Nr disponible (DeLuca *et al.* 2008). Un síntoma importante que acompaña a las entradas elevadas de N es el alivio de la limitación de la producción primaria por N (estado muy común en los ecosistemas naturales), desencadenando una cascada de cambios tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos (Galloway *et al.* 2004).

Los bosques pueden actuar como un gran reservorio y sumidero a corto y a largo plazo dentro de esta cascada del N. La cantidad de Nr total en sus suelos y biomasa puede llegar hasta cifras de 500 g N m<sup>-2</sup> (Galloway *et al.* 2003). Las entradas de N en regiones no contaminadas son del orden de 0,1 a 0,2 g N m<sup>-2</sup> año<sup>-1</sup>, pero en las regiones industrializadas pueden alcanzarse valores de 5 o, a veces, de hasta 10 g N m<sup>-2</sup> año<sup>-1</sup> (Dise y Wright 1995). Asimismo, en bosques no contaminados, las salidas de DON en el agua de arroyos suelen ser bajas y relativamente constantes (e.g. Goodale *et al.* 2000), mientras que la pérdida del N inorgánico disuelto es bastante variable, pudiendo ser nula o hasta del orden de la deposición dependiendo del estado sucesional y de la naturaleza del bosque (Gundersen *et al.* 1998; Dise *et al.* 1998; Fenn *et al.* 2003a). En general, esto significa que el tiempo de residencia del Nr dentro de un bosque es de cientos a miles de años y, por tanto, existe una oportunidad sustancial para que existan retrasos en la cascada de N (Galloway *et al.* 2003). Sin embargo, la actividad humana puede acortar este tiempo de residencia, tanto al incrementar las entradas, como eliminando Nr a través de talas, fuegos o conversión de zonas forestales a agrarias. La combinación del gran tamaño del reservorio de N en los bosques y sus tasas relativamente bajas de renovación significa que los cambios inducidos por el hombre en el estado del Nr pueden tener efectos a largo plazo en este tipo de ecosistemas, y que la historia previa de uso del suelo puede desempeñar un papel importante en la respuesta actual del bosque a las adiciones de Nr (Goodale *et al.* 2000; Aber *et al.* 2003).

### I.3. Consecuencias generales del incremento en las tasas de deposición atmosférica de N

Las emisiones de amonio ( $\text{NH}_3$ ) y óxidos de N ( $\text{NO}_x$ ) se incrementaron fuertemente en Europa y en Estados Unidos en la segunda mitad del siglo XX (Galloway 1998; Bobbink *et al.* 2003; Galloway *et al.* 2003; 2005; UNEP y WHRC 2007). El amonio se volatiliza desde sistemas agrarios intensivos mientras que los óxidos de N se originan principalmente de la quema de combustibles fósiles por el tráfico y la industria. Debido al transporte a cortas y largas distancias de estos compuestos nitrogenados, la deposición de N se ha incrementado en muchos ecosistemas naturales y seminaturales en el mundo (Bobbink *et al.* 2003).

Mientras que la deposición de azufre (S) ha descendido en respuesta a la regulación por la normativa medioambiental, comparativamente, la tasa de deposición de N se ha incrementado desde los 1980s en Estados Unidos (Driscoll *et al.* 2001; Driscoll *et al.* 2003) y desde los 1990s en Europa (EEA 2010). Históricamente, las estrategias de control de las emisiones se han centrado en reducir las emisiones de los óxidos de N por lo que actualmente predominan las formas reducidas del N sobre las oxidadas (Kelly *et al.* 2005; Lehmann *et al.* 2005; EEA 2010).

Áreas con altas tasas de deposición de N son Europa central y occidental, el este de Estados Unidos y, desde los 90s, Asia occidental (e.g. Galloway y Cowling 2002). Se han observado tasas de deposición atmosférica de N de 20-60 kg en ecosistemas no forestales de Europa occidental, mientras que en bosques de Europa y de Estados Unidos se han alcanzado valores entre 20-100 kg N  $\text{ha}^{-1}\text{año}^{-1}$ , en lugar de las entradas naturales estimadas de 1-3 kg N  $\text{ha}^{-1}\text{año}^{-1}$  al principio del siglo XX (p.e. Galloway *et al.* 1995; Asman *et al.* 1998; Fowler *et al.* 2002).

En términos generales, en el este de Estados Unidos, los bosques menos contaminados se encuentran en su sección norte y reciben entradas de N por deposición atmosférica entre 2-4 kg N  $\text{ha}^{-1}\text{año}^{-1}$ , mientras que los bosques más al sur, de carácter templado, reciben unos 5-10 kg N  $\text{ha}^{-1}\text{año}^{-1}$  y hasta 17 kg N  $\text{ha}^{-1}\text{año}^{-1}$  en las áreas más

contaminadas (Pardo *et al.* 2011; Weathers y Lynch 2011). Por su lado, los bosques europeos mostraron en el año 2010, según el ICP (International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests), una deposición de N total en el agua de trascolación superior a  $8 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  en la mayor parte de las parcelas de estudio, aunque se encuentran fácilmente valores superiores a  $15 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  y a  $20 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  en parcelas de Bélgica, Países Bajos y Alemania (máximo registrado de  $49,3 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ). En España, los últimos datos disponibles corresponden al año 2007 y muestran unas tasas de deposición que oscilaron entre 4,6 (zona centro) y  $20,8 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  (zona costera oriental).

La deposición húmeda y la deposición seca tienen generalmente la misma importancia en bosques templados, en los que la precipitación se distribuye uniformemente a lo largo del año (Lindberg *et al.* 1986; Lindberg *et al.* 1990). Sin embargo, la deposición seca es generalmente la principal forma de entrada atmosférica de N en ecosistemas Mediterráneos (hasta el 90% dependiendo del clima de la región, el tipo de vegetación y la orografía, pero generalmente entre el 30 y el 70%), en los que el N se acumula frecuentemente en el suelo y en las superficies vegetales durante los períodos secos, llegando a ser disponible como pulsos de alta concentración de N con los eventos de precipitación (Bytnerowicz y Fenn 1996; Fenn *et al.* 2003a, 2003b y 2003c). Rodà *et al.* (2002) encontraron en encinares de las montañas del Montseny, a 40 km de Barcelona, que la deposición seca de N supone en torno al 65% de la deposición total de N. Como consecuencia de esta dominancia y de la falta general de redes apropiadas para su seguimiento, las estimaciones de deposición de N en la mayoría de las áreas Mediterráneas son bastante inciertas (Fenn *et al.* 2009; EMEP 2010; Fenn *et al.* 2010). Las mejores estimaciones para las tasas de deposición de N en áreas Mediterráneas son las disponibles para los ecosistemas de California. Las tasas más altas ocurren para los bosques en las regiones más expuestas del sur de California (desde  $30$  a más de  $70 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ). Sin embargo, grandes áreas de bosques, de matorral y de praderas reciben sólo entradas bajas de N atmosférico ( $\approx 2$  a  $5 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) (Fenn *et al.* 2008, 2010). La niebla también se ha descrito como una importante fuente de N en estos sistemas, e.g., proveyendo un 33% de la deposición total de N en las Montañas de San Bernardino, al este de Los Ángeles (Fenn *et*

al. 2000). Sin embargo, esta forma de entrada es normalmente ignorada porque los colectores de deposición húmeda y seca normalmente empleados fallan al capturarlo (Fenn y Poth 2004). La deposición de N derivada de las nieblas apenas ha sido estimada en ninguna otra región Mediterránea, pero la importancia de su contribución a las entradas totales de N se supone generalizada dado que es un fenómeno meteorológico muy común.

En la Península Ibérica, los estudios realizados muestran unas tasas de deposición atmosférica de N relativamente bajas en comparación con las observadas en otras zonas de Europa. Así, en encinares del NE de España (Montseny, Cataluña) la deposición bruta de N ( $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$ ) es de  $5,7 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  (Avila *et al.* 2002; Rodà *et al.* 2002; Rodrigo *et al.* 2003). Otros estudios realizados en la costa este de España (Comunidad Valenciana) han mostrado unas tasas brutas de deposición de N de entre  $3,2$  y  $6,8 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  (Sanz *et al.* 2002). De manera similar, en robledales de *Quercus pirenaica* Willd. de la Sierra de Gata (Centro-oeste de la Península Ibérica) la deposición bruta de N es de unos  $6 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  (Moreno *et al.* 2001; Moreno y Gallardo 2002).

La deposición atmosférica de N está afectando a las comunidades bióticas y a los procesos de ciclado de nutrientes en muchas regiones (Bobbink *et al.* 2010). La mayoría de las especies de plantas de hábitats oligotróficos y mesotróficos están adaptadas a condiciones pobres en nutrientes y sólo pueden sobrevivir o competir con éxito en suelos con baja disponibilidad de N (e.g. Tamm 1991; Bobbink *et al.* 1998; Aerts y Chapin 1999). Los ecosistemas forestales consisten en diferentes compartimentos los cuales pueden ser afectados de forma diferente por el incremento en la deposición de N. El suelo puede ser tanto acidificado como eutrofizado, teniendo ambos procesos consecuencias para la microbiología, la fauna del suelo y la vegetación. La nutrición y el crecimiento de los árboles cambian por acidificación y/o eutrofización, lo que puede alterar su resistencia a otros factores de estrés bióticos y abióticos. La composición de especies de la vegetación y las comunidades de micorrizas también puede verse afectada, con el incremento de especies demandantes de N o tolerantes a la acidez, y la disminución de otras especies; por lo tanto, la biodiversidad puede verse significativamente alterada por la deposición de N (Bobbink *et al.* 2003; Bobbink *et al.* 2010). Bobbink *et al.* 2010 establecieron que, en relación con el

síndrome de saturación de N, el principal causante de la pérdida de diversidad es la propia acumulación de N en los ecosistemas, siendo otros efectos, como los mediados por la acidificación del suelo, o la toxicidad directa de gases y aerosoles del N o de las elevadas concentraciones de  $\text{NH}_3$  y  $\text{NH}_4^+$ , de carácter secundario y más específicos de cada ecosistema en concreto.

El suelo desempeña un papel importante en la mediación de los efectos del N en todo el ecosistema forestal. Son importantes los siguientes procesos:

a) La acidificación del suelo, debido a la nitrificación del amonio y a la lixiviación del nitrato. Estos procesos llevan a una lixiviación acelerada de cationes básicos y, en suelos pobremente tamponados, a un incremento en la disolución de aluminio, el cual puede dañar el desarrollo de las raíces finas y de las micorrizas y, por lo tanto, reducir la asimilación de nutrientes (Ulrich 1983).

b) La eutrofización, que resulta del excedente de nitrato, originado por la propia deposición o por el incremento de la nitrificación debido a la acumulación de N en el suelo.

Estudios de campo basados en marcaje con  $^{15}\text{N}$  demuestran que una gran proporción del N añadido se retiene en el suelo forestal a través de procesos bióticos y abióticos en los dos primeros años (Tietema *et al.* 1998; Emmett *et al.* 1998). Una acumulación de amonio en el complejo de intercambio iónico puede ocurrir en áreas con alta deposición de  $\text{NH}_4^+$  (Roelofs *et al.* 1985; van Dijk y Roelofs 1988; Schulze *et al.* 1989; Boxman *et al.* 1991), aunque el amonio no suele ser detectable en la solución del suelo en grandes concentraciones, como muestran los datos de las parcelas forestales del ICP (Vries *et al.* 2003).

Una aproximación para cuantificar los niveles mínimos de deposición atmosférica que tendrían efectos de contaminación dañina para los ecosistemas es la determinación de “cargas críticas”. Una carga crítica se define como ‘una estimación cuantitativa de una exposición a uno o más contaminantes por debajo de la cual no ocurren efectos perjudiciales para elementos sensibles del medio ambiente según el conocimiento actual’

(Nilsson y Grennfelt 1988). La aproximación de las cargas críticas ha ayudado a los gobiernos Europeos a avanzar en la reducción de la deposición de N en ecosistemas sensibles (Bobbink *et al.* 2010). Las cargas críticas de N empíricas y los efectos ecológicos de la deposición de N han sido revisadas recientemente para California (Fenn *et al.* 2010, 2011), los Estados Unidos (Pardo *et al.* 2011), Europa (Bobbink y Hettelingh 2011) y China (Liu *et al.* 2011).

Bobbink *et al.* (2003) consideran que una carga crítica de 10-20 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> es bastante fiable con carácter general para el caso de los bosques templados y boreales. Así, sobre la base de datos de lixiviación de N, Dise y Wright (1995) estimaron una carga crítica general de  $\approx 10$  kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> para ecosistemas templados y boreales de Europa, mientras que estimaciones basadas en organismos sensibles como los líquenes arrojan para este mismo tipo de ecosistemas cifras de carga crítica menores,  $<7,5$  kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (Britton y Fisher 2010).

Pardo *et al.* (2011) proponen un rango de cargas críticas para los ecosistemas forestales de Estados Unidos de entre 4 y 39 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (en el rango 4-8 para bosques templados del Este). El umbral de deposición de N que causaba lixiviación apreciable de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> desde los ecosistemas hacia aguas de escorrentía superficial fue de 8–17 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, correspondiendo el extremo más bajo a los bosques templados del Norte y el más alto a los bosques de coníferas Mediterráneos.

A pesar de que la deposición de N se considera una amenaza potencial para la región Mediterránea (Fenn *et al.* 2003c), y que se ha predicho su incremento desde un promedio de  $\approx 7$  kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> a mediados de los 90s hasta  $\approx 12$  kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en 2050 (Phoenix *et al.* 2006), los efectos potenciales de este fenómeno sobre la biodiversidad han sido raramente estudiados en los ecosistemas mediterráneos de la Europa semiárida (Bobbink *et al.* 2010; Ochoa-Hueso *et al.* 2011). Actualmente la mayor parte de la investigación en los impactos de la deposición de N en ecosistemas Mediterráneos se ha llevado a cabo en California ( Fenn *et al.* 2000, 2003a, 2008, 2010; Takemoto *et al.* 2001; Allen *et al.* 1996, 2005). Estos ecosistemas mediterráneos (bosque mixtos de coníferas, chaparral, matorrales costeros de salvia, etc.) han recibido entradas crónicas de N que

exceden las cargas críticas recientemente calculadas de forma empírica (3 a 17 kg N kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) para varios parámetros del ecosistema (Fenn *et al.* 2008, 2010). La evidencia para esas estimaciones de cargas críticas la han proporcionado experimentos de fertilización en campo o estudios de gradientes geográficos de contaminación (Fenn *et al.* 2008, 2010), y se han basado en diferentes tipos de indicadores (e.g., cambios en la comunidad de líquenes, invasión de hierbas exóticas, descenso en especies de plantas nativas y riqueza en pastos, pérdidas de nitrato por lixiviación, etc.) (Fenn *et al.* 2008, 2010).

La importancia del ciclo de nitrógeno como un agente regulador del clima ha ganado atención recientemente. El efecto más directo del nitrógeno sobre el clima se da a través del óxido nitroso. Este gas de efecto invernadero es el tercero más importante de origen humano y contribuye con un 6% al calentamiento global de origen antrópico (Davidson *et al.* 2012). Pero además, el depósito de Nr del aire sobre la superficie terrestre afecta a los sumideros de carbono mediante dos procesos clave. En primer lugar, la entrada adicional de nitrógeno a menudo favorece el crecimiento de los árboles, que almacenan grandes cantidades de carbono en su madera (Vitousek y Howarth 1991; LeBauer Andy Treseder 2008). En segundo lugar, las entradas de Nr desaceleran la descomposición de material vegetal muerto y de la materia orgánica del suelo en muchos suelos forestales, mas no en todos (de Vries *et al.* 2009; Davidson *et al.* 2012). Aunque se cree que la fertilización por el N atmosférico ha incrementado el almacenamiento de C en la biomasa y en el suelo de los ecosistemas forestales, las estimaciones de la magnitud de este sumidero varían mucho (Peterson y Melillo 1985; Schindler y Bayley 1993; Townsend *et al.* 1996; Holland *et al.* 1997). Diversos estudios han registrado una acumulación de 20-40 kg C/kg N en bosques europeos (de Vries *et al.* 2009).

Se han encontrado respuestas positivas en el crecimiento forestal y en la acumulación de C bajo adiciones de N de bajas a moderadas (Vitousek y Howarth 1991; Aber *et al.* 1995; Bergh *et al.* 1999). Sin embargo, un incremento excesivo en la disponibilidad de N podría debilitar el papel de los bosques como sumideros de C

(Nadelhoffer *et al.* 1999b) y provocar efectos deletéreos sobre los ecosistemas forestales, fundamentalmente en las zonas más industrializadas del hemisferio Norte.

#### **I.4. El síndrome de la Saturación de N**

Las entradas de N pueden estimular inicialmente la productividad de los bosques, pero la acumulación de N en el ecosistema puede llevar subsecuentemente a una saturación por N. La saturación de N ha sido definida de varias formas (Ågren y Bosatta 1988; Aber *et al.* 1989; Stoddard 1994; Binkley y Högberg 1997; Aber *et al.* 1998), pero puede ser considerada de forma general como la eliminación a largo plazo de las limitaciones por N en la actividad biológica, acompañada por un descenso en la capacidad de retención de N (Magill *et al.* 1996), resultando finalmente en incrementos de pérdidas de N del ecosistema y en síntomas de declive forestal (Aber *et al.* 1998).

El modelo conceptual dominante del síndrome de Saturación de N fue propuesto por Aber *et al.* (1989, 1998), a partir de los efectos de la deposición de N observados en bosques templados, como una serie de cambios hipotéticos que ocurrirían a medida que el ecosistema acumulase N a partir de la deposición atmosférica (Figura I.3). En este modelo se considera que el ecosistema atraviesa una serie de fases o estados de saturación de N, en los cuales el estado 0 se corresponde con un ecosistema fuertemente limitado por N, el estado 1 se caracteriza por cambios que indican el aumento en la disponibilidad de N, el estado 2 representa el inicio de síntomas de saturación de N como la creciente lixiviación de nitrato, y el estado 3 representa el estado de declive inducido por el N, en el que disminuye la productividad del bosque y se acelera la lixiviación de nitrato (Aber *et al.* 1998).

A medida que progresa esta secuencia, las entradas de N proporcionan N disponible para las plantas, naturalmente limitadas por N, lo que enriquece los tejidos vegetales y la hojarasca. Posteriormente el N de la hojarasca pasa a la materia orgánica del suelo, estimulando la mineralización del N y la nitrificación, y con el tiempo resulta en elevadas pérdidas de nitrato por lixiviación hacia el exterior del ecosistema. En ecosistemas bajo clima mediterráneo, las altas tasas de nitrificación características (incluso en bosques

limitados por N) junto con el desacople temporal que existe entre los flujos de pérdidas hidrológicas y la demanda de N por parte de las plantas, propician un incremento mucho más rápido de la lixiviación de nitrato en la llamada fase de saturación de N o estado 2 del modelo (Fenn *et al.* 1998).

La acidificación asociada a la lixiviación de nitrato produce el lavado de cationes básicos, y una solubilización de aluminio en el suelo que disminuye la biomasa de raíces finas. La asimilación de nitrato por los árboles se incrementa, con consecuencias para el gasto energético que supone su reducción asimilativa (actividad nitrato-reductasa). Todo ello, junto con la acumulación de N en forma de aminoácidos en los tejidos, fundamentalmente arginina (Rabe y Lovatt 1986; van Dijk y Roelofs 1988), y la existencia de desbalances nutricionales, debilita los árboles, que se tornan más susceptibles frente a otros agentes de estrés (ataque de patógenos, periodos climáticos desfavorables...). Eventualmente, se alcanza una fase de declive caracterizada por una elevada mortalidad de los árboles (Roelofs *et al.* 1985; Schulze *et al.* 1989; McNulty *et al.* 1996).

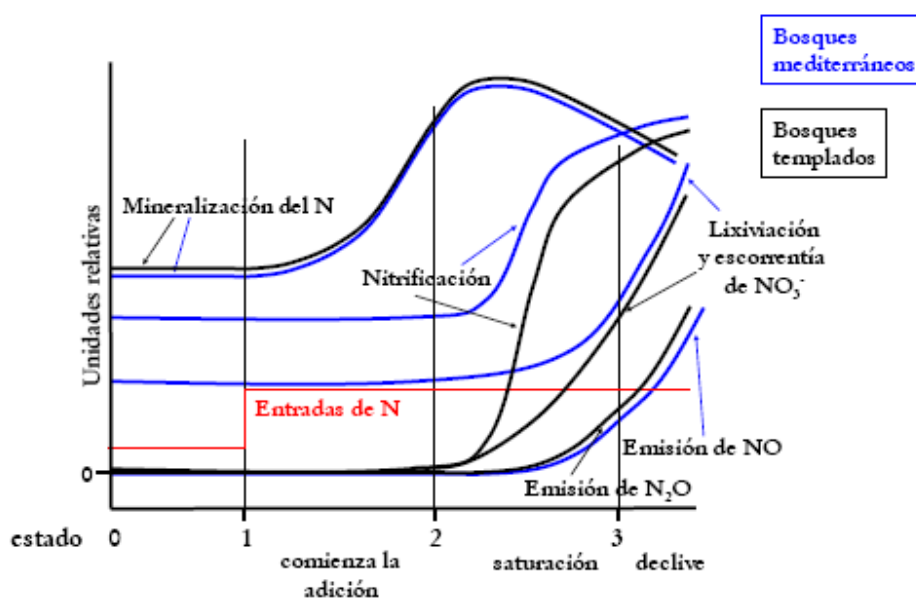


Figura I. 3. Modelo conceptual de las respuestas del suelo de bosques templados y mediterráneos frente a las adiciones crónicas de N (tomado de Salido 2007, a partir de Fenn *et*

*al. 1998).*

La hipótesis de Aber *et al.* (1998) asume que el N se va acumulando en la vegetación y en el suelo hasta que se satura la capacidad de retención de estos sumideros, con una fase relativamente larga entre el comienzo de las entradas de Nr y el lixiviado de  $\text{NO}_3^-$ . Sin embargo, la mayoría de los estudios experimentales en ecosistemas forestales (e.g. Emmett 2007; Moldan y Wright 2011) y experimentos con isótopos (Curtis *et al.* 2011) han mostrado rápidas respuestas en la lixiviación de  $\text{NO}_3^-$  a las entradas de Nr. Lovett y Goodale (2011) establecieron que las pérdidas de N del sistema pueden ser el resultado tanto de una saturación de la capacidad del sistema, si los sumideros de N en la vegetación y en el suelo se ven colmados, como de una saturación de índole cinética, si la acumulación de N en los sumideros ocurre a una tasa menor que la tasa de entrada de N. Esto sugiere que la lixiviación de  $\text{NO}_3^-$  puede ocurrir incluso si la capacidad de retención de N aún no ha sido saturada, hecho que ha sido observado en muchos sitios de estudio. Estos autores establecen un modelo conceptual sobre la saturación de N que enfoca a la simultaneidad con la que ocurren todos los procesos de transformación de N en el suelo, explicándose sobre esta premisa la rapidez con la que el ecosistema responde al Nr añadido (Kopáček *et al.* 2013). Los micrositios en el suelo con diferente disponibilidad de sustrato (donantes de electrones), condiciones redox y tasas de mineralización e inmovilización del N proveen de gran heterogeneidad a pequeña escala e intensos gradientes de propiedades del suelo (Schimell y Bennet 2004; Alewell *et al.* 2004, 2006). Esta microheterogeneidad espacial de condiciones y recursos vendrá seguida por una distribución heterogénea de los microorganismos, y todo ello conectado por fenómenos de flujo difusivo de solutos y de flujo hidrológico convectivo mediados por el agua del suelo (e.g. Ekschmitt *et al.* 2008). Todo esto significa que los procesos microbianos pueden ocurrir simultáneamente en distintos micrositios individuales y dentro de distancias relativamente pequeñas en el suelo, si se dan en ellos las condiciones de disponibilidad de sustrato y energía, y las condiciones ambientales (e.g. humedad, temperatura, pH, toxicidad ambiental, etc.), que los hacen termodinámica- y fisiológicamente posibles.

### **I.5. Factores que influyen sobre la capacidad de retención de N en ecosistemas forestales: Clima y Altitud**

El clima regula los procesos relacionados con la disponibilidad de N en el suelo forestal ya que las precipitaciones y la temperatura controlan tanto las transformaciones de N en el suelo como el consumo biológico (Fenn *et al.* 1996). Los ecosistemas mediterráneos tienen una capacidad limitada para retener entradas de N (Riggan *et al.* 1985; Fenn *et al.* 1996; Fenny Poth 1999), principalmente debido a altas tasas de nitrificación, estaciones de crecimiento cortas y una asincronía temporal entre los flujos de pérdidas hidrológicas y la demanda de N de las plantas, principalmente como consecuencia de periodos de sequía estival seguidos por intensas lluvias otoñales (Fenn *et al.* 1998; Meixner *et al.* 2001).

Los resultados de experimentos de fertilización a largo plazo en bosques templados sugieren que los bosques caducifolios podrían tener una mayor capacidad de retención y asimilación de N que los bosques de coníferas. Así, mientras que las parcelas de caducifolios del Harvard Forest absorbieron más de 900 kg N ha<sup>-1</sup> a lo largo de 8 años de experimento, sin aparente cambio en las ya de por sí bajas tasas de nitrificación neta y lixiviación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Aber *et al.* 1995), las parcelas de coníferas mostraron grandes incrementos en las tasas de nitrificación y de lixiviación de N, así como un descenso en la producción primaria neta e incluso un aumento en la mortalidad.

Se prevé que el aumento de la temperatura debido al cambio climático global, si no viene acompañado de un incremento del estrés hídrico, promoverá la mineralización y la nitrificación, aumentando así la movilidad y disponibilidad de nitrógeno del suelo (Ulrich 1983; Beauchamp y Drury 1991; Van Miegroet y Johnson 1993; Rustad *et al.* 2001; Emmett *et al.* 2004). Se esperan además cambios en la estacionalidad, con sequías más intensas y frecuentes seguidas de eventos de lluvias torrenciales. Como consecuencia, en ecosistemas templados se podrían provocar asincronías temporales (características de ecosistemas mediterráneos) entre los picos de N disponible del suelo, la disponibilidad de agua, y la demanda de N por las plantas, con lo que aumentaría la lixiviación de nitrato y limitaría la capacidad de retención de N observada en estos ecosistemas.

Por otra parte y de forma general, la temperatura desciende hacia una mayor altitud y la mineralización del N en el suelo forestal disminuye con la temperatura (Drury *et al.* 1991). Sin embargo, se han registrado tasas de mineralización del N superiores a mayor altitud en ecosistemas forestales al contrario de lo que cabría esperar (Knoepp y Swank 1998; Fernandez *et al.* 2000). Las diferencias en la disponibilidad de N en el suelo forestal podrían explicar este hecho (Vitousek 1982; Bonito *et al.* 2003). Las entradas atmosféricas de N se incrementan localmente con la altitud debido a las mayores precipitaciones, mayor deposición seca y mayor criptoprecipitación (Lovett y Kinsman 1990; Lovett, 1994) y, de manera general, la mayor disponibilidad de N en el suelo acelera el ciclo del N, con mayores tasas de transformación de este nutriente (Prescott *et al.* 2000). Los cambios altitudinales en la disponibilidad de agua y en el contenido de materia orgánica también contribuyen a explicar este proceso (Knoepp y Swank 1998; Bonito *et al.* 2003).

#### **I.6. Factores que influyen sobre la capacidad de retención de N en ecosistemas forestales: Estructura de la comunidad microbiana del suelo**

Aunque el balance de la integración del conjunto de los mecanismos por los cuales ocurre la retención de N en el suelo forestal aún no se han logrado comprender bien, el papel individual de la inmovilización microbiana del N añadido ha sido bien documentada (Schimely Firestone 1989; Davidson *et al.* 1992; Nadelhoffer *et al.* 1995; Stark y Hart 1997). Por este motivo, el estudio de la estructura y función de la comunidad de microorganismos adquiere una gran importancia a la hora de determinar la capacidad de retención de N en el suelo forestal.

Existe en la actualidad un amplio abanico de nuevas técnicas moleculares para dicho estudio, con una fiabilidad sin precedentes (Tiedje *et al.* 1999). Algunas de ellas posibilitan la comparación directa entre comunidades microbianas en muestras frescas de suelo. Estos métodos se basan en la extracción del ADN de la comunidad microbiana y en su amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Al ADN extraído y amplificado se le puede aplicar un amplio rango de técnicas que generan patrones de bandas de fragmentos de ácidos nucleicos, proporcionando una huella dactilar (*fingerprint*) característica de la comunidad microbiana en cuestión. Las técnicas para separar los

diferentes fragmentos incluyen la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante o de temperatura (D-TGGE), el análisis del espaciador intergénico ribosómico (RISA), y el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP) (Kirk *et al.* 2004; Zak *et al.* 2006). Esta última es una de las técnicas más ampliamente utilizada y se considera una técnica de alto rendimiento y alta reproducibilidad, muy recomendable para la comparación directa de comunidades microbianas (Kirk *et al.* 2004; Zak *et al.* 2006).

Tradicionalmente, el aspecto funcional de la comunidad se ha caracterizado mediante técnicas fisiológicas como la medida de actividades enzimáticas, tasas de nitrificación, respiración y mineralización, así como perfiles de utilización de substratos diversos (ej., Biolog). Las técnicas moleculares han introducido novedades al respecto, ya que permiten enfocar a genes cuya expresión es responsable de procesos biogeoquímicos concretos (genes funcionales). Su estudio facilita información sobre el modo preciso en que los microorganismos regulan los ciclos biogeoquímicos. Combinando secuencialmente las técnicas moleculares de caracterización de la estructura y de la función de las comunidades microbianas, se han desarrollado aproximaciones que permiten acoplar directamente descubrimientos en diversidad microbiológica con la ecofisiología del suelo y su biogeoquímica. Así, sabemos que la mayoría de los procesos importantes para la funcionalidad biogeoquímica de los ecosistemas terrestres, así como para la sostenibilidad de sus ciclos de nutrientes, dependen en última instancia del crecimiento y muerte de poblaciones microbianas o de las enzimas endógenas y exógenas que éstas producen (Tiedje *et al.* 1999).

Otro asunto con amplia tradición en la biogeoquímica forestal es la caracterización de variaciones espacio-temporales en la disponibilidad y en las tasas de transformación de nutrientes en el suelo (Fisher y Binkley 2000). La interpretación de los resultados consistía habitualmente en la búsqueda de correlaciones con factores de estado (mesoclima, litología, tipo de vegetación...), y la subsiguiente sugerencia de que comunidades microbiológicas distintas para cada combinación de éstos y, especialmente, cambios en la actividad de los microorganismos presentes debido a la estacionalidad de las condiciones de temperatura y humedad, estarían en la base de los patrones observados. Las técnicas moleculares abren

ahora la posibilidad de ligar directamente la variación espacio-temporal de la disponibilidad de nutrientes con la de las comunidades microbianas, constatándose en muchos casos que aquella se corresponde con cambios significativos y direccionales en la diversidad de éstas (Hackl *et al.* 2004; Chan *et al.* 2006).

### **I.7. Factores que influyen sobre la capacidad de retención de N en ecosistemas forestales: Inmovilización abiótica de N en el suelo**

Uno de los asuntos sin resolver respecto a la saturación de N en ecosistemas forestales se refiere a los mecanismos por los cuales cantidades muy grandes de N siguen siendo inmovilizadas en los suelos después incluso de haber recibido grandes dosis acumulativas de N. Resultados de experimentos de fertilización en bosques templados sugieren que los suelos, más que las plantas, son el sumidero dominante a largo plazo para el N añadido, y, por inferencia, para las entradas atmosféricas crónicas de N (Gundersen *et al.* 1998; Nadelhoffer *et al.* 1999a). Dicho sumidero está relacionado con mecanismos de inmovilización del N que aún no se han logrado comprender bien. Por ejemplo, evidencias relativamente recientes indican un potencial para incorporación abiótica del N en la materia orgánica del suelo, que no ha sido tenido en cuenta en los modelos conceptuales sobre saturación de N. Tales evidencias parten de experimentos que han registrado una rápida desaparición de nitrato marcado isotópicamente con  $^{15}\text{N}$  ( $^{15}\text{NO}_3$ ) cuando éste se añade a suelos esterilizados, en los que cabe asumir que no operan mecanismos de retención biótica (Davidson *et al.* 1991; Dail *et al.* 2001; Huygens *et al.* 2008). La rápida incorporación del  $^{15}\text{NO}_3$  añadido a formas de nitrógeno orgánico disuelto (DON, de las siglas en inglés) ha sido demostrada para horizontes orgánicos de suelos de bosques templados (Dail *et al.* 2001; Perakis y Hedin 2001). Dail *et al.* (2001) utilizaron dos métodos de esterilización para demostrar que la rápida conversión de  $^{15}\text{NO}_3$  a  $\text{DO}^{15}\text{N}$  en cuestión de minutos tras la adición a horizontes orgánicos fue abiótica. Aunque Perakis y Hedin (2001) no utilizaron un tratamiento de esterilización, la velocidad con la que observaron la conversión de  $^{15}\text{NO}_3$  a  $\text{DO}^{15}\text{N}$  sugiere que un mecanismo abiótico debe haber sido el responsable. Otros estudios también han observado rápidas pérdidas de  $^{15}\text{NO}_3$  en suelos orgánicos del Harvard Forest (Bernston y Aber 2000) y de bosques tropicales (Sotta *et al.* 2008), y en suelos orgánicos y

minerales de hayedos (Corre *et al.* 2003). Sin embargo, este fenómeno aún no ha sido explorado en suelos de ecosistemas mediterráneos y considerando horizontes organominerales.

Hasta ahora no existe un mecanismo probado para la retención abiótica de  $\text{NO}_3$  en la materia orgánica del suelo. La llamada ‘hipótesis de la rueda de hierro’ (Davidson *et al.* 2003) postula que iones  $\text{Fe}^{2+}$  presentes en la solución del suelo podrían mediar en la reducción abiótica de  $\text{NO}_3$  a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ). Este  $\text{NO}_2^-$  reacciona rápidamente con el carbono orgánico disuelto (DOC de las siglas en inglés) mediante reacciones de nitrosación pasando finalmente a formar parte del compartimento de nitrógeno orgánico del suelo, concretamente a su fracción disuelta (DON).

Colman *et al.* (2007) identificaron una potencial interferencia analítica del hierro soluble (Fe) en la cuantificación de  $\text{NO}_3$  en extractos de suelo (tampón  $\text{NH}_4\text{Cl}$ –EDTA) al emplear el método estándar de análisis de inyección en flujo continuo, y advirtieron que esta interferencia podría haber llevado a Dail *et al.* (2001) a conclusiones erróneas sobre la inmovilización abiótica de  $\text{NO}_3$  en su experimento. Esta afirmación no sólo ponía en entredicho la teoría de la retención abiótica de  $\text{NO}_3$  sino también todos los estudios en los que la medida de  $\text{NO}_3^-$  se hubiese realizado por este protocolo estándar.

Davidson *et al.* (2008) reprodujeron el efecto de altas concentraciones de Fe disuelto sobre la cuantificación de  $\text{NO}_3$  por el método estándar registradas por Colman *et al.* (2007) pero también demostraron entre otras cosas que las bajas concentraciones de Fe soluble encontradas en extractos de suelo esterilizado del Harvard Forest no interferían en la recuperación de cantidades conocidas de  $\text{NO}_3^-$  añadidas a dichos extractos, demostrando así la validez de los resultados encontrados por Dail *et al.* (2001). Además, existen como hemos mencionado muchos más estudios que han registrado una rápida pérdida del  $\text{NO}_3^-$  en suelos de la que se puede deducir la existencia de una inmovilización abiótica (Davidson *et al.* 1991; Berntson y Aber 2000; Zogg *et al.* 2000; Perakis y Hedin 2001; Compton y Boone 2002; Corre *et al.* 2003, 2006, 2007; Hall y Matson 2003; Magill *et al.* 2004; Micks *et al.* 2004; Huygens *et al.* 2008; Sotta *et al.* 2008). Mientras que es posible que algunas estimaciones de inmovilización abiótica puedan haberse visto comprometidas por la

interferencia del Fe soluble en la cuantificación de  $\text{NO}_3^-$  como describen Colman *et al.* (2007), Davidson *et al.* (2008) mostraron como este no fue el caso de Dail *et al.* (2001) ni podría haber ocurrido en caso de haberse utilizado el método del tampón imidazol (Huygens *et al.* 2008) así como que resulta improbable que todos los demás estudios contuviesen concentraciones de Fe disuelto lo suficientemente altas como para que dicha interferencia invalide la conclusión de la rápida desaparición de  $\text{NO}_3^-$  registrada.

### **I.8. El pinsapar como modelo experimental para el estudio de la respuesta de los bosques a la deposición de N. Antecedentes.**

Los bosques de *Abies pinsapo* Boiss. son relictos de bosques templados que actualmente ocupan sólo unas 2500 hectáreas en el Sur de la Península Ibérica. Se distribuyen en tres enclaves principales de las cordilleras Béticas, entre 1000 y 1800m de altitud. Durante los periodos glaciares ocuparon mayores extensiones, pero debido a diversos factores como el levantamiento de cordilleras costeras con el choque de las placas tectónicas eurosiberiana y africana, la progresiva aridificación del clima con la disminución de precipitaciones estivales que se inicia a mediados del Mioceno y, finalmente, la alternancia de periodos glaciares y de calentamiento climático interglaciar, las poblaciones de estos abetos se fueron fragmentando quedando restringidos a laderas umbrías con orientación Norte (Linares y Carreira 2006; Linares 2011).

Los pinsapares siguen manteniendo la fisonomía propia de abetales templados aunque se encuentren sometidos a un clima de tipo mediterráneo por su emplazamiento. A pesar de que la precipitación total es comparable a la de regiones templadas, ésta presenta una clara estacionalidad y los periodos de sequía estival demuestran la mediterraneidad del sitio, que se acentúa en las zonas bajas de distribución (Arista *et al.* 1997). Estas características hacen del pinsapar un modelo experimental útil, que permite aproximar el comportamiento biogeoquímico de un bosque de coníferas de tipo templado bajo condiciones de mayor temperatura y estacionalidad climática, especialmente respecto a las precipitaciones, del tipo de las que se predicen para regiones templadas ante el escenario de calentamiento global actual (IPCC 2007a).

Los estudios previos de caracterización de la biogeoquímica de los bosques de pinsapo, efectuados en sus principales localidades (Yunquera y Ronda en Sierra de las Nieves, Sierra de Grazalema, Sierra Bermeja y Sierra Real) en el marco de distintos proyectos de investigación del Plan Nacional (PB98-0309, BOS2000-0897) por el grupo de Ecología Forestal de la Universidad de Jaén, indican que estos abetales relictos muestran una notable variabilidad biogeoquímica (Liétor 2002), pese a su distribución restringida a localidades con condiciones muy definidas tanto micro-climática- como topográficamente (Navarro *et al.* 2006). Dicha variabilidad se debe, por un lado, a diferencias litológicas (calizas *vs* serpentinas), y sucesionales (pinsapares en fase agradativa *vs* pinsapares maduros y viejos) (Liétor *et al.* 2002, 2003; Viñegla *et al.* 2006) y, por otro, a la estacionalidad mediterránea a la que están sometidos que, junto a la elevada precipitación anual más propia de bosques templados, produce una alta variabilidad intra-anual en la disponibilidad de nutrientes (Liétor 2002). Además, se ha identificado un gradiente geográfico W-E de deposición de N que afecta diferencialmente a las distintas masas de pinsapar existentes en la provincia de Málaga (Sierra Bermeja, Yunquera y Sierra Real). Esto, junto a diferencias entre pinsapares en distintas variables del ciclo del N, indica un estado de saturación de N para el pinsapar de Sierra Bermeja, el más próximo al polígono industrial del Campo de Gibraltar, probable fuente contaminante (Salido 2007). Los datos previos muestran altas tasas de mineralización, de nitrificación y de desnitrificación (Liétor 2002), y pérdidas mayores de nitrato por lixiviación en dicho pinsapar, detectables incluso durante la estación de crecimiento (Salido 2007). También se ha encontrado que la inducción de una limitación por P en este pinsapar es el mecanismo subyacente a los síntomas de saturación de N observados (Liétor 2002; Viñegla *et al.* 2006; Blanes 2010; Blanes *et al.* 2012; 2013).

Por último, los datos obtenidos con los proyectos de investigación previos indican que la altitud puede inducir respuestas diferenciales en los mecanismos implicados en la retención de N en la biomasa y en el suelo. En las posiciones basales, a diferencia de las posiciones más elevadas, la temperatura media es superior, así como la magnitud del déficit hídrico, y la fecha de inicio de agotamiento de la reserva hídrica se adelanta. Blanes (2010) encontró en las parcelas a menor altitud una mayor tasa de crecimiento primario de

los árboles, y un mayor incremento en la retención de N por los árboles, en respuesta a una fertilización compensatoria con P, lo que sugiere que las parcelas situadas en una posición más elevada no solo estarían limitadas por P sino también por la temperatura y/o por la duración del periodo de crecimiento.

### **I.9. Hipótesis de trabajo y objetivos**

Cómo se ha comentado previamente, los ecosistemas mediterráneos tienen intrínsecamente una capacidad limitada para retener entradas de N (Riggan *et al.* 1985; Fenn *et al.* 1996; Fenn y Poth 1999), principalmente debido a altas tasas de nitrificación, a estaciones de crecimiento cortas y a una asincronía temporal entre los flujos de pérdidas hidrológicas y la demanda de N de las plantas, principalmente como consecuencia de periodos de sequía estival seguidos por intensas lluvias otoñales (Fenn *et al.* 1998; Meixner *et al.* 2001). Cabría esperar que en un escenario de cambio climático con consecuencias de desacoplamiento estacional de los procesos de retención y de pérdida de N, la eficiencia de los mecanismos que confieren capacidad de retención biótica y abiótica de N en el suelo disminuirán. En este sentido, proponemos que la susceptibilidad de los ecosistemas forestales templados al desarrollo del síndrome de saturación de N podría verse incrementada bajo los escenarios de cambio climático propuestos para estas regiones (IPCC 2007a).

La hipótesis general del presente trabajo plantea, en términos metodológicos, que los bosques de *Abies pinsapo* representan un buen modelo experimental para explorar el tipo de cambios que cabe esperar (de materializarse los escenarios de cambio climático previstos) en los bosques templados respecto a los efectos biogeoquímicos de la deposición crónica de N. En términos conceptuales, plantea que los suelos de los bosques de *Abies pinsapo* mostrarán menor capacidad de retención de N en general que la registrada en ecosistemas forestales templados propiamente dichos, y que tal capacidad de retención será inferior en pinsapares con cierto grado de saturación de N que en aquéllos limitados por N.

De acuerdo con dicha hipótesis general se desarrollaron los siguientes objetivos específicos e hipótesis particulares:

**Objetivo 1.** Evaluar el efecto de las principales fuentes de variación (estado sucesional, deposición de N, litología) sobre la biogeoquímica y disponibilidad de N en el suelo de los pinsapares.

Como hipótesis particular proponemos que el efecto del estado sucesional y de los niveles de deposición de N será de mayor magnitud que el debido a diferencias litológicas. Es bien sabido que el ciclo del N muestra un grado de control geoquímico mucho menor que el que muestran otros ciclos de elementos esenciales como el P (Stevenson 1986). Asimismo, existen numerosos antecedentes sobre el papel crítico que desempeña el estatus sucesional del bosque sobre los balances de entradas/pérdidas de N en los bosques (Nutrient Retention Hypothesis, Vitousek y Reiners 1978), sobre la acumulación de N en la materia orgánica del suelo (Vitousek *et al.* 1989; Goodale *et al.* 2000), y sobre la magnitud y estrategias de uso del N por parte de las comunidades microbianas (Schimann *et al.* 2008; Gömöryová *et al.* 2013) y vegetales (Tilman 1987).

En este contexto se analizaron distintas fracciones y tasas de transformación del N (potencial de nitrificación y desnitrificación, nitrificación y mineralización neta del N), abundancia natural de  $^{15}\text{N}$  y tasa de respiración en el suelo de pinsapares que permiten comparaciones pareadas de los efectos del desarrollo sucesional, la deposición atmosférica de N y la litología.

**Objetivo 2.** Evaluar el efecto de la adición de fuentes de C y N fácilmente disponibles sobre la biogeoquímica del N y la actividad microbiana en el suelo de los pinsapares.

La disponibilidad de C y de N en el suelo para el crecimiento microbiano desempeña un papel crucial en la regulación del ciclo de los nutrientes en los bosques (Magill y Aber 2000). Aunque la nitrificación y la mineralización neta del N aumentan con la disponibilidad de N (Aber *et al.* 1989, Van Miegroet *et al.* 1992), si la disponibilidad de C no aumenta vía trascolación, exudados de las raíces o por la descomposición, entonces la mineralización del N estaría limitada en cambio por la ausencia de una fuente lábil de C (Magill y Aber 2000).

En este sentido, realizamos un experimento de laboratorio de adición de fuentes lábiles de C y N, como elementos potencialmente limitantes de la actividad microbiana, para evaluar la respuesta del suelo de pinsapares que representan un gradiente de limitación-saturación de N en términos de las tasas de respiración y de mineralización y nitrificación netas. Esperamos que la actividad microbiana estará en general más limitada por C que por N, pero que la adición conjunta de C+N mostrará efectos sinérgicos de mayor grado sobre las variables medidas a menor grado de saturación de N.

**Objetivo 3.** Analizar la variabilidad en la estructura de las comunidades bacterianas (generales, y de desnitrificantes), y las relaciones entre dicha estructura y su funcionalidad biogeoquímica, en el suelo de pinsapares con distinto grado de disponibilidad de nitrógeno.

Se ha observado que el enriquecimiento en N puede alterar la composición de la comunidad bacteriana del suelo en bosques templados (Frey *et al.* 2004; Waldrop *et al.* 2004; Nemergut *et al.* 2008; Krumins *et al.* 2009; Eisenlord y Zak 2010; Campbell *et al.* 2010; Weand *et al.* 2010). La hipótesis a testar con este objetivo es que la distinta disponibilidad de N observada en el suelo de distintos pinsapares (pinsapares con distintas entradas de N atmosférico y pinsapares en distinto estacional) se corresponde con cambios en la estructura de la comunidad bacteriana de sus suelos (huella dactilar a escala microscópica).

En los ecosistemas Mediterráneos, la disponibilidad de agua es el principal factor ambiental limitante debido a la combinación en verano de altas temperaturas y bajas precipitaciones (Specht y Moll 1983; Larcher 2000) lo que limita en gran medida la actividad de los microorganismos (Sardans y Peñuelas 2005; Davidson y Janssens 2006). La segunda hipótesis que proponemos en este trabajo es que la estacionalidad mediterránea produce cambios en la estructura de la comunidad bacteriana del suelo de los pinsapares además de en su actividad.

Para ello se obtuvieron los perfiles (T-RFLP) de la comunidad bacteriana y de la comunidad desnitrificante del suelo de pinsapares con distinta disponibilidad de N.

**Objetivo 4.** Evaluar el efecto del grado de saturación de N sobre la eficiencia de la retención del N (balance entre entradas por trascolación y/o adición experimental, y salidas por lixiviación), y su variabilidad intra-anual, en los pinsapares.

Los resultados de experimentos de fertilización a largo plazo en bosques templados de Estados Unidos (Harvard Forest) y Europa (proyecto NITREX) han demostrado una gran capacidad de retención y asimilación de N en el suelo forestal de estos bosques incluso al someterlos a elevadas entradas de N (Aber *et al.* 1995; Tietema *et al.* 1998; Dise *et al.* 1998; Nadelhoffer *et al.* 1999; Magill *et al.* 2004). Nosotros planteamos que los suelos de los bosques de *Abies pinsapo* mostrarán menor capacidad de retención de entradas experimentales de N que la registrada en ecosistemas forestales templados propiamente dichos debido a la estacionalidad mediterránea (Fenn *et al.* 1996).

Además, los resultados en experimentos de fertilización con N realizados a bosques templados con distinta disponibilidad de N han puesto de manifiesto una menor retención del N añadido a mayor disponibilidad de N (Gundersen *et al.* 1998; Tietema *et al.* 1998). En este estudio proponemos que la inmovilización del N añadido será inferior en pinsapares con síntomas de saturación de N que en aquéllos limitados por N.

Para testar la influencia de las tasas de deposición atmosférica de N sobre la eficiencia de retención del N en el suelo de los pinsapares, se realizó un experimento de fertilización y marcaje *in situ* con  $^{15}\text{N-NO}_3$  en los pinsapares situados en ambos extremos del gradiente de deposición de N: Sierra Bermeja (con síntomas de saturación de N) y Yunquera, en la Sierra de las Nieves (pinsapar con evidencias de limitación por N). Se realizó el seguimiento de las entradas de N por trascolación y de las salidas por lixiviación a lo largo de un año hidrológico. Asimismo, se analizaron los cambios en la disponibilidad de N y los porcentajes de recuperación del N marcado en distintos compartimentos del suelo y en los lixiviados.

**Objetivo 5.** Evaluar si existe capacidad de retención abiótica del nitrato y, en su caso su magnitud, en dos suelos de carácter mediterráneo con distinto grado de disponibilidad de N; y disipar dudas de carácter metodológico sobre la fehaciencia de este proceso.

Cómo se ha mencionado previamente, existen evidencias de una rápida inmovilización abiótica de  $\text{NO}_3^-$  en el suelo de bosques templados (apartado I.7), lo que podría explicar la gran cantidad de N retenido en estos suelos incluso estando sometidos a elevadas entradas de N (Gundersen *et al.* 1998; Nadelhoffer *et al.* 1999a), pero este proceso no ha sido testado en ecosistemas mediterráneos. Como primera hipótesis proponemos que los suelos de bosques de *Abies pinsapo* mostrarán menos capacidad de inmovilización abiótica de N en general que la registrada en ecosistemas forestales templados debido a la ya mencionada limitada capacidad de los ecosistemas mediterráneos para retener las entradas de N (Riggan *et al.* 1985; Fenn *et al.* 1996; Fenn y Poth 1999).

Por otra parte, distintos estudios sugieren un descenso en la retención abiótica de  $\text{NO}_3^-$  con el enriquecimiento en N de suelos de bosques templados (Bernston y Aber 2000; Corre *et al.* 2007). Lo que nos lleva a plantear como segunda hipótesis que las tasas de inmovilización abiótica de  $\text{NO}_3^-$  en el suelo será mayor en pinsapares limitados por N que en pinsapares con indicios de saturación de N.

En este contexto, seleccionamos suelos de dos masas de pinsapar, uno limitado por N y otro con síntomas de saturación de N. Se realizó un experimento en laboratorio de marcaje con  $^{15}\text{N}\text{-NO}_3$  con el objetivo de testar el potencial para la inmovilización abiótica del  $\text{NO}_3^-$  en el suelo de los pinsapares y la influencia del grado de disponibilidad de N en dicho potencial.

Por último, para disipar dudas sobre una posible interferencia del Fe en el análisis de las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  mediante análisis de inyección en flujo, se tuvieron en cuenta las recomendaciones de Davidson *et al.* (2008): se determinaron las concentraciones de Fe soluble en los extractos de suelo realizados con  $\text{K}_2\text{SO}_4$  y se realizó la adición de estándares de  $\text{NO}_3^-$  a dichos extractos. Además, se analizaron las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  en extractos de las mismas muestras pero realizados con agua mediante cromatografía iónica además de por análisis de inyección en flujo para comparar los resultados de ambas técnicas.



## ***II. Material y Métodos***



## II.1. Objeto de estudio: el pinsapo

El pinsapo (*Abies pinsapo* Boiss.) es una especie relictica de abeto circunmediterráneo que se diferenció respecto a una especie ancestral de más amplia distribución debido a la sucesión de alternancias climáticas, con periodos húmedos y secos, que se dieron fundamentalmente en el Plioceno y que produjeron un fenómeno de fragmentación en poblaciones cada vez más pequeñas y aisladas (Linares 2011). La sequía estival, inherente al clima que se consolidó entonces en la cuenca mediterránea, constituyó un mecanismo de presión selectiva que promovió la adquisición de caracteres xero-heliófilos en *A. pinsapo*. Estos procesos, junto a la existencia de refugios locales en cordilleras costeras del Mediterráneo occidental durante la alternancia de periodos glaciares Cuaternarios, permitieron la especiación y la supervivencia de esta especie. Actualmente, sus poblaciones se localizan en áreas de pluviosidad alta-muy alta (por encima de los 1000 mm anuales) y generalmente en orientaciones N, E o NE (Figura II.1).



Figura II. 1. Pinsapar de Grazalema en la ladera norte de la Sierra del Pinar. Cádiz.

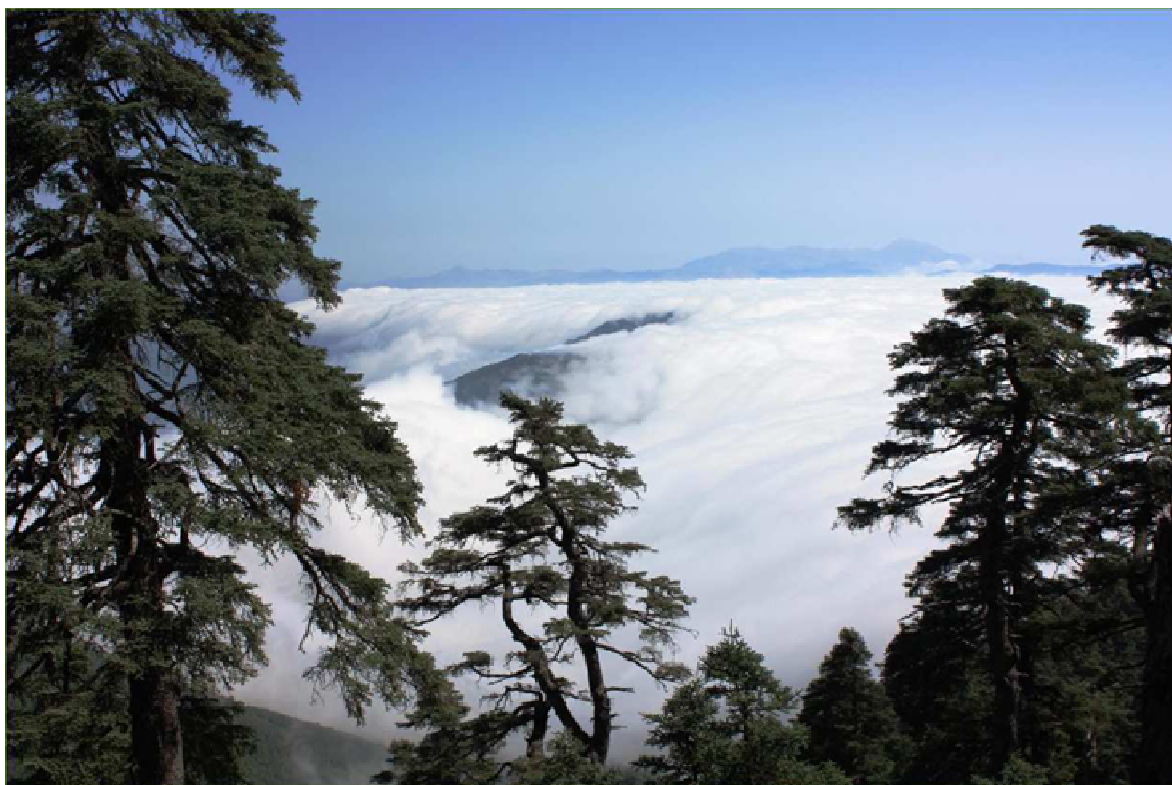
Así, los pinsapares del sur de la Península Ibérica constituyen relictos de bosques templados de coníferas que en la actualidad se encuentran sometidos a las constricciones de un clima típicamente mediterráneo, con una marcada estacionalidad en las precipitaciones y periodos de prolongada e intensa sequía estival. Sin embargo, siguen mostrando propiedades estructurales y biogeoquímicas propias de bosques templados, aunque bajo las temperaturas y estacionalidad propias de bosques mediterráneos de coníferas.

Esta conjunción de singularidad biogeográfica y condiciones climáticas subóptimas en su área de distribución actual, convierten a los bosques de *Abies pinsapo* en un objeto de estudio excepcional. Se trata de bosques cuya fisionomía y carácter de la especie dominante muestran rasgos propios de bosques de coníferas templados (Figura II.2), pero que están sujetos a una estacionalidad climática de tipo Mediterráneo en el presente.



**Figura II. 2.** La fisionomía de los pinsapares se asemeja a la de bosques de coníferas templado-boreales. Cañada Ánimas, Ronda.

En este trabajo de Tesis empleamos los pinsapares como modelo experimental para evaluar la robustez de la teoría Biogeoquímica forestal (ciclo del N), que pudiera estar sesgada ya que se ha desarrollado fundamentalmente sobre estudios en regiones templadas (Likens y Bornman 1995). Por otro lado, nuestros estudios previos indican que los pinsapares son ecosistemas especialmente vulnerables a distintos componentes del cambio global (cambio climático y de usos del territorio, deposición de N; Salido 2007; Linares 2008; Blanes 2010) y contamos con un amplio juego de parcelas de muestreo previamente caracterizadas al respecto. La superficie total con presencia de *A. pinsapo pinsapo* es de algo menos de 4000 ha en la actualidad (Navarro *et al.* 2006), localizándose entre los 900 y 1800 metros de altitud en las montañas del S-SW de la Península Ibérica (existe una superficie similar con presencia de las subespecies *maroccana* y *tazaotana* en el Rift occidental en Marruecos). No obstante, los bosques con dominancia de esta especie comprenden sólo unas 2400 ha en tres núcleos principales en las serranías penibéticas: en el Parque Natural de la Sierra de las Nieves y en el Paraje Natural de los Reales de Sierra Bermeja en la provincia de Málaga, y en el Parque Natural de la Sierra de Grazalema en la provincia de Cádiz. En toda la Serranía de Ronda, el clima aparece condicionado por su carácter de barrera natural a los frentes húmedos atlánticos que penetran por el Golfo de Cádiz, siendo de especial interés en Sierra Bermeja (Figura II.3) las precipitaciones indirectas provocadas por las abundantes nubes y nieblas que se encumbran en la sierra producidas por los vientos húmedos costeros (Salido 2007). La temperatura oscila entre 0 y 5°C de media durante el mes de enero y entre 18 y 22°C en el mes de agosto (Rosuá *et al.* 2001).



**Figura II. 3. Las frecuentes nieblas en Sierra Bermeja le confieren el carácter de refugio microclimático.**

Los pinsapos se localizan en dos unidades edáficas bien diferenciadas (Mapa de Suelos de Andalucía, Junta de Andalucía, 2005). Por un lado, el pinsapo se localiza en las serranías de la Penibética, sobre calizas y dolomías, de relieve accidentado con pendientes escarpadas y superiores en muchos casos al 30% (Rosuá *et al.* 2001). Por otro lado, los pinsapares de Sierra Bermeja y de Sierra Real se localizan en uno de los mayores afloramientos del mundo de una roca intrusiva de carácter ultrabásico, donde dominan peridotitas y serpentinas ricas en minerales pesados y que originan un suelo de fina textura (Figura II.4). Este suelo es muy rico en óxido de hierro y es muy importante la existencia de desequilibrios Mg/Ca en el complejo de cambio, y la presencia de ciertos metales como níquel, cobalto, cromo, molibdeno, etc., que impide el desarrollo adecuado de muchas plantas que no son capaces de resistir altas concentraciones de metales pesados. Sin embargo el pinsapo es capaz de vivir en diferentes sustratos siempre que las condiciones climáticas lo permitan.

En localidades con condiciones climáticas favorables, el pinsapo tiende a constituir

masas prácticamente monoespecíficas y densas. El ambiente sombrío y el suelo cubierto de acículas de difícil descomposición no favorece el desarrollo de arbustos y herbáceas. Por el contrario, los musgos y líquenes son muy abundantes. Hacia las zonas de menor altitud y con componente de solana, pinos (*Pinus halepensis* en la Sierra de las Nieves, y *P. pinaster* en Sierra Bermeja) y encinas van progresivamente desplazando al pinsapo. Si se trata de umbrías, el pinsapo se mezcla con el quejigo. En áreas donde se ha sufrido alguna perturbación mayor como el fuego, el pastoreo o la extracción de leña abusivos, el pinsapar ha sido sustituido por matorrales de carácter heliófilo. En su límite altitudinal superior, el bosque se vuelve más abierto, con rodales discontinuos y ejemplares achaparrados. Aquí el pinsapar contacta con una formación de pequeños arbustos espinosos y almohadillados típicos de la alta montaña mediterránea. En ocasiones, bosques abiertos de quejigo coronan el pinsapar, a causa de estas condiciones más soleadas o venteadas de las cumbres (Salido 2007).



**Figura II. 4. Contacto entre materiales calcáreos y serpentínicos en la Sierra de las Nieves, Málaga**

## II.2. Diseño experimental general y características de las parcelas de estudio

Como se comentó en el apartado I.8 de la Introducción, los estudios previos de caracterización de los principales bosques de pinsapo (Yunquera y Ronda en Sierra de las Nieves, Sierra de Grazalema, Sierra Bermeja y Sierra Real) indican una elevada variabilidad biogeoquímica entre las distintas localidades debido a diferencias de litología, de estado sucesional y de tasas de deposición atmosférica de nitrógeno (Liétor *et al.* 2002; Liétor *et al.* 2003; Viñegla *et al.* 2006; Salido 2007). Al contraste entre localidades respecto a la litología dominante (materiales calcáreos en las Sierras de las Nieves y de Grazalema, serpentinas en las Sierras Bermeja y Real), se añade una elevada variedad de tipos estructurales de pinsapar, atribuible a diferencias en el régimen de perturbación que ha derivado del uso histórico particular en cada territorio (Linares 2011).



Figura II. 5. Localización geográfica de los sitios de muestreo: pinsapares de Yunquera (Y) y de Ronda (R) en la Sierra de las Nieves, pinsapar de Sierra Real (SR), y pinsapar de Sierra Bermeja (sitios BP y B).

Así, dentro de la Sierra de las Nieves, se encuentran desde pinsapares con atributos estructurales propios de bosques viejos (“old-growth”), en el término municipal de Ronda, a bosques jóvenes con estructura de latizal y fustal bajo-medio, en el término municipal de Yunquera. Por otro lado, los pinsapares de Sierra Bermeja, Sierra Real y Yunquera-Sierra de las Nieves, se localizan a lo largo de un gradiente de deposición de N asociado a un gradiente geográfico de distancia a la zona industrial del Campo de Gibraltar (Figura II.5), siendo presumiblemente ésta zona el origen mayoritario de las emisiones gaseosas y la fuente principal de N inorgánico que se deposita sobre el pinsapar de Sierra Bermeja. Este pinsapar es el más cercano al Campo de Gibraltar y el que se encuentra en una fase incipiente de saturación de N, mientras que los de Sierra Real y Yunquera están limitados por N (Salido 2007; Blanes *et al.* 2012 a, b y c).

Considerando los antecedentes reseñados, para la realización de esta Tesis se seleccionó un juego de un total de cinco sitios de muestreo, comparables desde el punto de vista topográfico y mesoclimático, pero que recogen el rango de variabilidad existente en los pinsapares andaluces en términos de litología, estructura del dosel y tasas de deposición atmosférica de N (Tabla II.1.A). Los distintos muestreos se efectuaron, entre la primavera de 2005 y el verano de 2008, en parcelas permanentes de seguimiento, valladas, de entre 0.5 y 1 ha, e instaladas en dichos sitios en el marco del II Plan de Recuperación del Pinsapo (Consejería de medio Ambiente, Junta de Andalucía). Las propiedades generales del suelo en los sitios de muestreo se recogen en la Tabla II.1.B.

**Tabla II.1.A. Principales fuentes de variación, localización y rasgos fisiográficos del conjunto de pinsapares objeto de estudio. Localidades: BP y B, Sierra Bermeja (Estepona-Jubrique); SR, en Sierra Real (Instán); Y (Yunquera, Cañada del Alcornicalejo) y R (Ronda, Cañada de las Ánimas), en la Sierra de las Nieves. Estado sucesional: 1, agradativo, inicio fase exclusión de tallos (~ latizal alto); 2a: agradativo, transición exclusión tallos a reinicio sotobosque (~ fustal bajo-medio); 2b: agradativo, transición exclusión tallos a reinicio sotobosque (~ fustal medio); 3: maduro, bosque “viejo” (“old-growth”). B. Clasificación de los suelos y propiedades generales del suelo superficial en las localidades de estudio (a partir de datos de Liétor 2002 y Blanes 2010).**

Localidades:	Sierra Bermeja		Sierra Real	Sierra de las Nieves	
Referencia:	B	BP	SR	Y	R
<b>A. Características fisiográficas y climáticas</b>					
Substrato litológico	Serpentinas	Serpentinas	Serpentinas	Calizas-dolomías	Calizas-dolomías
Estado sucesional	2a-2b	2b	2a	1-2a	3
Distancia al área industrial (km)	35	35	60	70	64
Deposición bruta <sup>§</sup> (kg N <sub>min</sub> ha <sup>-1</sup> año <sup>-1</sup> )	10.4	7.8	3.5	4.9	-
Trascolación neta <sup>§</sup> (kg N <sub>min</sub> ha <sup>-1</sup> año <sup>-1</sup> )	-	14.4 <sup>b</sup>	3.7 <sup>a</sup>	6.7 <sup>a</sup>	-
Estatus de N <sup>&amp;</sup>	Saturación (P limitante)	Saturación (P limitante)	Limitación	Limitación	Co-limitación con P
Longitud	5°12'26"	5°12'07"	4°58'14"	4°57'52"	5°0'35"
Latitud	36°29'09"	36°29'26"	36°36'58"	36°43'31"	36°4'37"
Altitud (m.s.n.m.)	1400	1200	1200	1200	1240
Orientación	NE	NE	NE	NE	NW
Pendiente media (%)	73	61	51	39	41
<b>B. Características del suelo</b>					
Tipo de suelo	Hapludolls oxiácuicos		Dystroudep lítico	Haploxerept típico	Calcixeroll típico
Biomasa raíces finas (mg <sub>raíz</sub> cm <sup>-3</sup> <sub>suelo</sub> )	3.6 (2.2)	3.3 (2.1)	6.5 (2.3)	7.0 (4.2)	4.0 (1.7)
pH (CaCl <sub>2</sub> )	5.80 (0.06)	6.10 (0.03)	6.27 (0.05)	7.43 (0.07)	7.01 (0.08)
Materia orgánica (%)	11.4 (4.6)	16.0 (3.9)	12.9 (2.9)	10.6 (4.5)	21.5 (4.1)
Arena (%)	59.1 (9.8)	56.9 (3.0)	68.5 (1.9)	33.8 (5.2)	42 (10.9)
Limo (%)	29.7 (8.3)	30.6 (0.7)	19.4 (1.2)	44.0 (6.5)	24.8 (5.1)
Arcilla (%)	11.2 (2.0)	12.5 (3.2)	12.1 (0.8)	22.2 (4.9)	32.3 (6.3)
C IC (meq/100g)	27.3 (5.1)	34.5 (4.1)	30.1 (2.1)	27.8 (3.5)	36.7 (5.8)

§: Liétor (2002), Salido (2007) y (Torres-Cañabate *et al.* 2008). Tasas de deposición bruta estimadas a partir de mediciones en distintos periodos de tiempo entre Febrero de 2000 y Mayo de 2006, cubriendo un período total de 910 días para Y y B, 665 días para BP y 455 días para SR. Los datos de trascolación corresponden al año 2004.

&: Liétor (2002) y Blanes (2010). Evaluación del nutriente limitante mediante la técnica de incubación *in situ* de cilindros fertilizados de crecimiento de raíces (Raich *et al.* 1994).

El limitado número de localidades con pinsapares y la reducida extensión de los mismos hace imposible la selección de lugares de muestreo adicionales con los que conseguir un diseño experimental más completo, que incluyera todas las combinaciones posibles entre los factores considerados, manteniendo al mismo tiempo los requerimientos de homogeneidad para otras posibles fuentes de variación. El juego de parcelas seleccionado permite, en todo caso, hacer las siguientes comparaciones pareadas que cumplen dichos requisitos:

Dos de las localidades de muestreo empleadas se ubican en la Sierra de las Nieves, en los pinsapares sobre substrato calcáreo de Yunquera (Y) y de Ronda (R). Estos dos sitios permiten comparar el efecto de diferencias estructurales y de desarrollo sucesional en pinsapares calcícolas a baja altitud y sometidos a tasas reducidas de deposición atmosférica de N (Tabla II.2). Así, el sitio Y en el pinsapar de Yunquera se trata de un bosque joven, regenerado desde una situación muy degradada a partir de la adopción de medidas de protección en la década de 1960 (Figura II.6). Actualmente presenta una estructura del dosel forestal del tipo latizal alto a fustal bajo-medio, en fase sucesional de exclusión de tallos a reiniciación del sotobosque (Linares y Carreira 2009). Por otro lado, el sitio R en el pinsapar de Ronda se caracteriza por una estructura del dosel con distribución de tamaños en forma de “J” invertida, propia de bosques viejos (“old-growth” en la terminología anglosajona) que no han sufrido una perturbación mayor en mucho tiempo.

Los tres lugares de muestreo restantes corresponden a pinsapares serpentínícolas con estructura del dosel de tipo fustal bajo-medio a medio, en transición entre las fases sucesionales de exclusión tallos y de reinicio del sotobosque (Tabla II.1.A). Dos de ellos se localizan en el pinsapar de Sierra Bermeja, afectado por tasas elevadas de deposición de N: los sitios BP a baja altitud (1200 m) y B a mayor altitud (1400 m) en la cima de dicha sierra.

El tercer pinsapar serpentínicola se localiza a baja altitud en la Sierra Real (sitio SR), que recibe niveles reducidos de deposición de N. Por tanto, la comparación BP *versus* SR permite evaluar efectos de diferencias en deposición de N, manteniendo homogéneas el resto de fuentes de variación (Tabla II.2). La comparación BP *versus* B permite evaluar el efecto de diferencias de altitud dentro de una localidad con síntomas de saturación de N. Finalmente, la comparación Y *versus* SR es adecuada para testar efectos de diferencias litológicas en pinsapares basales sujetos a niveles bajos de deposición de N.



**Figura II. 6. Cambio en los usos territorio en el pinsapar de Yunquera a partir de las medidas de protección tomadas en los sesenta, Pinsapar joven en la actualidad con estructura latizal alto-fustal bajo/medio.**

**Tabla II. 2. Comparaciones pareadas entre las localidades de estudio que permiten testar el efecto de alguna de las principales fuentes de variación consideradas en esta Tesis, manteniendo homogéneas el resto.**

Comparaciones pareadas entre localidades:	Efecto que permiten testar:	Fuentes de variación para las que existe homogeneidad <sup>§</sup> :			
		Estado sucesional	Deposición de N	Litología	Altitud
Y vs R	Estado sucesional (joven vs viejo)		↓	C	↓
SR vs BP	Deposición N (baja vs alta)	J		S	↓
Y vs SR	Litología (calcárea vs serpentinas)	J	↓		↓
BP vs B	Altitud (1200 vs 1400 m)	J	↑	S	

§: Estado sucesional: J, pinsapares jóvenes en estado agradativo, estructura tipo latizal-fustal.  
 Deposición de N: ↓, < 7 kg N<sub>mineral</sub> ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>; ↑, > 10 kg N<sub>mineral</sub> ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>.  
 Litología: C, sustratos calcáreos; S, serpentinas y peridotitas.  
 Altitud: ↓, 1200 m.

De este conjunto de cinco sitios de muestreo, se seleccionó el subconjunto apropiado en función de las especificidades y requerimientos del Objetivo concreto que se tratara (Tabla II.3):

Así, para acometer el Objetivo 1, relativo a la evaluación del efecto de las principales fuentes de variación (estado sucesional, deposición de N, litología) sobre la biogeoquímica y disponibilidad de N en el suelo, se seleccionaron las parcelas R, Y, SR y BP; descartándose B que difiere de las anteriores en altitud. Ese mismo juego de parcelas fue empleado para los Objetivos 2 y 3, que evalúan, respectivamente, los efectos de la adición de una fuente de N y/o C disponible sobre la biogeoquímica del N y la actividad microbiana del suelo, y la correspondencia entre disponibilidad de N y estructura de las comunidades microbianas.

En relación al Objetivo 4, se contrastaron el sitio Y (limitado por N) con los sitios BP y B (saturado por N). Idealmente, habría sido oportuno incluir también el sitio SR, con sustrato serpentínico, pero resultó operativamente imposible; este objetivo requería una

frecuencia de muestreos elevada, lo que resultaba impracticable para el caso del sitio SR dada su muy mala accesibilidad (el carril de acceso quedó cortado tras lluvias torrenciales y no fue reparado en el tiempo requerido).

Para el objetivo 5, relativo a la comprobación de la operatividad bajo clima de tipo Mediterráneo del mecanismo de retención abiótica de nitrato postulado en la hipótesis de la “rueda de hierro” (Davidson *et al.* 2003), se seleccionaron las parcelas Y y BP. Esta combinación permitía incluir un bosque con baja y otro con alta disponibilidad de N. Tratándose de un objetivo de chequeo y de comprobación metodológica, las diferencias litológicas eran irrelevantes en este caso. Por un lado, se pretendía comprobar si el mecanismo postulado de retención abiótica de nitrato que, según casos, parece operar en suelos de regiones templadas y tropicales, era también observable en suelos Mediterráneos. Por otro lado, se trataba de descartar que los indicios de retención abiótica de nitrato en suelos resulten de un artefacto del método espectrofotométrico empleado para medir nitrato, debido a posibles interferencias con el Fe, como habían apuntado algunos autores (Colman *et al.* 2007).

**Tabla II. 3. Subconjunto de los sitios de muestreo considerado en cada uno de los objetivos de la tesis.**

OBJETIVO:	Sitios de muestreo considerados:				
	R	Y	SR	BP	B
1. Evaluación general del efecto de las fuentes de variación principales.	X	X	X	X	
2. Efecto de la adición de fuentes de N y de C fácilmente disponibles.	X	X	X	X	
3. Relación funcionalidad biogeoquímica/estructura comunidades microbianas.	X	X	X	X	
4. Efecto de la deposición de N sobre la eficiencia de retención del N.		X		X	X
5. Mecanismos específicos de retención: ¿inmovilización abiótica de nitrato?		X		X	

### **II.3. Métodos del Objetivo 1, “Evaluación general de la biogeoquímica y disponibilidad del N en el suelo de los pinsapares: fuentes de variación principales”**

#### **II.3.1. Concentraciones en distintas fracciones y tasas de transformación del N**

Para acometer el Objetivo 1 se muestrearon los suelos de los pinsapares de las localidades Y, R, BP y SR, que permiten comparaciones pareadas de los efectos del desarrollo sucesional, la deposición atmosférica de N y la litología (Tabla II.2). Se realizaron tomas de muestras en dos fechas del año (transición marzo a abril y mitad de julio) para evaluar, adicionalmente, cambios estacionales entre el periodo primaveral con condiciones favorables y el estival con fuerte déficit hídrico. En cada sitio y estación del año se tomaron aleatoriamente 5 muestras compuestas tanto del horizonte Ah del suelo (primeros 10 cm de profundidad) como de la hojarasca (capas L+F). Cada muestra compuesta resultó a su vez de la mezcla de 4 muestras individuales. Las muestras fueron tamizadas en fresco, las de suelo por un tamiz de luz (2 mm) y las de hojarasca en cascada de tamices (2 y 1 mm).

En sub-muestras frescas de estas muestras se midieron distintas variables dependientes relacionadas con el ciclo del N y del C, incluyendo indicadores de reservas de distintas fracciones de nutrientes e indicadores de tasas de procesos biogeoquímicos. Los detalles del procedimiento analítico empleado para la medida de cada una de estas variables se reseñan en el apartado II.8.

Se consideraron las siguientes fracciones de nutrientes:

- ✓ C total ( $C_t$ ) y N total ( $N_t$ ) (Analizador Elemental CHNS-O Flash Series EA).
- ✓ N inorgánico disponible ( $N_i$ ), extraíble en solución 2M de KCl (Keeney y Nelson 1985), mediante análisis espectrofotométrico de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en los extractos con autoanalizador de flujo segmentado (ALLIANCE FUTURA).

Como indicadores de procesos, se midieron:

- ✓ Tasas de desnitrificación potencial (método de inhibición con acetileno y medida de la producción de óxido nitroso; Klemmedtsson *et al.* 1977).
- ✓ Tasas de nitrificación potencial en ausencia de limitación por sustrato (método de adición de amonio e incubación aeróbica breve con inhibidor de la oxidación del nitrito producido; Kandeler 1996).
- ✓ Tasas netas de mineralización del N (MNN) y de nitrificación (NN) (medidas exclusivamente en las muestras de primavera, método de incubación aeróbica a 23°C en oscuridad, sin adición de sustrato, durante 1 mes; Hart *et al.* 1994).
- ✓ Tasas de respiración (incubación durante 1 semana a 23°C, y humedad de campo y secuestro del CO<sub>2</sub> producido en trampa alcalina; Anderson 1982).

Todas las variables medidas dos veces (primavera y verano) se evaluaron mediante ANOVA de medidas repetidas con la “estación del año” como factor de agrupamiento y los factores “localidad” (Y, R, BP, SR), y “compartimento” (hojarasca, suelo 0-10 cm) como factores principales, seguido del test *a posteriori* de Tukey para evaluar las diferencias entre estaciones y compartimentos. Las diferencias entre pinsapares se testaron mediante comparaciones planeadas *a priori*. Cuando los datos no cumplían los requisitos de normalidad y homocedasticidad, se transformaron con el algoritmo “log (x+1)” (C/N, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Ni, tasa de desnitrificación potencial, respiración) o de transformación por rangos (amonio:nitrato, tasa de nitrificación potencial). Todos los contrastes de hipótesis se efectuaron considerando un nivel de significación de  $\alpha = 0.05$ .

Las diferencias en las tasas de MNN y NN entre pinsapares para el período completo de incubación se contrastaron por separado para los compartimentos H y Ah mediante ANOVA de una vía seguido de comparaciones planeadas *a priori*. Los datos correspondientes al compartimento H se transformaron por rangos para que se cumplieran las asunciones teóricas del ANOVA. Se consideró un nivel de significación  $\alpha=0.05$ .

### II.3.2. Abundancia natural de <sup>15</sup>N

Con el objetivo de determinar la distribución vertical en los perfiles del suelo de la

abundancia natural de  $^{15}\text{N}$ , y realizar en base a ello una inferencia general sobre el carácter más o menos abierto del ciclo del N en los pinsapares de estudio, se realizó un muestreo estival adicional en el juego completo de localidades (Y, R, BP, B y SR). En cada una de ellas, se tomaron 4 muestras compuestas tanto de hojarasca (capas L y F) como de suelo a 0-5 cm, 5-15 cm y >15 cm de profundidad. Estas muestras compuestas se obtuvieron se mezclando 6 submuestras tomadas aleatoriamente en los casos del suelo a 0-5 y 5-15 cm; 3 submuestras en el de la hojarasca y el suelo >15 cm. Para la toma de muestras de hojarasca se usó un marco de 30 x 19 cm<sup>2</sup>. Los suelos se extrajeron con muestreadores cilíndricos de acero galvanizado de 4,5 cm de diámetro.

Las muestras fueron se tamizaron en fresco (< 2 mm para el suelo; >2 y >1 mm en cascada de tamices para la hojarasca). Las muestras completas de hojarasca se pesaron para determinar la masa de hojarasca por unidad de superficie en nuestras parcelas de estudio. Para el análisis de la abundancia natural de  $^{15}\text{N}$ , las muestras se pre-procesaron como se indica en el apartado II.8.3, y se enviaron al Stable Isotope Facility de la Universidad de Davis en California (<http://stableisotopefacility.ucdavis.edu/>). El análisis se efectúa empleando un analizador elemental Elementar Vario Micro Cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany) en interfase con espectrómetro de masas PDZ Europa 20-20 (Sercon Ltd., Cheshire, UK).

La significación de los efectos de los factores “localidad” (R, Y, R, BP, SR) y “compartimento” (L, F, 0-5, 5-15 y >15 cm) sobre la abundancia natural de  $^{15}\text{N}$  en el suelo y el %N total en las mismas muestras se contrastaron mediante ANOVA de dos vías. Las diferencias entre compartimentos se contrastaron mediante el test *post-hoc* de Tukey. Las diferencias entre pinsapares (localidades) se contrastaron mediante comparaciones planeadas *a priori*. Los datos de N total se transformaron mediante el algoritmo raíz (x) para cumplir las asunciones del ANOVA. En todos los casos se consideró un nivel de significación de  $\alpha = 0.05$ .

## **II.4. Métodos del Objetivo 2, “Efecto de la adición de fuentes de C y N fácilmente disponibles sobre la biogeoquímica del N y la actividad microbológica en el suelo de los pinsapares”**

### **II.4.1. Montaje del experimento en laboratorio de adición de formas disponibles de C y N**

Para este experimento se emplearon alícuotas frescas tamizadas, conservadas a 4°C en frigorífico durante un máximo de 1 mes, de las mismas muestras de suelo y de hojarasca de los muestreos de primavera (marzo) y de verano (julio) del Objetivo 1 (II.3.1.). Se separaron tres sub-muestras de cada una de ellas para aplicar los siguientes tratamientos: (i) sin adición de fuentes de C y/o N (control, C), (ii) adición de una fuente de C (glucosa, G), y (iii) adición conjunta de una fuente de C y de N (glucosa + nitrato potásico, G+N). Se pesó en botes de plástico (500 ml) el equivalente a 70 g de suelo seco o a 20 g de hojarasca seca. Los botes se pre-incubaron en cámara oscura (23 °C, 4 días en el caso de suelos; 5 días en el de hojarasca) con el objetivo de reactivar y estabilizar la actividad microbiana de las muestras, previamente a la aplicación de los tratamientos. Para el tratamiento G, se aplicó glucosa en dosis de 8 mg C-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> g<sup>-1</sup> de peso seco de suelo u hojarasca; para el tratamiento G+N se aplicó conjuntamente la dosis de glucosa con nitrato potásico a razón de 100 µg de N-KNO<sub>3</sub> g<sup>-1</sup> de peso seco de muestra. Las dosis se aplicaron añadiendo de modo homogéneo sobre las muestras el volumen necesario de soluciones de glucosa o de glucosa + nitrato potásico para conseguir un % de humedad final comparable al de la humedad en campo en el momento del muestreo. Así, para las muestras de suelo, la humedad durante la incubación de las muestras tomadas en primavera fue del 19 % en SR, del 23 % en Y, del 30 % en BP y del 39 % en R., y el de las muestras de verano del 16 % en SR, del 17 % en Y, del 18 % en BP y del 25 % en R. Para las muestras de hojarasca del muestreo de primavera los valores fueron del 38 % en SR, del 55 % en Y, del 50 % en BP y del 40 % en R, y para las de verano del 30 % en SR, del 31 % en Y, del 31 % en BP y del 32 % en R. Para el tratamiento “control” se añadió el volumen de agua destilada necesario para obtener el mismo % de humedad que en las correspondientes submuestras que recibieron los tratamientos de adición.

Los botes se incubaron aeróbicamente durante un total de 26 días en el caso de las muestras de primavera, y de 7 días en el caso de las muestras de verano. La incubación se realizó en cámara con condiciones constantes de temperatura (23°C) y en oscuridad.

#### **II.4.2. Seguimiento del experimento y variables dependientes consideradas**

Para el seguimiento de la respuesta a los tratamientos, se consideraron los siguientes tiempos desde el inicio de la incubación: 2, 4, 7, 14 y 26 días en el caso de las muestras tomadas en primavera; 2, 4 y 7 (6 para los tratamientos de las muestras de suelo) días para las muestras de verano. En cada uno de esos tiempos se midieron las siguientes variables dependientes:

- ✓ Tasas de respiración.
- ✓ Concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  y de  $\text{NO}_3^-$ .
- ✓ Tasas de netas de mineralización del N (MNN) y de nitrificación (NN).

*Tasas de respiración.* Las tasas de respiración se midieron mediante el método de la trampa alcalina (Anderson 1982). Tanto al inicio de la incubación, como en los distintos tiempos de seguimiento, se incorporó una trampa alcalina (vial de vidrio con solución de sosa) a cada bote de incubación. Los botes se sellaron con un tapón de rosca para evitar el intercambio de  $\text{CO}_2$  con la atmósfera. La tapa de los botes se desenroscó y abrió brevemente cada día para garantizar el mantenimiento de condiciones aeróbicas durante todo el periodo de incubación. Se emplearon “blancos” (botes de incubación sin muestra pero con trampa alcalina) para dar cuenta del  $\text{CO}_2$  atmosférico que pudiera intercambiarse en esos periodos de aireación, y fijarse subsecuentemente en la trampa alcalina. Las trampas alcalinas se retiraban al siguiente tiempo de seguimiento y eran substituidas por trampas nuevas. En el apartado II.8.8 se dan más detalles sobre el procedimiento analítico y de cálculo para obtener las tasas de respiración.

El efecto de las distintas fuentes de variación incluidas en el experimento, sobre las tasas de respiración al cabo de una semana de incubación en las distintas localidades se

contrastó por separado para los dos compartimentos (H y Ah) mediante ANOVAs factoriales con tres factores independientes: tratamiento (control, G, G+N), estación del año y localidad (R, Y, BP, SR). Los datos se transformaron por rangos (Potvin y Roff, 1993) para que se cumplieran las asunciones teóricas del ANOVA. No se incluyeron todos los datos en único ANOVA de medidas repetidas porque no se cumplían las asunciones del ANOVA aunque se transformaran los datos por rangos. La significación de las diferencias entre tratamientos se evaluó con el test *post-hoc* de Tukey mientras que las diferencias entre localidades se evaluó mediante comparaciones planeadas *a priori*. Se consideró un nivel de significación  $\alpha=0.05$ .

Para caracterizar la dinámica de la respiración del suelo con el tiempo de incubación, los datos de tasas de respiración acumuladas de las muestras recogidas en primavera se ajustaron a una función no lineal (Sigmaplot 10.0) con la siguiente ecuación (curva de crecimiento exponencial que se acerca a un máximo con el tiempo):

$$y = a (1 - e^{-bx}),$$

donde el parámetro  $a$  representa el valor máximo que alcanza la curva y el parámetro  $b$  hace referencia a la velocidad de crecimiento de la curva.

Las diferencias en estos parámetros  $a$  y  $b$  de la cinética de la respiración se evaluaron mediante un ANOVA factorial de tres factores (compartimento, tratamiento y localidad) seguido del test *post-hoc* de Tukey. Las diferencias entre pinsapares/localidades para cada combinación de compartimento y tratamiento se testaron mediante comparaciones planeadas *a priori*. Los datos se transformaron con el algoritmo raíz(x) para que se cumplieran las asunciones teóricas del ANOVA. Se consideró un nivel de significación  $\alpha=0.05$ .

*Concentraciones de  $NH_4^+$  y de  $NO_3^-$ , y tasas de MNN y de NN.* Estas variables se midieron sólo en el caso de la incubación de las muestras de primavera. En todos los tratamientos, tanto inmediatamente tras su aplicación como coincidiendo con los tiempos de seguimiento de la evolución de la tasa de respiración, se tomaron alícuotas del suelo que fueron sometidas a extracciones con KCl 2M para la medida de amonio y de nitrato y para el

cálculo de las tasas de MNN y de NN. En el apartado II.8.9 se dan más detalles sobre los procedimientos analíticos y de cálculo de estas variables.

La acumulación de amonio y nitrato en las distintas localidades de muestreo se contrastó mediante ANOVA de medidas repetidas con el compartimento (Ah, H) y el tratamiento (C, G, G+N) como factores independientes y el tiempo de muestreo como factor de agrupamiento. Las variables se transformaron con el algoritmo raíz ( $x$ ) para cumplir las asunciones del ANOVA. El efecto del compartimento y del tratamiento se testó mediante el test *post hoc* de Tukey. Las diferencias entre pares se evaluaron mediante comparaciones planeadas *a priori*. Se consideró un nivel de significación  $\alpha=0.05$ .

Las diferencias en las tasas de MNN y NN entre parcelas control para el período completo de incubación se contrastaron por separado para el suelo y la hojarasca mediante ANOVA de una vía seguido de comparaciones planeadas *a priori*. Los datos correspondientes a la hojarasca se transformaron por rangos para que se cumplieran las asunciones teóricas del ANOVA. Se consideró un nivel de significación  $\alpha=0.05$ . Las diferencias en las tasas de MNN y NN entre parcelas tratamiento para el período completo de incubación se contrastaron mediante ANOVA de dos vías seguido de comparaciones planeadas *a priori*. Cuando los datos no cumplían las asunciones teóricas del ANOVA se transformaron por rangos (NN) o mediante el algoritmo  $\lg(x+1)$  (MNN en adición de C y N). Se consideró un nivel de significación  $\alpha=0.05$ .

La cinética de la nitrificación en las muestras de suelo (horizonte Ah) fue caracterizada mediante la estimación de distintos parámetros mediante el análisis propuesto por Miegroet *et al.* (1990). Se calcularon los siguientes parámetros: (i) Tasa máxima de nitrificación ( $K_{\max}$ ), calculada como el valor máximo de la primera derivada de las curvas sigmoidales ajustadas para la evolución de la concentración de  $\text{NO}_3^-$  con el tiempo de incubación; (ii) tiempo de saturación ( $T$ ), momento en el que la curva alcanza la asíntota, es decir, cuando su primera derivada se hace cero; (iii) tiempo de retraso ( $t_o$ ), calculada como la intersección de la tasa máxima con el eje tiempo (si la intersección caía en la parte negativa del eje se tomó  $t_o=0$ , es decir, no hay tiempo de retraso en la producción de  $\text{NO}_3^-$ ); (iv) nitrificación neta potencial ( $NNP$ ), cantidad neta de nitrato producido cuando se llega al

tiempo  $T$ ; si  $T >$  tiempo de incubación, entonces la cantidad neta de nitrato producido al final de la incubación será una estimación conservativa de  $NNP$  ( $NNP_{\text{conservativo}} = [\text{NO}_3^- \text{ neto producido}]_{\text{t}_{\text{final incubación}}} < NNP_{\text{real}}$ ). Las diferencias entre los parámetros de los distintos sitios de estudio se analizaron mediante ANOVA de una vía. Los datos correspondientes a  $K_{\text{máx}}$  se transformaron con el algoritmo  $\lg(x+1)$  para que se cumplieran las asunciones teóricas del ANOVA. Se consideró un nivel de significación  $\alpha=0.05$ .

### **II.5. Métodos del Objetivo 3, “Variabilidad en la estructura de las comunidades bacterianas del suelo de los pinsapares, y relaciones estructura/función”**

#### **II.5.1. Análisis de la comunidad microbiana del suelo**

Los análisis se efectuaron sobre las muestras de suelo y de hojarasca de los muestreos de primavera (marzo) y de verano (julio) en las localidades Y, R, BP y SR, que se describieron en el apartado II.3.1. De cada una de dichas muestras compuestas se tomó una sub-muestra que se tamizó en fresco ( $< 4$  mm en el caso de los suelos,  $> 2$  y  $> 1$  mm para la hojarasca). Las muestras tamizadas se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta la extracción de su ADN microbiano en el Scottish Crop Research Institute (SCRI, Dundee, Escocia), donde la doctoranda realizó una estancia pre-doctoral.

La estructura de la comunidad microbiana del suelo se evaluó mediante el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de ADN de restricción terminal (T-RFLP). Este método se basa en la digestión con enzimas de restricción del ADN amplificado y marcado con fluorescencia en uno de sus extremos. Se estudiaron tanto la estructura de la comunidad bacteriana total del suelo mediante amplificación de los genes 16S rDNAs, como de la estructura de la comunidad de bacterias desnitrificantes mediante amplificación de los genes de la Nitrito Reductasa (genes *nirK*). Se realizaron pruebas de amplificación de los genes *amoA* de microorganismos nitrificantes pero no se consiguieron amplificar, probablemente por encontrarse por debajo de nuestro límite de detección. Los detalles de los métodos analíticos se recogen en el apartado II.8.10.

Tanto para el análisis de la estructura de la comunidad bacteriana como para el de la estructura de bacterias desnitrificantes, la diversidad ecológica de la comunidad se

caracterizó mediante el cálculo de la “riqueza específica” ( $S$ , número de unidades taxonómicas operacionales diferentes –OTUs-), de los índices de diversidad de Shannon y de dominancia de Simpson ( $H' = -\sum p_i \ln(p_i)$  y  $D = 1/\sum p_i^2$ , respectivamente; donde  $p_i$  es la abundancia relativa de cada OTU), y del índice de equitatividad ( $E = H'/\ln S$ ).

Los efectos de las fuentes de variación sobre estos índices de  $\alpha$ -diversidad se testaron mediante ANOVAs de tres factores (compartimento, estación del año y localidad) seguidos del test post-hoc de Tukey. En el caso de la comunidad bacteriana los datos se transformaron por rangos para que se cumplieran las asunciones teóricas del ANOVA. Las diferencias entre localidades para la misma combinación de compartimento y estación del año se exploraron mediante comparaciones planeadas *a priori*. Se consideró un nivel de significación  $\alpha=0.05$ .

Al objeto de ordenar las distintas parcelas en función de la huella dactilar (“fingerprint”) de su comunidad microbiana (bacterias y desnitrificantes de forma independiente), se utilizó un análisis de componentes principales (ACP). Los datos de las coordenadas de cada localidad sobre cada uno de los cinco primeros componentes principales fueron sometidos a un ANOVA factorial (compartimento, estación del año y parcela) seguido del test *post-hoc* de Tukey. También se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson entre las coordenadas de los tres primeros ejes del ACP y el número de OTUs observadas. En todos los contrastes de hipótesis se consideró un nivel de significación  $\alpha=0.05$ .

### **II.5.2. Análisis de relaciones entre estructura de las comunidades bacterianas y la funcionalidad biogeoquímica del suelo**

Con objeto de estudiar el engranaje microbiológico que subyace a los patrones macroscópicos de variabilidad biogeoquímica en los pinsapares, se buscaron correspondencias entre las variables biogeoquímicas medidas en las muestras de suelo y de hojarasca (apartado II.3.1) y la estructura de la comunidad microbiana del suelo determinada por análisis TRFLP en las mismas muestras (II.5.1).

Para analizar el grado de asociación entre la funcionalidad biogeoquímica del suelo/hojarasca y la estructura de la comunidad bacteriana/desnitrificante se calcularon coeficientes de correlación de Pearson. Para ello se emplearon las coordenadas de las muestras sobre los tres primeros ejes del ACP realizado sobre los datos TRFLP, y los valores de las variables biogeoquímicas medidas en las mismas muestras.

## **II.6. Métodos del Objetivo 4, “Efecto del grado de saturación de N sobre la eficiencia de los mecanismos de retención del N en los pinsapares”**

### **II.6.1. Diseño y montaje del experimento “in situ” de adición al suelo de N marcado con $^{15}\text{N}$**

Con el objetivo de testar la influencia de las tasas de deposición atmosférica de N sobre la eficiencia de retención del N en el suelo de los pinsapares, se realizó un experimento de fertilización y marcaje *in situ* con  $^{15}\text{N-NO}_3$  en las siguientes localidades (véase también el apartado II.2): Y (Yunqueira, en la Sierra de las Nieves; 1200 m de altitud; pinsapar con evidencias de limitación por N), BP y B (1200 y 1400 m, respectivamente; ambas en el pinsapar de Sierra Bermeja, con síntomas de saturación de N).

En cada una de esas tres localidades, se delimitaron ocho parcelas experimentales de 4 m<sup>2</sup> de superficie cada una. El criterio para la selección de la posición de estas parcelas dentro de cada localidad fue que existiera la máxima similitud posible entre ellas en cuanto a características del micrositio, estructura del dosel vegetal, abundancia y disposición espacial de la hojarasca, pedregosidad/rocosidad, microtopografía, y profundidad media del suelo. Para la determinación de la pedregosidad y de la profundidad media del suelo, en cada localidad se realizaron transectos de 25 m de longitud, anotándose cada 0,5 m si se encontraba roca, grava/roca suelta o suelo y su profundidad. La profundidad media del suelo se estimó mediante la inserción de hincos de metal hasta la máxima profundidad posible, probando en varias posiciones separadas por pocos centímetros en cada tramo del transecto. Asimismo se tomaron muestras de suelo para la determinación de su densidad aparente (apartado II.8.2). La masa de hojarasca por unidad de superficie de terreno se determinó como se indica en el apartado II.3.2.

En cada una de las ocho parcelas experimentales de cada localidad se instaló un lisímetro de tensión cero para recoger el agua de lixiviación del suelo. Se colocaron cuatro lisímetros adicionales en zonas cercanas y similares a las unidades experimentales. Los lisímetros consistieron en cajas de acero galvanizado, con cara superior abierta de 275 cm<sup>2</sup> de superficie de captación, borde de 10 cm de altura y base con un desagüe por el que dirigir los lixiviados, a través de un tubo, hacia un colector de pared negra opaca y 5 l de capacidad, situado pendiente abajo. Los lisímetros se rellenaron de arena lavada y esterilizada, que se empaquetó entre malla de fibra de vidrio tanto por la cara abierta como por la base. Los lisímetros fueron enterrados por debajo de la zona principal de enraizamiento de raíces finas (~20 cm de profundidad; alcanzar más profundidad de forma general no era posible dada la elevada pedregosidad de estos suelos). Una vez instalados los lisímetros, se reconstruyeron cuidadosamente encima de ellos los horizontes edáficos que habían sido excavados y apartados previamente. Para el diseño e instalación de estos lisímetros se siguieron las recomendaciones de Radulovich y Sollins (1987). La instalación de los lisímetros se realizó con seis meses de antelación a la aplicación del tratamiento de adición de N marcado isotópicamente, para minimizar el efecto de “memoria” por la perturbación causada en el proceso de su instalación, así como para dar tiempo a la recolonización por raíces del suelo perturbado.

Además de los lisímetros, en cada localidad de muestreo se colocaron cuatro colectores de agua de trascolación en posiciones adyacentes a las parcelas experimentales, para recoger la precipitación que atraviesa y lava el dosel forestal alcanzando el suelo y cuantificar así las entradas de N por esta vía. Los colectores consistieron en garrafas oscuras de 5 l de capacidad con un embudo de 11 cm de diámetro acoplado en sus tapas. Un disco circular de una malla metálica galvanizada de 0.5 mm de poro, insertado a media altura dentro del embudo, minimizaba la entrada de restos vegetales y otros cuerpos extraños al colector.

La aplicación de los tratamientos de adición de N marcado isotópicamente se realizó al inicio del año hidrológico (principios de Octubre). En cada localidad, cuatro de las ocho parcelas o unidades experimentales recibieron el equivalente a 25 kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ha<sup>-1</sup> (ó 2,5 g

$\text{N-NO}_3^- \text{ m}^{-2}$ ) con una riqueza de  $^{15}\text{N}$  del 15,4 %. Para ello, empleando una mochila fumigadora, se aplicó homogéneamente sobre el suelo una dosis de  $2 \text{ l m}^{-2}$  de una solución acuosa de nitrato sódico conseguida mezclando la proporción de 12.75 gramos de producto sin marcar (riqueza atómica en  $^{15}\text{N}$  del 0,384 %) con 2.29 gramos de producto marcado (99 % de riqueza atómica). Las cuatro parcelas restantes actuaron como controles experimentales, recibiendo el mismo volumen por superficie de agua destilada que las que recibieron la solución con N. Con el objetivo de aumentar el número de réplicas, dos de los cuatro lisímetros extra recibieron la misma dosis de nitrato sódico sin marcar ( $^{14}\text{N}$ ) mientras que los otros dos actuaron como controles.

### **II.6.2. Seguimiento del experimento: muestreo de aguas de trascolación y lixiviación, y de suelos**

Para el seguimiento de las entradas de N por trascolación y de las pérdidas de N por lixiviación, se realizaron muestreos secuenciales, en todas las localidades consideradas, que abarcaron un año hidrológico completo (2005-06). La periodicidad del muestreo fue aproximadamente mensual, excepto en el verano (las fechas de muestreo en cada periodo, siguiendo el orden de localidad Y, BP y B fueron: 7, 8, 9 noviembre 2005; 5, 6, 7 diciembre 2005; 12, 10, 11 enero 2006; 10, 6, 6 febrero 2006; 9, 7, 8 marzo 2006; 4, 3, 3 abril 2006; 8, 12, 12 mayo 2006; 15, 13, 13 julio 2006; 6, 5, 5 octubre 2006; 18, 18, 18 noviembre 2006).

En cada ocasión, tanto en las parcelas control como en las marcadas con  $^{15}\text{N}$ , se midió el volumen de agua recogida en los colectores de trascolación y en los lisímetros, se tomó una alícuota para su análisis (o el volumen completo si el total recolectado fue inferior) en botes de polietileno de 250 ml, y se cambiaron las garrafas por otras limpias que contenían 10 ml de una disolución biocida (timol,  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$ ). Las muestras de agua de trascolación y lixiviación fueron almacenadas y mantenidas a  $4^\circ \text{C}$  hasta su llegada al laboratorio en un período máximo de 3-4 días, donde se filtraron empleando filtros Whatman GF/F ( $0.7\mu\text{m}$ . tamaño de poro) y se congelaron hasta su análisis.

Adicionalmente, y coincidiendo con los muestreos de diciembre, enero y marzo, se tomaron muestras de suelo para el seguimiento de las concentraciones de nitrato, amonio y  $\text{N}_{\text{total}}$ . Se muestrearon los siguientes compartimentos: capa de hojarasca (L+F) y suelos de

0-10 cm y de 10-20 cm de profundidad. Para ello se tomó una muestra de cada compartimento por unidad experimental, compuesta a su vez por tres muestras tomadas al azar. Las muestras de hojarasca se tomaron con una pala pequeña, mientras que las de suelo fueron extraídas con muestreadores metálicos cilíndricos (5 cm de diámetro) y la ayuda de un martillo y de unos alicates. Tras su transporte al laboratorio, las muestras de suelo fueron secadas al aire, tamizadas (< 2 mm) y almacenadas hasta su análisis. En el caso de las muestras de hojarasca, una vez secadas al aire se tamizaron en cascada de tamices (< 2 mm y < 1mm), y las piedras se retiraron manualmente. En noviembre de 2006 se realizó un cuarto muestreo de la capa de hojarasca, y del suelo de 0-5 cm y de 5-15 cm de profundidad, para el análisis del C y N totales.

### **II.6.3. Entradas de N con el agua de trascolación**

La composición química del agua de trascolación puede diferir de la del agua de deposición húmeda debido fundamentalmente a: (i) el lavado de la deposición seca captada por el dosel forestal en los intervalos entre eventos de precipitación (las coníferas son más eficaces que los caducifolios en la captación de partículas y de la criproprecipitación; Draaijers *et al.* (1988), y (ii) el intercambio de iones con los tejidos vegetales que conforman el dosel forestal (De Schrijver *et al.* 2004). En los ecosistemas Mediterráneos, la deposición seca suele exceder a la deposición húmeda, contribuyendo de forma mayoritaria a la deposición bruta (Rodà *et al.* 2002). Por otro lado, la criptoprecipitación es abundante en los pinsapares (e.g., en Sierra Bermeja, el volumen de trascolación es aproximadamente un 150 % del de la precipitación; Salido (2007)). Por estos motivos, para aproximar las entradas de N por deposición atmosférica, elegimos muestrear el agua de trascolación en lugar de la deposición húmeda.

Para el análisis químico de las muestras de agua de trascolación se empleó un autoanalizador de flujo segmentado ALLIANCE FUTURA. Se determinaron las concentraciones de N inorgánico en forma de (los detalles de los métodos empleados se recogen en el apartado II.8.4):

- ✓ Amonio disuelto (método espectrofotométrico del "azul indofenol"; Keeney y

Nelson (1982)).

- ✓ Nitrato disuelto (método de reducción a nitrito en columna reductora de cadmio y determinación espectrofotométrica de nitritos totales por el método de Shinn; Keeney y Nelson (1982)).

Para contrastar los efectos de la localidad y de la fecha de muestreo sobre el volumen y las concentraciones de amonio y de nitrato en las muestras de agua de trascolación, así como sobre las tasas mensuales y acumuladas de deposición de dichas formas de N, se realizaron ANOVAs/MANOVA de medidas repetidas (fechas de muestreo como factores de agrupamiento).

Los datos de volumen y de concentración nitrato se transformaron mediante el algoritmo  $\log(x+1)$  para cumplir las asunciones del ANOVA. Los datos de la relación amonio:nitrato fueron transformados por rangos (Potvin y Roff 1993) para cumplir las asunciones del ANOVA. Las diferencias entre muestreos se testaron con el *post hoc* de Tukey. Las diferencias entre parcelas se contrastaron mediante comparaciones planeadas *a priori*. En todos los casos se consideran significativos los efectos para  $p < 0.05$ . La relación entre las concentraciones de amonio y nitrato ( $\mu\text{g N ml}^{-1}$ ) y el volumen de trascolación ( $\text{l m}^{-2}$ ) se analizó mediante análisis de regresión. Se dan las rectas de regresión a las que se ajustaron dichas relaciones, junto con el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el valor de  $p$ .

Los datos de concentración de amonio y de nitrato se expresaron también en términos de cantidad de N que entra al suelo por unidad de superficie ( $\text{kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ), usando los correspondientes volúmenes de trascolación, intervalos de tiempo entre muestreos y superficies de los embudos colectores. Se realizó un ANOVA de medidas repetidas con dichas tasas. Las tasas acumuladas de amonio se transformaron mediante el algoritmo  $\log(x+1)$  para cumplir las asunciones del ANOVA. Las diferencias entre muestreos se testaron con el *post hoc* HSD de Tukey. Las diferencias entre parcelas se contrastaron mediante comparaciones planeadas *a priori*. Las diferencias entre localidades para las tasas anuales de deposición de amonio, de nitrato y de N inorgánico total, así como para el volumen de agua de trascolación anual, se contrastaron mediante ANOVAs de una vía seguidas del test HSD de Tukey.

#### II.6.4. Pérdidas de N por lixiviación y señal de $^{15}\text{N}$ (% atómico $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) en los lixiviados

Para evaluar las pérdidas de N por lixiviación se empleó tanto el análisis químico convencional de distintas fracciones de N en el agua recogida por los lisímetros, como la relación isotópica  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  (% atómico) del N lixiviado.

*Aproximación química convencional.* En las muestras de agua de lixiviación se analizaron las siguientes fracciones de N (véanse los apartados II.8.4 y II.8.5):

- ✓ Amonio disuelto (método espectrofotométrico del "azul indofenol"; Keeney y Nelson (1982)).
- ✓ Nitrato disuelto (método de reducción a nitrito en columna reductora de cadmio y determinación espectrofotométrica de nitritos totales por el método de Shinn; Keeney y Nelson (1982)).
- ✓ N total disuelto, TDN (determinación espectrofotométrica del nitrato tras oxidación UV de la muestra; método UNE-EN ISO 11905-1:1998).
- ✓ N orgánico disuelto, DON (por diferencia entre TDN y la suma de nitrato más amonio)

Con los datos de concentración de formas de N (orgánico e inorgánico) en los lixiviados y los correspondientes volúmenes de lixiviación se calcularon las cantidades de N lixiviado en los distintos periodos de muestreo, localidades y tratamientos de adición de N. Para cada periodo, los efectos de los factores "localidad" y "tratamientos" sobre las concentraciones de N en el agua de lixiviación, volumen de agua lixiviada y cantidad de N (orgánico e inorgánico) lixiviado, se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Tukey. Las variaciones estacionales entre localidades y tratamientos se testaron mediante ANOVAs/MANOVAs de medidas repetidas, también seguido del test de Tukey. Los datos se transformaron cuando fue necesario para cumplir las asunciones del ANOVA. Se consideró un nivel de significación  $\alpha=0.05$ .

*Cálculo de la eficacia de retención neta del N añadido.* Para estimar la eficacia de retención neta del N en las distintas localidades, a la cantidad de N añadido con el tratamiento de adición y marcaje isotópico (25 kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ha<sup>-1</sup>), se le restó la cantidad de N lixiviado en exceso en las parcelas que recibieron tratamiento de fertilización con respecto a la cantidad lixiviada en las parcelas control no fertilizadas (esta última cifra se toma como el nivel de base de lixiviación de N en ausencia de fertilización):

$$\text{Retención neta del N añadido} = \text{N añadido} - \text{Exceso de N lixiviado en parcelas fertilizadas,}$$

$$\begin{aligned} \text{Siendo: Exceso de N lixiviado en parcelas fertilizadas} &= \\ &= \text{N lixiviado en parcelas fertilizadas} - \text{N lixiviado en parcelas control.} \end{aligned}$$

Esta aproximación asume que, en nuestro tipo de ecosistema, caracterizado por precipitaciones relativamente elevadas pero muy estacionales, las pérdidas de N fuera del ecosistema en fase gaseosa (desnitrificación, volatilización de amonio...) son minoritarias en relación a las pérdidas de N en fase líquida por lixiviación (Houlton *et al.* 2006). También asume que la lixiviación domina frente a la escorrentía en cuanto a vías de pérdida hidrológica de N en nuestras parcelas.

Las diferencias entre pinsapares tanto en la lixiviación neta mensual como en el % de retención del N añadido se testaron mediante tests de t-student de comparación de medias entre pares de localidades (pinsapares B, BP, Y).

*Señal de <sup>15</sup>N (% atómico <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N) de la lixiviación y proporción del N añadido que es lixiviado.* Una alícuota de cada muestra de agua lixiviada de las parcelas sometidas al tratamiento de fertilización y marcaje con <sup>15</sup>N fue destinada a la determinación del enriquecimiento en <sup>15</sup>N en el N total disuelto (TDN) de las mismas. Las alícuotas fueron digeridas siguiendo una modificación del método de oxidación con persulfato (D'Elia *et al.* 1976) para oxidar todos los componentes nitrogenados del lixiviado a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Se emplearon los datos de concentración de TDN de los lixiviados para calcular qué volumen de los mismos era necesario someter a la oxidación con persulfato para alcanzar una cantidad de N en el digerido entre 80 y 350 µg de N. Tras la digestión, las disoluciones fueron tratadas con aleación de Devarda finamente molida para reducir el nitrato total en la muestra

(correspondiente al TDN) a amonio, para su posterior difusión en forma de NH<sub>3</sub> hasta discos acidificados (Stark y Hart 1996). Estos discos fueron enviados al Stable Isotope Facility de la Universidad de California en Davis, para el análisis del porcentaje atómico de <sup>15</sup>N por espectrometría de masas. En el apartado II.8.11 se ofrecen más detalles de estos procedimientos analíticos.

La estimación del flujo del trazador <sup>15</sup>N añadido hacia otros compartimentos del ecosistema se realizó mediante el cálculo de balances de masas de <sup>15</sup>N, empleando para ello el contenido total de N en el compartimento de interés y el cambio observado tras un periodo de tiempo en su contenido de <sup>15</sup>N como consecuencia de la aplicación del trazador (Nadelhoffer y Fry 1994). La cantidad de <sup>15</sup>N procedente del fertilizante marcado que es recuperada en el tiempo  $t$  desde el compartimento  $i$  del ecosistema se calculó mediante la expresión general:

$${}^{15}N_{rec}(i_t) = Nt(i_t) * [(atom\%{}^{15}N(i_t) - atom\%{}^{15}N(ref)) / (atom\%{}^{15}N(traz) - atom\%{}^{15}N(ref))]$$

Aplicada al caso de los lixiviados del suelo recolectados en cada periodo de muestreo, quedaría (Wachendorf *et al.* 2005) :

$${}^{15}N_{rec}(lix) = Nt(lix) * [Exceso\ atom\%{}^{15}N(lix) / Exceso\ atom\%{}^{15}N(traz)],$$

donde:

${}^{15}N_{rec}(lix)$  es la masa del trazador <sup>15</sup>N que se recupera en la muestra de lixiviado, en g m<sup>-2</sup>.

$Nt(lix)$  es la masa de nitrógeno total en la muestra de lixiviado, expresada en g m<sup>-2</sup> teniendo en cuenta el volumen de lixiviado correspondiente a ese periodo de muestreo y la superficie de captación del lisímetro.

$Exceso\ atom\%{}^{15}N(lix)$  es el enriquecimiento en isótopo pesado observado en la lixiviación, calculado como la diferencia entre el porcentaje atómico de <sup>15</sup>N en las muestras de lixiviados de las parcelas marcadas con <sup>15</sup>N [ $atom\%{}^{15}N(lix)$ ] y su abundancia natural o porcentaje atómico de <sup>15</sup>N en lixiviados de las parcelas control no marcadas [ $atom\%{}^{15}N(ref)$ ].

$Exceso\ atom\%{}^{15}N(traz)$  es el enriquecimiento respecto a la abundancia natural del trazador o fertilizante marcado isotópicamente que se aplicó a las parcelas

$$[atom\%^{15}N(traz) - atom\%^{15}N(ref)].$$

El valor de  $^{15}N_{rec}(lix)$  obtenido se expresó como % del  $^{15}N$  añadido empleando la expresión:

$$\% \ ^{15}N_{rec}(lix) = (^{15}N_{rec}(lix) / ^{15}N_{añadido}) * 100 ,$$

donde:

$^{15}N_{añadido}$  es la masa del trazador  $^{15}N$  que se añadió a la parcela, expresada en las mismas unidades (su valor fue de 0,39977 g m<sup>-2</sup>).

Las diferencias entre pinsapares tanto en el % del marcador añadido (+4 kg  $^{15}N$ -NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ha<sup>-1</sup>) que se recupera en el agua de lixiviación como en el % atómico de  $^{15}N$  en la misma se testaron mediante tests de t-student de comparación de medias entre pares de localidades (pinsapares B, BP, Y)

#### **II.6.5. Cambios en la disponibilidad de N y en la señal $\delta^{15}N$ en el suelo**

*Concentraciones de N mineral y total.* Las muestras de hojarasca (L+F) y de suelos tomadas tanto en las parcelas fertilizadas como control de cada localidad (ver II.6.2) se analizaron para las concentraciones de amonio y nitrato extraíbles en 2 M KCl, y de C y N totales. Los métodos analíticos se recogen en los apartados II.8.4 y II.8.3, respectivamente.

Se realizó un ANOVA/MANOVA de medidas repetidas con la fecha como factor de agrupamiento y la localidad, compartimento y tratamiento como factores principales, seguido del test *a posteriori* de Tukey y de comparaciones planeadas *a priori*. Los datos de concentraciones de amonio y nitrato extraíbles se transformaron mediante el algoritmo log(x+1) para cumplir las asunciones del ANOVA. Se consideró un nivel de significación  $\alpha=0.05$ . En el ANOVA/MANOVA de medidas repetidas de las variables %C, %N y relación C/N se incluyeron también los datos correspondientes al muestreo de noviembre de 2006 (en este caso, las profundidades de suelo muestreadas no fueron idénticas a las de los tres muestreos anteriores; ver II.6.2).

*% del  $^{15}N$  añadido que es recuperado desde el suelo.* Submuestras finamente molidas de

cada muestra de hojarasca o de suelo a 0-10 o 10-20 cm de profundidad fueron enviadas al Laboratorio de Isótopos Estables de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC, Granada) para el análisis de  $^{15}\text{N}$  total mediante espectrometría de masas (Stevens y Laughlin 1994; Laughlin *et al.* 1997) (apartado II.8.3). La determinación del  $^{15}\text{N}$  total mediante espectrometría de masas de las submuestras del muestreo de noviembre se realizó del mismo modo en la Universidad Pública de Navarra (Servicio de Apoyo a la Investigación). El porcentaje de recuperación de  $^{15}\text{N}$  desde cada compartimento se obtuvo a partir de la masa de N marcado que permanecía en el mismo, calculado de acuerdo con la siguiente ecuación (Templer *et al.* 2005):

$$\% \text{ } ^{15}\text{N}_{rec} = [m_{comp} \times (\text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N}_{comp} - \text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N}_{ref}) / 100] / \text{ } ^{15}\text{N}_{añadido}, \text{ donde}$$

$\% \text{ } ^{15}\text{N}_{rec}$  es porcentaje de  $^{15}\text{N}$  recuperado en el compartimento de que se trate en parcelas marcadas isotópicamente;

$m_{comp}$  es la masa total de N en ese compartimento por unidad de superficie ( $\text{g m}^{-2}$ ), obtenida como el producto entre la concentración de N total (en tanto por uno) y la masa del mismo, calculada a su vez empleando datos de densidad aparente y profundidad del compartimento (suelo) o de peso seco por unidad de superficie (hojarasca) (apartado II.3.1).

$\text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N}_{comp}$  es el porcentaje atómico de  $^{15}\text{N}$  en el compartimento;

$\text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N}_{ref}$  es la abundancia natural de  $^{15}\text{N}$  o porcentaje atómico de  $^{15}\text{N}$  del compartimento de que se trate en parcelas control no marcadas; y

$\text{ } ^{15}\text{N}_{añadido}$  es la masa de  $^{15}\text{N}$  añadido a cada parcela ( $0,39977 \text{ g m}^{-2}$ ).

Los efectos de las distintas fuentes de variación sobre el % de  $^{15}\text{N}$  recuperado se analizaron mediante ANOVA/MANOVA de medidas repetidas con la fecha como factor de agrupamiento y la localidad, compartimento y tratamiento como factores principales, seguido del test *a posteriori* de Tukey y de comparaciones planeadas *a priori*. Los datos se transformaron por rangos para cumplir las asunciones del ANOVA.

## **II.7. Métodos del Objetivo 5, “Retención abiótica del nitrato: disipación de dudas metodológicas y de su operatividad en suelos Mediterráneos”**

Se realizó un experimento en laboratorio de marcaje con  $^{15}\text{N-NO}_3$  con el objetivo de testar el potencial para la inmovilización abiótica del nitrato en el suelo de los pinsapares y la influencia del grado de disponibilidad de N en dicho potencial. Como se comentó en el apartado I.7, la observación de incrementos a corto plazo en el pool de DON tras la adición de nitrato a suelos esterilizados ha sido atribuida a algún mecanismo de retención abiótica del mismo. La “hipótesis de la rueda de Fe” (“iron wheel hypothesis”, Davidson *et al.* (2003)) propone que la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  presente en la solución del suelo podría mediar la reducción abiótica del nitrato a nitrito; este nitrito, mediante reacciones de nitrosación de compuestos de C orgánico disuelto (DOC), pasaría finalmente a formar parte del compartimento de nitrógeno orgánico del suelo, concretamente a su fracción disuelta (DON). Para este experimento se escogieron dos localidades de estudio: Y en el pinsapar de Yunquera en la Sierra de las Nieves, limitado por N, y BP en el pinsapar de Sierra Bermeja, con síntomas de saturación de N (véase justificación más detallada de esta elección en el último párrafo del apartado II.2).

### **II.7.1. Muestreo, preparación y esterilización de las muestras de suelo**

Los antecedentes sobre indicios de tasas relevantes de retención abiótica del nitrato corresponden principalmente a muestras del horizonte O (orgánico) de suelos de bosques templados (Dail *et al.* 2001; Perakis y Hedin 2001; Davidson *et al.* 2003; Sotta *et al.* 2008). Sin embargo, el perfil del suelo de los pinsapares carece de un horizonte O, por lo que el experimento se realizó en muestras de suelo del horizonte Ah (organo-mineral, 0-10 cm) recogidas en periodo estival (julio) en ambas localidades. Se tomaron tres muestras del horizonte Ah en cada localidad, siendo cada una compuesta de tres a cuatro muestras individuales tomadas al azar dentro de las parcelas permanentes de seguimiento de aproximadamente una hectárea.

Las muestras, una vez secadas al aire y tamizadas (< 2 mm), se enviaron al Woods Hole Research Center, MA (USA) donde se llevó a cabo el experimento (estancia corta pre-doctoral de P. Torres-Cañabate con el Dr. E. Davidson). Una vez allí, se pusieron y

mantuvieron al 65% de su capacidad de campo durante los tres días previos al inicio del experimento de marcaje con  $^{15}\text{N}$  en el laboratorio. Una sub-muestra de cada réplica se sometió a extracción con  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,5M para determinar las concentraciones iniciales de N extraíble, amonio y nitrato. Para la determinación del N total disuelto (TDN) en los extractos se realizó una digestión en línea con persulfato seguida por análisis en un autoanalizador LACHAT de inyección de flujo. La concentración de N orgánico disuelto (DON) se calculó como la diferencia entre TDN y N inorgánico disuelto ( $\text{DIN} = \text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ ) (Véase apartado II.8.5).

Por otro lado, de cada réplica se tomaron cuatro sub-muestras de un peso equivalente a 50 g de suelo seco y se colocaron en tarros de cristal de 1 l de capacidad. Dos tarros de suelo de cada réplica fueron esterilizados autoclavándolos (121 °C durante 0,5 h) dos veces, mientras los otros dos permanecieron con el suelo sin esterilizar (*vivo*). Las muestras esterilizadas se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente bajo campana estéril (todo el trabajo que requería condiciones de esterilidad fue realizado en dicha campana). Todas las técnicas de esterilización modifican el suelo, causando de forma no intencionada potenciales artefactos (Wolf y Skipper 1994). La esterilización con cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) produce pocos cambios en las propiedades físico-químicas del suelo, pero la adición de este reactivo podría causar interferencias con el tipo de reacción redox que propone la “hipótesis de la rueda de hierro” como causante de la retención abiótica de nitrato. También existen dudas acerca de la rapidez con la que el  $\text{HgCl}_2$  esteriliza la muestra (Morier *et al.* 2008). Aunque el autoclavado puede modificar las concentraciones de Fe extraíble y de materia orgánica disuelta, es un método eficiente para eliminar microorganismos viables y sus exoenzimas mientras que otras propiedades del suelo como su capacidad de intercambio, área superficial y pH son menos afectadas (Wolf y Skipper 1994). La efectividad de la esterilización fue testada colocando 1 g de suelo esterilizado de cada réplica en un conjunto de tubos (2 tipos de suelo x 3 réplicas = 6 tubos) con caldo de cultivo estéril (Fisher Scientific, Cat#S716942A) utilizando métodos de transferencia también estériles. Otra muestra de 1 g de suelo *vivo* de cada réplica se colocó en otro juego de seis tubos con caldo de cultivo estéril. Todos los tubos fueron incubados en la oscuridad a temperatura ambiente durante 7 días. El caldo de cultivo en los tubos con el suelo

autoclavado por dos veces permaneció claro y no se observó crecimiento de microorganismos, mientras que el caldo de cultivo de todos los tubos con suelo vivo se tornó turbio.

### **II.7.2. Adición de $^{15}\text{N-NO}_3^-$**

A cada tarro (esterilizados y no esterilizados) se le añadió una alícuota de 5 ml de una solución acuosa esterilizada de 0,68 g de  $\text{K}^{15}\text{NO}_3 \text{ l}^{-1}$  con un enriquecimiento en  $^{15}\text{N}$  del 99% atómico (el equivalente a 10 g de N g suelo seco<sup>-1</sup> aproximadamente), y se mezcló concienzudamente. Este paso fue ejecutado bajo condiciones asépticas para las muestras de suelo esterilizadas. Inmediatamente después de añadir el  $^{15}\text{N}$ , los tarros se cerraron herméticamente y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h. Tras el período de incubación, una muestra de suelo vivo y otra de suelo esterilizado de cada grupo de cuatro réplicas se sometieron a extracción con  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,5 M, empleándose agua desionizada para las muestras del otro par de tarros, todo ello en una proporción 1:5 suelo:extractante. Los tarros se agitaron y se dejaron sedimentar durante 1 h y luego fueron filtrados con bomba de vacío usando filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/F) previamente aclarados con agua desionizada. Tanto los extractos de agua como los de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  se llevaron a pH 2 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y se almacenaron a 4 °C para preservarlos hasta análisis posteriores. Todos los extractos de suelo se analizaron para DIN, TDN y DON. Las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  en los extractos de agua desionizada se midieron también por cromatografía iónica (IC) usando un sistema DIONEX con columna de guardia Ion-Pac AG14 y columna analítica AS14 (Dionex Corporation, document # 031199, "IonPac AS14 Manual"). También se determinó el hierro soluble en ambos tipos de extractos (agua desionizada y  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) con el método de la fenantrolina seguido de hervido en ácido e hidroxilamina (APHA 1989).

### **II.7.3. Determinación del enriquecimiento en $^{15}\text{N}$**

En la figura II.2 se muestra un resumen del procedimiento seguido en este experimento para la determinación del enriquecimiento en  $^{15}\text{N}$  de las reservas de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  y DON extraíbles del suelo. Se utilizó el método de difusión secuencial para atrapar las dos formas de N inorgánico en discos de filtro acidificados para prepararlos para la determinación de la relación isotópica  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  por espectrometría de masas (Stark y Hart 1996). El procedimiento analítico se detalla en el apartado II.8.11.

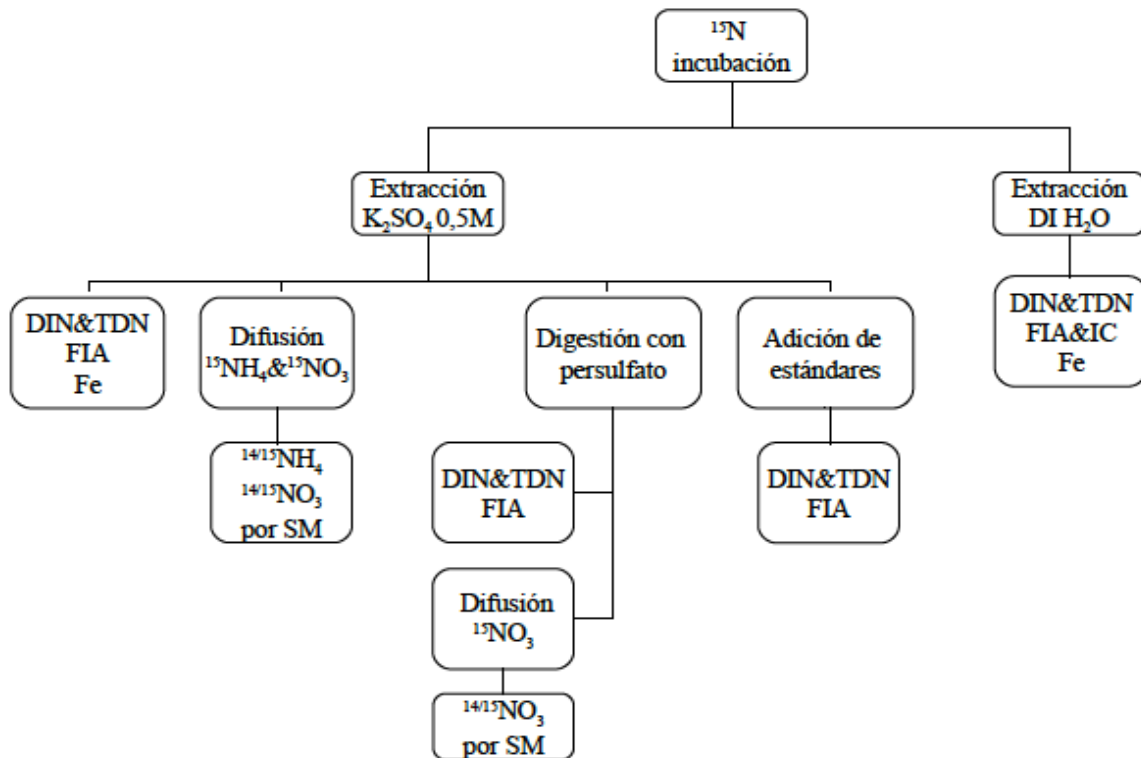


Figura II.2. Procedimiento para la determinación del enriquecimiento en  $^{15}\text{N}$  de las reservas de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y N orgánico disuelto (DON) del suelo. Otras abreviaturas: DIN, N inorgánico disuelto; Fe, hierro; FIA, análisis por inyección en flujo; IC, análisis por cromatografía iónica; SM, análisis por espectrometría de masas.

Otra alícuota de cada extracto de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  fue digerida siguiendo una modificación del método de oxidación con persulfato (D'Elia *et al.* 1976) para oxidar todos los componentes nitrogenados del extracto de suelo a  $\text{NO}_3^-$ . Dependiendo de la concentración de TDN de los extractos, se tomó el volumen del extracto digerido adecuado para proveer un rango de 80-300  $\mu\text{g}$  de N, y se diluyó con agua desionizada en matraces Duran hasta un volumen total de 40 ml. Se añadieron alícuotas de 5 ml de una solución de persulfato (25 g

de  $K_2S_2O_8$  en 500 ml de agua desionizada) y de 1,5 ml de una solución de NaOH 1N. Los matraces se cerraron y sometieron a digestión en un autoclave (121 °C, 1 h). A continuación, las disoluciones fueron sometidas al protocolo analítico de difusión del N hasta discos acidificados (apartado II.8.11) para determinar el enriquecimiento en  $^{15}N$  de la fracción TDN por espectrometría de masas. El enriquecimiento en  $^{15}N$  de la fracción de DON se calculó substrayendo el  $^{15}NO_3^-$  y el  $^{15}NH_4^+$  del  $TD^{15}N$  en los extractos de  $K_2SO_4$ .

Este protocolo estándar de estimación del DON (diferencia entre TDN y formas minerales de N) ha sido criticado por la posibilidad de que resulte en una sobre-estimación del mismo, si la reserva de  $NO_3^-$  está a su vez subestimada debido a interferencias analíticas en su determinación por la presencia de hierro en los extractos (Colman *et al.* 2007). Estos autores advierten que la “observación” de retención abiótica de nitrato en suelos podría ser sólo un artefacto derivado de la sobreestimación del DON poniendo, por tanto, en tela de juicio, la existencia de dicho mecanismo de retención de N. Para descartar esa posibilidad, se abordó el problema mediante tres comprobaciones independientes diferentes:

1) Se midió la concentración de  $NO_3^-$  en los extractos de agua desionizada con dos técnicas analíticas distintas: espectrofotométricamente por análisis de inyección en flujo (FIA) y por cromatografía iónica (IC). Mientras que el método FIA podría ser afectado por la interferencia con el Fe, la técnica IC utiliza un sistema de detección completamente diferente que no debería verse afectado por la presencia de Fe.

2) Se midió el Fe soluble en los extractos para determinar si sus concentraciones eran lo suficientemente altas como para ser susceptibles de causar problemas preocupantes de interferencia.

3) Se llevó a cabo una adición de estándares de  $NO_3^-$  a ambos tipos de extractos (agua desionizada y  $K_2SO_4$ ) tanto de los suelos esterilizados como de los suelos vivos, para medir la recuperación de esas cantidades conocidas de  $NO_3^-$  añadido mediante FIA (Davidson *et al.* 2008). Los extractos fueron analizados para  $NO_3^-$  por la misma metodología FIA que se recoge en el apartado II.8.4, antes y después de haber añadido una alícuota de estándar de  $NO_3^-$  calculada para incrementar su concentración en  $2 \text{ mg N l}^{-1}$ .

Para testar los efectos de la localidad y la esterilización, sobre el porcentaje de recuperación de  $^{15}\text{N}$  como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  y DON, se realizaron ANOVAs de dos vías. Para las variables que no cumplían las asunciones del ANOVA se aplicó la transformación  $\ln(x+1)$ . En el caso de  $^{15}\text{NH}_4^+$  las asunciones del ANOVA seguían sin cumplirse con la transformación logarítmica por lo que se realizó una transformación por rangos seguida del ANOVA de dos vías (Potvin y Roff 1993).

## **II.8. Especificaciones sobre el protocolo de los métodos analíticos empleados**

### **II.8.1. Humedad de las muestras de suelo y hojarasca**

El % de humedad de las muestras de suelo se determinó por gravimetría (Gardner 1986). En una estufa se desecaron 25 g de tierra fina a 104 °C durante 24 h, y posteriormente se volvió a pesar la muestra para conocer la pérdida de agua. Las muestras de hojarasca se secaron a 80 °C durante 48 h. Para el cálculo del % de humedad se aplicó el siguiente algoritmo:

$$\% \text{ humedad} = [ (\text{Peso}_{\text{fresco}} - \text{Peso}_{\text{seco}}) / \text{Peso}_{\text{seco}} ] \times 100.$$

### **II.8.2. Densidad aparente del suelo**

La densidad aparente del suelo de las localidades de estudio se determinó a tres profundidades (0-5 cm, 5-15 cm y 15-30 cm) mediante el método de excavación (Blake y Hartge). Se practicaron agujeros en el suelo a cada una de esas profundidades, sirviéndonos de una calicata. Las muestras de suelo extraídas de cada profundidad se guardaron en bolsas de plástico para transportarlas al laboratorio. El volumen de los agujeros excavados se determinó forrando sus paredes con tejido de plástico flexible, rellenándolos con arena lavada calibrada, y determinando el volumen de arena empleado mediante una probeta. Una vez en el laboratorio, las muestras de suelo se secaron en estufa (105 °C, 24 h), y se tamizaron (< 2 mm). Seguidamente, se pesó la tierra fina por un lado y las gravas por otro, para determinar el porcentaje de ambas fracciones.

La densidad aparente de la tierra fina se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$D_a = P_{TF} / [V_t - (P_g / D_g)]$$

donde,  $D_a$  es la densidad aparente de la tierra fina ( $\text{g cm}^{-3}$ );  $D_g$  es la densidad de la grava (estimada a partir del volumen de agua desplazado en una probeta por una muestra de gravas de peso conocido);  $P_{TF}$  es el peso en gramos de la tierra fina en la muestra;  $P_g$  es el peso en gramos de gravas en la muestra; y  $V_t$  es el volumen total de la muestra en  $\text{cm}^3$  (el volumen de arena medido con la probeta en el campo).

### II.8.3. Carbono y Nitrógeno totales

En el caso de muestras de suelo, alícuotas tamizadas ( $< 2 \text{ mm}$ ) se secaron en estufa ( $105^\circ \text{C}$ , 24 h), se molieron finamente en un mortero de ágata, y se pesó una submuestra de entre 4 y 5 mg que fue encapsulada en una envoltura de estaño. En el caso de las muestras de hojarasca, el material de partida (fracciones de  $> 2$  y  $> 1 \text{ mm}$ ), una vez secado ( $80^\circ \text{C}$ , 48 h), se trituró con un molino de cuchillas (IKA-MF10), previamente al molido fino de una alícuota en mortero de ágata y el encapsulado de una submuestra de entre 1.5 y 2 mg. Las concentraciones de C y N totales se determinaron empleando un Analizador Elemental CHNS-O Flash Series EA, en el Centro de Instrumentación Científico-Técnica de la Universidad de Jaén.

### II.8.4. Amonio y Nitrato

Para extraer el nitrato y el amonio de las muestras de suelo se empleó una solución de KCl 2 M como agente extractante, en una proporción 1:10 suelo:extractante (Keeney y Nelson 1982). Se pesó el equivalente a 3.5 g de peso seco de suelo en tubos Falcon de 50 ml y se añadió 35 ml de la solución extractante. Para las muestras de hojarasca se emplearon 3 g de muestra y 30 ml de extractante. Los tubos cerrados se agitaron en posición horizontal durante 2 h en un agitador de vaivén (200 rpm), procediéndose posteriormente al filtrado de los extractos. Una vez filtrados, los extractos fueron congelados hasta su posterior análisis.

Las concentraciones de amonio y nitrato en los extractos de suelo, así como en las muestras de aguas de trascolación y escorrentía, se determinaron en un autoanalizador de flujo continuo marca ALLIANCE FUTURA (Alliance Instruments, France), excepto en el experimento de retención abiótica de  $^{15}\text{N-NO}_3^-$ , en el que se midieron mediante análisis de inyección en flujo en un autoanalizador tipo LACHAT (Lachat Instruments, Milwaukee, USA).

La determinación del contenido de amonio en el autonalizador ALLIANCE se basó en el método espectrofotométrico del "azul indofenol" (Keeney y Nelson 1982). Este método se basa en la medida de absorbancia del compuesto azul que se forma al reaccionar el amonio con nitroprusiato de sodio e hipoclorito de sodio en condiciones de alcalinidad. La concentración de amonio se determinó a partir de la medida de absorbancia en el espectrofotómetro a 636 nm. Por su parte, el principio de la metodología seguida en el autoanalizador LACHAT para la determinación del N amoniacal se basó en la formación de un complejo de color verde esmeralda entre los iones amonio, salicilato y cloruro, en medio alcalino y en presencia de nitroprusiato sódico, de forma proporcional a la concentración de amonio. Se midió la absorbancia del compuesto coloreado a 660 nm.

La determinación de nitrato se realizó mediante la reducción del nitrato a nitrito por acción de pasar la muestra a través de una columna reductora de cadmio cuperizado y la medida de la concentración de nitrito siguiendo el método espectrofotométrico de Shinn (en Keeney y Nelson (1982)). Éste método se basa en la reacción del nitrito con N-naftiletildiamina y sulfanilamida, que produce un compuesto color rosado con pico de absorbancia a 540 nm. Del elevado número de muestras de suelos de los pinsapares analizados con anterioridad, en ningún caso la concentración de nitrito fue superior a  $1 \mu\text{g g}^{-1}$  (Liétor 2002; Salido 2007). Por este motivo, para este trabajo de Tesis, no se determinó directamente el nitrito en las alícuotas de los extractos. Por tanto, los datos de concentración de nitrato corresponden a nitritos totales (nitrato, más el nitrito presente en los extractos previamente a su drenaje por la columna reductora).

### **II.8.5. N total disuelto (TDN) y N orgánico disuelto (DON)**

La concentración de TDN de las muestras de agua lixiviada se determinó en un autoanalizador de flujo continuo marca ALLIANCE FUTURA. El método se basó en la transformación de las distintas formas de N presentes en la muestra a nitratos mediante foto-oxidación con lámpara UV en presencia de peroxidisulfato (Método adaptado de UNE-EN-ISO-11905-1=1998). En el circuito analítico, a continuación, el ion nitrato se reduce a nitrito durante su paso por una columna de Cd cuperizado, y se determina la concentración de nitrito siguiendo el método espectrofotométrico ya descrito (apartado II.8.4). En el caso de los extractos de suelo del experimento de retención abiótica de  $^{15}\text{N-NO}_3^-$ , la determinación del TDN se realizó con el mismo método pero empleando un autoanalizador LACHAT.

En todos los casos la concentración de DON se calculó como la diferencia:

$$DON = TDN - (NO_3^- + NH_4^+)$$

### **II.8.6. Nitrificación potencial en ausencia de limitación por sustrato**

Para la determinación de la nitrificación potencial del suelo de los pinsapares se utilizó el método desarrollado por Kandeler (1996) en el que, usando sulfato de amonio como sustrato y clorato de sodio como inhibidor de la oxidación del nitrito a nitrato, las muestras de suelo son incubadas durante 5 h a 25 °C. El nitrito producido durante el período de incubación es extraído con cloruro potásico y determinado espectrofotométricamente (apartado II.8.4).

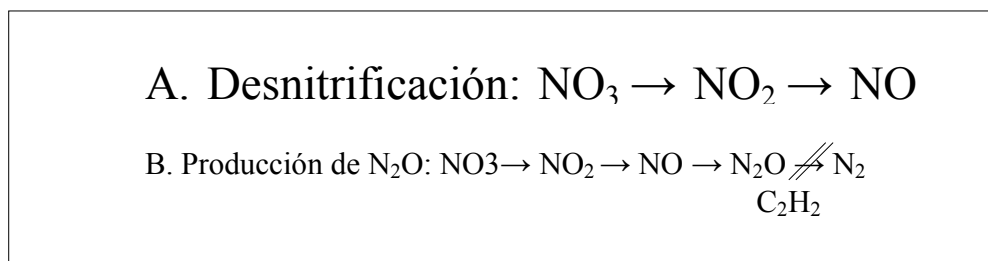
De cada una de las muestras, ya fueran de suelo o de hojarasca, se pesaron dos veces 5 g de suelo fresco y 3 g de hojarasca fresca respectivamente, en sendos tubos Falcon de 50 ml. Se añadieron 20 ml de una disolución sustrato de trabajo de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 mM, se mezcló brevemente y se cerraron los tubos con sus tapones. De cada muestra, un tubo Falcon se incubó durante 5 h en un agitador de vaivén (en adelante, + sustrato), y el otro se almacenó durante esas 5 h en congelador a -20°C (control).

Tras la incubación, los controles se llevaron a temperatura ambiente. Se añadió entonces 5 ml de disolución de KCl 2M tanto a los tubos “+ substrato” como “control”, se mezcló brevemente y se filtró de manera inmediata por gravimetría.

Para el análisis espectrofotométrico del nitrito, en tubos de ensayo se pipetearon 5 ml de los filtrados (y de soluciones patrón de nitrito en matriz KCl 2 M), 3 ml de disolución tampón de NH<sub>4</sub>Cl (0.19 M, pH 8.5) y 2 ml de reactivo de color (sulfanilamida y N-1-naftil-etilendiamina en medio ácido). El contenido de los tubos se mezcló empleando un agitador “vortex”, y se dejó reposar 15 min a temperatura ambiente. Tras este tiempo se midió la absorbancia a 520 nm de las soluciones “+ substrato”, “control” y patrón. Las tasas de nitrificación potencial se calcularon como la cantidad de nitrito producido (diferencia entre el nitrito medido en el extracto “+ substrato” y el extracto “control”) por unidad de masa de suelo y de tiempo de incubación ( $\mu\text{g N-NO}_2 \text{ g}_{\text{ss}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

### **II.8.7. Desnitrificación potencial en ausencia de limitación por aceptor o dador de electrones**

La desnitrificación es el proceso secuencial por el cual el  $\text{N-NO}_3^-$ , actuando como aceptor de electrones en la respiración de microorganismos desnitrificantes en condiciones de limitación por  $\text{O}_2$ , es reducido a  $\text{N}_2$  (Figura II.3.A). Dada la elevada concentración de  $\text{N}_2$  en la atmósfera, la medida de ligeras variaciones en la misma debidas a la desnitrificación resulta muy difícil. Klemetsson *et al.* (1977) propuso como alternativa inhibir con acetileno el último de los pasos en la secuencia de reacciones de la desnitrificación, de modo que el proceso se interrumpa con la producción de  $\text{N}_2\text{O}$  (Figura II.3.B). Como la concentración de este último gas es muy baja en la atmósfera (unas 310 ppb), incluso tasas pequeñas de producción de  $\text{N}_2\text{O}$  originan cambios significativos en su concentración en la atmósfera del contenedor en el que se realiza el ensayo, que son fáciles de medir y de discriminar. Así, tras la adición de acetileno, se miden diferencias de concentración de  $\text{N}_2\text{O}$  con las que se calcula la tasa de producción de  $\text{N}_2\text{O}$  que, en estas condiciones, representa una buena estimación de la tasa potencial de desnitrificación.



**Figura II.3. Formas gaseosas de N implicadas en la desnitrificación y en la producción de  $\text{N}_2\text{O}$  (mediante la inhibición del paso a  $\text{N}_2$  con acetileno).**

Se pesó el equivalente a 5 g de suelo fresco y a 3 g de hojarasca fresca, respectivamente, y se introdujeron en matraces Erlenmeyer de 125 ml, a los que se les añadieron 20 ml de una solución de nitrato potásico ( $\text{KNO}_3$ ) y glucosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), equivalentes a dosis de 0.2 mg de N y 2 mg de C por gramo en peso seco de suelo u hojarasca. Empleamos esta solución, en lugar de los 20 ml de agua destilada que prescribe el método convencional, al objeto de aliviar posibles efectos limitantes de la disponibilidad de C y de N sobre la actividad de la comunidad microbiana desnitrificante del suelo (Liétor 2002).

Cada matraz fue sellado herméticamente con un tapón “septum” de goma, burbujeándose el líquido en su interior con  $\text{N}_2$  durante 3 minutos para crear condiciones anaeróbicas. A continuación fueron inyectados 5 ml de agua saturada en acetileno. La presión del interior del matraz fue igualada con la presión exterior con una aguja hipodérmica durante 1 minuto. Las muestras fueron incubadas por un tiempo mínimo de 5 horas a 25 °C. Tras la incubación, las muestras se agitaron vigorosamente durante 30 segundos y se dejaron reposar durante otros 30 segundos. Tras este período se tomaron 2 ml de la fracción gaseosa de la muestra con una jeringa Hamilton (1 ml) y fueron analizadas en un cromatógrafo de gases HP 5890 serie II con detector de captura de electrones (Centro de Instrumentación Científico-Técnica de la Universidad de Jaén).

Para determinar la tasa de producción de  $\text{N}_2\text{O}$  se tuvieron en cuenta la concentración de  $\text{N}_2\text{O}$ , los volúmenes de la fase gaseosa y de la líquida, y el coeficiente de adsorción del

N<sub>2</sub>O de Bunsen (Wilhelm *et al.* 1977). Los resultados se expresaron como ng N-N<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> ss<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

#### II.8.8. Tasa de respiración

Para la determinación de la tasa de respiración se pesó el equivalente a 70 g de suelo seco en botes de plástico (500 ml) que se pre-incubaron a su humedad del campo, a 23 °C durante 4 d, para reactivar y estabilizar su actividad microbiana. En el caso de las muestras de hojarasca se pesó el equivalente a 20 g de hojarasca seca y la preincubación duró cinco días.

Las tasas de respiración se midieron de acuerdo con el método de la trampa de álcali descrito por Anderson (1982). Para ello, se introdujo en cada bote un vial con 10 ml de NaOH 0.5 N. En el caso de las muestras correspondientes a los tratamientos de adición de fuentes de C y de N (véase apartado II.4) se empleó el mismo volumen pero de NaOH 1.5 N. Los botes se taparon herméticamente y se incubaron a 23 °C, aeróbicamente (apertura breve diaria de los botes). Se incluyeron también seis “blancos” consistentes en botes con la trampa de álcali pero sin suelo. Estos blancos se usan para corregir el efecto del CO<sub>2</sub> preexistente en la atmósfera de los botes, así como el intercambiado con el aire exterior durante la aireación diaria.

Tras cada tiempo de incubación (apartados II.3 y II.4), los viales de los botes con muestra y de los blancos se retiraron, se vertió su contenido en matraces Erlenmeyer de 250 ml, y se lavaron con 25 ml de agua destilada que fue también vertida en el Erlenmeyer. A continuación se añadió un número de equivalentes, en exceso a los iniciales de sosa en los viales, de una solución de Cl<sub>2</sub>Ba 2.5 N para precipitar como BaCO<sub>3</sub> todo el carbonato formado por reacción con el CO<sub>2</sub>. Finalmente, tras añadir de 6 a 10 gotas de indicador de fenolftaleína, se procedió a la titulación con HCl (0.25 N para la respiración basal y 0.75 N para los tratamientos con C y C+N) del NaOH sobrante en los viales (que no reaccionó con CO<sub>2</sub> durante la incubación). Los resultados se expresaron como mg CO<sub>2</sub> g seco<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

### II.8.9. Tasas de mineralización neta del N (MNN) y de nitrificación neta (NN)

En ausencia de asimilación de N por las plantas, de lixiviación, de reducción heterotrófica de nitrato y de desnitrificación, la mineralización neta del N estará definida por la diferencia entre la mineralización y la inmovilización microbiana del N, determinándose a partir del cambio en el tamaño de las reservas de N inorgánico en el suelo a largo de un período de tiempo determinado (t):

$$\text{MNN } (\mu\text{g N g}^{-1} \text{ d}^{-1}) = ([\text{N-NO}_3^- + \text{N-NH}_4^+]_{\text{final}} - [\text{N-NO}_3^- + \text{N-NH}_4^+]_{\text{inicial}}) / T_{\text{días}}$$

Del mismo modo, las tasas netas de nitrificación se determinan a partir del cambio neto en el tamaño de la reserva de nitrato que tiene lugar a lo largo de un período determinado de tiempo (t):

$$\text{NN } (\mu\text{g N g}^{-1} \text{ d}^{-1}) = ([\text{N-NO}_3^-]_{\text{final}} - [\text{N-NO}_3^-]_{\text{inicial}}) / T_{\text{días}}$$

Para evaluar las tasas netas de mineralización del N y de nitrificación se realizaron incubaciones aeróbicas de suelo en el laboratorio (Hart *et al.*, 1994). Se utilizaron alícuotas de las mismas muestras de suelo y hojarasca contenidas en los botes de incubación empleados para determinar las tasas de respiración (23°C, ~humedad de campo, oscuridad, aireación diaria). Se tomaron alícuotas de las muestras (3,5 g para el suelo, 3 g para la hojarasca) a los 0, 2, 7, 14, y 26 días de incubación. El análisis de las concentraciones de amonio y de nitrato en estas alícuotas se realizó según se indica en el apartado II.8.4.

Las tasas de mineralización neta del N y de nitrificación neta se calcularon con las fórmulas anteriores empleando los datos correspondientes a los tiempos de incubación  $t = 0$  días (inicial) y  $t = 26$  días (final). Los datos correspondientes a todos los tiempos de incubación considerados fueron utilizados para estudiar la dinámica de las concentraciones de las distintas formas de N inorgánico con el tiempo.

## **II.8.10. Estudio de la estructura de la comunidad microbiana del suelo mediante análisis de ADN (T-RFLP)**

### ***II.8.10.A. Extracción de ADN del suelo***

El ADN se extrajo del suelo de acuerdo a la metodología descrita en (Pennanen *et al.* 2004), con la salvedad de que, en nuestro caso, utilizamos placas con 96 celdas. Brevemente, se extrajo el ADN de un gramo de suelo mediante la adicción de 2 ml de NaHPO<sub>4</sub> 0.12 M en una solución tamponada de sodio docecilsulfato (SDS) al 1 %. Se tomó 1 ml de la mezcla y los ácidos nucleicos se extrajeron mediante la disrupción de las células utilizando un agitador de cuentas (bead beater) durante 90 segundos a 30 Hz (Retsch Mixer Mill MM300). La agitación se repitió durante 3 veces (manteniendo los tubos en hielo entre cada pulso, y girando los contenedores para asegurar un extracción uniforme).

Posteriormente se procedió a la centrifugación de los tubos durante 5 minutos a 5000 rpm. La fase acuosa fue transferida a un tubo limpio de 2 ml y se añadieron 450 µl de una solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). A continuación se agitó la mezcla durante unos 30 segundos y se procedió a su centrifugación (5000 rpm durante 5 minutos). Posteriormente la fase acuosa se transfirió a nuevos tubos, a los que se añadieron 450 µl de una solución cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), repitiendo posteriormente la agitación y centrifugación. La fase acuosa se volvió a transferir a nuevos tubos a los que además se añadió 400 µl de isopropanol y 40 µl de acetato sódico 3M, y se centrifugaron (5000 rpm durante 5 minutos), descartando el sobrenadante nuevamente. Los tubos se lavaron seguidamente con etanol frío al 70 % y se centrifugaron (5000 rpm durante 5 minutos), descartando el sobrenadante de nuevo. El precipitado se resuspendió en 50 µl de 10 mM Tris·Cl (pH 8.5). Los 50 µl de suspensión se sometieron a una separación en una columna de polivinilpolipirrolidona (PVPP, Sigma), para purificar el ADN. Previamente, la PVPP en polvo había sido empacada en los platos Multiscreen HTS HV (Millipore), los cuales fueron estabilizados tres veces con agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato).

### ***II.8.10.B. Amplificación de ADN bacteriano mediante PCR***

La PCR para eubacterias se realizó usando 1 µl de los extractos de ADN extraídos del suelo diluidos 100 veces (prueba inicial). Se amplificó un fragmento de 1365 pb en un volumen total de reacción de PCR de 15 µl que contenía tampón Platinum Taq con MgCl<sub>2</sub>, una concentración final de cada nucleótido de 0.06 mM (dNTP: dATP, dCTP, dGTP y dTTP), una concentración final de cada cebador de 0.4 mM: 16f27 marcado con el fluoróforo FAM (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'; Lane 1991) y 1392R marcado con el fluoróforo VIC (5'ACGGGCGRTGTGTACA 3'; Amann *et al* 1995), 6 µg albúmina de suero bovino BSA y 0.3U de ADN polimerasa (Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity-Invitrogen).

Antes de la amplificación, la mezcla de reactivos para la PCR se sometió a digestión con la enzima de restricción HhaI (40 min a 37 °C) para eliminar posible contaminación bacteriana con la subsiguiente inactivación por calor (10 min a 65 °C) de la actividad endonucleasa.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador DNA Engine DYAD, con un periodo inicial de desnaturalización de 4,5 min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de amplificación de: desnaturalización (0.5 min a 94 °C), hibridación (0.5 min a 57 °C) y elongación (1.5 min a 68 °C) y un último paso de extensión a 68 °C durante 10 min. A continuación se llevó a cabo el enfriamiento de la placa a 4 °C durante 15 min.

Los productos de la PCR fueron visualizados tras una separación con electroforesis en gel de agarosa 1.5 %, con TBE (EDTA-tris-borato) como tampón, y teñido en un baño de bromuro de etidio.

### ***II.8.10.C. Amplificación de ADN de bacterias desnitrificantes mediante PCR***

Para la amplificación del ADN de bacterias desnitrificantes se llevó a cabo una PCR “anidada” en dos fases usando 4 cebadores o “primers” en dos reacciones separadas.

En la primera reacción se utilizó 1 µl de los extractos de ADN extraídos del suelo

(dilución 1/50 o 1/100 según muestra, prueba previa). Se amplificó un fragmento de 540 pb en un volumen total de reacción de PCR 15 µl que contenía tampón Expand Taq con MgCl<sub>2</sub>, una concentración final de cada nucleótido de 0.1 mM (dNTP: dATP, dCTP, dGTP y dTTP), una concentración final de cada cebador de 0.3 mM: nirKF1 (5' TTCGTCTAYCAYTGYGC 3'; SCRI) y nirKR1 (5' GCCTCGATCAGRTRRTG 3'; SCRI), 10 µg albúmina de suero bovino BSA y 0.5U de ADN polimerasa (Expand Taq High Fidelity-Roche).

La reacción se llevó a cabo en un termociclador DNA Engine DYAD, con un periodo inicial de desnaturalización de 3 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de amplificación de: desnaturalización (0.5 min a 94 °C), hibridación (0.5 min a 54 °C) y elongación (0.75 min a 72 °C) y un último paso de extensión a 72 °C durante 10 min. A continuación se llevó a cabo el enfriamiento de la placa a 4 °C durante 15 min.

La segunda PCR se aplicó al producto (dilución 1:100) de la primera. Se amplificó un fragmento de 475 pb en un volumen total de reacción de PCR de 15 µl con las mismos reactivos y concentraciones que la primera pero con los siguientes cebadores (0.3 mM de concentración final de cada uno): nirKF2 marcado con FAM (5' ATGGTSCTKCCSCGYGA 3'; Braker *et al.* (1998)) y nirKR5 (5' GCCTCGATCAGRTRRTGG 3'; Braker *et al.* (1998)).

La segunda PCR también se llevó a cabo en un termociclador DNA Engine DYAD. Tras un periodo inicial de desnaturalización de 5 min a 95 °C se realizó una PCR touchdown (Braker *et al.* 2000; Priemé *et al.* 2002), que consistió en una etapa de desnaturalización de 30 seg a 95 °C seguida de 35 ciclos de amplificación con una etapa de desnaturalización 30 seg a 95 °C, etapa de hibridación de 40 seg y un fase de extensión de 30 seg a 72 °C. Durante los 10 primeros ciclos, la temperatura de hibridación fue disminuida 0.5 °C cada ciclo, empezando en 56 °C hasta que alcanzó 51.5 °C. Durante los siguientes 25 ciclos, la temperatura de hibridación se cambió a 54 °C. Después de los 35 ciclos, se realizó una incubación final de 10 min a 72 °C. A continuación se llevó a cabo el enfriamiento de la placa a 4 °C durante 1 hora.

Los productos de la PCR fueron visualizados tras una separación con electroforesis

en gel de agarosa 1.5 %, con TBE (EDTA-tris-borato) como tampón, y teñido en un baño de bromuro de etidio.

#### ***II.8.10.D. Análisis de T-RFLP***

Para el ADN bacteriano, el producto marcado con fluorescencia de la PCR (3  $\mu$ l para un volumen final de 5  $\mu$ l) fue digerido con la enzima de restricción Alu I (5 U) (Promega, Madison, WI, USA) mediante una incubación de 2 h a 37 °C seguida por una desnaturalización a 65 °C durante 10 min.

Para la digestión del ADN de desnitrificantes, se realizó una prueba previa para averiguar qué enzima de restricción daba mejores resultados. Se probó con las enzimas Hha I, Hae III y MspI, de forma individualizada. Tras dos horas de digestión (incubación 37 °C) se visualizaron los productos de las digestiones mediante una electroforesis en gel de agarosa observándose que la enzima que mejores resultados ofrecía era la Hae III (lugar de restricción: GG/CC ). Por tanto, el producto marcado con fluorescencia de la segunda PCR (3  $\mu$ l para un volumen final de 5  $\mu$ l) fue digerido con la enzima de restricción Hae III (5 U) mediante una incubación de 2h a 37°C.

A continuación, alícuotas (1  $\mu$ l) de los productos de la digestión (diluido 1/10) se mezclaron con 8.95  $\mu$ l de formamida (Applied Biosystems) y 0.05  $\mu$ l de estándar interno de tamaño LIZ500 (Applied Biosystems Inc., Fremont, CA).

Las longitudes de los fragmentos terminales de las muestras digeridas fueron determinadas en un analizador de secuencias automático ABI 3700 por electroforesis capilar. También se realizó la digestión y el análisis de blancos (controles negativos de la PCR). Los perfiles resultantes de la electroforesis se analizaron con Genemapper ® Software v3.7 (Applied Biosystems UK), lo que permitió la medida del tamaño de los picos y la generación del área de pico para cada pico identificado. La abundancia relativa de cada fragmento de ADN fue determinada calculando la ratio entre el área del pico a la longitud de pico específica de ese fragmento y el área total de pico de todos los fragmentos de ADN de la muestra. Para eliminar el error introducido por el software, sólo se consideraron para posteriores análisis los fragmentos terminales de ADN con una abundancia relativa mayor a

0.01.

### II.8.11. Análisis de $^{15}\text{N}$ en muestras líquidas

Para el análisis separado de  $^{15}\text{N}$  en forma de nitrato y en forma de amonio en extractos líquidos de muestras de suelo (experimento de retención abiótica de nitrato, apartado II.5), se empleó un método de difusión secuencial (Stark y Hart 1996). Este método retira del extracto acuoso, hacia discos de filtro acidificados, primero el amonio, y después el nitrato. La fracción de N inorgánico correspondiente queda atrapada en estos discos, y la relación isotópica  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  se analiza por espectrometría de masas. De forma breve, en primer lugar se añade MgO al extracto líquido a analizar, contenido en botes herméticos que se agitan diariamente durante seis días. Este procedimiento reduce a  $\text{NH}_3$  el  $\text{NH}_4^+$  presente en el extracto. El  $\text{NH}_3$ , muy volátil en medio alcalino, queda atrapado en un disco de papel de fibra de vidrio acidificado, colocado en flotación sobre la superficie de la muestra líquida. Tras ese periodo, los discos de papel de filtro se extraen, se secan y se introducen en cápsulas de estaño para el análisis de su contenido en  $^{15}\text{N}$  por espectrometría de masas. Una vez que el amonio ha sido retirado del extracto líquido del suelo, se añade a éste una cantidad de aleación de Devarda finamente molida, la cual reduce el nitrato a amonio. Entonces se repite el proceso de difusión de dicho amonio hacia nuevos discos acidificados, cuyo análisis por espectrometría de masas da la fracción de  $^{15}\text{N}$  en forma de nitrato. También se sometieron tres blancos a difusión secuencial y se pipetearon estándares de  $^{15}\text{N}$  directamente sobre discos acidificados de fibra de vidrio para corregir posibles fuentes de contaminación y la dilución de  $^{15}\text{N}$  durante las difusiones (Stark y Hart 1996).

En el caso de las muestras de agua de lixiviación (experimento de fertilización y marcaje *in situ* con  $^{15}\text{N}$ , apartado II.4), el análisis de  $^{15}\text{N}$  se efectuó sobre todo el N disuelto (TDN). Para ello, alícuotas de las muestras fueron sometidas a un paso previo de digestión con persulfato en autoclave (D'Elia *et al.* 1976) para oxidar todos los componentes nitrogenados a  $\text{NO}_3^-$ . Tras la digestión, las disoluciones fueron tratadas con aleación de Devarda finamente molida para reducir el nitrato total en la muestra (correspondiente al TDN) a amonio, para su posterior difusión en forma de  $\text{NH}_3$  hasta discos acidificados.

Los filtros de todas las difusiones se enviaron a la Universidad de Davis en California para los análisis de  $^{15}\text{N}$  mediante un espectrómetro de masas EUROPA INTEGRA en UC Davis Stable Isotope Facility.

## ***II. Resultados***



### III.1. Objetivo 1, “Evaluación general de la biogeoquímica y disponibilidad del N en el suelo de los pinsapares: fuentes de variación principales”

#### III.1.1. Abundancia natural de $^{15}\text{N}$

Para efectuar una inferencia general inicial, integrada en el tiempo, respecto al carácter más o menos abierto del ciclo del N en los pinsapares de estudio, se determinó la distribución vertical de la abundancia natural de  $^{15}\text{N}$  en sus suelos (Tabla III.1).

**Tabla III.1. Concentración de N total y abundancia natural de  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ) en el perfil del suelo de los cuatro sitios de estudio a igual altitud (Y, SR, BP y R). Capa de hojarasca: L (residuos vegetales identificables no fragmentados) y F (residuos no fácilmente identificables y muy fragmentados). Suelo a distintas profundidades: 0 a 5cm, 5 a 15cm y >15cm. Entre paréntesis se indica el error estándar (n=4). Letras minúsculas distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre sitios. Letras mayúsculas distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre compartimentos. Nivel de significación  $\alpha=0.05$  en ambos casos.**

Litología:		<i>Serpentinas-Peridotitas</i>		<i>Calizas-Dolomías</i>	
Estado sucesional:		<i>Agradativo (“maturing”)</i>			<i>“Old-growth”</i>
Deposición atmosférica N:		<i>Alta</i>		<i>Baja</i>	
Variable	Compartimento	BP	SR	Y	R
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	L	-5,41(0,18) <sup>cA</sup>	-6,72(0,19) <sup>bA</sup>	-4,39(0,07) <sup>aA</sup>	-4,16(0,17) <sup>aA</sup>
	F	-3,70(0,27) <sup>bcB</sup>	-4,55(0,34) <sup>cB</sup>	-2,48(0,13) <sup>abB</sup>	-3,17(0,16) <sup>abB</sup>
	0-5cm	-1,08(0,22) <sup>bc</sup>	-0,64(0,47) <sup>bc</sup>	1,57(0,11) <sup>aC</sup>	0,15(0,08) <sup>cC</sup>
	5-15cm	0,72(0,41) <sup>cd</sup>	1,68(0,52) <sup>bcD</sup>	3,47(0,17) <sup>aC</sup>	1,38(0,20) <sup>cD</sup>
	>15cm	1,29(0,33) <sup>cd</sup>	3,04(0,19) <sup>bd</sup>	5,18(0,22) <sup>ad</sup>	2,22(0,20) <sup>dd</sup>
$\text{N}_{\text{total}}$ (%)	L	1,07(0,09) <sup>aA</sup>	0,89(0,05) <sup>bA</sup>	1,21(0,07) <sup>aA</sup>	1,04(0,04) <sup>abA</sup>
	F	1,07(0,11) <sup>aA</sup>	1,01(0,09) <sup>aA</sup>	1,17(0,08) <sup>abA</sup>	1,27(0,01) <sup>bA</sup>
	0-5cm	0,54(0,05) <sup>bb</sup>	0,37(0,06) <sup>ab</sup>	0,33(0,01) <sup>ab</sup>	1,16(0,05) <sup>cAB</sup>
	5-15cm	0,36(0,05) <sup>bc</sup>	0,19(0,03) <sup>ac</sup>	0,22(0,01) <sup>abc</sup>	0,90(0,04) <sup>cBC</sup>
	>15cm	0,28(0,03) <sup>bc</sup>	0,14(0,01) <sup>ac</sup>	0,15(0,01) <sup>ac</sup>	0,74(0,03) <sup>cC</sup>

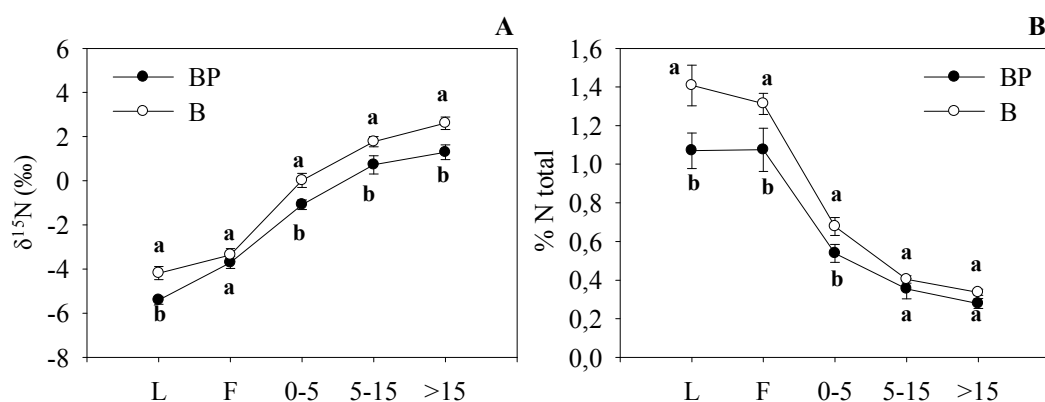
La señal de  $^{15}\text{N}$  fue significativamente menor (más empobrecimiento en isótopo pesado) en los compartimentos de hojarasca que en los de suelo en todos los pinsapares (Tabla III.1). Respecto a la capa de hojarasca, en todas las localidades se observaron valores significativamente superiores en el horizonte L respecto al F (Tukey,  $p<0,05$ ). En el

suelo mineral, las cifras de  $\delta^{15}\text{N}$  se incrementaron significativamente con la profundidad (Tukey,  $p < 0,05$ ).

La señal  $\delta^{15}\text{N}$  fue significativamente mayor en Y (pinsapar calcícola agradativo, bajas tasas de deposición atmosférica de N) que en el resto de los sitios, para todas las profundidades del suelo analizadas ( $p < 0,05$ ). Los menores valores se encontraron en BP (pinsapar serpentinícola, mayor deposición de N), siendo intermedios en SR (pinsapar serpentinícola, baja deposición de N) y R (pinsapar calcícola “old-growth”) (Tabla III.1). Comparando BP y SR, los valores de abundancia natural de  $^{15}\text{N}$  en el compartimento H tendieron a ser mayores en el primer caso, con diferencias significativas en la capa L. Sin embargo, para el suelo, las cifras fueron mayores en SR, con diferencias significativas sólo a la mayor profundidad. Comparando Y y R, no se observaron diferencias en los compartimentos de hojarasca, y sí en todas las profundidades de suelo muestreadas, con valores  $\delta^{15}\text{N}$  significativamente menores en el pinsapar maduro (R) que en el joven (Y). Comparando SR con Y, los valores fueron menores en el primero (pinsapar serpentinícola) que en el segundo (pinsapar calcícola) en todos los compartimentos de hojarasca y de suelo.

Respecto al N total (Tabla III.1), en todos los compartimentos de suelo se encontraron efectos significativos del estado sucesional, con valores superiores en R (pinsapar maduro) que en Y (pinsapar agradativo); así como de la deposición atmosférica de N, con mayores valores de N total en el pinsapar con mayores tasas de deposición de N (BP > SR) (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ). En cuanto a los compartimentos de hojarasca, el %N total fue significativamente superior a mayores tasas de deposición en la capa L sin que existiese efecto significativo en la capa F. Todas las parcelas mostraron un descenso en el valor del N total a lo largo del perfil del suelo que fue significativo en función del sitio. No se encontraron diferencias significativas en ningún pinsapar ni entre los dos compartimentos de hojarasca (L y F) ni entre los dos compartimentos más profundos del suelo (5-15cm; >15cm). En los compartimentos de hojarasca, el N total fue significativamente superior al encontrado en los compartimentos de suelo en todos los pinsapares excepto en R, donde no se encontraron diferencias respecto al compartimento de 0-5cm.

Aunque no se incluye de manera general en el diseño experimental de este apartado, se efectuaron adicionalmente medidas de  $^{15}\text{N}$  en la localidad B (comparable a la BP excepto en altitud). Como puede observarse en la Figura III.1, en Sierra Bermeja (elevada deposición de N) se encontraron diferencias significativas entre 1200 m (BP) y 1500 m (B) de altitud en la abundancia natural de  $^{15}\text{N}$  en todos los compartimentos muestreados (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ), excepto en la hojarasca F, siendo mayor la señal de  $^{15}\text{N}$  en el sitio de mayor altitud. La proporción de N total en las mismas muestras (Figura III.9.A) fue significativamente superior en B que en BP en la hojarasca, L y F, y en el suelo de 0-5cm de profundidad ( $p < 0,05$ ), sin que existiesen diferencias en zonas más profundas del suelo.



**Figura III. 1. (A) Abundancia natural de  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ , ‰), y (B) porcentaje de N total, en el perfil del suelo de pinsapares serpentínícolos con síntomas de saturación de N a diferente altitud (localidades BP: 1200 m, y B:1500 m), en las capas de hojarasca (L y F) y en el suelo a distintas profundidades (0 a 5cm, 5 a 15cm y >15cm). Se representan los valores medios y el error estándar (n=4). Letras distintas indican diferencias significativas entre sitios en cada compartimento.**

### III.1.2. Concentraciones en distintas fracciones y tasas de transformación del N

#### III.1.2.A. Nitrógeno y Carbono totales

La estación del año en que se efectuó el muestreo (primavera o verano) no tuvo efectos significativos sobre las concentraciones de N y de C totales ni sobre la relación C/N (véase Tabla VII.1 en el Anexo-Material Suplementario, con los resultados del ANOVA de medidas repetidas). El efecto del compartimento del suelo sí fue significativo sobre esas tres variables. Así, la capa de hojarasca (H) mostró valores significativamente mayores que el suelo superficial (horizonte Ah, 0-10 cm) en todos los pinsapares y fechas de muestreo, exceptuando los casos de R en verano para Nt y Ct, y de BP en primavera para la relación C/N (Tabla III.2; test *post-hoc* HSD de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tanto en primavera como en verano, se encontraron valores significativamente más altos de Nt en las localidades Y y R (calizas) que en SR y BP (serpentinicas), excepto en el caso del suelo superficial en verano para la comparación entre Y y SR (Tabla III.2). No se observaron diferencias significativas entre SR (limitación por N) y BP (saturación por N) para ningún compartimento ni fecha de muestreo. El % de Nt en el compartimento Ah fue siempre significativamente superior en R (pinsapar maduro) que en Y (pinsapar joven).

En general, las concentraciones de Ct en el compartimento H fueron significativamente superiores en los pinsapares calcícolas (Y y R) que en los serpentinícolas (SR y BP) (Tabla III.2). En el caso del suelo superficial, el pinsapar maduro (R) mostró en las dos fechas de muestreo un % de Ct significativamente mayor que el resto de localidades.

La relación C/N tomó valores en torno a 25 en el compartimento H y en torno a 20 en el Ah (Tabla III.2). Dentro de los pinsapares serpentinícolas, la relación C/N fue mayor en SR que en BP (menor y mayor deposición de N, respectivamente), de modo significativo en ambas estaciones para H y sólo en verano para Ah. Respecto a los pinsapares calcícolas, la relación C/N en primavera fue significativamente mayor en Y que en R en ambos compartimentos, y en verano sólo en el caso del suelo.

**Tabla III.2. Porcentajes de N y de C totales en los compartimentos H (fracciones L+F de la hojarasca) y Ah (suelo mineral de 0-10 cm), en primavera (P) o en verano (V), en los cuatro pinsapares muestreados (Y, SR, BP y R). Entre paréntesis se indican los errores estándar (n=5). Las letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre sitios (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ), y los asteriscos entre compartimentos del suelo (test *post hoc* de Tukey; \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ).**

			<b>BP</b>	<b>SR</b>	<b>Y</b>	<b>R</b>
<b>% N total</b>	H	P	0,87 (0,03) <sup>a</sup>	0,74 (0,05) <sup>a</sup>	1,19 (0,04) <sup>b</sup>	1,18 (0,06) <sup>b</sup>
		V	0,78 (0,09) <sup>a</sup>	0,76 (0,11) <sup>a</sup>	1,08 (0,04) <sup>b</sup>	1,01 (0,10) <sup>b</sup>
	Ah	P	0,32 (0,03) <sup>a</sup>	0,25 (0,02) <sup>a</sup>	0,44 (0,03) <sup>b</sup>	0,84 (0,06) <sup>c</sup>
		V	0,41 (0,05) <sup>a</sup>	0,28 (0,04) <sup>ab</sup>	0,43 (0,02) <sup>b</sup>	0,89 (0,08) <sup>c</sup>
	H vs Ah	P	***	***	***	*
		V	*	***	***	n.s.
<b>%C total</b>	H	P	19,9 (0,46) <sup>a</sup>	21,2 (1,94) <sup>a</sup>	31,9 (0,35) <sup>b</sup>	28,5 (2,66) <sup>b</sup>
		V	20,2 (2,63) <sup>a</sup>	23,2 (3,39) <sup>ab</sup>	26,5 (1,18) <sup>b</sup>	23,8 (2,55) <sup>ab</sup>
	Ah	P	6,51 (0,68) <sup>a</sup>	5,24 (0,46) <sup>a</sup>	8,56 (0,67) <sup>a</sup>	14,7 (1,28) <sup>b</sup>
		V	7,73 (1,01) <sup>a</sup>	5,98 (0,91) <sup>a</sup>	8,55 (0,37) <sup>a</sup>	15,9 (1,55) <sup>b</sup>
	H vs Ah	P	***	***	***	***
		V	**	***	***	n.s.
<b>Relación Ct/Nt</b>	H	P	23,0 (0,54) <sup>a</sup>	28,4 (1,13) <sup>b</sup>	26,9 (0,78) <sup>b</sup>	24,0(1,08) <sup>a</sup>
		V	25,6 (0,84) <sup>a</sup>	30,7 (0,37) <sup>b</sup>	24,6 (0,67) <sup>a</sup>	23,5 (0,36) <sup>a</sup>
	Ah	P	20,0 (0,56) <sup>a</sup>	21,0 (0,36) <sup>a</sup>	19,4 (0,75) <sup>a</sup>	17,4 (0,28) <sup>b</sup>
		V	18,9 (0,30) <sup>a</sup>	21,0 (0,54) <sup>b</sup>	20,3 (1,41) <sup>ab</sup>	17,8 (0,29) <sup>c</sup>
	H vs Ah	P	n.s.	***	***	***
		V	***	***	*	***

### III.1.2.B. Formas inorgánicas extraíbles de N

Se obtuvo significación estadística para los efectos principales del compartimento del suelo, de la localidad y de la fecha de muestreo, sobre las concentraciones de N mineral tanto de forma conjunta ( $N_i$ ) como separadamente en sus formas de amonio ( $NH_4^+$ ) y de nitrato ( $NO_3^-$ ) (Tabla VII.1 Anexo-Material Suplementario, resultados del ANOVA de medidas repetidas). No obstante y exceptuando el caso del nitrato, los efectos de la localidad fueron dependientes del compartimento del suelo de que se tratara (interacciones “sitio\*compartimento” significativas). Los efectos de la estación del año (primavera o verano) fueron interdependientes del compartimento y de la localidad para las tres variables citadas (interacciones “tiempo\*sitio\*compartimento” significativas).

Se observó una tendencia general de mayores concentraciones de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{N}_i$  total en primavera que en verano, y en el compartimento H respecto al Ah (Figura III.2; tests *post-hoc* de Tukey,  $p < 0,05$ ).

*Efecto de la deposición de N.* Comparando BP con SR (pinsapares serpentinícolas agradativos, saturado y limitado por N, respectivamente), los niveles de  $\text{N}_i$  fueron significativamente superiores en primavera en el primero tanto en el compartimento H como Ah, y debido fundamentalmente a la contribución del  $\text{NO}_3^-$  (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ). Así, en el pinsapar saturado por N se encontró una concentración de nitrato hasta siete veces superior en la hojarasca ( $67,0$  y  $9,14 \mu\text{gN-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en BP y SR, respectivamente), y casi tres veces superior en el suelo ( $25,0$  y  $8,9 \mu\text{gN-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en BP y SR, respectivamente). Este patrón de mayores concentraciones de  $\text{N}_i$  en B que en SR se mantuvo en verano, pero en esta estación del año el  $\text{NH}_4^+$ , en lugar del  $\text{NO}_3^-$ , fue el mayor contribuyente a la diferencia.

*Efecto del estado sucesional.* Comparando R con Y (pinsapares calcícolas con bajas tasas de deposición de N, maduro y en fase agradativa, respectivamente),  $\text{N}_i$  fue significativamente superior en el primero en las dos fechas y compartimentos del suelo (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ), contribuyendo de nuevo a tal patrón mayoritariamente el  $\text{NO}_3^-$  en primavera y el  $\text{NH}_4^+$  en verano.

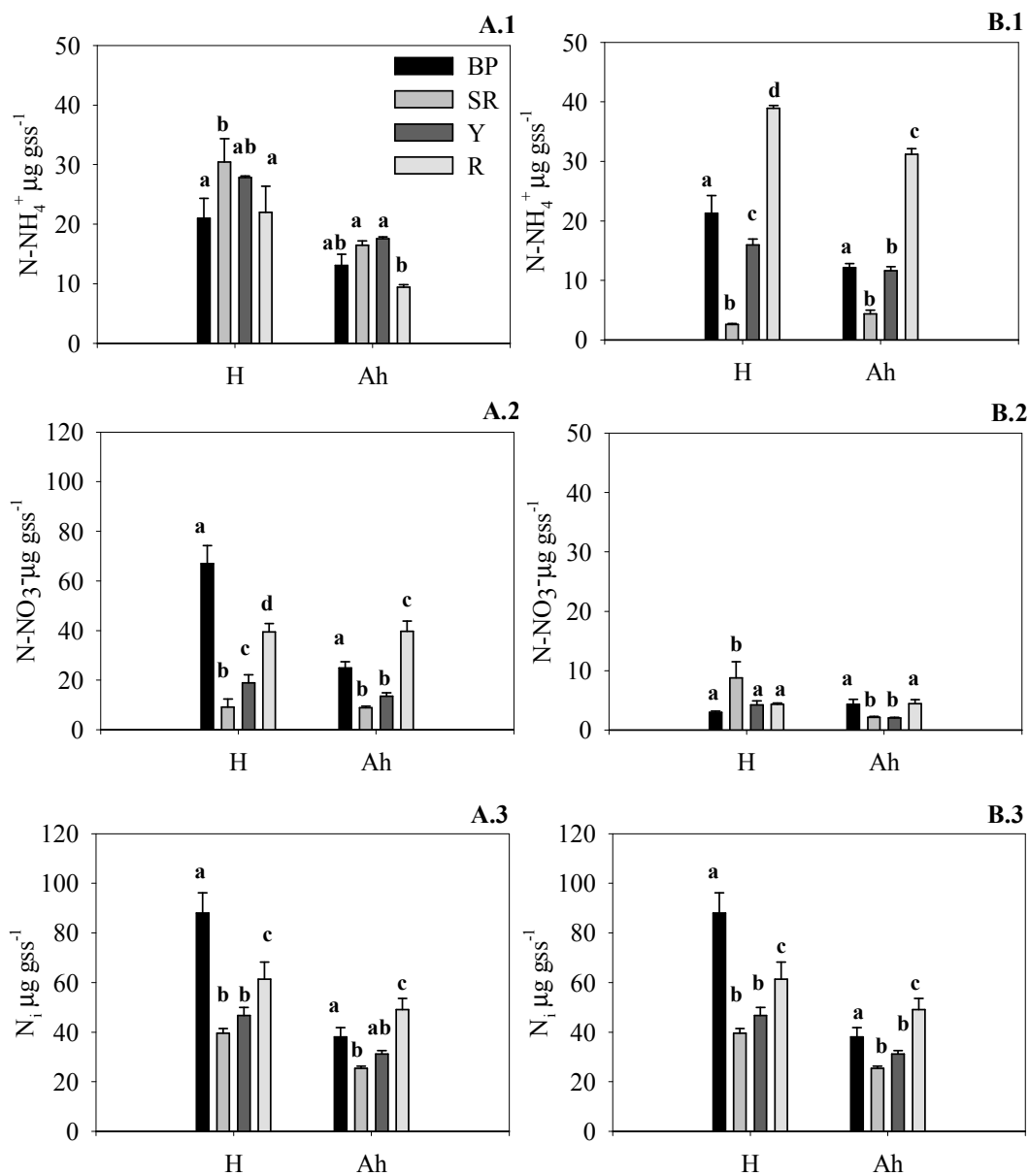


Figura III. 2. Concentraciones ( $\mu\text{g N g}^{-1}$  de suelo seco) de amonio (1), nitrato (2) y nitrógeno inorgánico total (3) en primavera (A) y en verano (B) en SR, Y, BP y R para los dos compartimentos de suelo muestreados, hojarasca (H=L+F) y horizonte Ah (0-10cm). Se representan las media con el error estándar (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas entre sitios para cada compartimento ( $p < 0,05$ ).

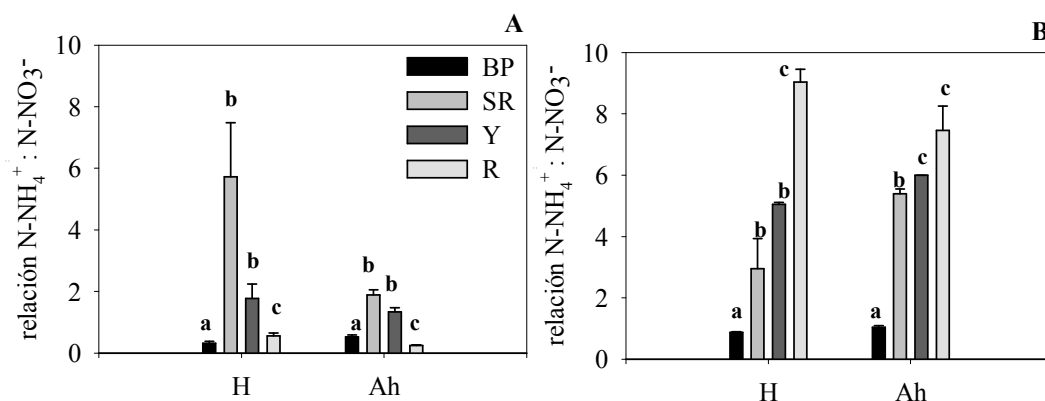
*Efecto de la litología.* Comparando Y con SR (pinsapares en fase agradativa limitados por N, calcícola y serpentínica, respectivamente), no se observaron diferencias en  $N_i$  en ninguna de las dos fechas y compartimentos. Respecto al  $NO_3^-$ , sus concentraciones en la hojarasca fueron significativamente mayores en primavera en Y, y en verano en SR; en el suelo superficial no se observaron diferencias estacionales entre estas dos localidades. Respecto al  $NH_4^+$ , en primavera no se encontraron diferencias entre Y y SR en ninguno de los compartimentos del suelo, y en verano sus niveles fueron significativamente superiores en la hojarasca en Y.

*Relación  $N-NH_4^+ : N-NO_3^-$*  (Figura III.3). Sus valores fueron parecidos en la capa de hojarasca y en el suelo superficial, existiendo diferencias significativas entre ambos compartimentos sólo para el caso de muestras de verano en la localidad SR (Tukey,  $p < 0,05$ ). Tampoco se observó un patrón consistente entre localidades y compartimentos respecto a la variación estacional de este índice, aunque sus valores en los pinsapares calcícolas tendieron a ser mayores en verano que en primavera.

Se observó un efecto global significativo de la deposición atmosférica de N sobre la relación  $N-NH_4^+ : N-NO_3^-$  (comparación BP vs SR; comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ), con valores significativamente inferiores en ambas fechas de muestreo y compartimentos del suelo en BP ( $N-NH_4^+ : N-NO_3^- < 1$ ) que en SR ( $N-NH_4^+ : N-NO_3^- > 2$ ).

También se observaron diferencias significativas debidas al estado sucesional (Y vs R; comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ), pero dependientes de la estación del año. Así, en primavera, la relación ( $N-NH_4^+ : N-NO_3^-$ ) fue significativamente mayor (tanto muestras H como Ah) en el pinsapar agradativo. Pero en verano, las cifras tendieron a ser superiores en el pinsapar “old-growth”, alcanzando significación en el caso de la hojarasca.

La litología (Y vs SR) no mostró un efecto significativo sobre esta variable (comparaciones planeadas *a priori*,  $p > 0,05$ ).



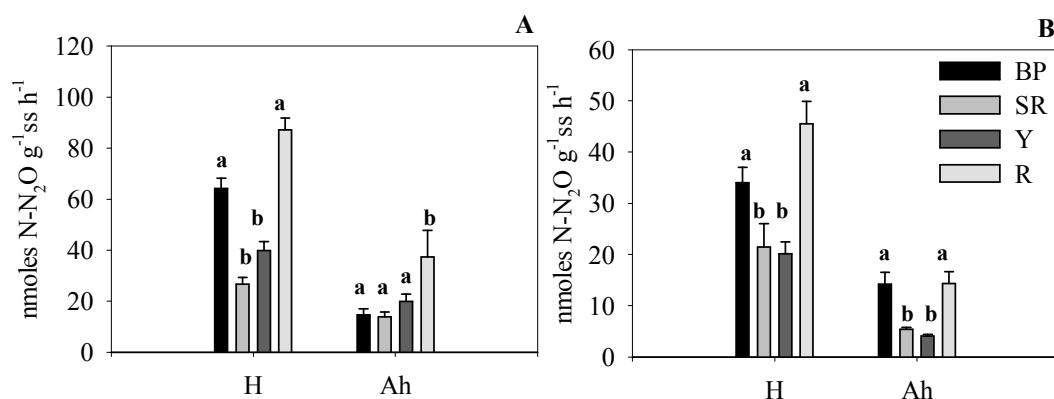
**Figura III. 3. Relación  $N-NH_4^+ : N-NO_3^-$  en primavera (A) y verano (B) en los compartimentos de la hojarasca (H) y del horizonte Ah del suelo, en los cuatro pinsapares de estudio (Y, BP, SR y R). Se representan las medias con el error estándar (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas entre sitios para cada compartimento (*post hoc* Tukey,  $p < 0,05$ ).**

### III.1.2.C. Tasa de desnitrificación potencial.

El factor “sitio” y la interacción “tiempo\*sitio\*compartimento” mostraron efectos significativos sobre la tasa de desnitrificación potencial (Tabla VII.1 Anexo-Material Suplementario, resultados del ANOVA de medidas repetidas). Así, los valores en las muestras de primavera fueron significativamente mayores que en las de verano, y en el compartimento H que en el Ah (Tukey,  $p < 0,05$ ). Las diferencias entre compartimentos fueron significativas en todos los pinsapares para ambas estaciones, mientras que las diferencias entre estaciones fueron significativas en el compartimento Ah de Y, SR y R (Tukey,  $p < 0,05$ ) y marginalmente significativas en el compartimento H de R (Tukey,  $p = 0,09$ ).

*Efecto de la deposición de N.* Los valores de producción de  $N-N_2O$  (Figura III.4) en el compartimento H observados en BP fueron el doble ( $p < 0,05$ ) de los de SR en primavera; en verano no se encontraron diferencias significativas. En el compartimento Ah, la tasa de desnitrificación potencial también tendió a ser superior en BP que en SR pero, al contrario que para la hojarasca, la diferencia fue significativa sólo en verano, con una producción de 14,2 y 5,39 nmoles  $N-N_2O \text{ g}_{ss}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en BP y en SR, respectivamente.

*Efectos del estado sucesional y la litología.* Tanto en primavera como en verano, la desnitrificación potencial en R fue significativamente mayor que en Y (Figura III.4). No se encontró efecto significativo de la litología en la producción de  $N-N_2O$  en ninguno de los casos.



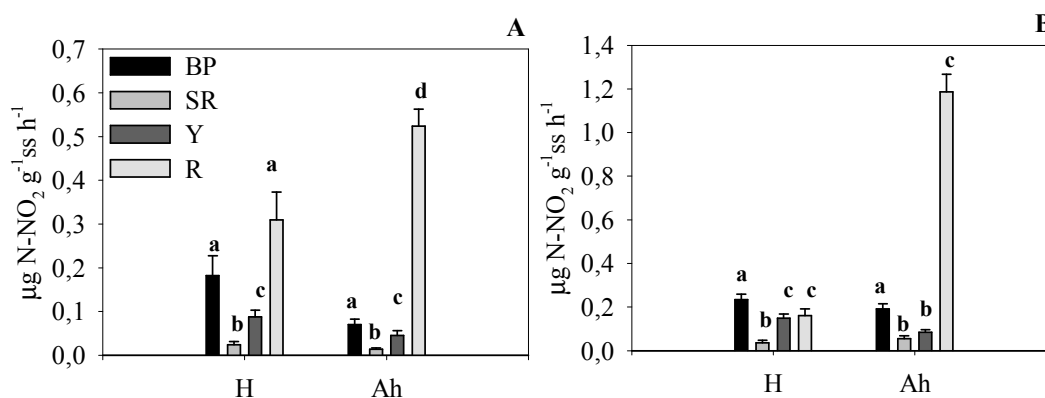
**Figura III. 4.** Tasa potencial de producción de  $N-N_2O$  (nmol  $g_{ss}^{-1} h^{-1}$ ) en los compartimentos H y Ah, tanto en primavera (A) como en verano (B), para los cuatro pinsapares (Y, BP, SR y R). Se representan las medias con el error estándar (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas entre sitios para cada compartimento ( $p < 0,05$ ).

#### III.1.2.D. Tasa potencial de nitrificación.

La fecha de muestreo (primavera vs verano) no mostró efectos globales significativos sobre las tasas potenciales de nitrificación, ni en la hojarasca ni en el suelo (Tabla VII.1 Anexo-Material Suplementario, resultados del ANOVA de medidas repetidas). Respecto a diferencias entre compartimentos, el potencial de nitrificación en Y fue significativamente mayor en la hojarasca que en el suelo, mientras que en R se observó lo contrario (Tukey,  $p < 0,05$ ) (Figura III.5).

*Efecto de la deposición de N.* En ambos compartimentos y fechas de muestreo, las tasas potenciales de nitrificación fueron significativamente superiores en BP respecto a SR. En primavera, se encontraron en BP valores cinco veces superiores que en SR en el compartimento Ah, y siete veces superiores en el compartimento H. En verano, la magnitud de las diferencias de potencial de nitrificación entre BP y SR fueron algo menores, pero aún

tres veces superiores en el suelo mineral del primero que del segundo, y seis veces en el caso de la hojarasca.



**Figura III. 5. Tasa potencial de nitrificación ( $\mu\text{g g}_{\text{ss}}^{-1}$ ) en los compartimentos H y Ah, tanto en primavera (A) como en verano (B), para los cuatro pinsapares (Y, BP, SR y R). Se representan las medias con el error estándar ( $n=5$ ). Letras distintas indican diferencias significativas entre sitios para cada compartimento ( $p<0,05$ ).**

*Efecto del estado sucesional.* En primavera existió un efecto significativo debido al estado sucesional (Y vs R) para ambos compartimentos del suelo, con mayores tasas potenciales de nitrificación en el pinsapar maduro (R); en verano, tal patrón sólo se mantuvo en el caso del suelo mineral. Así, la nitrificación potencial en el suelo mineral del pinsapar maduro fue en verano quince veces mayor a la del pinsapar en fase agradativa, y en primavera diez veces mayor, siendo por tanto muy destacado el efecto del estado sucesional sobre esta variable. De hecho, las tasas de nitrificación en el compartimento Ah de este pinsapar maduro fueron significativamente superiores a las del resto de sitios.

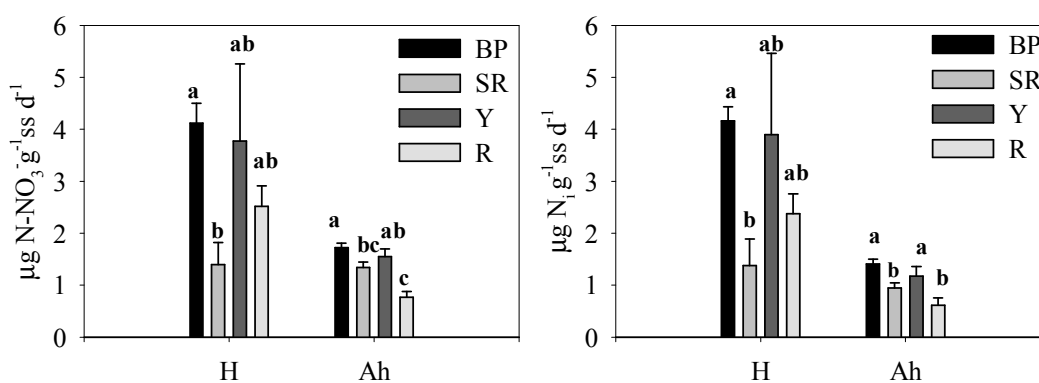
*Efecto de la litología.* El potencial de nitrificación en la hojarasca fue significativamente mayor en el pinsapar agradativo sobre calizas (Y) que en el serpentínicola (SR) en ambas estaciones, y sólo en primavera para el caso del compartimento Ah ( $p<0,05$ ). Aunque los valores en Y, en términos absolutos, fueron bajos (e.g.,  $0,05 \mu\text{g N-NO}_2 \text{ g}_{\text{ss}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en Ah en primavera), los valores correspondientes observados en SR fueron extremadamente bajos ( $0,01 \mu\text{g N-NO}_2 \text{ g}_{\text{ss}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

### III.1.2.E. Tasas de nitrificación neta (NN) y mineralización neta del N (MNN).

Las tasas de NN y de MNN en primavera fueron, de manera general, superiores en el compartimento de hojarasca que en el horizonte Ah del suelo (Figura III.6). Globalmente, en todos los pinsapares, las tasas de NN fueron del orden de las de MNN, indicando que, en términos netos, el nitrógeno mineralizado es mayoritariamente nitrificado. No existieron diferencias significativas entre pinsapares en relación con el % que la NN representa respecto a la MNN, que fue en todos los casos cercano al 100%.

*Efecto de la deposición de N.* Tanto las tasas de NN como de MNN fueron significativamente superiores en BP respecto a SR en ambos compartimentos del suelo, siendo la diferencia del orden de un 20 % en el suelo superficial y de más del 100 % en la capa de hojarasca.

*Efecto del estado sucesional.* En el compartimento Ah, tanto NN como MNN fueron significativamente inferiores en R (pinsapar maduro) que en Y (agradativo). El mismo tipo de tendencia se observó para el compartimento H, pero en este caso las diferencias entre las respectivas medias no alcanzaron significación estadística.



**Figura III. 6. (A) Tasas de nitrificación neta-NN, y (B) tasas de mineralización neta del nitrógeno-MNN, en primavera, en el horizonte superficial del suelo (Ah) y en la capa de hojarasca (H), de los cuatro pinsapares (Y, BP, SR y R). Se representan las medias con el error estándar (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios dentro de cada compartimento ( $p < 0,05$ ).**

### III.1.2.F. Tasa de respiración.

Se obtuvo significación estadística para los efectos principales del compartimento del suelo, de la localidad y de la fecha de muestreo, sobre las tasas de respiración, así como para las interacciones entre los tres factores (Tabla VII.1 Anexo-Material Suplementario, resultados del ANOVA de medidas repetidas).

En todos los sitios de estudio, las tasas de respiración en condiciones homogéneas de incubación en laboratorio resultaron significativamente mayores en las muestras del compartimento H que en las del Ah (Tukey,  $p < 0,05$ ), siendo las diferencias de en torno a un orden de magnitud (Figura III.7). Por otra parte, en los pinsapares calcícolas (Y y R), las tasas de respiración registradas con las muestras de hojarasca tomadas en primavera fueron significativamente superiores (Tukey,  $p < 0,05$ ) a las registradas con las de verano (nótese el cambio de escala en las ordenadas de las gráficas III.7 A y B). No existieron diferencias estacionales en el caso de los pinsapares serpentínícolas.

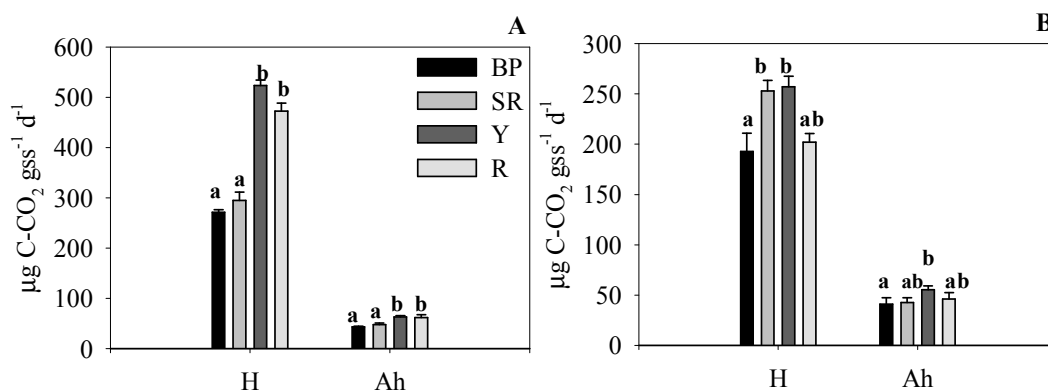


Figura III. 7. (A) Tasas de respiración (incubación en laboratorio durante una semana) en primavera, y (B) en verano, en los compartimentos H y Ah del suelo de los pinsapares de estudio (Y, BP, SR y R). Se representan las medias con el error estándar (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas entre localidades para cada combinación de estación del año y compartimento del suelo ( $p < 0,05$ ).

*Efectos de la deposición de N y del estado sucesional.* Estas dos fuentes de variación apenas mostraron efectos sobre la respiración potencial. Para cada compartimento del suelo y fecha de muestreo, las cifras fueron muy similares entre los pinsapares BP y SR (diferencias de estatus de N), y entre los pinsapares R e Y (diferencias de estatus sucesional). La única diferencia significativa encontrada para estas comparaciones pareadas (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ) correspondió al caso de las muestras de hojarasca recogidas en verano en BP y en SR, aunque el tamaño del efecto fue pequeño ( $271,1$  y  $294,3 \mu\text{g C-CO}_2\text{g}_{\text{ss}}^{-1}\text{d}^{-1}$ , respectivamente).

*Efecto de la litología.* En primavera, las tasas de respiración potencial tanto en la hojarasca como en el suelo superficial fueron significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) en los pinsapares calcícolas (Y y R) que en los serpentínícolas (SR y BP). El tamaño de este efecto fue especialmente destacado en el caso de la hojarasca, con cifras para Y ( $522,9 \mu\text{g C-CO}_2\text{g}_{\text{ss}}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) cercanas al doble de las encontradas para SR ( $294,3 \mu\text{g C-CO}_2\text{g}_{\text{ss}}^{-1}\text{d}^{-1}$ ). Sin embargo, en las muestras de verano no se observaron diferencias entre localidades para ninguno de los compartimentos del suelo.

## **III.2. Objetivo 2, “Efecto de la adición de fuentes de C y/o de N fácilmente disponibles sobre la biogeoquímica del N y la actividad microbológica en el suelo de los pinsapares”.**

### **III.2.1. Respiración.**

#### ***III.2.1.A. Tasas de respiración.***

Los resultados del ANOVA para evaluar los efectos de la adición de sustratos (C: control; G: glucosa; G+N: glucosa + nitrato potásico), de la estación del año (primavera o verano) y del sitio de estudio (pinsapares BP, SR, Y y R), sobre las tasas de respiración en el suelo superficial y en la hojarasca se muestran en la Tabla III.3. Los tratamientos de adición tuvieron un efecto principal muy significativo sobre la respiración en ambos compartimentos del suelo, al que se añaden efectos interactivos con la estación del año (interacción “Tratamiento\*Estación” significativa en Ah y en H), y con el pinsapar de que

se trate sólo en el caso del compartimento Ah (interacción “Tratamiento\*Sitio” significativa en Ah).

Respecto a los efectos principales de los factores “sitio” y “estación”, ambos fueron significativos en la hojarasca, pero sólo el segundo en el caso del suelo. Para el conjunto de sitios, la tasa media de respiración del suelo o de la hojarasca fue significativamente superior en primavera que en verano, independientemente del tratamiento excepto para los controles Ah (Tukey,  $p < 0,05$ ). La respiración del suelo bajo cualquiera de los tratamientos de adición fue siempre significativamente superior a la de los controles en ambas estaciones. Además, en el suelo del pinsapar SR, la activación de la respiración al añadir carbono fácilmente asimilable se reforzó significativamente al combinarla con una fuente de nitrógeno ( $G+N > G$ ) (Tukey,  $p < 0,05$ ). En el caso de la hojarasca, los tratamientos de adición activaron la respiración sólo en las muestras tomadas en primavera, mientras que la inhibieron en las muestras de verano (Tukey,  $p < 0,05$ ).

**Tabla III.3. Efectos de los factores estación del año, tratamiento y sitio de estudio sobre las tasa de respiración en cada compartimento muestreado, Ah y H (ANOVA de tres factores). En negrita se indican los efectos significativos.**

Compartimento	Factor	g.l.	F	p
<b>Ah</b>	Tratamiento de adición	2	596,1	<b>&lt;0,001</b>
	Estación del año	1	297,6	<b>&lt;0,001</b>
	Sitio	3	2,5	0,066
	Tratamiento *Estación	2	45,4	<b>&lt;0,001</b>
	Tratamiento*Sitio	6	4,3	<b>&lt;0,001</b>
	Estación*Sitio	3	1,3	0,293
	Tratamiento*Estación*Sitio	6	0,7	0,656
<b>H</b>	Tratamiento de adición	2	9,2	<b>&lt;0,001</b>
	Estación del año	1	960,0	<b>&lt;0,001</b>
	Sitio	3	27,5	<b>&lt;0,001</b>
	Tratamiento*Estación	2	46,9	<b>&lt;0,001</b>
	Tratamiento*Sitio	6	1,5	0,192
	Estación*Sitio	3	17,88	<b>&lt;0,001</b>
	Tratamiento*Estación*Sitio	6	1,010	0,424

*Efecto de la deposición de N* (Figura III.8). Para ninguno de los tratamientos de adición se observaron diferencias significativas entre los pinsapares serpentínícolos BP y SR (altas y bajas tasas de deposición de N, respectivamente) ni en las muestras de suelo en primavera o en verano, ni en las de hojarasca en primavera. Sin embargo, las tasas de respiración de la hojarasca de verano fueron significativamente menores en BP que en SR bajo cualquiera de los tratamientos de adición; la magnitud de éste efecto fue más marcada en el tratamiento control (de un -24%, con 192,8 y 253,1  $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}_{\text{ss}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  en SR y BP, respectivamente). Por último, como ya se ha comentado en el párrafo anterior, hay que destacar que la respiración no se modificó significativamente en el pinsapar saturado por N (BP) si junto a la fuente de carbono asimilable se añadía otra de nitrógeno; por el contrario, en el pinsapar limitado por N (SR) sí se observó tal tipo de efecto sinérgico de la adición conjunta de C y N.

*Efecto de la litología* (Figura III.8). Las tasas de respiración primaveral en el compartimento H de los pinsapares agradativos limitados por N fueron significativamente inferiores en sustrato serpentínico (SR) que calcáreo (Y), independientemente del tratamiento de adición. En el caso del compartimento Ah, tal efecto se observó únicamente en los controles (48,0 y 62,7  $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}_{\text{ss}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  en SR e Y, respectivamente). En cuanto a las tasas de respiración estival, las citadas diferencias entre SR e Y desaparecen en el caso de la hojarasca, pero se mantienen en el tratamiento control sobre muestras de suelo superficial (42,77 y 55,43  $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}_{\text{ss}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  en SR e Y, respectivamente).

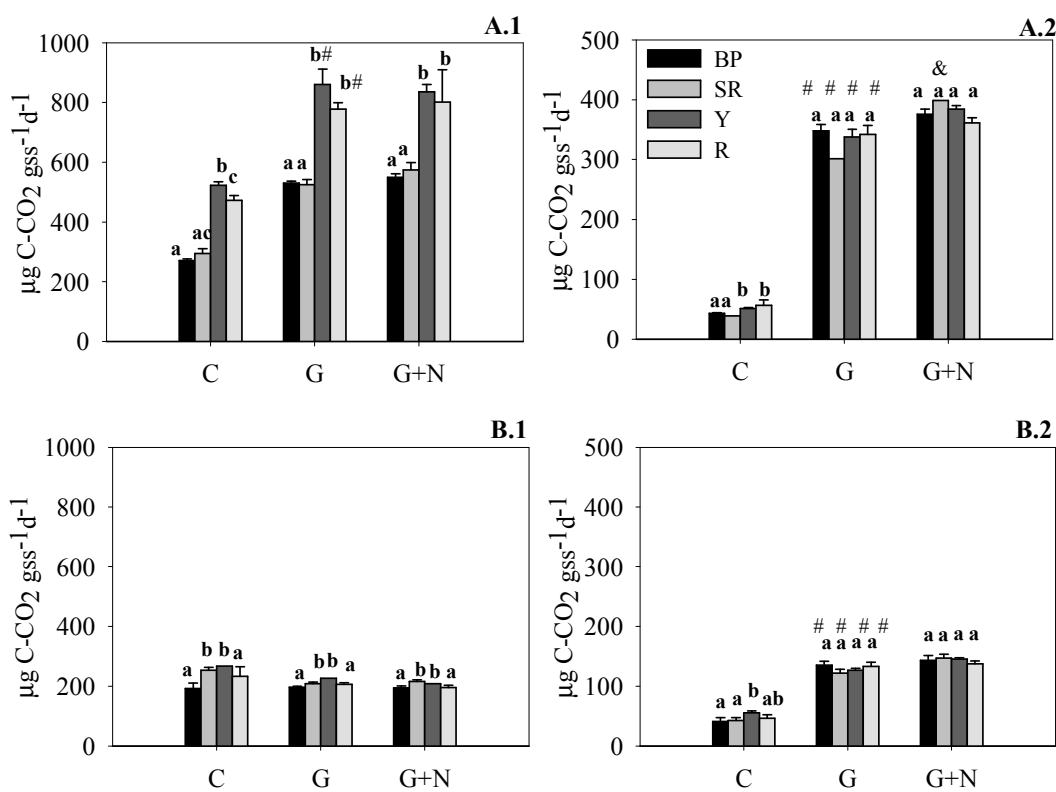


Figura III.8. Tasas de respiración (incubación en laboratorio durante una semana) bajo los tratamientos “control” (C), de adición de glucosa (G) o de glucosa y nitrato (G+N), en muestras de los compartimentos del suelo H (1) y Ah (2), tomadas en primavera (A) y verano (B). Las barras representan el error estándar (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios dentro de cada tratamiento  $p < 0.05$ . El símbolo “#” indica valores significativamente superiores en el tratamiento G respecto al control C; símbolo “&”, valores significativamente superiores en el tratamiento G+N respecto al G ( $p < 0.05$ ).

*Efecto del estado sucesional* (Figura III.8). Las tasas de respiración del compartimento Ah no mostraron diferencias atribuibles al estado sucesional (comparación Y vs R) para ninguna de las dos estaciones del año ni tratamientos de adición. En el caso de la hojarasca sí se observaron efectos significativos, con tasas de respiración mayores en Y que en R en el tratamiento control sobre muestras de primavera, y en todos los tratamientos de adición para el caso de las muestras de verano.

**III.2.1.B. Cinética de las tasas acumuladas de respiración (muestras de primavera).**

Se realizaron ajustes de regresión mediante la curva  $y = a (1 - e^{-bx})$  con los valores de CO<sub>2</sub> producido (mg C-CO<sub>2</sub>g<sub>suelo seco</sub><sup>-1</sup>) a lo largo del período de incubación de cada réplica de las muestras tomadas en primavera, bajo los distintos tratamientos de adición (véanse las Figuras VII.1 y VII.2 del Anexo-Material Suplementario). Los resultados del ANOVA para evaluar el efecto de los factores tratamiento, compartimento y sitio de estudio sobre los parámetros  $a$  y  $b$  de las correspondientes ecuaciones de regresión se muestran en la tabla III.4. Fueron significativos los efectos de los tres factores y de todas sus interacciones.

**Tabla III.4. Efectos del tratamiento, compartimento y sitio de estudio sobre los parámetros  $a$  y  $b$  de la ecuación  $y = a (1 - e^{-bx})$  (ANOVA de tres factores). En negrita se indican los efectos significativos.**

Parámetro	Factor	g.l.	F	p
<b>a</b>	Tratamiento de adición	2	46,4	< <b>0,001</b>
	Compartimento del suelo	1	1133,1	< <b>0,001</b>
	Sitio	3	121,4	< <b>0,001</b>
	Tratamiento*Compartimento	2	154,5	< <b>0,001</b>
	Tratamiento*Sitio	6	10,0	< <b>0,001</b>
	Compartimento*Sitio	3	141,3	< <b>0,001</b>
	Tratamiento*Compartimento*Sitio	6	4,1	< <b>0,01</b>
	<b>b</b>	Tratamiento de adición	2	268,0
Compartimento del suelo		1	102,1	< <b>0,001</b>
Sitio		3	38,4	< <b>0,001</b>
Tratamiento*Compartimento		2	5,1	< <b>0,01</b>
Tratamiento*Sitio		6	10,2	< <b>0,001</b>
Compartimento*Sitio		3	52,6	< <b>0,001</b>
Tratamiento*Compartimento*Sitio		6	11,1	< <b>0,001</b>

Los valores de  $a$  (valor de saturación en estado estacionario, o máxima ordenada a la que tiende la curva de respiración acumulada, mg C-CO<sub>2</sub> g<sub>ss</sub><sup>-1</sup>) y  $b$  (parámetro de pendiente de la curva o máxima tasa instantánea de respiración, mg C-CO<sub>2</sub> g<sub>ss</sub><sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) fueron significativamente superiores en los tratamientos de adición que en los controles ( $p < 0,05$ ); sin embargo, este efecto de los tratamientos dependió del compartimento del suelo y del

sitio de que se tratara (interacción tratamiento\*compartimento\*sitio). Así, en el compartimento Ah, ambos parámetros fueron significativamente superiores en los tratamientos de adición (G y G+N) que en las muestras control (C) en todos los sitios de estudio (Figura III.9.A.2 y B.2; Tukey,  $p < 0,05$ ), sin que existieran diferencias significativas entre los tratamientos G y G+N.

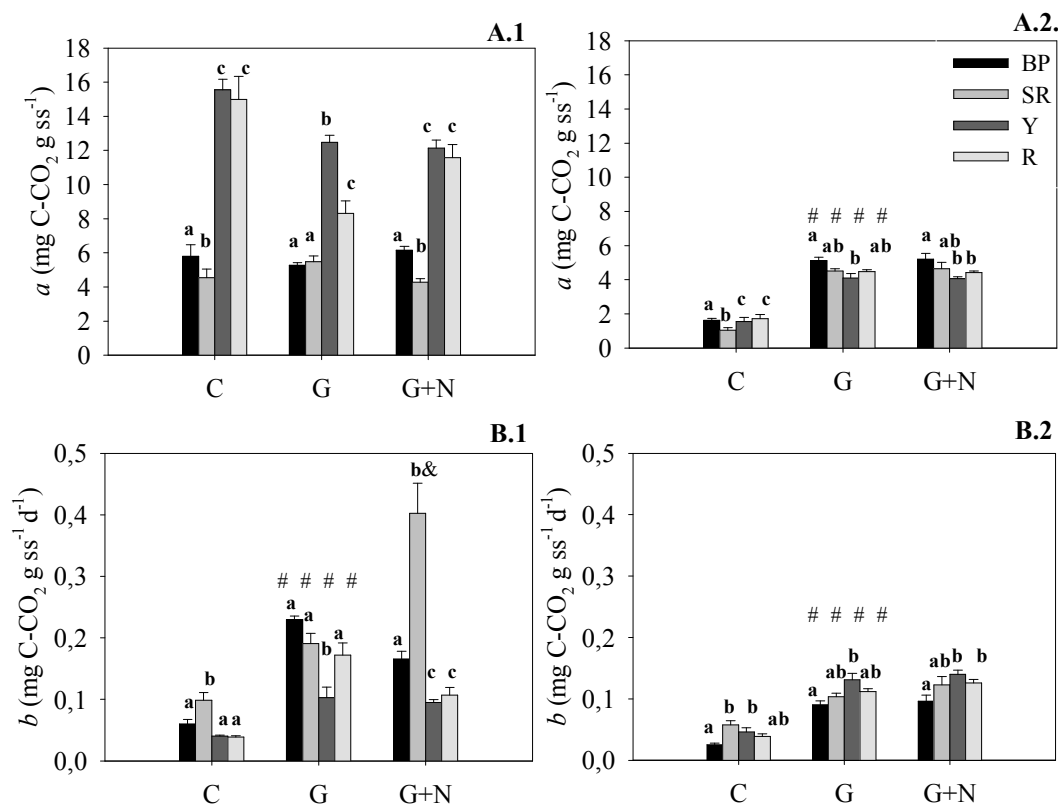


Figura III.9. Parámetros  $a$  (A) y  $b$  (B) del ajuste de la ecuación  $y = a(1 - e^{-bx})$  a los datos de respiración acumulada en muestras recolectadas en primavera de los compartimentos H (1) y Ah (2), bajo los tratamientos “control” (C), y de adición de glucosa (G) o de glucosa y nitrato (G+N). Las barras representan el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios dentro de cada tratamiento ( $p < 0,05$ ). El símbolo “#” indica valores significativamente superiores en el tratamiento G respecto al control C; símbolo “&”, valores significativamente superiores en el tratamiento G+N respecto al G ( $p < 0,05$ ).

Sin embargo, en las muestras del compartimento H, no se encontraron diferencias en la máxima producción de CO<sub>2</sub> (*a*) entre controles y tratamientos ni en BP ni en SR, mientras que en Y y en R los valores de *a* de los controles fueron superiores a los de los tratamientos (ver efectos significativos en la figura III.9.A.1). La pendiente máxima de la curva (*b*), tanto para muestras del compartimento H como del Ah (gráficas III.11.B.1 y B.2), fue significativamente superior en los tratamientos que en los controles en todos los sitios (Tukey,  $p < 0,05$ ). Además, la adición de nitrógeno junto con carbono aumentó significativamente la pendiente de la curva de respiración acumulada en el caso de SR (tratamiento G+N > G), pero la disminuyó en el caso de R (G+N < G).

La producción máxima de CO<sub>2</sub> (*a*) fue significativamente superior (Tukey,  $p < 0,05$ ) en el compartimento H que en el Ah en los controles de todos los sitios, y en los tratamientos G y G+N de Y y de R (Tabla III.5).

En cuanto a la velocidad de crecimiento de la curva (*b*), en los controles, sólo existieron diferencias entre compartimentos en BP (H > Ah). En el tratamiento con glucosa, *b* fue mayor en el compartimento H que en el Ah en todas las localidades (Tukey,  $p < 0,05$ ). En el tratamiento con glucosa y nitrato, *b* fue significativamente superior en H que en Ah para los sitios SR y R ( $p < 0,05$ ).

En la Tabla III.5 también pueden observarse las diferencias existentes entre pinsapares en los parámetros *a* y *b* de la curva de respiración acumulada para cada combinación de tratamiento y compartimento (comparaciones planeadas *a priori*):

*Efecto de la litología.* Los valores del parámetro *a* fueron significativamente mayores en Y (calizas) que en SR (serpentinadas) en ambos compartimentos del suelo bajo el tratamiento control, y sólo para el compartimento H bajo los tratamientos de adición de glucosa y de adición combinada de carbono y nitrógeno. Por el contrario, los valores del parámetro *b* para el compartimento H fueron significativamente superiores en SR que en Y tanto en los controles como en ambos tratamientos de adición, mientras que en el compartimento Ah no se encontraron diferencias significativas.

*Efecto del estado sucesional.* Para el caso de la comparación entre Y y R, sólo se observaron diferencias significativas para el tratamiento con glucosa (G) y en el compartimento H, encontrándose en el pinsapar agradativo (Y) mayores valores máximos de producción acumulada de CO<sub>2</sub> (*a*) y menores tasas instantáneas máximas de respiración (*b*) que en el pinsapar maduro (R).

**Tabla III.5. Valor medio (error estándar) de los parámetros *a* (mg C-CO<sub>2</sub> g<sub>ss</sub><sup>-1</sup>) y *b* (mg C-CO<sub>2</sub> g<sub>ss</sub><sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) de la ecuación  $y = a(1 - e^{-bx})$  ajustada a los datos de respiración acumulada. *n*: número de réplicas. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre sitios dentro de cada combinación de tratamiento (control, C, glucosa, G y glucosa+nitrato, G+N) y compartimento (Ah y H) para  $\alpha=0.05$ , mientras que letras mayúsculas distintas muestran diferencias entre compartimentos en cada combinación de tratamiento y sitio para  $\alpha=0.05$ .**

Tratamiento	Compartimento	Sitio	<i>n</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
C	H	BP	4	5,81(0,67) <sup>Ba</sup>	0,06(0,01) <sup>Ba</sup>
		SR	5	4,53(0,52) <sup>Bb</sup>	0,10(0,01) <sup>Ab</sup>
		Y	4	15,6 (0,62) <sup>Bc</sup>	0,04(0,00) <sup>Aa</sup>
		R	3	15,0 (1,35) <sup>Bc</sup>	0,04(0,00) <sup>Aa</sup>
	Ah	BP	5	1,62(0,11) <sup>Aa</sup>	0,03(0,00) <sup>Aa</sup>
		SR	5	1,03(0,16) <sup>Ab</sup>	0,06(0,01) <sup>Ab</sup>
		Y	5	1,55(0,24) <sup>Ac</sup>	0,05(0,01) <sup>Ab</sup>
		R	5	1,72(0,24) <sup>Abc</sup>	0,04(0,00) <sup>Aab</sup>
G	H	BP	5	5,26(0,17) <sup>Aa</sup>	0,22(0,01) <sup>Ba</sup>
		SR	5	5,48(0,33) <sup>Aa</sup>	0,19(0,01) <sup>Ba</sup>
		Y	5	12,5 (0,41) <sup>Bb</sup>	0,10(0,01) <sup>Bb</sup>
		R	5	8,31(0,73) <sup>Bc</sup>	0,19(0,02) <sup>Ba</sup>
	Ah	BP	5	5,12(0,20) <sup>Aa</sup>	0,09(0,01) <sup>Aa</sup>
		SR	5	4,51(0,13) <sup>Aab</sup>	0,10(0,01) <sup>Aab</sup>
		Y	5	4,10(0,27) <sup>Ab</sup>	0,13(0,01) <sup>Ab</sup>
		R	5	4,46(0,13) <sup>Aab</sup>	0,11(0,00) <sup>Aab</sup>
G+N	H	BP	5	6,16(0,23) <sup>Aa</sup>	0,17(0,01) <sup>Aa</sup>
		SR	3	4,28(0,21) <sup>Ab</sup>	0,40(0,05) <sup>Bb</sup>
		Y	5	12,2 (0,47) <sup>Bc</sup>	0,10(0,00) <sup>Ac</sup>
		R	4	11,6 (0,77) <sup>Bc</sup>	0,11(0,01) <sup>Bc</sup>
	Ah	BP	5	5,20(0,34) <sup>Aa</sup>	0,10(0,01) <sup>Aa</sup>
		SR	5	4,65(0,38) <sup>Aab</sup>	0,12(0,01) <sup>Aab</sup>
		Y	5	4,06(0,13) <sup>Ab</sup>	0,14(0,01) <sup>Ab</sup>
		R	5	4,41(0,10) <sup>Ab</sup>	0,13(0,01) <sup>Ab</sup>

### III.2.2. Dinámica de las concentraciones de $\text{NH}_4^+$ y de $\text{NO}_3^-$ , y tasas netas de mineralización del nitrógeno (MNN) y de nitrificación (NN).

#### III.2.2.A. Concentraciones de $\text{NO}_3^-$ y de $\text{NH}_4^+$ .

**NITRATO:** Las concentraciones de nitrato en las muestras de hojarasca o suelo de los distintos pinsapares con el transcurso de su incubación sin o con adición de fuentes de C y N mostraron efectos significativos de todos los factores e interacciones entre ellos (ANOVA de medidas repetidas, Tabla III.6). Globalmente, la concentración de nitrato a lo largo del periodo de incubación resultó significativamente superior en los compartimentos H que en los Ah (Tukey,  $p < 0,05$ ). También se observaron diferencias significativas entre los tratamientos C, G y G+N, con las mayores concentraciones de nitrato en los controles y las menores en el tratamiento con glucosa (Tukey,  $p < 0,05$ ). El efecto de la localidad consistió en valores significativamente superiores en BP y en R que en Y y en SR, implicando mayor concentración de nitrato a mayor tasa de deposición de N ( $\text{BP} > \text{SR}$ ), y a mayor grado de desarrollo sucesional ( $\text{R} > \text{Y}$ ) (Tukey,  $p < 0,05$ ).

**Tabla III.6. Efectos de los factores tratamiento de adición, sitio de estudio, compartimento del suelo y tiempo de incubación aeróbica, sobre la concentración de  $\text{NO}_3^-$  (ANOVA de medidas repetidas). En negrita se indican los efectos significativos para  $\alpha=0.05$ .**

	g.l.	F	p
Tratamiento de adición	2	311,5	<b>&lt;0,001</b>
Compartimento del suelo	1	21,1	<b>&lt;0,001</b>
Sitio	3	34,1	<b>&lt;0,001</b>
Tratamiento*Compartimento	2	9,4	<b>&lt;0,001</b>
Tratamiento* Sitio	6	10,2	<b>&lt;0,001</b>
Compartimento*Sitio	3	5,3	<b>&lt;0,01</b>
Tratamiento* Compartimento*Sitio	6	2,4	<b>0,032</b>
Estación del año	4	481,8	<b>&lt;0,001</b>
Estación del año*Tratamiento	8	343,0	<b>&lt;0,001</b>
Estación del año*Compartimento	4	94,7	<b>&lt;0,001</b>
Estación del año*Sitio	12	9,6	<b>&lt;0,001</b>
Estación del año*Tratamiento*Compartimento	8	29,0	<b>&lt;0,001</b>
Estación del año*Tratamiento*Sitio	24	5,6	<b>&lt;0,001</b>
Estación del año*Compartimento*sitio	12	3,6	<b>&lt;0,001</b>
Estación *Tratamiento*Sitio*Compartimento	24	2,6	<b>&lt;0,001</b>

Al analizar la interacción “tratamiento\*sitio\*compartimento”, podemos observar que en los controles, sólo en BP se obtuvieron diferencias significativas de concentraciones de nitrato entre compartimentos (H > Ah). En cuanto a las diferencias entre tratamientos (Figura III.10), globalmente para todos los tiempos de incubación, las concentraciones medias de nitrato en el compartimento H resultaron significativamente superiores en los controles (C) que en los tratamientos con glucosa (G) o con glucosa+nitrato (G+N) en todos los pinsapares, excepto en SR donde la concentración en los controles fue significativamente superior a la del tratamiento G pero no a la del tratamiento con G+N. Por su parte, la concentración media de nitrato durante la incubación en el compartimento Ah de SR y de Y (pinsapares con menor disponibilidad de N) fue significativamente superior en los tratamientos control y G+N que en el tratamiento G con sólo carbono. Sin embargo, en BP y en R (pinsapares con mayor disponibilidad de N) existieron diferencias significativas entre todos los niveles de tratamiento, encontrándose los mayores valores en los controles y los menores en los tratamientos con sólo carbono.

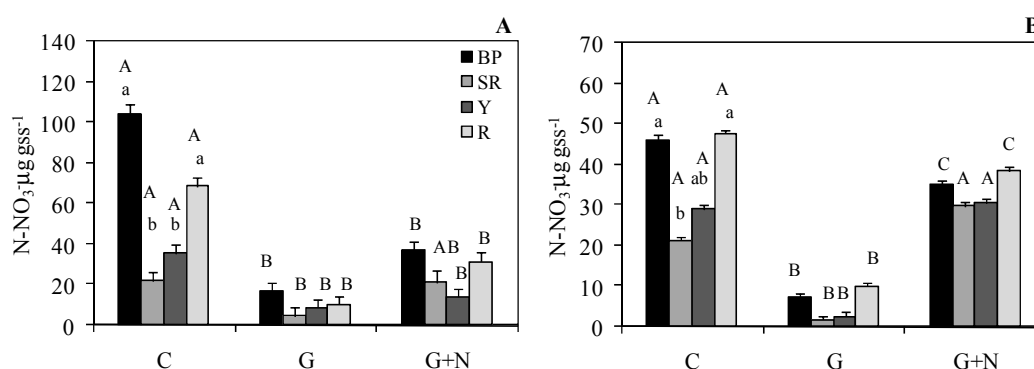


Figura III. 10. Concentración media de nitrato durante la incubación ( $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{gss}^{-1}$ ) en los compartimentos H (A) y Ah (B) en controles (C) y tratamientos con glucosa (G) y con glucosa y nitrato (GN) de los cuatro sitios de estudio. Las barras verticales representan el error estándar. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos mientras que letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre pinsapares para las muestras control ( $p < 0,05$ ).

También analizando esta interacción “tratamiento\*sitio\*compartimento”, podemos observar que no hay diferencias significativas entre sitios para cada combinación de compartimento, sitio y tratamiento, salvo para los controles. La concentración media de nitrato durante la incubación en ambos compartimentos mostró un efecto significativo del grado de deposición de N (BP > SR) y del estado sucesional (R > Y) (Figura III.10).

En cuanto al efecto del tiempo de incubación, en la Figura III.11 se muestra la dinámica de las concentraciones de nitrato para cada combinación de tratamiento, sitio y compartimento, con indicación de diferencias significativas entre la serie de medidas (ANOVA de medidas repetidas, factor tiempo,  $p < 0,05$ ) (Véanse también las Figuras VII.3 y VII.4 en el ANEXO). En los controles de ambos compartimentos, la concentración de nitrato tiende a aumentar con el tiempo de incubación en todos los pinsapares. Con los tratamientos de adición ocurrió al contrario, disminuyendo las concentraciones de nitrato drásticamente ya a los dos días tras su aplicación. Así, en y desde este momento, bajo el tratamiento de glucosa (G), la hojarasca de todos los sitios de estudio mostró valores de entre sólo 0,62 y 3,03  $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$ , siempre significativamente inferiores a los medidos inmediatamente tras la aplicación de dicho tratamiento, salvo para la última medida de Y (11,2  $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$ ) (Figura III.11.A.2). En el compartimento Ah la disminución de la concentración de nitrato tras añadir glucosa fue aún más acusada, con niveles de  $< 1 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  a los dos días, y por debajo del límite de detección a partir de ahí (Figura III.11.B.2).

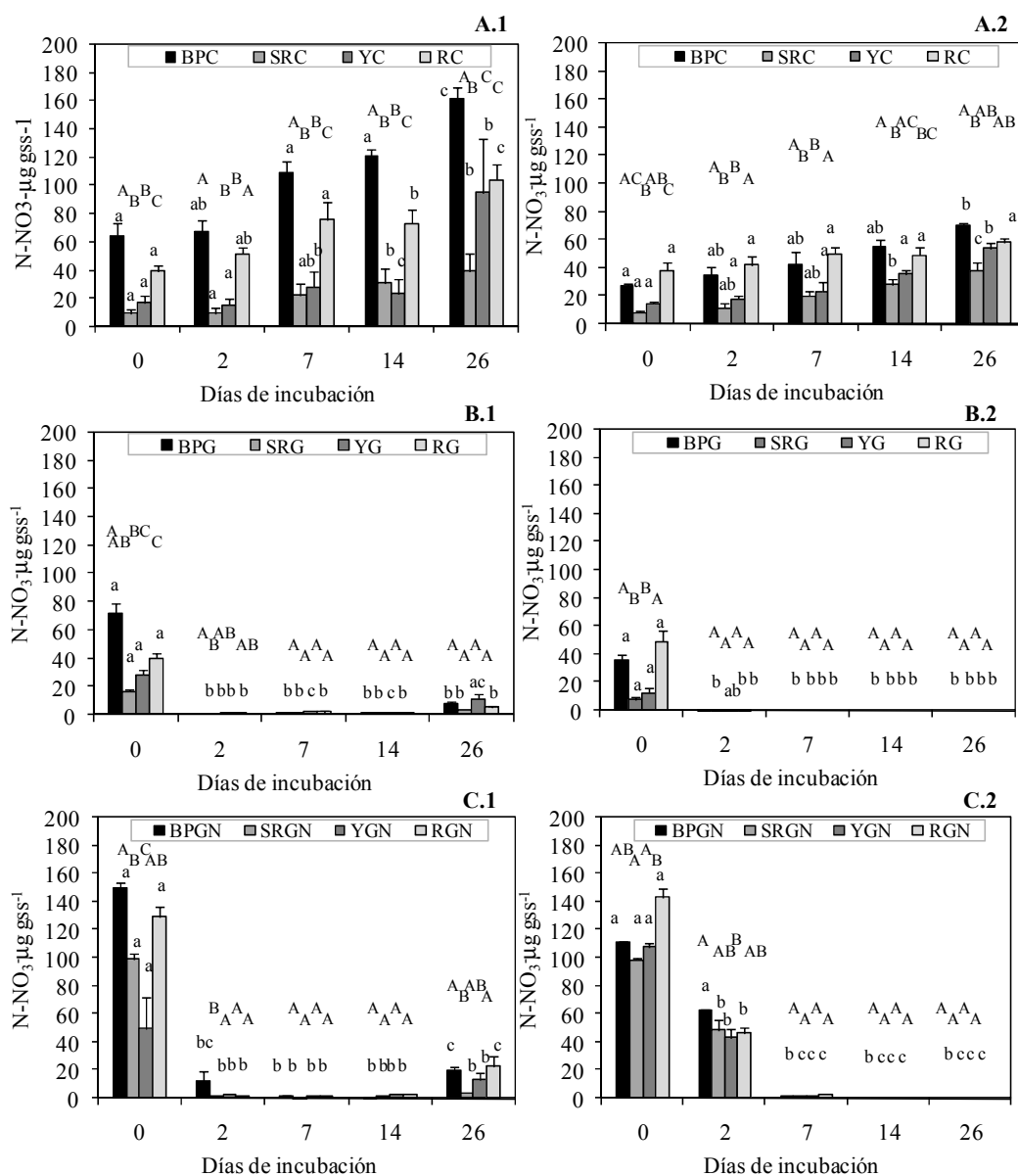


Figura III. 11. Concentración de nitrato ( $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{gss}^{-1}$ ) a lo largo del período de incubación de muestras de los compartimentos H (1) y Ah (2) de los cuatro sitios de estudio sujetas a los tratamientos C-control (A) o G-adición de glucosa (B) o G+N-adición de glucosa y nitrato (C). Se muestran valores medios  $\pm$  error estándar. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre los distintos tiempos de incubación para un mismo pinsapare ( $p < 0,05$ ). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre pinsapares para cada combinación de tiempo, compartimento y tratamiento ( $p < 0,05$ ).

Por último, aunque al añadir nitrato junto a la fuente de carbono (tratamiento G+N), obviamente, sus concentraciones se elevaron de forma inmediata muy considerablemente, tan sólo dos días después ya fueron significativamente inferiores a las previas en todos los sitios, con un descenso muy brusco en la hojarasca (de más de un orden de magnitud) y más escalonado en el suelo superficial (del orden de la mitad), manteniéndose en niveles aún más bajos durante el resto del tiempo de incubación, excepto en el caso de BP y de R donde se observó un repunte significativo al final (20,0 y 23,1  $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$ , respectivamente) (Figura III.11.B3).

*Efecto de la Deposición de N* (Figura III.11). En los tratamientos control, la concentración de nitrato en todos los tiempos de incubación fue significativamente superior, tanto en el compartimento H como en el Ah, a mayores tasas de deposición de N (BP > SR). El efecto de disminución de los niveles de nitrato que provoca la adición de glucosa eliminó rápidamente ese patrón entre BP y SR (0,62 y 0,79  $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$ , respectivamente, a los dos días), y la ausencia de diferencias significativas se mantuvo hasta el final de la incubación. En el tratamiento G+N, la situación inicial BP > SR no se mantuvo en las muestras de suelo, pero sí a corto plazo en las de hojarasca (12,1 y 1,82  $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$ , respectivamente, a los dos días), recuperándose de nuevo al final de la incubación (20,0 y 3,8  $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$ , respectivamente).

*Efecto del estado sucesional* (Figura III.11). En las muestras control, se encontraron valores de nitrato significativamente mayores en el pinsapar maduro (R) que en el agradativo (Y): en todas las medidas excepto la última en el caso de la hojarasca, y sólo durante la primera semana en el del suelo. Sin embargo, la adición individual o combinada con nitrógeno de glucosa anuló el patrón significativo R > Y a lo largo de toda la incubación en los compartimentos H y Ah.

*Efecto de la litología* (Figura III.11). En los controles, sólo en la última medida sobre muestras de hojarasca fue significativo el efecto de la litología, con mayor concentración de nitrato en el pinsapar sobre calizas (Y) que en el pinsapar sobre serpentinas (SR). En ningún caso hubo diferencias entre esos dos pinsapares bajo los tratamientos de adición.

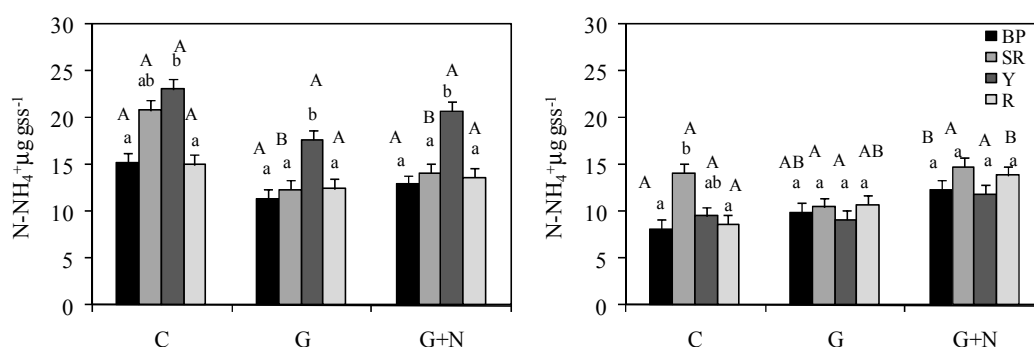
AMONIO: En el caso de la concentración de amonio, también todos los factores y todas las interacciones posibles en el ANOVA de medidas repetidas tuvieron efectos significativos, exceptuando a la interacción compartimento\*sitio\*tratamiento (Tabla III.7). Del mismo modo, la concentración de amonio globalmente a lo largo del periodo de incubación resultó significativamente superior en el compartimento H que en el Ah (Tukey,  $p < 0,05$ ). La concentración de amonio en el tratamiento G resultó ser significativamente inferior a las de los tratamientos C y G+N), entre los cuales no se encontraron diferencias significativas (Tukey,  $p < 0,05$ ). Al contrario que con el nitrato, el efecto de la localidad consistió en valores significativamente superiores en Y y en SR que en BP y en R, implicando mayor concentración de amonio a menor tasa de deposición de N (BP < SR) y a menor grado de desarrollo sucesional (R < Y) (Tukey,  $p < 0,05$ ).

**Tabla III.7. Efectos de los factores tratamiento de adición, sitio de estudio, compartimento y tiempo de incubación sobre la concentración de  $\text{NH}_4^+$  (ANOVA de medidas repetidas). En negrita se indican los efectos significativos.**

	g.l.	F	p
Tratamiento	2	19,8	<0,001
Sitio	3	14,9	<0,001
Compartimento	1	152,6	<0,001
Tratamiento*Compartimento	2	23,7	<0,001
Tratamiento*Compartimento	6	4,4	<0,001
Tratamiento* Sitio	3	23,1	<0,001
Compartimento*Sitio	6	0,3	0,933
Estación del año	4	143,0	<0,001
Estación del año*Tratamiento	8	11,6	<0,001
Estación del año*Compartimento	4	74,3	<0,001
Estación del año*Sitio	12	11,8	<0,001
Estación del año*Tratamiento*Compartimento	8	13,8	<0,001
Estación del año*Tratamiento*Sitio	24	2,5	<0,001
Estación del año*Compartimento*sitio	12	6,0	<0,001
Estación *Tratamiento*Sitio*Compartimento	24	1,72	<b>0,020</b>

Al analizar la interacción “tratamiento\*sitio\*compartmento”, podemos observar que en todos los controles se obtuvieron diferencias significativas de concentraciones de amonio entre compartimentos (H > Ah), mientras que en los tratamientos G y G+N sólo se dieron estas diferencias en la localidad Y (Tukey; p<0,05).

En cuanto a las diferencias entre tratamientos (Figura III.12), globalmente para todos los tiempos de incubación, las concentraciones de amonio en el compartimento H resultaron significativamente superior en los controles que en los tratamientos con glucosa y con glucosa+nitrato en SR. Por su parte, la concentración media de amonio durante la incubación en el compartimento Ah de BP y de R (pinsapares con mayor disponibilidad de N) fue significativamente superior en el tratamiento G+N que en el tratamiento control.



**Figura III. 12.** Concentración media de amonio durante la incubación ( $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{g}_{\text{ss}}^{-1}$ ) de muestras de los compartimentos H (A) y Ah (B) de los cuatro sitios de estudio sujetas al tratamientos control (C) o a los tratamientos de adición de glucosa (G) o de glucosa más nitrato (G+N). Las barras verticales representan el error estándar. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, mientras que letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre pinsapares ( $p < 0,05$ ).

También analizando esta interacción podemos observar que la concentración global de amonio durante la incubación en los controles mostró efecto significativo del estado sucesional ( $Y > R$ ) en el compartimento H, y del grado de deposición de N ( $SR > BP$ ) en el compartimento Ah. Diferencias significativas entre los tratamientos G y G+N sólo se encontraron para el compartimento H, con valores de amonio significativamente superiores en calizas (Y) que en serpentinas (SR) (Figura III.12).

En cuanto al efecto del tiempo de incubación, en la Figura III.13 se muestra la dinámica de las concentraciones de amonio para cada combinación de tratamiento, sitio y compartimento, con indicación de diferencias significativas entre la serie de medidas (ANOVA de medidas repetidas, factor tiempo,  $p < 0,05$ ) (véanse también las Figuras VII.5 y VII.6 en el ANEXO).

En los controles de ambos compartimentos, la concentración de amonio tiende a descender con el tiempo de incubación, experimentando las muestras del compartimento H un aumento en la concentración de amonio al final del período de incubación (ver efectos significativos en la Figura III.13. A.1 y B.1). Con los tratamientos de adición de glucosa (G) y de glucosa más nitrato (G+N), las concentraciones de amonio en el compartimento H en general disminuyeron significativamente tras los dos primeros días de incubación, momento a partir del cual se mantuvieron más o menos constantes, experimentando en Y y en SR de nuevo un aumento al final del período de incubación, con valores en el caso de Y similares a los previos al tratamiento ( $21,9$  y  $30 \mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en G y G+N respectivamente). Por su parte, en el compartimento Ah, la concentración de amonio en los tratamientos G y G+N fue disminuyendo durante la primera semana de incubación en todos los pinsapares, excepto para R en el tratamiento G+N y para BP en ambos tratamientos, sitios en los que la concentración de amonio se mantuvo más o menos constante a lo largo de casi todo el período de incubación (ver efectos significativos en la Figura III.13).

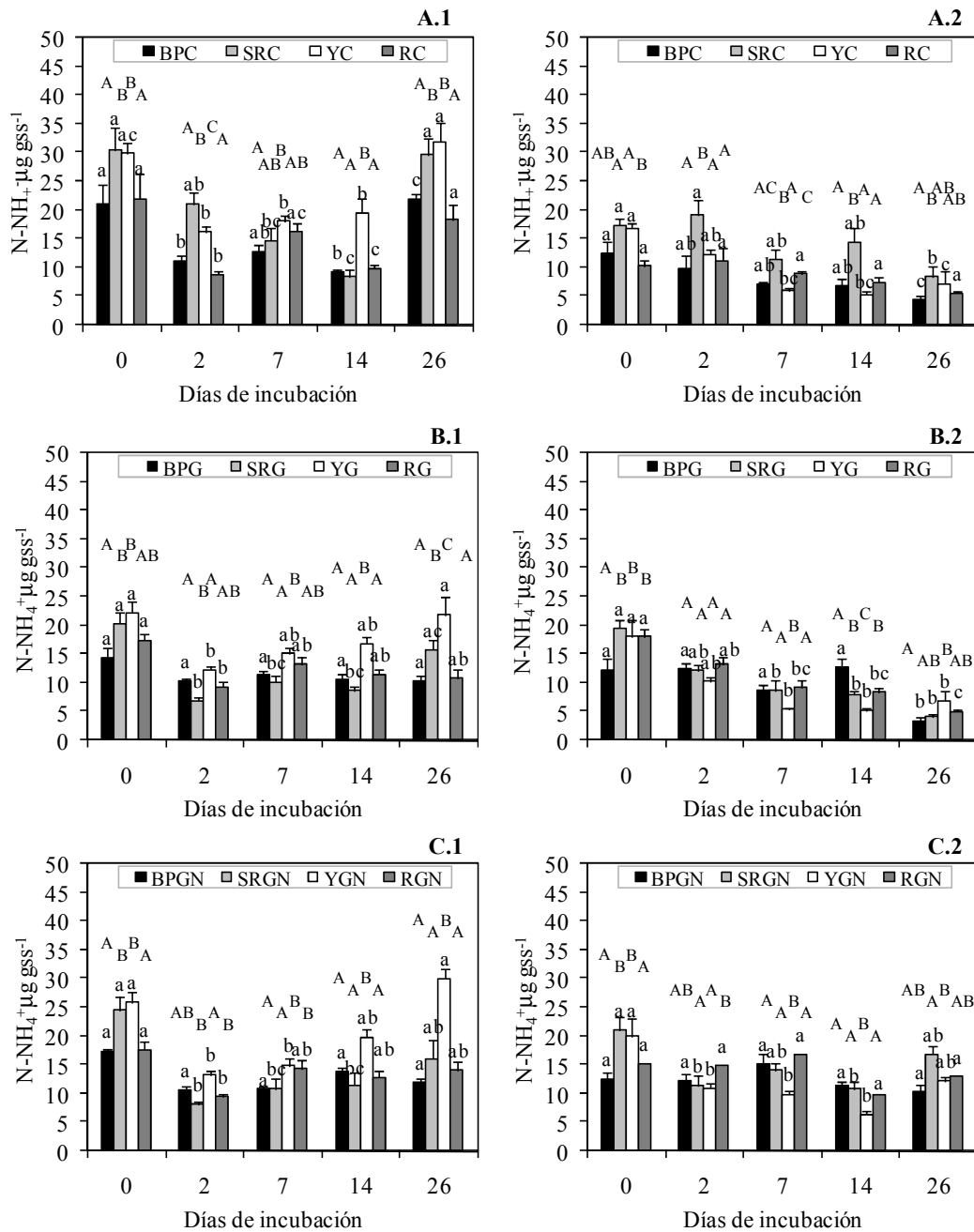


Figura III. 13. Concentración de amonio ( $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{gss}^{-1}$ ) en los compartimentos H (A) y Ah (B) en controles (C) y tratamientos con glucosa (G) y con glucosa y nitrato (GN) de los cuatro sitios de estudio a lo largo del período de incubación de las muestras. Las barras verticales representan el error estándar. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre medidas o días de incubación para un mismo sitio de estudio ( $p < 0,05$ ). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre sitios de estudio para cada combinación de tiempo, compartimento y tratamiento ( $p < 0,05$ ).

*Efecto de la Deposición de N* (Figura III.13). En los tratamientos control de ambos compartimentos, la concentración de amonio en todos los tiempos de incubación fue en general superior a menores tasas de deposición de N (SR > BP). El efecto de disminución de los niveles de amonio que provoca la adición de glucosa eliminó rápidamente ese patrón entre BP y SR (a los dos días, para la hojarasca 10,3 y 6,89  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{g}_{\text{ss}}^{-1}$ , respectivamente, y para el suelo 12,45 y 12,16  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{g}_{\text{ss}}^{-1}$ ), manteniéndose a partir de ese momento las concentraciones de amonio más o menos igualadas a lo largo del período de incubación en ambos compartimentos, con un repunte significativo en la hojarasca de SR al final del estudio. En el tratamiento G+N, ocurrió lo mismo, igualándose rápidamente las concentraciones de amonio en ambos pinsapares BP y SR después de la adición en ambos compartimentos (a los dos días, en la hojarasca 10,7 y 8,09  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{g}_{\text{ss}}^{-1}$ ; en el suelo 12,17 y 11,35  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{g}_{\text{ss}}^{-1}$ , respectivamente) y manteniéndose esta tendencia durante toda la incubación.

*Efecto del estado sucesional* (Figura III.13). En las muestras control se encontraron valores de amonio significativamente mayores en el pinsapar agradativo (Y) que en el maduro (R) en todas las medidas, excepto a la semana de incubación en el caso de la hojarasca, pero sólo a los dos días de incubación en el caso del suelo. Mientras que la adición individual o combinada con nitrógeno de glucosa no implicó cambios en estas diferencias en el compartimento H, en el compartimento Ah aumentó la concentración de amonio en el pinsapar maduro (R) respecto al agradativo (Y) a medida que avanzó la incubación.

*Efecto de la litología* (Figura III.13). Mientras que en los controles del compartimento H no fue significativo el efecto de la litología salvo a los dos (SR > Y) y a los siete (Y > SR) días de incubación, la adición individual o combinada con nitrógeno de glucosa propició una concentración de amonio significativamente superior en el pinsapar sobre calizas (Y) que en el pinsapar de serpentinas (SR) en todas las medidas realizadas. En los controles del compartimento Ah fue significativo el efecto de la litología durante las dos primeras semanas de incubación (SR > Y), manteniéndose estas diferencias en ambos tratamientos G y G+N, aunque no fueron significativas a los dos días de incubación del tratamiento con glucosa.

**III.2.2.B. Tasas netas de mineralización del nitrógeno (MNN) y de nitrificación (NN).**

Ambas tasas fueron superiores en los controles que en los tratamientos de adición, los cuales mostraron valores negativos tanto de NN como de MNN (indicando inmovilización neta) en ambos compartimentos del suelo, encontrándose los menores valores en el tratamiento G+N (Tabla III.8).

Las tasas de NN y de MNN en los controles fueron de manera general superiores en el compartimento de hojarasca que en el horizonte Ah del suelo (Tabla III.8). En el caso del tratamiento G, en BP se encontraron mayores valores (menos negativos) para ambas tasas en el compartimento Ah que en el H (Tukey,  $p < 0.05$ ), mientras que en R la tasa de MNN fue significativamente superior en H que en Ah. En el tratamiento G+N, las tasas de NN y de MNN fueron significativamente superiores en H que en Ah tanto en Y como en R, mientras que en BP se encontraron mayores valores de NN en el compartimento Ah (Tukey,  $p < 0.05$ ).

**Tabla III.8. Tasas de nitrificación neta (NN) y mineralización neta del N (MNN) ( $\mu\text{g N g}_{\text{SS}}^{-1}$ ) en muestras de hojarasca (H) y de suelo mineral 0-10 cm(Ah) sometidas a los tratamientos control (C), de adición de glucosa(G) o de adición de glucosa más nitrato (G+N). Las barras representan el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre pares dentro de cada compartimento.**

Tratamiento	Tasa	Comp.	BP	SR	Y	R
C	NN	H	3,81 (0,26) <sup>a</sup>	1,18 (0,39) <sup>b</sup>	3,05 (1,35) <sup>ab</sup>	2,52 (0,39) <sup>ab</sup>
		Ah	1,72 (0,04) <sup>a</sup>	1,19 (0,19) <sup>bc</sup>	1,55 (0,15) <sup>ab</sup>	0,77 (0,15) <sup>c</sup>
	MNN	H	3,93 (0,19) <sup>a</sup>	1,38 (0,51) <sup>b</sup>	3,14 (1,43) <sup>ab</sup>	2,38 (0,38) <sup>ab</sup>
		Ah	1,31 (0,07) <sup>a</sup>	0,76 (0,21) <sup>ab</sup>	1,18 (0,19) <sup>a</sup>	0,62 (0,18) <sup>b</sup>
G	NN	H	-2,42 (0,17) <sup>b</sup>	-0,53 (0,06) <sup>a</sup>	-0,67 (0,10) <sup>a</sup>	-1,36 (0,11) <sup>c</sup>
		Ah	-1,41 (0,15) <sup>b</sup>	-0,31 (0,08) <sup>a</sup>	-0,49 (0,13) <sup>a</sup>	-1,94 (0,29) <sup>b</sup>
	MNN	H	-2,58 (0,16) <sup>b</sup>	-0,80 (0,07) <sup>a</sup>	-0,69 (0,18) <sup>a</sup>	-1,62 (0,12) <sup>c</sup>
		Ah	-1,76 (0,12) <sup>b</sup>	-1,03 (0,04) <sup>a</sup>	-0,93 (0,15) <sup>a</sup>	-2,45 (0,29) <sup>c</sup>
G+N	NN	H	-5,23 (0,14) <sup>b</sup>	-3,72 (0,10) <sup>c</sup>	-1,43 (0,77) <sup>a</sup>	-4,31 (0,32) <sup>d</sup>
		Ah	-4,32 (0,21) <sup>a</sup>	-3,73 (0,14) <sup>b</sup>	-4,22 (0,14) <sup>a</sup>	-5,80 (0,26) <sup>c</sup>
	MNN	H	-5,34 (0,10) <sup>b</sup>	-4,10 (0,15) <sup>c</sup>	-1,27 (0,75) <sup>a</sup>	-4,45 (0,35) <sup>c</sup>
		Ah	-4,41 (0,17) <sup>a</sup>	-3,88 (0,26) <sup>a</sup>	-4,52 (0,16) <sup>a</sup>	-5,89(0,30) <sup>b</sup>

*Efecto de la deposición de N.* En los controles de ambos compartimentos del suelo, en BP (alta deposición de N) se encontraron mayores tasas de NN y MNN que en SR. Sin embargo, en los tratamientos G y G+N, también para ambos compartimentos, en SR (baja deposición de N) estas tasas fueron significativamente inferiores (valores más negativos en BP que en SR) (Tabla III.8).

*Efecto del estado sucesional.* Tanto en controles como en tratamientos, las tasas de NN y de MNN fueron superiores en el pinsapar agradativo (Y) que en el pinsapar maduro (R), siendo significativas estas diferencias en todos los casos excepto en el compartimento H de los controles (Tabla III.8).

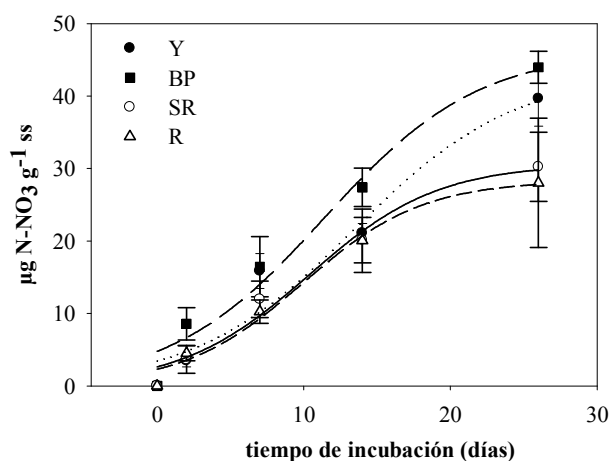
*Efecto de la litología.* Se encontraron diferencias en las tasas de NN y de MNN en pinsapares con diferente litología (Y vs SR) en el tratamiento con glucosa más nitrato, encontrándose mayores valores sobre serpentinas (SR) en el compartimento Ah y sobre calizas (Y) en el compartimento H, siendo significativas estas diferencias excepto para la tasa de MNN del compartimento Ah (Tabla III.8).

### **III.2.2.C. Cinética de la nitrificación.**

No se encontraron diferencias significativas (comparaciones planeadas *a priori*) en el patrón de acumulación de nitrato en el suelo (Ah) de los distintos sitios de estudio (Tabla III.9 y Figura III.14). Los valores máximos de la capacidad de nitrificación (nNNP) (producción total de nitrato cuando se alcanza el tiempo de saturación) y de la tasa máxima de nitrificación neta ( $K_{\text{máx}}$ ) se encontraron en BP (altas tasas de deposición de N) y los mínimos en SR (tasas bajas de deposición de N), pero las diferencias no alcanzaron la significación (Tabla III.9). La producción de nitrato alcanzó la saturación (T) dentro del período de incubación (26 días) sólo en la localidad R.

**Tabla III.9.** Tasa máxima de nitrificación neta ( $K_{m\acute{a}x}$ ,  $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{g}^{-1} \text{ss d}^{-1}$ ), tiempo de saturación (T, días de incubación a partir de los que  $K=0$ ), nitrificación neta potencial (nNNP,  $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{g}^{-1} \text{ss}$  en el tiempo T) y nitrificación neta potencial conservativa (nNNP<sub>conservativa</sub>,  $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{g}^{-1} \text{ss}$ ) en el suelo (Ah) de los cuatro sitios de estudio.

	$K_{m\acute{a}x}$	T	$t_0$	nNNP	NNP <sub>conservativa</sub>
<b>Y</b>	2,06 (0,08)	38,4 (3,81)	2,94 (0,68)	44,4 (5,20)	39,6 (3,79)
<b>BP</b>	2,95 (0,55)	33,1 (6,33)	2,07 (1,55)	46,6 (2,38)	44,0 (2,21)
<b>SR</b>	1,93 (0,31)	28,4 (2,64)	2,20 (1,14)	30,4 (4,98)	30,2 (4,77)
<b>R</b>	2,17 (0,43)	24,8 (5,24)	2,96 (1,43)	29,9 (9,90)	28,0 (8,92)



**Figura III. 14.** Curvas ajustadas de acumulación del nitrato producido (sigmoideal de 3 parámetros:  $y = a/(1 + \exp(-(x-x_0)/b))$ ) en el suelo (Ah) de los sitios de estudio a lo largo del período de incubación.

### III.3. Objetivo 3, “Variabilidad en la estructura de las comunidades bacterianas del suelo de los pinsapares, y relaciones estructura/función”.

#### III.3.1. Análisis de la comunidad microbiana del suelo.

##### III.3.1.A. Diversidad ecológica.

En la tabla III.10 se recogen los efectos de los factores sitio, compartimento del suelo y estación del año sobre la riqueza específica (S), la equitatividad (E) y diversidad (H' de Shannon y 1-D de Simpson) de los OTUs procedentes de la comunidad bacteriana. Sólo se encontró efecto significativo del sitio de estudio en el caso de E, mientras que el factor compartimento tuvo un efecto significativo sobre los demás índices pero no en éste. Así, los valores de S, H' y 1-D fueron significativamente superiores en el compartimento H que en el Ah (*post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$ ).

**Tabla III.10. Efectos de los factores sitio de estudio, compartimento del suelo y estación del año sobre los índices de diversidad de la comunidad bacteriana (ANOVA de tres factores). En negrita se indican los efectos significativos.**

	gl	ÍNDICES DE DIVERSIDAD <sup>1</sup>							
		H'		S		E		1-D	
		F	p	F	p	F	p	F	p
Sitio	3	0,98	0,406	0,81	0,493	9,00	<b>&lt;0,001</b>	0,48	0,701
Compartimento	1	29,24	<b>&lt;0,001</b>	24,55	<b>&lt;0,001</b>	0,62	0,435	50,31	<b>&lt;0,001</b>
Estación del año	1	2,11	0,151	1,78	0,187	0,04	0,851	2,70	0,105
Sitio*Compartimento	3	1,50	0,224	0,42	0,737	1,37	0,260	0,11	0,952
Sitio*Estación	3	1,05	0,376	2,16	0,101	2,19	0,098	0,26	0,854
Compartimento*Estación	1	1,29	0,260	0,05	0,823	6,50	<b>0,01</b>	1,83	0,181
Sitio*Compartimento*Estación	3	0,84	0,476	0,57	0,637	0,61	0,608	0,31	0,818

H' (índice de diversidad de Shannon):  $-\sum p_i \ln(p_i)$ , donde  $p_i$  es la abundancia relativa de cada OTU

S (riqueza específica): número de OTUs

E (equitatividad):  $H'/\ln(S)$

1-D (índice de diversidad de Simpson):  $1-\sum p_i^2$

Los valores de diversidad en todos los casos fueron de magnitud media, oscilando entre 1,51 y 1,76, teniendo un gran peso en ello el componente de equitatividad (Tabla III.11). Así, tanto los valores de E como de 1-D fueron en todos los casos cercanos a 1 (0,71-0,78 y 0,7-0,77 para E y 1-D respectivamente); lo cual indica que en todos los

compartimentos de todos los sitios la comunidad bacteriana muestra una dominancia muy baja. A pesar de que todas las comunidades mostraron una elevada equitatividad, los valores de E fueron significativamente inferiores en R que en el resto de pinsapares (*post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$ ), siendo en general la comunidad bacteriana menos equitativa en R (pinsapar maduro,  $E=0,72$ ), que en Y (agradativo,  $E=0,76$ ). El efecto del estado sucesional fue claro ( $R < Y$ ) en las dos fechas y compartimentos de muestreo, aunque en verano en el compartimento H las diferencias encontradas no fueron significativas (Tabla III.11).

**Tabla III.11. Índices de diversidad de la comunidad bacteriana calculados a partir de los OTUs (promedio  $\pm$  error estándar,  $n=5$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ) entre sitios dentro de cada combinación de compartimento del suelo (H y Ah), estación del año (primavera y verano) y localidad (BP, R, SR y Y).**

		BP	SR	Y	R	
H	Primavera	H'	1,76 (0,06)	1,51 (0,23)	1,77 (0,07)	1,74 (0,03)
		S	11 (1,14)	9,5 (2,16)	11,2 (1,46)	11,5 (0,5)
		E	0,74 (0,01)ab	0,78 (0,04)a	0,75 (0,01)a	0,71 (0,01)b
		1-D	0,77 (0,01)	0,77 (0,01)	0,77 (0,00)	0,77 (0,00)
	Verano	H'	1,73 (0,06)	1,76 (0,02)	1,61 (0,16)	1,68 (0,05)
		S	10,2 (0,66)	10 (0)	9,75 (1,77)	9,6 (0,68)
		E	0,75 (0,01)	0,76 (0,01)	0,78 (0,04)	0,74 (0,01)
		1-D	0,78 (0,01)	0,76 (0,01)	0,76 (0,01)	0,76 (0,01)
Ah	Primavera	H'	1,51 (0,06)	1,63 (0,05)	1,72 (0,07)	1,60 (0,06)
		S	8 (0,45)	8,2 (0,37)	9,6 (0,6)	10 (0,63)
		E	0,78 (0,06)a	0,77 (0,02)a	0,76 (0,01)a	0,7 (0,01)b
		1-D	0,72 (0,04)	0,72 (0,04)	0,73 (0,02)	0,73 (0,02)
	Verano	H'	1,51 (0,05)	1,56 (0,02)	1,61 (0,02)	1,51 (0,05)
		S	8,6 (0,68)	8,4 (0,24)	8,4 (0,24)	8,4 (0,51)
		E	0,71 (0,02)a	0,74 (0,01)ab	0,76 (0,01)b	0,71 (0,01)a
		1-D	0,7 (0,02)	0,7 (0,02)	0,71 (0,02)	0,71 (0,02)

H' (índice de diversidad de Shannon):  $-\sum p_i \ln(p_i)$ , donde  $p_i$  es la abundancia relativa de cada OTU

S (riqueza específica): número de OTUs

E (equitatividad):  $H'/\ln(S)$

1- D (índice de diversidad de Simpson):  $1-\sum p_i^2$

En la Tabla III.12 se recogen los efectos de los factores sitio, compartimento y estación sobre la riqueza específica (S), equitatividad (E) y diversidad ( $H'$  ó 1-D) de los OTUs procedentes de la comunidad desnitrificante. Todos los índices mostraron efectos significativos de la localidad ( $p < 0.05$ ) y ninguno del compartimento. La riqueza específica fue significativamente superior en verano que en primavera (Tukey,  $p < 0,05$ ), mientras que el resto de índices fueron similares en ambas estaciones. Se encontró una mayor diversidad de genes desnitrificantes en los pinsapares sobre serpentinas BP y SR que en los pinsapares calizos Y y R. Tanto el índice de Shannon ( $H'$ ) como el índice de Simpson (1-D) resultaron significativamente superiores en BP y SR que en Y (Tukey,  $p < 0,05$ ). En cuanto a la equitatividad (E), los valores encontrados en Y fueron significativamente inferiores a los encontrados en los otros pinsapares, existiendo diferencias debidas al estado sucesional (Y vs R), además de debidas a la litología (Y vs SR) (Tukey,  $p < 0,05$ ).

**Tabla III.12. Efectos de los factores sitio de estudio, compartimento del suelo y estación sobre los índices de diversidad de la comunidad desnitrificante (ANOVA de tres factores). En negrita se indican los efectos significativos.**

	gl	ÍNDICES DE DIVERSIDAD <sup>1</sup>							
		$H'$		S		E		1-D	
		F	p	F	p	F	p	F	p
Sitio	3	7,98	<b>&lt;0,001</b>	4,02	<b>0,011</b>	6,64	<b>0,001</b>	7,24	<b>&lt;0,001</b>
Compartimento	1	0,02	0,892	0,18	0,670	3,42	0,069	0,01	0,922
Estación del año	1	0,92	0,340	4,58	<b>0,036</b>	0,40	0,529	0,08	0,783
Sitio*Compartimento	3	2,18	0,100	0,71	0,548	3,63	<b>0,018</b>	3,06	<b>0,034</b>
Sitio*Estación	3	2,01	0,122	2,18	0,099	3,05	<b>0,035</b>	1,84	0,148
Compartimento*Estación	1	0,16	0,693	1,24	0,270	1,06	0,307	0,36	0,549
Sitio*Compartimento*Estación	3	0,85	0,470	3,07	<b>0,034</b>	2,07	0,114	0,98	0,410

<sup>1</sup>  $H'$  (índice diversidad de Shannon):  $-\sum p_i \ln(p_i)$ , donde  $p_i$  es la abundancia relativa de cada OTU

S (riqueza específica): número de OTUs

E (equitatividad):  $H'/\ln(S)$

1- D (índice de diversidad de Simpson):  $1-\sum p_i^2$

*Efecto de la deposición de N* (Tabla III.13). Comparando BP con SR (pinsapares serpentinícolas agradativos, saturado y limitado por N, respectivamente), todos los índices de diversidad fueron significativamente superiores (hasta casi el doble) en SR en el compartimento Ah en primavera, mientras que en verano no se encontraron diferencias significativas. En el compartimento H sólo existió efecto significativo de la equitatividad en primavera ( $SR > BP$ ), pero este patrón desapareció en las muestras de verano (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ).

*Efecto del estado sucesional* (Tabla III.13). Comparando R con Y (pinsapares calcícolas con bajas tasas de deposición de N, maduro y en fase agradativa, respectivamente), los índices de diversidad  $H'$ , E y 1-D, fueron significativamente superiores (también del orden del doble) en R en el compartimento Ah en primavera, mientras que en verano aunque se mantuvo la tendencia no se dieron diferencias significativas (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ). Por lo tanto, podemos decir que la comunidad en el pinsapar maduro fue más diversa y más equitativa en el compartimento Ah. Sin embargo, en el caso del compartimento H sólo se encontraron diferencias significativas para E en primavera, siendo más equitativa la comunidad del pinsapar agradativo.

*Efecto de la litología* (Tabla III.13). Comparando Y con SR (pinsapares en fase agradativa limitados por N, calcícola y serpentinícola, respectivamente), se observaron valores de todos los índices superiores en SR en el compartimento Ah tanto en primavera como en verano (aunque estas diferencias no fueron significativas en el caso del índice S en verano), mientras que en el compartimento H no existieron diferencias significativas para ninguna combinación de sitio y estación del año (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ).

**Tabla III.13. Índices de diversidad de la comunidad desnitrificante calculados a partir de los OTUs (promedio  $\pm$  error estándar, n=5). Letras distintas indican diferencias significativas (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ) entre sitios dentro de cada combinación de compartimento (H y Ah), estación del año (primavera y verano) y localidad (BP, R, SR y Y).**

		BP	SR	Y	R	
H	Primavera	H'	1,25 (0,15)	1,17 (0,24)	0,73 (0,08)	0,78 (0,14)
		S	7,8 (0,66)a	4,6 (0,93)ab	4 (0,95)b	6 (0,95)ab
		E	0,61 (0,05)ab	0,83 (0,09)c	0,65 (0,11)bc	0,44 (0,04)a
		1-D	0,61 (0,05)	0,6 (0,1)	0,4 (0,04)	0,41 (0,06)
	Verano	H'	1,44 (0,21)a	1,28 (0,19)a	1,03 (0,25)ab	0,86 (0,12)b
		S	8,5 (1,66)a	9,6 (1,12)a	7,5 (1,71)ab	5,25 (0,63)b
		E	0,69 (0,06)	0,57 (0,06)	0,51 (0,08)	0,52 (0,06)
		1-D	0,67 (0,07)a	0,58 (0,06)ab	0,51 (0,1)ab	0,49 (0,07)b
Ah	Primavera	H'	0,8 (0,31)ac	1,41 (0,12)b	0,6 (0,21)c	1,21 (0,1)ab
		S	5,2 (1,32)a	8,8 (1,59)b	5,4 (0,98)a	6,6 (0,75)ab
		E	0,45 (0,12)a	0,67 (0,02)b	0,34 (0,09)a	0,65 (0,02)b
		1-D	0,42 (0,14)a	0,7 (0,03)b	0,33 (0,12)a	0,66 (0,03)b
	Verano	H'	1,45 (0,25)a	1,31 (0,16)ab	0,61 (0,12)c	0,87 (0,17)bc
		S	9,2 (2,06)a	7,8 (0,66)ab	5,8 (0,66)b	5,6 (0,93)ab
		E	0,67 (0,07)a	0,64 (0,06)a	0,35 (0,06)b	0,51 (0,06)ab
		1-D	0,65 (0,07)a	0,64 (0,07)a	0,31 (0,06)b	0,45 (0,08)ab

H' (índice de diversidad de Shannon):  $-\sum p_i \ln(p_i)$ , donde  $p_i$  es la abundancia relativa de cada OTU

S (riqueza específica): número de OTUs

E (equitatividad):  $H' / \ln(S)$

1- D (índice de diversidad de Simpson):  $1 / \sum p_i^2$

**III.3.1.B. Estructura de la comunidad bacteriana.**

El análisis de componentes principales (ACP) realizado sobre los datos de T-RFLP segregó claramente las comunidades bacterianas en función del sitio de estudio, el compartimento y la estación del año en que se realizó el muestreo, siendo la variabilidad explicada por los tres primeros ejes o componentes del ACP del 26%, 15% y 13% respectivamente (Tabla III.14 y Figura III.15).

**Tabla III.14. Efectos de los factores sitio de estudio, compartimento del suelo y estación del año sobre los tres primeros ejes del Análisis de Componentes Principales (CP1, CP2 y CP3) sobre los datos de T-RFLP de la comunidad bacteriana (ANOVA de tres factores). En negrita se indican los efectos significativos.**

	gl	CP1 (26%)		CP2 (15%)		CP3 (13%)	
		F	p	F	p	F	p
Sitio	3	5,34	<b>&lt;0,01</b>	10,81	<b>&lt;0,001</b>	7,93	<b>&lt;0,001</b>
Compartimento	1	126,95	<b>&lt;0,001</b>	1,32	0,256	1,81	0,184
Estación del año	1	16,72	<b>&lt;0,001</b>	17,79	<b>&lt;0,001</b>	3,39	0,071
Sitio*Compartimento	3	1,56	0,208	7,97	<b>&lt;0,001</b>	5,51	<b>&lt;0,01</b>
Sitio*Estación	3	0,22	0,882	0,59	0,625	0,87	0,463
Compartimento*Estación	1	0,17	0,685	0,02	0,899	0,05	0,817
Sitio*Compartimento*Estación	3	1,84	0,150	0,23	0,877	0,65	0,584

Considerando el primer componente principal (CP1), se encontraron diferencias significativas en la estructura de la comunidad bacteriana entre compartimentos, estaciones y sitios de estudio. Este eje ordena las combinaciones de sitios, compartimento y estación según un gradiente general de disponibilidad de N (Figura III.15), segregándose la pareja de localidades Y y SR (baja disponibilidad de N) de la pareja BP y R (alta disponibilidad de N). Además, se encontraron diferencias significativas entre las coordenadas de Y y las de R y BP (Tukey,  $p < 0,05$ ).

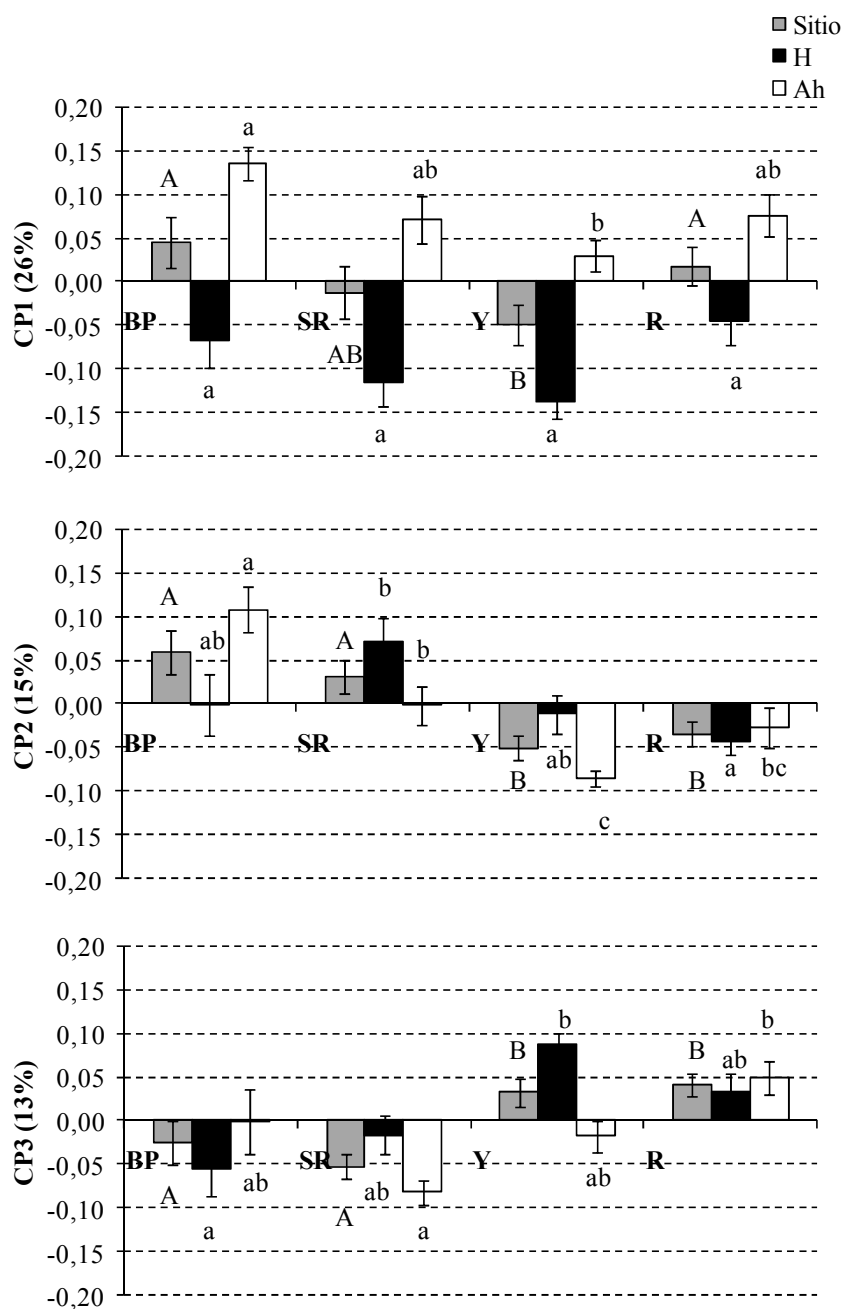


Figura III.15. Valor medio de las coordenadas de las localidades de estudio (BP: Sierra Bermeja, SR: Sierra Real, R: Ronda, Y: Yunquera) y de los compartimentos muestreados (H y Ah) en cada una de ellas, sobre los tres primeros ejes (CP1, CP2 y CP3) del Análisis de Componentes Principales realizado con los datos del análisis T-RFLP de la comunidad bacteriana. Las barras muestran el error estándar. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre sitios (*post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre sitios para cada combinación sitio\*compartimento (*post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Por su parte, en el CP2, los sitios se agruparon por sustrato litológico (Figura III.15), siendo el tándem Y-R (calizas) significativamente diferente del BP-SR (serpentininas) (Tukey,  $p < 0,05$ ). En cuanto al efecto de la interacción sitio\*compartimento sobre las coordenadas en el CP2, para el compartimento Ah se encontró que la estructura de la comunidad bacteriana en BP era significativamente distinta a la del resto de sitios. Además, la estructura de la comunidad bacteriana en Y resultó significativamente distinta a la de SR, pero fue similar a la de Ronda. En cuanto al compartimento H, se encontraron diferencias significativas entre R y SR.

El CP3 separó los sitios por sustrato litológico de nuevo (Figura III.15), encontrándose diferencias significativas (*post hoc* de Tukey) entre BP y R, y entre SR y la pareja R e Y. En cuanto a la interacción sitio\*compartimento, en las muestras del compartimento Ah se encontraron diferencias significativas entre la estructura de la comunidad bacteriana de R y de SR, mientras que en el compartimento H la estructura de Y fue diferente de la de BP (Tukey,  $p < 0,05$ ).

En la Figura III.16 se muestra la posición de cada una de las combinaciones sitio\*compartimento\*estación en el espacio bidimensional CP1-CP2. La diferencia media entre primavera y verano fue de la misma magnitud que las encontradas entre sitios y entre horizontes del suelo, lo que refleja importantes cambios en la comunidad microbiana asociados a la variabilidad estacional.

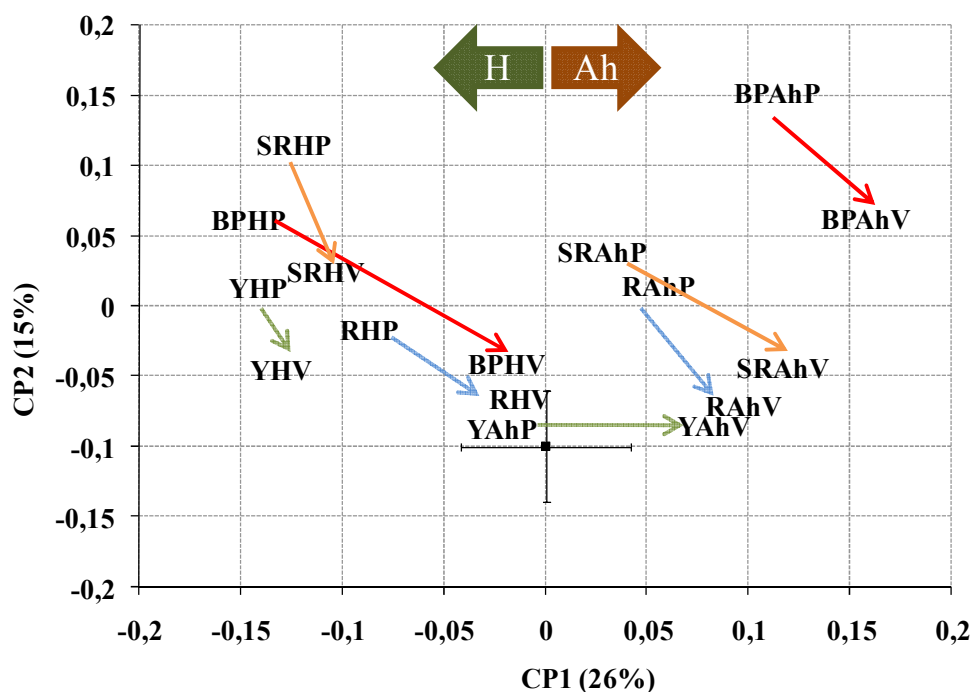


Figura III.16. Posición media de cada combinación de sitio (BP, SR, Y, R), compartimento (hojarasca: H; suelo 0-10 cm: Ah) y estación de muestreo (primavera: P; verano: V) sobre el espacio definido por los componentes principales CP1 (26 % de varianza explicada) y CP2 (15%) obtenidos a partir de los datos de T-RFLP de la comunidad bacteriana. La longitud de las barras de error indica la menor distancia sobre los ejes que ha de haber entre los casos representados para que estos sean significativamente distintos (LSD/2, Fisher's least significant difference) en términos de sus coordenadas medias. Las flechas indican diferencias de posición según la estación del año para un mismo pinsapar (BP: rojo; SR: naranja; Y: verde; R: azul).

Por otro lado, de los veintinueve OTUs observados, mostraron correlaciones con coeficiente  $r$  de Pearson  $> 0,6$  y significativas ( $p < 0,5$ ) sólo cinco de ellos con el CP1, uno con el CP2, y dos con el CP3 (Tabla III.15). Dado que los tres primeros ejes del ACP explican el 54% de la variabilidad total en los datos, lo anterior indica que las tendencias principales de variación en la estructura de las comunidades bacterianas de los pinsapares se deben a cambios en una fracción relativamente pequeña de los OTUs (el 24% del total).

Tabla III.15. Coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) entre las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) observadas para la comunidad bacteriana (los números indican el orden de aparición) y las coordenadas de los tres primeros ejes del Análisis de Componentes Principales (ACP, se muestra el porcentaje de varianza de los datos que explicaron los tres primeros componentes principales). En negrita se resaltan los coeficientes significativos ( $p < 0,05$ ) y además con un valor de  $r$  mayor de 0,6. Los coeficientes no significativos se indican con *ns*.

OTUs	CP1(26%)	CP2(15%)	CP3(13%)
1	-0,50	0,35	<i>ns</i>
2	-0,23	0,27	-0,32
3	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
4	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
5	<b>-0,70</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
6	<b>-0,76</b>	0,35	<i>ns</i>
7	-0,33	0,55	<i>ns</i>
8	<b>-0,74</b>	<i>ns</i>	0,24
9	<b>-0,81</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
10	-0,37	0,28	<i>ns</i>
11	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
12	<i>ns</i>	0,27	<i>ns</i>
13	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
14	-0,33	0,26	<i>ns</i>
15	<i>ns</i>	-0,55	<i>ns</i>
16	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
17	0,44	<i>ns</i>	<i>ns</i>
18	-0,53	<i>ns</i>	<i>ns</i>
19	0,40	-0,27	0,24
20	0,30	<b>0,67</b>	<i>ns</i>
21	<i>ns</i>	<b>-0,63</b>	<b>-0,66</b>
22	<b>0,68</b>	<i>ns</i>	0,69
23	-0,25	-0,59	0,52
24	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
25	<i>ns</i>	0,27	-0,41
26	-0,52	<i>ns</i>	0,31
27	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
28	-0,26	<i>ns</i>	<i>ns</i>
29	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

### III.3.1.C. Estructura de la comunidad desnitrificante.

El análisis de componentes principales (ACP) realizado sobre los datos de T-RFLP segregó claramente la comunidad desnitrificante en función del sitio de estudio, el compartimento y la estación del año en que se realizó el muestreo, siendo la variabilidad explicada por los tres primeros ejes o componentes del ACP del 33%, 18% y 12% respectivamente (Tabla III.16 y Figura III.17).

**Tabla III.16. Efectos de los factores sitio de estudio, compartimento y estación sobre los tres primeros ejes del Análisis de Componentes Principales (CP1, 2 y 3) de la comunidad desnitrificante (ANOVA de tres factores). En negrita se indican los efectos significativos.**

	g.l	CP1 (33%)		CP2 (18%)		CP3 (12%)	
		F	p	F	p	F	p
Sitio	3	10,92	<b>&lt;0,001</b>	3,95	<b>0,012</b>	6,18	<b>&lt;0,001</b>
Compartimento	1	0,18	0,669	0,24	0,625	4,71	<b>0,034</b>
Estación del año	1	5,98	<b>0,017</b>	0,57	0,452	0,00	0,953
Sitio*Compartimento	3	2,60	0,060	0,53	0,665	0,48	0,696
Sitio*Estación	3	13,14	<b>&lt;0,001</b>	2,62	0,059	1,29	0,287
Compartimento*Estación	1	1,75	0,191	0,84	0,364	29,35	<b>&lt;0,001</b>
Sitio*Compartimento*Estación	3	2,89	<b>0,042</b>	0,20	0,899	0,60	0,617

Como se puede observar en la Tabla III.16, en el primer componente principal (CP1) se encontraron efectos principales e interactivos significativos sobre la estructura de la comunidad bacteriana debidos al sitio de estudio y a la estación del año. Este eje segrega los sitios según su litología (Figura III.17), siendo el grupo de los pinsapares calcícolas (Y y R) significativamente diferente del de los serpentínícolas (BP y SR (Tukey,  $p < 0,05$ ). En primavera, la estructura de la comunidad desnitrificante en BP resultó significativamente distinta a la de SR en el compartimento H, y a la de Y en ambos compartimentos muestreados (Tukey,  $p < 0,05$ ), lo que indica una segregación en función de la disponibilidad de N en el suelo (Figura III.18.A). En verano, la posición de R fue significativamente diferente a la del resto de sitios de estudio en el compartimento H (Figura III.18.B).

En el CP2 también se encontró efecto significativo del sitio (Tukey,  $p < 0,05$ ), siendo la posición de BP diferente a la del resto de localidades (Figura III.18), por lo que este eje segregaría el estatus de saturación de N.

Por su parte, el CP3 mostró diferencias significativas entre los sitios de estudio y compartimentos del suelo, siendo el efecto de estos últimos dependiente de la estación del año. Este eje segregó a SR significativamente (*post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$ ) respecto a Y y a BP (Figura III.17). Se encontraron diferencias significativas entre compartimentos en verano (Tukey,  $p < 0,05$ ), pero no en primavera.

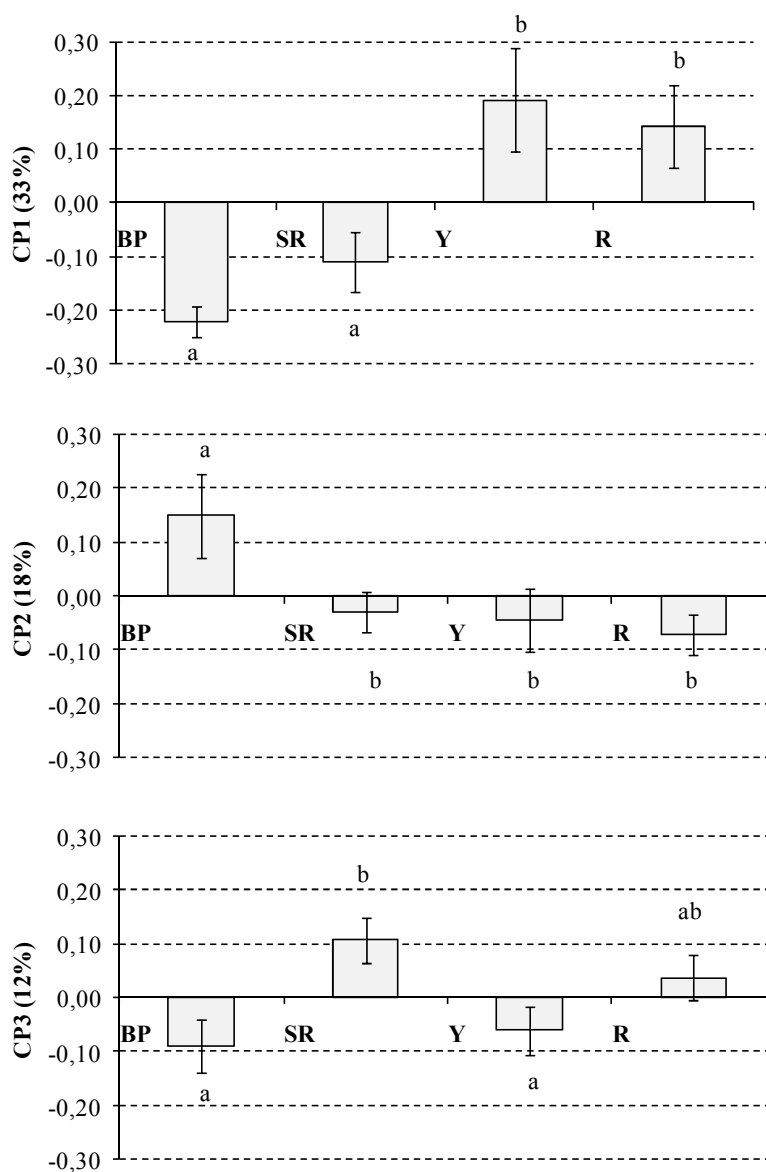
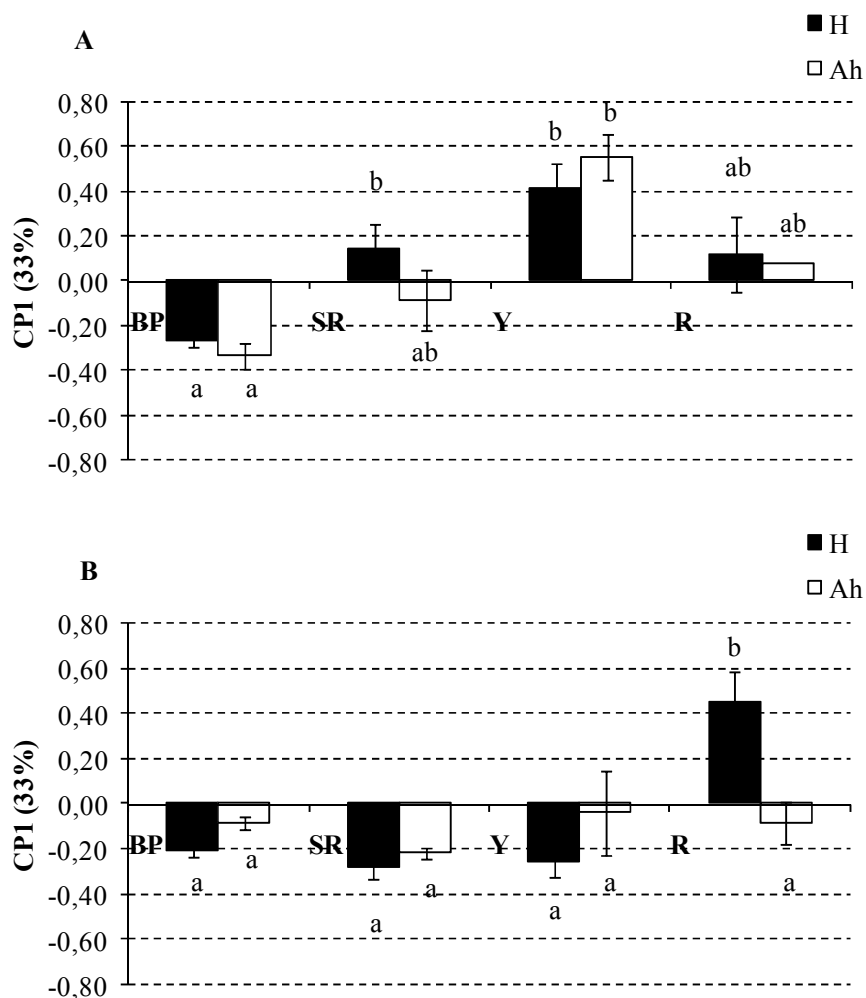


Figura III.17. Valor medio de las coordenadas de las localidades de estudio (BP: Sierra Bermeja, SR: Sierra Real, R: Ronda, Y: Yunquera) sobre los tres primeros ejes (CP1, CP2 y CP3) del Análisis de Componentes Principales realizado con los datos del análisis T-RFLP de la comunidad desnitrificante. Las barras representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre sitios (*post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$ ).



**Figura III.18.** Valor medio de las coordenadas de los compartimentos muestreados ( H y Ah) en las distintas localidades de estudio (BP: Sierra Bermeja, SR: Sierra Real, R: Ronda, Y: Yunquera) sobre el eje CP1 en primavera (A) y en verano (B) del Análisis de Componentes Principales realizado con los datos del análisis T-RFLP de la comunidad desnitrificante. Las barras representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre sitios para cada combinación sitio\*compartimento (*post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$ ).

En la Figura III.19 se muestra la diferenciación de comunidades desnitrificantes en función del sitio de estudio, el compartimento y la estación de muestreo en el espacio definido por los componentes 1 y 2 del ACP.

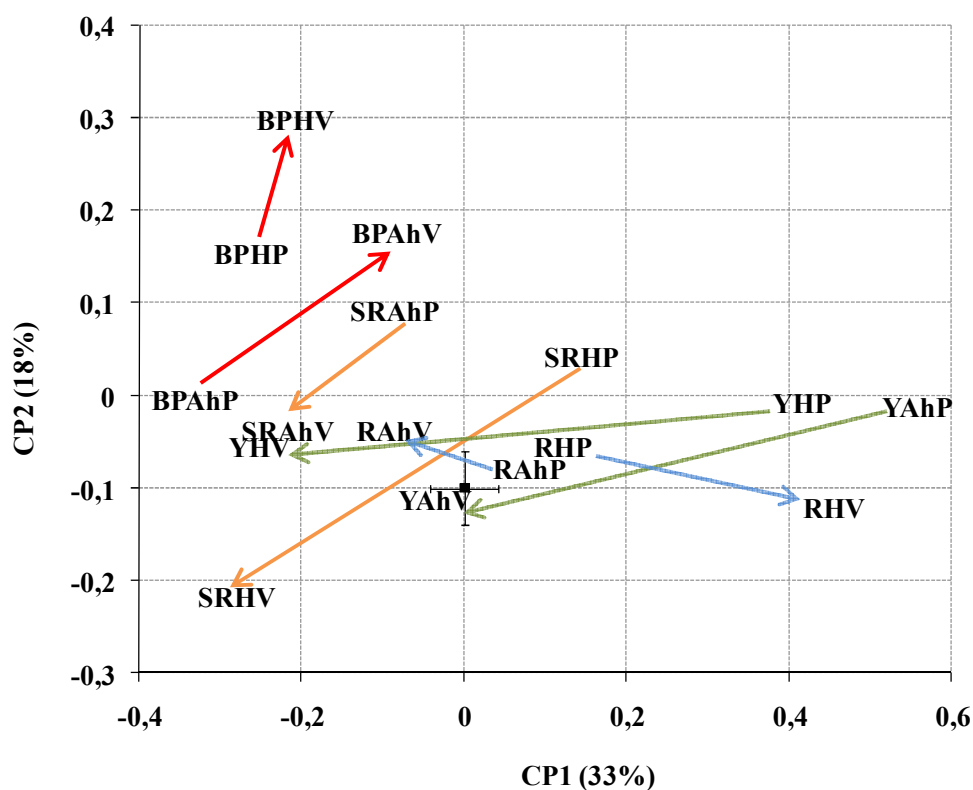


Figura III. 19. Posición media de cada combinación de sitio (BP, SR, Y, R), compartimento (hojarasca: H; suelo 0-10 cm: Ah) y estación de muestreo (primavera: P; verano: V) sobre el espacio definido por los componentes principales CP1 (33% de varianza explicada) y CP2 (18%) obtenidos a partir de los datos de T-RFLP de la comunidad desnitrificante. La longitud de las barras de error indica la menor distancia sobre los ejes que ha de haber entre los casos representados para que estos sean significativamente distintos (LSD/2) en términos de sus coordenadas medias. Las flechas indican diferencias de posición según la estación del año para un mismo pinsapar (BP: rojo; SR: naranja; Y: verde; R: azul).

Por otro lado, de los cuarenta OTUs relacionados con la comunidad desnitrificante observados, sólo tres mostraron correlaciones significativas ( $p < 0,05$ ) y con un coeficiente mayor de 0,6 con los tres primeros componentes del ACP (Tabla III.17), los cuales explican el 63% de la variabilidad total en los datos. Esto indica que las tendencias principales de variación en la estructura de la comunidad desnitrificante del suelo de los pinsapares se deben a cambios en una fracción pequeña de los OTUs (el 10% del total), al igual que ocurría con la estructura de la comunidad bacteriana.

Tabla III.17. Coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) entre las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) de la comunidad desnitrificante observadas (los números indican el orden de aparición) y las coordenadas de los tres primeros ejes del Análisis de Componentes Principales (ACP, se muestra el porcentaje de varianza de los datos que explicaron los tres primeros componentes principales). En negrita se resaltan los coeficientes significativos ( $p < 0,05$ ) y además con un valor de  $r$  mayor de 0,6. Los coeficientes no significativos se indican con *ns*.

OTUs	CP1(33%)	CP2(18%)	CP3(12%)
1	<b>0,96</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
2	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
3	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,39
4	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
5	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,29
6	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
7	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,23
8	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
9	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
10	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,35
11	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
12	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
13	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
14	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
15	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
16	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
17	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
18	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
19	-0,33	<b>0,70</b>	<b>-0,60</b>
20	-0,25	<i>ns</i>	0,52
21	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
22	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
23	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
24	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
25	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
26	-0,23	<i>ns</i>	<i>ns</i>
27	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
28	-0,59	<b>-0,73</b>	-0,33
29	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
30	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
31	<i>ns</i>	0,29	<i>ns</i>
32	-0,30	<i>ns</i>	<i>ns</i>
33	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
34	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
35	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
36	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
37	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
38	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
39	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
40	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

### III.3.2. Análisis de relaciones entre estructura de las comunidades microbianas y la funcionalidad biogeoquímica

Del mismo modo que en el apartado anterior (III.3.1) ordenamos las muestras en base a sus patrones de T-RFLP (estructura de la comunidad microbiana) mediante un ACP, en este caso hicimos lo mismo a partir de los valores de indicadores de la funcionalidad biogeoquímica obtenidas en esas mismas muestras: tasa de nitrificación potencial, tasa de desnitrificación potencial, tasa de respiración, concentración en el suelo de amonio, nitrato y N inorgánico total, % C, %N, C/N y %Humedad.

De este modo podemos comparar la posición de cada combinación de localidad\*compartimento\*estación en términos de funcionalidad biogeoquímica en el espacio definido a partir del análisis multivariante (Figura III.20). La variabilidad explicada por los dos primeros ejes fue cercana al 70%. Este análisis indicó una discriminación significativa ( $p < 0,05$ ) de las muestras de acuerdo al sitio de estudio, el compartimento y la estación del año en que se realizó el muestreo, siendo además significativos todos los efectos interactivos entre dichos factores, excepto para la interacción triple en el caso del CP1 (Tabla III.18).

**Tabla III.18. Efectos de los factores sitio de estudio, compartimento del suelo y estación sobre los tres primeros ejes del Análisis de Componentes Principales (CP1, 2 y 3) realizado a las variables biogeoquímicas medidas (ANOVA de tres factores). En negrita se indican los efectos significativos.**

	gl	CP1 (42%)		CP2 (26%)		CP3 (14%)	
		F	p	F	p	F	p
Sitio	3	43,68	<b>&lt;0,001</b>	66,58	<b>&lt;0,001</b>	118,33	<b>&lt;0,001</b>
Compartimento	1	380,55	<b>&lt;0,001</b>	116,44	<b>&lt;0,001</b>	146,47	<b>&lt;0,001</b>
Estación del año	1	190,87	<b>&lt;0,001</b>	124,43	<b>&lt;0,001</b>	0,38	0,539
Sitio*Compartimento	3	6,94	<b>&lt;0,001</b>	5,04	<b>&lt;0,01</b>	15,87	<b>&lt;0,001</b>
Sitio*Estación	3	4,09	<b>0,011</b>	41,58	<b>&lt;0,001</b>	55,91	<b>&lt;0,001</b>
Compartimento*Estación	1	5,81	<b>0,019</b>	6,84	<b>0,011</b>	40,07	<b>&lt;0,001</b>
Sitio*Compartimento*Estación	3	1,99	0,126	6,34	<b>0,001</b>	8,91	<b>&lt;0,001</b>

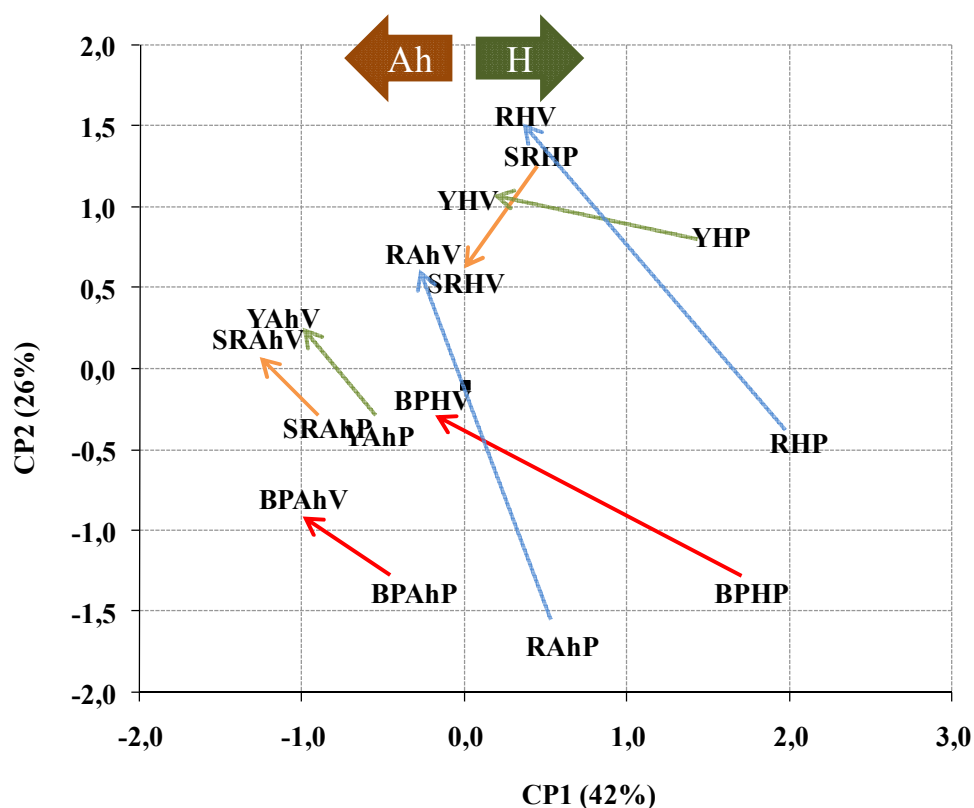


Figura III. 20. Ordenación de cada combinación de sitio (BP, SR, Y, R), compartimento del suelo (hojarasca: H; suelo 0-10 cm: Ah) y estación de muestreo (primavera: P; verano: V) sobre el espacio definido por los componentes principales CP1 (42% de varianza explicada) y CP2 (26%) del ACP realizado sobre las variables biogeoquímicas obtenidas en esas mismas muestras. La longitud de las barras de error indica la menor distancia sobre los ejes que ha de haber entre los casos representados para que estos sean significativamente distintos (LSD/2) en términos de sus coordenadas medias. Las flechas indican diferencias de posición según la estación del año para un mismo pinsapar (BP: rojo; SR: naranja; Y: verde; R: azul).

Como se puede observar en la Figura III.21, las posiciones de R y SR fueron significativamente diferentes de las correspondientes a BP e Y pero también diferentes entre sí a lo largo del CP1 (Tukey,  $p < 0,05$ ). Estas diferencias entre sitios dependieron en gran parte de la estación de muestreo, de forma que en primavera se mantuvo el efecto significativo general, y en verano no se encontraron diferencias entre las coordenadas de Y, SR y BP (Tukey,  $p < 0,05$ ).

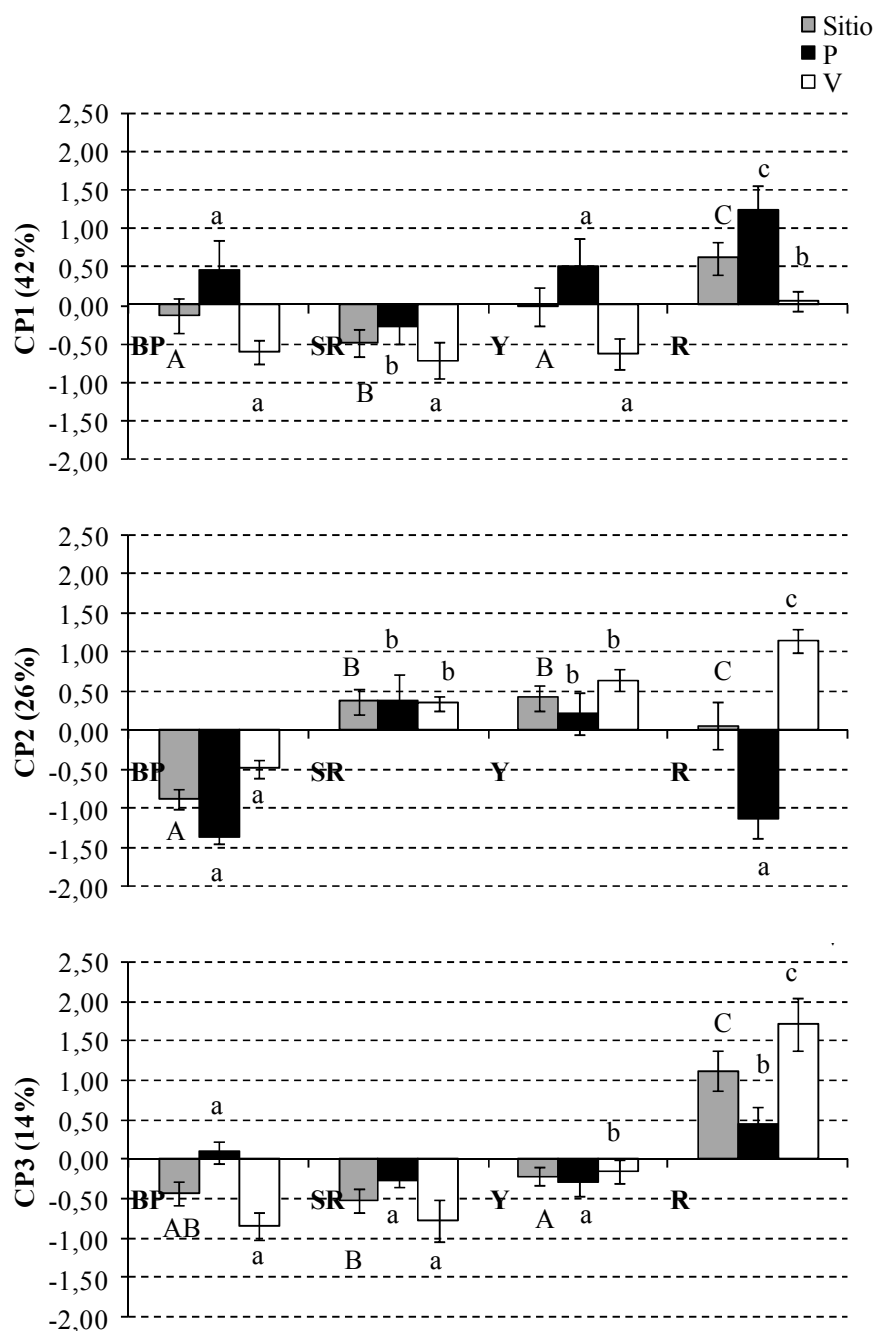


Figura III.21. Valor medio de las coordenadas para las localidades de estudio (BP: Sierra Bermeja, SR: Sierra Real, Y: Yunquera, R: Ronda) en primavera (P) y en verano (V) sobre los tres primeros ejes (CP1, CP2 y CP3) del Análisis de Componentes Principales realizado sobre las variables biogeoquímicas medidas. Las barras representan el error estándar. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre sitios (*post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre sitios para cada combinación sitio\*estación del año (*post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Por su parte, en el CP2 existió una discriminación según la disponibilidad de N, de forma que las posiciones de R y BP fueron significativamente distintas de las de la pareja SR-Y, además de entre sí (Tukey,  $p < 0,05$ ; Figura III.21). Haciendo el análisis separadamente por estación del año, el patrón cambió según se tratase de primavera, cuando el tándem BP y R mostró coordenadas significativamente menores a las de Y y SR, o verano, cuando las posiciones de R y BP fueron significativamente distintas de las de la pareja SR e Y, pero también entre sí y mostrando R coordenadas más positivas que el resto de sitios.

La segregación de localidades a lo largo del CP3 fue similar a la del CP1 aunque existieron diferencias significativas entre SR e Y pero no entre SR y BP, lo que puede indicar un cierto efecto de la litología en este eje (Figura III.21). El efecto de la estación se tradujo en mayores valores de las coordenadas CP3 para la pareja BP y R que para la pareja SR e Y en primavera (efecto de la disponibilidad de N), aunque no se encontraron diferencias significativas entre BP y el resto de localidades. En verano sin embargo, las coordenadas de R y de Y fueron significativamente diferentes entre sí y también respecto a la pareja BP y SR (efecto de la litología).

Existieron diferencias significativas entre estaciones (Figura III.21) en todas las localidades en el CP1, mientras que en los CP2 y CP3 no se encontraron diferencias significativas ni en SR ni en Y (Tukey,  $p < 0,05$ ).

Como se puede observar en la Tabla III.19, todas las variables excepto la nitrificación potencial mostraron una correlación significativa ( $p < 0,05$ ) con el primer componente del ACP (CP1) realizado sobre las variables biogeoquímicas. En la mayoría de esos casos significativos la correlación fue positiva, y muy fuerte ( $r > 0,8$ ) para %C, %N, C/N, %Humedad, Ni, desnitrificación y respiración. Sin embargo, la relación  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  mostró una asociación inversa con el CP1. El contenido de amonio y la relación  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  mostraron una fuerte correlación positiva ( $p < 0,05$ ) con el CP2, mientras que el contenido de nitrato y su porcentaje en la fracción de N mineral se correlacionaron de forma negativa ( $r > 0,6$ ;  $p < 0,05$ ). Aunque la nitrificación potencial no se correlacionó con los dos primeros ejes del ACP, sí lo hizo de forma significativa y positiva con el CP3 ( $r = 0,77$ ).

**Tabla III.19. Coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) entre las variables biogeoquímicas medidas y las coordenadas de los tres primeros ejes del Análisis de Componentes Principales realizado al conjunto de dichas variables (ACP, se muestra el porcentaje de varianza de los datos que explicaron los tres primeros componentes principales). En negrita se resaltan los coeficientes significativos ( $p < 0,05$ ) y además con un valor de  $r$  mayor de 0,6. Los coeficientes no significativos se indican con *ns*.**

<b>Variables Biogeoquímicas</b>	<b>CP1(42%)</b>	<b>CP2(26%)</b>	<b>CP3(14%)</b>
%C	<b>0,80</b>	0,46	<i>ns</i>
%N	<b>0,81</b>	0,35	<i>ns</i>
C/N	0,39	0,51	<b>-0,66</b>
%H	<b>0,83</b>	-0,29	<i>ns</i>
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (μg gss <sup>-1</sup> )	0,47	<b>0,64</b>	0,43
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (μg gss <sup>-1</sup> )	<b>0,67</b>	<b>-0,65</b>	<i>ns</i>
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-0,23	<b>0,83</b>	0,39
N <sub>i</sub> (μg gss <sup>-1</sup> )	<b>0,82</b>	-0,21	0,35
%NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,38	<b>-0,88</b>	<i>ns</i>
Desnitrificación (ng N-N <sub>2</sub> O g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	<b>0,87</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Nitrificación (μgr N-NO <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> g ss <sup>-1</sup> )	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<b>0,77</b>
Respiración (μgr C-CO <sub>2</sub> gss <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	<b>0,81</b>	0,36	-0,35

Por otra parte, el %C, el %N y la relación C/N en el suelo se correlacionaron de forma fuerte y significativa ( $r > -0,6$ ,  $p < 0,05$ ) con el primer componente principal del ACP de la comunidad bacteriana (Tabla III.20) lo que sugiere que los cambios observados en la estructura de dicha comunidad estuvieron influenciados por la diferente disponibilidad de N, ya fuera debida a diferencias sucesionales o a las distintas tasas de deposición de N.

Por su parte, las correlaciones entre la estructura de la comunidad desnitrificante y las variables biogeoquímicas medidas revelaron una relación significativa entre el CP1 y la tasa de desnitrificación potencial o producción de N-N<sub>2</sub>O (nmoles g<sup>-1</sup><sub>ss</sub> h<sup>-1</sup>) para todos los datos ( $r=0,24$ ;  $p=0,043$ ). Sin embargo, al realizar las correlaciones de los resultados de cada estación por separado encontramos una correlación fuerte y significativa en verano ( $r=0,51$ ;  $p=0,001$ ), estación en la que los pinsapares se segregaron por diferencias sucesionales, mientras que en primavera, estación que separó los pinsapares por litología, no se dio correlación. Esto significa que aunque las comunidades desnitrificantes fueron diferentes

tanto en primavera como en verano, estas diferencias estuvieron ligadas a la actividad desnitrificante sólo en la época estival, con mayor producción de N<sub>2</sub>O en el pinsapar maduro que en el agradativo. También se encontró una correlación significativa en verano entre las coordenadas del CP3 y la tasa de desnitrificación potencial ( $r=-0,45$ ;  $p=0,006$ ), ligada en este caso a diferencias en las tasas de deposición de N (Tabla III.21).

**Tabla III.20. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre las variables biogeoquímicas medidas y las coordenadas de los tres primeros ejes del Análisis de Componentes Principales realizado con los datos del análisis T-RFLP de la comunidad bacteriana (entre paréntesis se muestra el porcentaje de varianza de los datos que explicaron los tres primeros componentes principales, CP). En negrita se resaltan los coeficientes de correlación superiores a 0,6.**

<b>Variables Biogeoquímicas</b>	<b>CP1 (26%)</b>	<b>CP2 (15%)</b>	<b>CP3 (13%)</b>
%C	<b>-0,74<sup>***</sup></b>	ns	0,36 <sup>**</sup>
%N	<b>-0,63<sup>***</sup></b>	ns	0,41 <sup>***</sup>
C/N	<b>-0,64<sup>***</sup></b>	ns	ns
%H	-0,39 <sup>**</sup>	0,29*	ns
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (µg g <sub>ss</sub> <sup>-1</sup> )	-0,40 <sup>***</sup>	ns	ns
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (µg g <sub>ss</sub> <sup>-1</sup> )	-0,26*	0,26*	ns
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> :N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	ns	-0,30*	ns
N <sub>i</sub> (µg g <sub>ss</sub> <sup>-1</sup> )	-0,43 <sup>***</sup>	ns	ns
%NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	ns	0,34 <sup>**</sup>	ns
Desnitrificación (ng N-N <sub>2</sub> O g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	-0,48 <sup>***</sup>	ns	ns
Nitrificación (µgr N-NO <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> g <sub>ss</sub> <sup>-1</sup> )	ns	-0,20 <sup>ms</sup>	0,24*
Respiración (µgr C-CO <sub>2</sub> g <sub>ss</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	<b>-0,74<sup>***</sup></b>	ns	0,24*

Niveles de significación: ns:  $p>0,1$ ; ms:  $0,1>p>0,05$ ; \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$

También se encontraron correlaciones significativas entre las coordenadas del CP1 y otras variables biogeoquímicas relacionadas con la disponibilidad de N, %N y amonio, así como con el % humedad y la tasa de respiración (Tabla III.21) pero las correlaciones también dependieron de la estación muestreada. Así, en primavera la estructura de la comunidad desnitrificante estuvo influenciada por el porcentaje de C y N del suelo así como por el grado de humedad del mismo mientras que en verano los factores determinantes fueron el %N, el contenido en amonio y Ni y la relación amonio:nitrato, más relacionados con la disponibilidad de N. En verano encontramos una influencia mayor de variables relacionadas con la disponibilidad de N, ligada a diferencias sucesionales,

mientras que en primavera la correlación con el %N estuvo ligada con diferencias en las tasas de deposición de N pero también con el %C en el suelo y el % humedad.

**Tabla III.21. Coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) entre las variables biogeoquímicas medidas y las coordenadas de los tres primeros ejes del Análisis de Componentes Principales realizado con los datos del análisis T-RFLP de la comunidad desnitrificante (entre paréntesis se muestra el porcentaje de varianza de los datos que explicaron los tres primeros componentes principales, CP).**

Variables Biogeoquímicas	Conjunto de los datos			Primavera			Verano		
	CP1 (33%)	CP2 (18%)	CP3 (12%)	CP1 (33%)	CP2 (18%)	CP3 (12%)	CP1 (33%)	CP2 (18%)	CP3 (12%)
%C	ns	ns	ns	0,49**	ns	0,33 <sup>ms</sup>	ns	ns	-0,52**
%N	0,29*	ns	ns	0,49**	ns	ns	0,34*	ns	-0,45**
C/N	ns	ns	ns	ns	ns	0,33 <sup>ms</sup>	ns	ns	-0,35*
%H	0,24*	ns	ns	0,38*	ns	ns	ns	ns	ns
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (μg g <sub>ss</sub> <sup>-1</sup> )	0,4**	ns	ns	0,35 <sup>ms</sup>	ns	0,39*	0,51**	-0,29 <sup>ms</sup>	ns
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (μg g <sub>ss</sub> <sup>-1</sup> )	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> :N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,21 <sup>ms</sup>	ns	ns	ns	ns	0,32 <sup>ms</sup>	0,44**	-0,32 <sup>ms</sup>	ns
N <sub>i</sub> (μg g <sub>ss</sub> <sup>-1</sup> )	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,46**	-0,33 <sup>ms</sup>	ns
%NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	-0,30 <sup>ms</sup>	-0,31 <sup>ms</sup>	0,36*	ns
DP	0,24*	ns	ns	ns	ns	ns	0,51**	ns	-0,45**
NP	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
R	0,28*	ns	ns	0,54**	ns	ns	ns	ns	-0,58***

DP: Desnitrificación potencial (ng N-N<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)

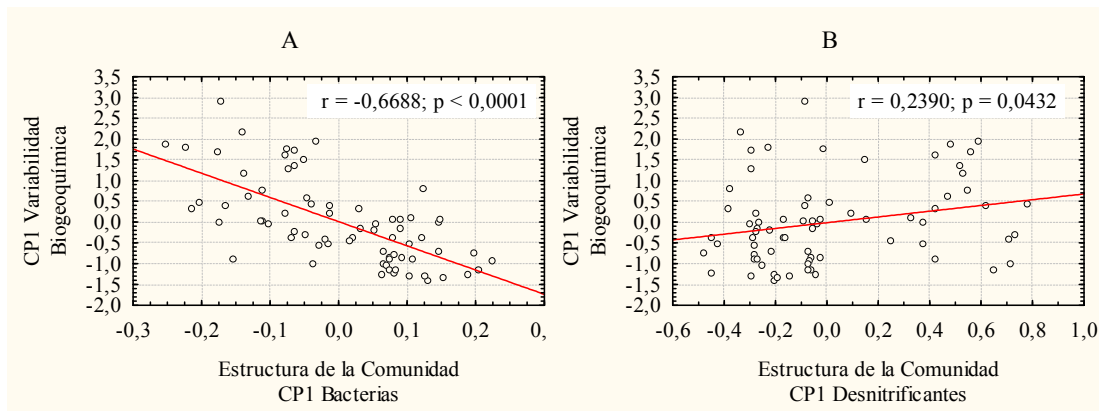
NP: Nitrificación potencial (μgr N-NO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sub>ss</sub><sup>-1</sup>)

R: Respiración (μgr C-CO<sub>2</sub> g<sub>ss</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)

Niveles de significación: ns: p>0,1; ms: 0,1>p>0,05; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

No se encontraron correlaciones entre el CP2 y el CP3 de los dos ejes y las variables biogeoquímicas medidas para el conjunto de los datos. Sin embargo, en verano el porcentaje de nitrato se correlacionó positiva y significativamente con el CP2 mientras que el amonio, la relación amonio:nitrato y el contenido en Ni lo hicieron de forma negativa y marginalmente significativa (Tabla III.21). Esto sugiere que los cambios observados en la estructura de la comunidad desnitrificante del suelo en verano estuvieron influenciados por la diferente disponibilidad de N debida a las distintas tasas de deposición de N. Este hecho puede deberse a la interacción marginalmente significativa del sitio y de la estación, encontrándose diferencias significativas entre las posiciones de BP y SR sólo en verano

(Tabla III.16). Asimismo, en verano se encontraron correlaciones significativas y negativas entre el CP3 y variables relacionadas con la disponibilidad de N como el %N y la relación C/N (Tabla III.21). En primavera, tan sólo el contenido de amonio se correlacionó significativamente con el CP3, aunque se encontraron correlaciones marginalmente significativas con variables indicadoras de disponibilidad de N. A lo largo del CP3 también se segregaron significativamente Y de SR, existiendo por tanto un efecto añadido de la litología en este eje que puede interferir en las correlaciones con las variables biogeoquímicas (Figura III.17). Para llevar a cabo un estudio gráfico de la correspondencia entre funcionalidad biogeoquímica y estructura de la comunidad microbiana del suelo se analizó la relación entre: (i) las coordenadas en el CP1 resultante del análisis ACP obtenido a partir de los perfiles de T-RFLP (indicadores de estructura de la comunidad microbiana) y (ii) las coordenadas en el CP1 resultante del análisis ACP con las variables biogeoquímicas. La Figura III.22.A muestra dicha relación para el caso de la comunidad de bacterias, y la Figura III.22.B para el caso de la comunidad de desnitrificantes.



**Figura III.22. Relación entre las coordenadas de las muestras sobre los primeros componentes principales derivados, por un lado, del ACP sobre los perfiles de T-RFLP de la comunidad bacteriana (A) o de la desnitrificante (B) (eje de abcisas) y, por otro, del ACP sobre las variables biogeoquímicas (eje de ordenadas).**

En dicha figura podemos observar la correlación significativa entre los perfiles de la comunidad bacteriana o de la desnitrificante (coordenadas sobre los respectivos CP1) y las coordenadas del CP1 del ACP realizado a las variables biogeoquímicas, para el conjunto de datos observados (bacterias:  $r=-0,67$  y  $p<0,0001$ ; desnitrificantes:  $r=0,24$  y  $p<0,05$ ). La

relación encontrada entre los indicadores de disponibilidad de N y los perfiles de las comunidades bacteriana y desnitrificante sugiere que los cambios observados en la estructura de dichas comunidades del suelo estuvieron ligeramente más influenciados por la disponibilidad de N que por diferencias litológicas.

### III.4. Objetivo 4, “Efecto del grado de saturación de N sobre la eficiencia de los mecanismos de retención del N en los pinsapares”

#### III.4.1. Entradas de N con el agua de trascolación.

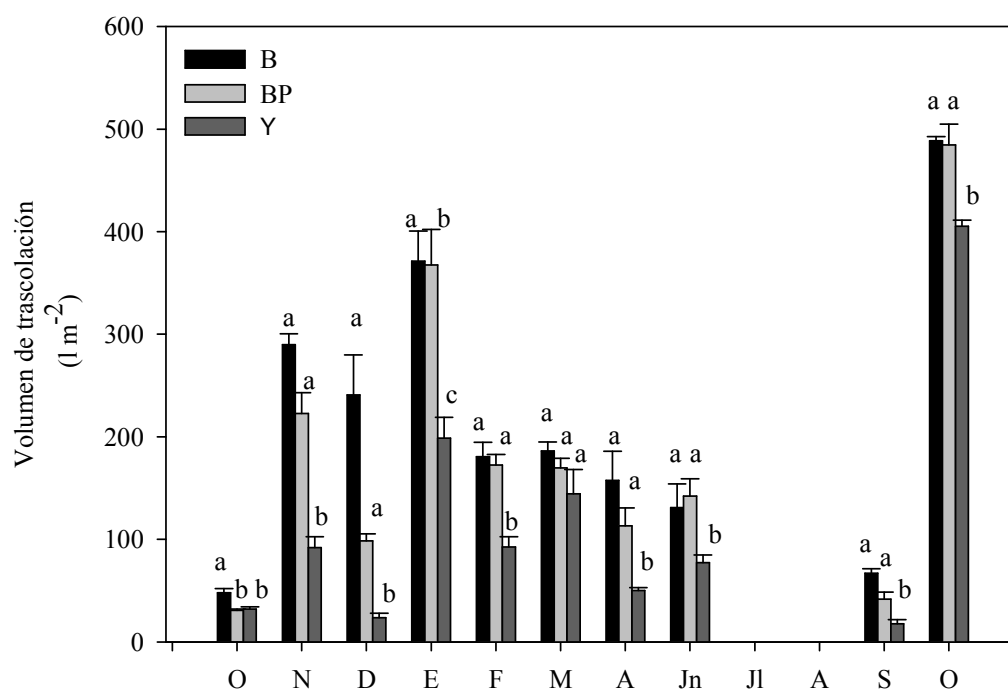
##### III.4.1.A. Volumen de trascolación.

El volumen de agua recogido en los colectores de trascolación en los tres sitios de muestreo empleados para este objetivo (B y BP, en Sierra Bermeja; Y en Sierra de las Nieves) mostró una clara estacionalidad (Figura III.23) siguiendo el patrón habitual de la precipitación en ambientes mediterráneos, con la mayor parte de las lluvias concentradas a lo largo del otoño y el invierno, y un periodo de sequía estival desde Julio a Septiembre. El sitio de muestreo afectó significativamente al volumen de trascolación (Tabla III.22).

**Tabla III.22. Efecto de la localidad (pinsapares B, BP e Y) y de la fecha de muestreo (intervalos aproximadamente mensuales durante un ciclo anual de otoño a otoño) en los volúmenes mensuales de agua de trascolación y de lixiviación, en la concentración de nutrientes en el agua de trascolación, en la relación amonio:nitrato y en las tasas mensuales y acumuladas de trascolación de amonio y nitrato (ANOVA de medidas repetidas). En negrita se resaltan los efectos significativos.**

	g.l.	Sitio		g.l.	Tiempo		Tiempo*Sitio		
		F	p		F	p	g.l.	F	p
Volumen trascolación (TC)	2	72,29	<b>&lt;0,001</b>	9	181,74	<b>&lt;0,001</b>	18	10,39	<b>&lt;0,001</b>
[N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] TC	2	3,58	0,072	9	1,28	0,6	18	4,05	0,216
[N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]TC	2	0,66	0,542	9	358,69	<b>0,041</b>	18	5,25	0,172
Relación N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2	2,55	0,133	9	0,00	1,000	18	1,23	0,256
TC mensual N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	2	18,18	<b>&lt;0,001</b>	9	75,73	0,089	18	9,57	0,099
TC mensual N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2	0,92	0,432	9	145,53	0,064	18	4,02	0,218
TC acumulada N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	2	15,04	<b>0,001</b>	9	220,27	0,052	18	6,37	0,144
TC acumulada N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2	1,14	0,363	9	115,38	0,072	18	3,86	0,226
Volumen de lixiviación	2	5,98	<b>&lt;0,01</b>	9	28,64	<b>&lt;0,001</b>	18	6,07	<b>&lt;0,001</b>

Se registraron valores de trascolación globalmente mayores a mayor altitud (B > BP, 1500 y 1200 m, respectivamente, en Sierra Bermeja), y a mayor longitud (BP > Y, gradiente Este-Oeste de precipitación en Andalucía; 1200 m en Sierra Bermeja y Sierra de las Nieves, respectivamente) (Tukey,  $p < 0,05$ ). El efecto significativo de la interacción entre fecha de muestreo y localidad refleja que este patrón general de mayor volumen en Sierra Bermeja que en Yunquera, aunque es consistente casi todos los meses (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ), no se mantuvo para las muestras de octubre de 2005 y marzo de 2006 (Figura III.23). Asimismo, el volumen de trascolación mensual fue significativamente mayor en B (1500 m) que BP (1200 m) para los muestreos de octubre 2005 (47,9 y 30,5 l m<sup>-2</sup>, respectivamente) y diciembre 2005 (241 y 98,4 l m<sup>-2</sup>, respectivamente), pero no en el resto de fechas.



**Figura III. 23.** Variación en el volumen de agua de trascolación (l m<sup>-2</sup>) a lo largo de un ciclo hidrológico anual en los pinsapares de las localidades B y BP (Sierra Bermeja), e Y (Sierra de las Nieves). Se muestra la media ± el error estándar de cuatro réplicas.

Considerando el volumen total anual de trascolación, se observó un efecto significativo del sitio de estudio (Tabla III.23), tal que los valores máximos se obtuvieron en B (2160 l m<sup>-2</sup>), seguidos de los valores encontrados en BP (1843 l m<sup>-2</sup>), mientras que en Y se obtuvieron los mínimos (1133 l m<sup>-2</sup>) (Tabla III.24).

**Tabla III.23. Efecto de la localidad de estudio (pinsapares B, BP e Y) sobre los valores anuales del volumen de trascolación (l m<sup>-2</sup>) y de la deposición por trascolación de formas inorgánicas de N (ANOVA de 1 vía). En negrita se resaltan los efectos significativos.**

	trascolación (kg N ha <sup>-1</sup> año <sup>-1</sup> )			trascolación anual
	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N <sub>i total</sub>	(l m <sup>-2</sup> )
g.l.	2	2	2	2
F	18,18	0,92	2,18	66,51
p	<b>&lt;0,001</b>	0,432	0,169	<b>&lt;0,001</b>

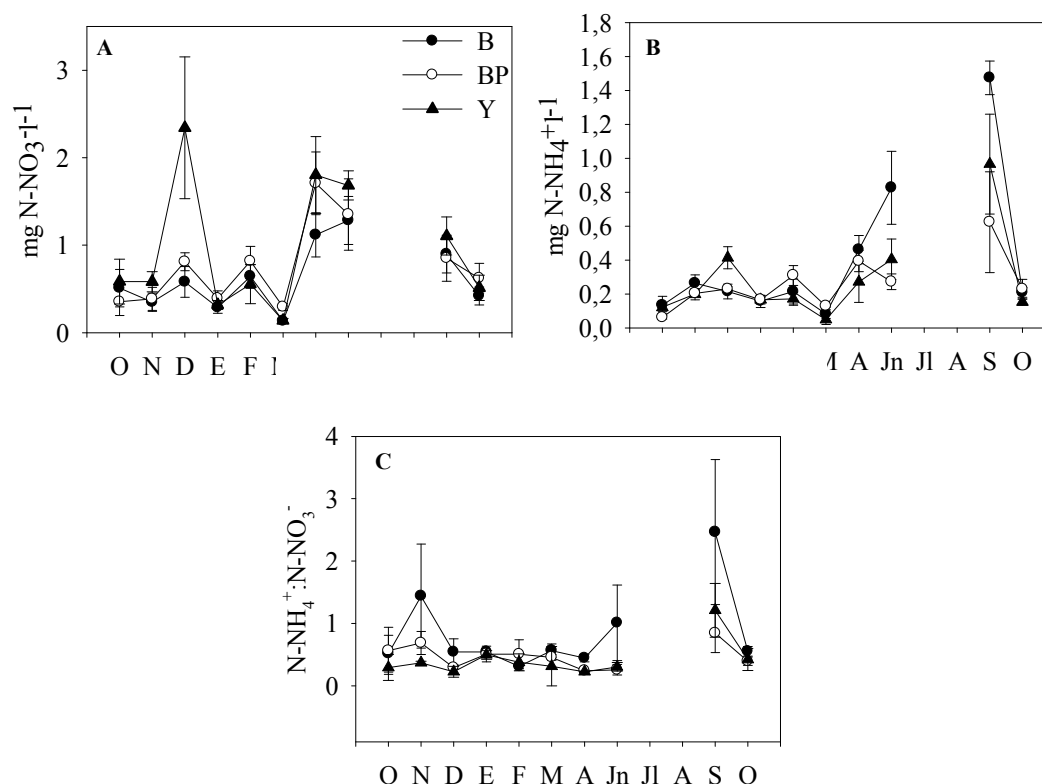
**Tabla. 24. Tasas de trascolación anual de amonio, nitrato y N inorgánico total, y volumen total de trascolación anual, en los tres pinsapares de estudio. Entre paréntesis se indica el error estándar. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre sitios para esa variable (test *a posteriori* de Tukey, p<0.05).**

	trascolación (kg N ha <sup>-1</sup> año <sup>-1</sup> )			trascolación anual
	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N <sub>i total</sub>	(l m <sup>-2</sup> )
Y	2,06(0,26)a	7,96(2,02)	10,02(2,24)	1133,21(73,83)a
BP	4,30(0,60)ab	12,6(2,71)	16,76(3,07)	1842,60(76,37)b
B	6,22(0,53)b	11,40(2,56)	17,62(3,07)	2159,98(34,38)c

#### **III.4.1.B. Concentración de amonio y nitrato en el agua de trascolación.**

La dinámica temporal de la concentración de nitrato en el agua de trascolación (Figura III.24.A) mostró un efecto significativo de la fecha de muestreo (Tabla III.22). En el muestreo de diciembre, la concentración de nitrato fue significativamente mayor en Y que en las localidades de Sierra Bermeja. No se encontraron efectos significativos sobre la concentración de amonio, aunque el del sitio fue marginalmente significativo (Tabla III.22). Se observó una mayor concentración de amonio en Y también en diciembre, mientras que

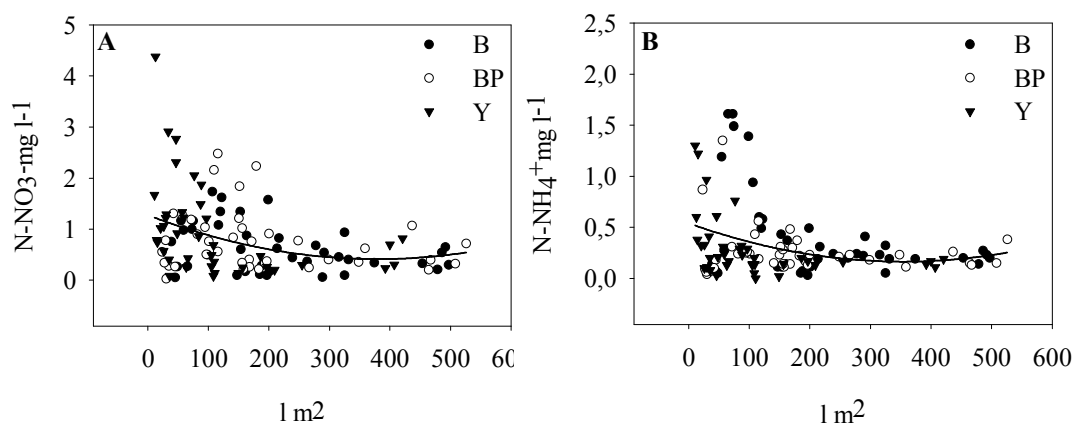
en los muestreos de junio y septiembre de 2006 fue significativamente superior en B que en BP (Figura III.24.B).



**Figura III. 24. Concentración media de  $\text{N-NO}_3^-$  (A) y de  $\text{N-NH}_4^+$  (B) y relación amonio:nitrato (C) en el agua de trascolación mensual en los pinsapares de Yunquera (Y) y de Sierra Bermeja (B y BP). Las barras representan el error estándar (n=4).**

No se observaron efectos principales significativos ni del sitio ni de la fecha de muestreo en la relación amonio:nitrato (Tabla III.22). Los valores medios de ésta oscilaron entre 0,62 en B y 0,96 en Y (Figura III. 24.C). Considerando cada fecha de muestreo separadamente, se encontraron diferencias significativas entre B e Y ( $B > Y$ ) en los muestreos de enero y febrero, y entre B y BP en el muestreo de junio (tests de comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ).

Las concentraciones de nitrato y de amonio en la trascolación mostraron una relación inversa no lineal (polinomio de segundo orden) y significativa con el volumen de ésta (Figuras III.25.A y B, respectivamente).



**Figura III. 25. Relación entre la concentración ( $\text{mg N l}^{-1}$ ) de nitrato (A) o de amonio (B) en el agua de trascolación y el volumen de las muestras correspondientes ( $\text{l m}^{-2}$ ). Las ecuaciones de regresión fueron:**

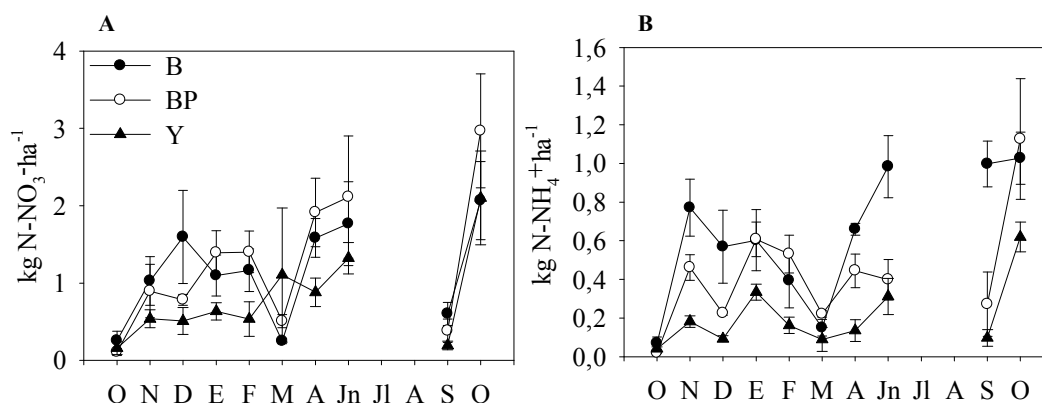
$$[\text{N-NO}_3^-] = 1,274 - 4,6\text{E-}3 \text{ vol.} + 5,53\text{E-}6 \text{ vol.}^2 \quad (r^2 = 0,13, p < 0,001);$$

$$[\text{N-NH}_4^+] = 0,54 - 2,1\text{E-}3 \text{ vol.} + 6,007\text{E-}6 \text{ vol.}^2 \quad (r^2 = 0,1, p = 0,002).$$

#### **III.4.1.C. Tasas de deposición de amonio y nitrato con el agua de trascolación.**

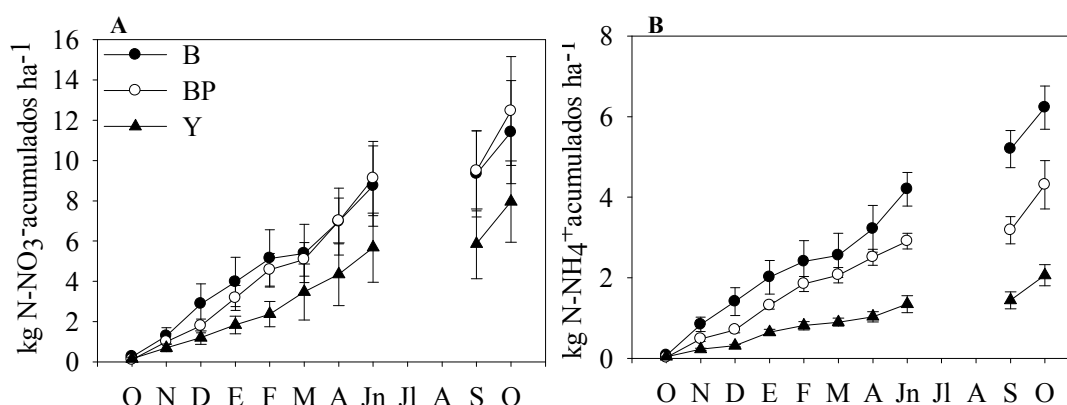
En las Figuras III.26.A y B se pueden observar los valores medios mensuales de deposición de N en el agua de trascolación en forma de nitrato y de amonio, respectivamente. En el primer caso no se observó efecto significativo del sitio de estudio, siendo el tiempo marginalmente significativo ( $p = 0,06$ , Tabla III.22). La comparación individualizada por fechas (comparaciones planeadas *a priori*) indicó tasas de trascolación de nitrato significativamente mayores en BP que en Y en los muestreos de enero, febrero y abril de 2006 ( $p < 0,05$ ), y en B que en Y en septiembre de 2006. En el caso de la trascolación de amonio, sí se observó un efecto significativo del sitio de estudio (Tabla III.22), con valores en B y BP globalmente superiores a los de Y (Tukey,  $p < 0,05$ ). Por su parte, el tiempo y la interacción tiempo\*sitio mostraron efectos marginalmente

significativos ( $<0.01$ ). Así, la comparación por fechas mostró tasas de trascolación de amonio significativamente superiores en B que en el resto de sitios ( $B > BP \approx Y$ ) en noviembre de 2005 y en abril, junio y septiembre de 2006; y que en Y ( $B > Y$ ) en diciembre de 2005. Asimismo, BP fue significativamente superior a Y en febrero 2006.



**Figura III. 26. Tasas mensuales de deposición de nitrato (A) y de amonio (B) con el agua de trascolación en los pinsapares de estudio. Las barras representan el error estándar.**

Las tasas mensuales acumuladas de trascolación de nitrato ( $\text{kg N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1}$ ) no mostraron diferencias significativas entre sitios (Tabla III.22), aunque las curvas correspondientes a Sierra Bermeja se mantienen durante todo el año por encima de la de Yunquera (Figura III.27.A). Por su lado, la trascolación acumulada de amonio ( $\text{kg N-NH}_4^+ \text{ ha}^{-1}$ ) sí mostró efectos significativos del sitio, siendo mayor en Sierra Bermeja que en Yunquera (Tukey,  $p < 0,05$ , Figura III.27.B). Así, la trascolación acumulada de amonio fue significativamente superior en Sierra Bermeja en todos los muestreos, salvo en el tercero (enero;  $BP=Y$ ). Entre las dos altitudes de Sierra Bermeja existieron diferencias significativas en noviembre y diciembre de 2005, y en junio y septiembre de 2006. Respecto al factor tiempo, su efecto sobre la trascolación acumulada de amonio fue sólo marginalmente significativo (Tabla III.22).



**Figura III.27. Tasas mensuales acumuladas de deposición de nitrato y amonio en el agua de trascolación en los pinsapares de estudio. Las barras representan el error estándar.**

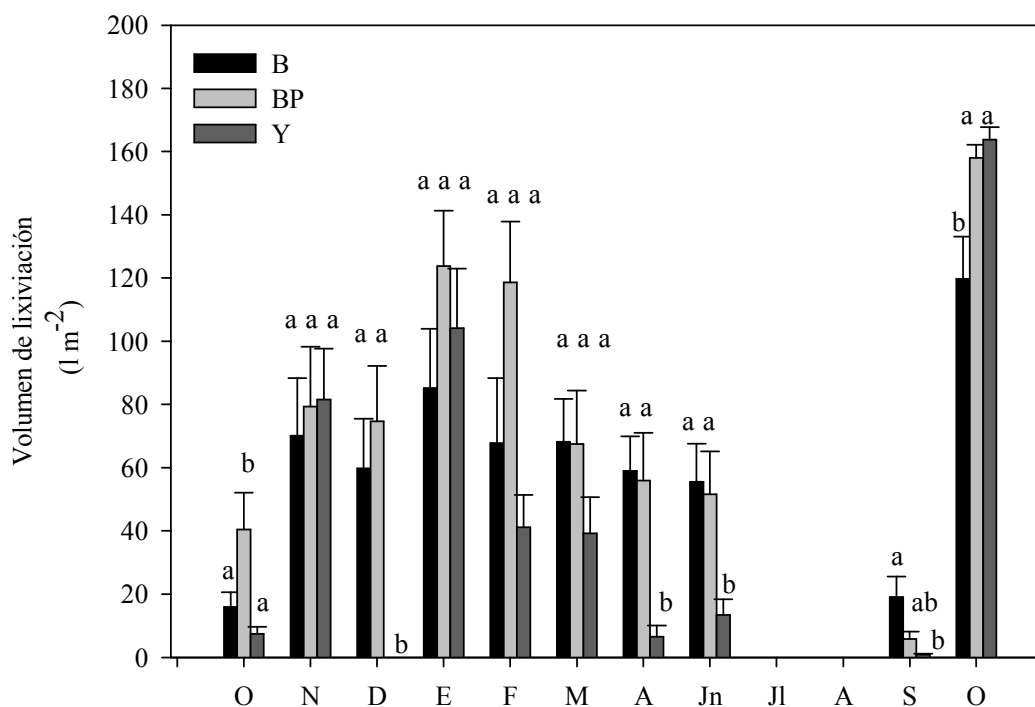
Los valores medios anuales de trascolación de nitrato oscilaron entre los 12.6 y 11.4 kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> encontrados en B y BP, respectivamente, y los 8 kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> correspondientes a Y (Tabla III.24); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tres sitios de estudio (Tabla III.23). La trascolación anual de amonio sí mostró diferencias significativas entre parcelas (Tabla III.23), siendo superior en Sierra Bermeja (6.2 y 4.3 kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en B y BP, respectivamente) que en Sierra de las Nieves-Yunquera (2.1 kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) (Tabla III.23). La trascolación anual de N inorgánico (nitrato más amonio) se situó en torno a 17 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en Sierra Bermeja, y a 10 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en Yunquera, pero como en el caso del nitrato las diferencias no fueron significativas.

### III.4.2. Pérdidas de N por lixiviación y señal de $^{15}\text{N}$ en los lixiviados. Efecto de la fertilización con N

#### III.4.2.A. Volumen de lixiviación

Para el análisis estadístico ANOVA de los volúmenes de agua de lixiviación se incluyó inicialmente el factor “fertilización con N” a efectos de probar que la asignación de los tratamientos control o de adición de N entre las diferentes parcelas de  $2 \times 2 \text{ m}^2$  dentro de cada localidad fue adecuada. Dicho factor no mostró un efecto significativo, indicando que los flujos de lixiviación fueron comparables entre ambos subconjuntos de parcelas dentro de cada sitio. Consecuentemente, los datos de volumen de lixiviación correspondientes a las parcelas control y a las fertilizadas se agruparon por localidad y fecha de muestreo, para realizar el ANOVA definitivo. Los volúmenes mensuales de lixiviación mostraron efectos significativos principales de estos factores, así como de su interacción sitio\*tiempo (Tabla III.22). Los volúmenes de lixiviación fueron globalmente mayores en Sierra Bermeja, pero tal patrón no fue plenamente consistente entre fechas de muestreo como indica la significación de la interacción. Así, por periodos individualizados (Figura III.28), B y BP mostraron una lixiviación significativamente mayor que Y sólo en diciembre de 2005, y en abril y junio de 2006. Entre B y BP hubo diferencias significativas sólo en los muestreos de octubre de 2005 y de 2006 (mayor lixiviación en BP).

La estacionalidad de la lixiviación (Figura III.28) fue cualitativamente similar a la de la trascolación. El mayor rango de variabilidad estacional en la lixiviación se encontró en Yunquera (no hubo lixiviación en diciembre-nieve/suelo congelado-;  $< 20 \text{ l m}^{-2}$  en octubre de 2005, y en abril, junio y septiembre de 2006;  $> 100 \text{ l m}^{-2}$  en enero y octubre de 2006). En esta localidad empieza antes la sequía, con valores de lixiviación significativamente más bajos en el muestreo de abril que en el de marzo (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ). En Sierra Bermeja, el volumen de lixiviación de octubre de 2005 y de septiembre de 2006 fue significativamente inferior al de octubre de 2006 (en BP, el mínimo de septiembre de 2006 fue significativamente inferior al resto de muestreos).



**Figura III.28.** Variación en el volumen de agua de lixiviación ( $l\ m^{-2}$ ) a lo largo de los meses muestreados en las localidades de estudio. Las barras representan el error estándar de doce réplicas.

El volumen total anual de lixiviación mostró un efecto significativo del sitio de estudio (Tabla III.25). De esta manera, el valor máximo se obtuvo en BP ( $775 \pm 74\ l\ m^{-2}$ ; un 42 % del volumen de trascolación), seguido de B ( $620 \pm 90\ l\ m^{-2}$ ; 29 % de la trascolación), mientras que en Y se obtuvo el valor mínimo ( $458 \pm 52\ l\ m^{-2}$ ; 40 % de la trascolación), siendo significativa la diferencia entre BP e Y (Tukey,  $p < 0,05$ ).

**Tabla III.25. Efecto de la localidad y del tratamiento de adición de N en el volumen medio anual de agua de lixiviación (ANOVA factorial). En negrita se resaltan los efectos significativos.**

	g.l	F	p
Tratamiento	1	0,95	0,337
Sitio	2	4,33	<b>0,022</b>
Tratamiento*Sitio	2	0,03	0,975

### III.4.2.B. Concentración de formas de N en el agua de lixiviación.

Las concentraciones de formas inorgánicas de nitrógeno en la lixiviación mostraron, en el caso del nitrato (véase Figura VII.7.A en el Anexo) efectos significativos del tiempo y de sus interacciones con el tratamiento de adición de N y con el sitio, mientras que para el amonio (Figura VII.7.B en el Anexo) hubo efectos principales significativos del tiempo y el tratamiento (Tabla III.26).

**Tabla III.26. Efectos de la localidad (pinsapares B, BP o Y), del tratamiento de adición de N (control, +25 kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ha<sup>-1</sup>) y del periodo de muestreo (intervalos aproximadamente mensuales durante un ciclo anual de otoño a otoño) sobre la concentración de formas de N en el agua de lixiviación (ANOVA de medidas repetidas; la necesidad de un diseño balanceado que posibilitara la comparación entre sitios, llevó excluir de este análisis los meses de enero - sin lixiviación en Y-, y mayo, julio y octubre -insuficiente número de réplica en Y- de 2006.). En negrita se resaltan los efectos significativos.**

	Concentración								
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>			N-DON		
	g.l.	F	p	g.l.	F	p	g.l.	F	p
Tratamiento	1	2,45	0,142	1	5,21	<b>0,039</b>	1	4,20	0,061
Sitio	2	0,39	0,683	2	1,29	0,307	2	1,29	0,307
Tratamiento*Sitio	2	0,42	0,665	2	0,44	0,654	2	1,08	0,369
Tiempo	5	4,53	<b>0,001</b>	5	10,30	<b>&lt;0,01</b>	5	30,69	<b>&lt;0,001</b>
Tiempo*Tratamiento	5	2,41	<b>0,046</b>	5	2,18	0,138	5	2,70	0,092
Tiempo*Sitio	10	2,99	<b>&lt;0,01</b>	10	1,95	0,098	10	5,90	<b>&lt;0,001</b>
Tiempo*Tratamiento*Sitio	10	1,02	0,437	10	1,72	0,145	10	1,32	0,291

Así, destacó una mayor concentración de nitrato en los tratamientos de adición de N que en los controles, pero sólo a corto plazo tras su aplicación que tuvo lugar al comienzo del mes de octubre (primeros dos muestreos, octubre y noviembre de 2005,  $p=0,08$  y  $0,04$ , respectivamente). Respecto a diferencias entre sitios, en Sierra Bermeja se observaron concentraciones significativamente mayores de nitrato en el agua lixiviada en abril ( $B$  y  $BP > Y$  en los tratamientos de adición de N) y en octubre ( $BP > Y$  tanto en controles como en tratamientos) de 2006 (comparaciones planeadas *a priori*,  $p<0,05$ ). Adicionalmente, la concentración de nitrato en los tratamientos de octubre de 2006 fue significativamente superior en BP que en B (comparaciones planeadas *a priori*,  $p<0,05$ ).

Al realizar el ANOVA de medidas repetidas exclusivamente con las localidades B y BP (diseño balanceado con el conjunto de los meses muestreados), se encontró un efecto significativo del tiempo y de la interacción tiempo\*sitio: las concentraciones de nitrato en la lixiviación fueron mayores a mayor altitud ( $B > BP$ ,  $p<0,05$ ) en los meses de junio y septiembre de 2006 en los controles, y en marzo de 2006 en los tratamientos; pero este patrón se invirtió ( $BP > B$ ,  $p<0,05$ ) en los tratamientos en septiembre de 2006.

Respecto a la concentración de amonio en los lixiviados, se observaron efectos significativos del tratamiento y del tiempo, pero no del sitio, siendo la interacción tiempo\*sitio marginalmente significativa (Tabla III.26). En los tres pinsapares de estudio, los niveles de amonio en la lixiviación de las parcelas tratadas con adición de N fueron significativamente superiores a los de las parcelas control (véase Figura VII.7.B en el Anexo). En estas parcelas, la concentración de amonio fue similar entre sitios a lo largo de todos los muestreos, salvo en el de abril ( $Y < B$  y  $BP$ ). En el caso de los tratamientos también hubo pocas diferencias entre sitios, excepto en los muestreos de octubre ( $Y > BP$ ) y de noviembre ( $BP > B$ ) de 2005 (comparaciones planeadas *a priori*,  $p<0,05$ ).

Para la concentración de DON en los lixiviados (véase Figura VII.7.C en el Anexo) se encontraron efectos significativos del tiempo y de la interacción tiempo\*sitio (Tabla III.26). Así, mientras que en octubre de 2005 los valores de DON fueron significativamente

superiores en Yunquera, en octubre y noviembre de 2005 lo fueron en los pinsapares de Sierra Bermeja (Tukey,  $p < 0,05$ ). Por su lado, la adición de N sólo mostró un efecto marginalmente significativo, y dependiente de la fecha de muestreo, sobre el DON en la lixiviación (Tabla III.26): sus concentraciones se incrementaron significativamente en las parcelas tratadas pero sólo a corto plazo tras aplicar el tratamiento (muestreos de octubre y noviembre de 2005).

En términos de concentraciones promedio anuales de formas de nitrógeno en el agua de lixiviación, sólo se observaron efectos significativos de la localidad en el caso del nitrato (Tabla III.27). Así, la concentración media anual de nitrato en la lixiviación (Tabla III.28) fue significativamente inferior en el pinsapar de Yunquera que en el pinsapar a mayor altitud en Sierra Bermeja ( $Y < B$ ), tanto en los controles como en los tratamientos. Dentro de cada localidad, el nivel promedio anual de nitrato en la lixiviación tendió a ser mayor en los tratamientos que en los controles, pero sin alcanzarse la significación.

**Tabla III.27. Efecto de la localidad y del tratamiento de adición de nitrógeno sobre la concentración media anual de formas de nitrógeno en el agua de lixiviación (ANOVA factorial). En negrita se resaltan los efectos significativos.**

	Concentración media anual								
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>			DON		
	g.l.	F	p	g.l.	F	p	g.l.	F	p
Tratamiento	1	1,27	0,268	1	1,27	0,073	1	1,27	0,473
Sitio	2	5,23	<b>&lt;0,05</b>	2	5,23	0,163	2	5,23	0,627
Tratamiento*Sitio	2	0,01	0,990	2	0,01	0,082	2	0,01	0,708

**Tabla III.28. Concentración media anual de nitrato, amonio y N orgánico disuelto (DON) en los lixiviados de controles (C) y tratamientos (T, +25 kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ha<sup>-1</sup>) de los tres pinsapares de estudio (B, BP e Y). Entre paréntesis se indica el error estándar. Para cada forma de N, las diferencias significativas entre medias (comparaciones planeadas *a priori*, p<0.05) se indican mediante: (i) un asterisco (ón.s. si p>0.05) para la comparación entre tratamientos dentro de una misma localidad; (ii) letras minúsculas para la comparación de los controles entre localidades diferentes; y (iii) letras mayúsculas para la comparación de los tratamientos entre localidades.**

Localidad	Tratamiento	Concentración media anual (mg N l <sup>-1</sup> )		
		N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	DON
B	C	3,24 (0,43) a	0,14 (0,01) a	1,73 (0,60) a
	T	3,66 (0,59) A	0,15 (0,04) AB	1,70 (0,71) A
	<i>C vs T:</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
BP	C	2,99 (0,57) ab	0,10 (0,01)b	0,73 (0,18) a
	T	3,48 (0,53) AB	0,14 (0,01) A	1,71 (0,78) A
	<i>C vs T:</i>	<i>n.s.</i>	*	<i>n.s.</i>
Y	C	1,90 (0,26) b	0,12 (0,02) ab	1,05 (0,59) a
	T	2,25 (0,22) B	0,16 (0,01) B	1,23 (0,75) A
	<i>C vs T:</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

En cuanto a la concentración media anual de amonio en los lixiviados, los efectos del tratamiento y del tratamiento\*sitio resultaron marginalmente significativos (Tabla III.27). Así, en BP, el valor en los tratamientos (0,14 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> l<sup>-1</sup>) fue significativamente superior al de los controles (0,10 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> l<sup>-1</sup>) (comparaciones planeadas *a priori*, p<0,05; Tabla III.28). Por otra parte, en las parcelas control, la concentración media anual de amonio en los lixiviados fue significativamente superior en B que en BP; y en las parcelas con adición de N, el valor en Y fue significativamente superior al de B (comparaciones planeadas *a priori*, p<0,05; Tabla III.28). Respecto a la concentración media anual de DON (Tabla III.28) no se encontraron efectos significativos ni de la localidad, ni del tratamiento, ni de su interacción (Tablas III.27).

### III.4.2.C. Lixiviación acumulada de N

Los valores de lixiviación mensual acumulada de nitrato, amonio y DON mostraron efectos significativos del tiempo y de la interacción tiempo\*sitio; para el caso del DON, se encontró también significación de los factores sitio y tratamiento (Tabla III.29).

**Tabla III.29. Efecto de la localidad (pinsapares B, BP o Y), del tratamiento de adición de N (control, +25 kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ha<sup>-1</sup>) y del periodo de muestreo (intervalos aproximadamente mensuales durante un ciclo anual de otoño a otoño, a partir de la aplicación de tratamientos al inicio del mes de octubre) en los valores mensuales acumulados de pérdida por lixiviación de distintas formas de N (ANOVA de medidas repetidas). En negrita se resaltan los efectos significativos.**

	Lixiviación mensual acumulada de:								
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>			N-DON		
	g.l.	F	p	g.l.	F	p	g.l.	F	p
Tratamiento	1	1,20	0,287	1	2,79	0,111	1	5,86	<b>0,026</b>
Sitio	2	2,08	0,152	2	2,53	0,106	2	3,63	<b>0,046</b>
Tratamiento*Sitio	2	0,70	0,509	2	0,88	0,433	2	0,61	0,551
Tiempo	9	49,56	<b>&lt;0,001</b>	9	5,53	<b>&lt;0,01</b>	9	31,08	<b>&lt;0,001</b>
Tiempo*Tratamiento	9	2,30	0,097	9	0,46	0,872	9	0,60	0,774
Tiempo*Sitio	18	4,42	<b>0,001</b>	18	2,28	<b>0,034</b>	18	4,63	<b>&lt;0,001</b>
Tiempo*Tratamiento*Sitio	18	1,40	0,226	18	1,10	0,409	18	1,00	0,497

El curso de la pérdida acumulada de nitrato tendió por lo general a ser superior en Sierra Bermeja que en Yunquera (Figura III.29.A). En las parcelas control, este patrón alcanzó significación hacia el final del periodo de muestreo (B > Y en septiembre y octubre de 2006, con 19,7 y 24,1 kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ha<sup>-1</sup> en B, y 8,78 y 10,4 kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ha<sup>-1</sup> en Y, respectivamente; BP > Y en octubre de 2006, con 24,1 y 10,4 kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ha<sup>-1</sup>, respectivamente). En los tratamientos, además de hacia el final del periodo de muestreo (B > Y en septiembre de 2006, con 18,1 y 8,45 kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ha<sup>-1</sup>; BP > Y en octubre de 2006, con 27,6 y 9,68 kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ha<sup>-1</sup>), la lixiviación acumulada de nitrato también fue mayor en Sierra Bermeja a corto plazo tras la adición de N (B > Y en diciembre de 2005, con 7,95 y 2,91 kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ha<sup>-1</sup>; BP > Y en octubre de 2005, con 3,19 y 0,36 kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ha<sup>-1</sup>).

El efecto de la interacción tiempo\*tratamiento en la lixiviación mensual acumulada de nitrato fue sólo marginalmente significativo (Tabla III.29). Así, en el pinsapar a mayor altitud en Sierra Bermeja (B), las cifras fueron significativamente inferiores en los controles que en los tratamientos a corto-medio plazo (desde noviembre de 2005 a febrero de 2006). En ese periodo, los valores oscilaron entre 2,42 y 3,60 kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>ha<sup>-1</sup> en los controles, y entre 7,95 y 11,4 kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>ha<sup>-1</sup> en los tratamientos (Figura III.29.A.2).

Para la lixiviación acumulada de amonio, también se observaron valores significativamente más elevados en Sierra Bermeja que en Yunquera hacia el final del año de muestreo: B > Y en septiembre y octubre de 2006, y BP > Y desde abril a octubre de 2006 (comparaciones planeadas *a priori*, p<0,05). La pérdida acumulada total de amonio fue de 0,60 y 0,55 kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ha<sup>-1</sup> en B y BP, respectivamente, y de 0,44 kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>ha<sup>-1</sup> en Yunquera. No hubo diferencias significativas entre tratamientos y controles, excepto en B en el muestreo de diciembre de 2005 (mayor lixiviación acumulada de amonio en los tratamientos; Figura III.29.B.1).

En cuanto a la lixiviación acumulada de DON, se obtuvieron efectos principales significativos para el sitio, el tratamiento y el tiempo, además de para la interacción tiempo\*sitio (Tabla III.29). En las parcelas control, no hubo diferencias significativas entre sitios en ninguna fecha, pasándose desde < 2 kg N-DON lixiviado ha<sup>-1</sup> al primer mes en todas las localidades, hasta valores acumulados al final del año muestreado de algo más de 12 kg N-DON ha<sup>-1</sup> en Yunquera, y en torno a 20 kg N-DON ha<sup>-1</sup> en Sierra Bermeja. Por el contrario, en las parcelas que recibieron adiciones de N, las pérdidas acumuladas de DON sí fueron a corto plazo significativamente mayores en Sierra Bermeja que en Yunquera (B > Y desde noviembre 2005 a enero 2006, BP > Y desde octubre 2005 a enero de 2006), dejaron de serlo en los muestreos intermedios (final de invierno y primavera), y volvieron a aparecer al final (B > Y desde junio a octubre 2006, BP > Y en septiembre 2006). La lixiviación acumulada total en los tratamientos fue de 12,3 kg N-DON ha<sup>-1</sup> en Y, y de 27,8 y 25 kg N-DON ha<sup>-1</sup> en B y en BP, respectivamente (Figura III.29.C y Tabla III.30).

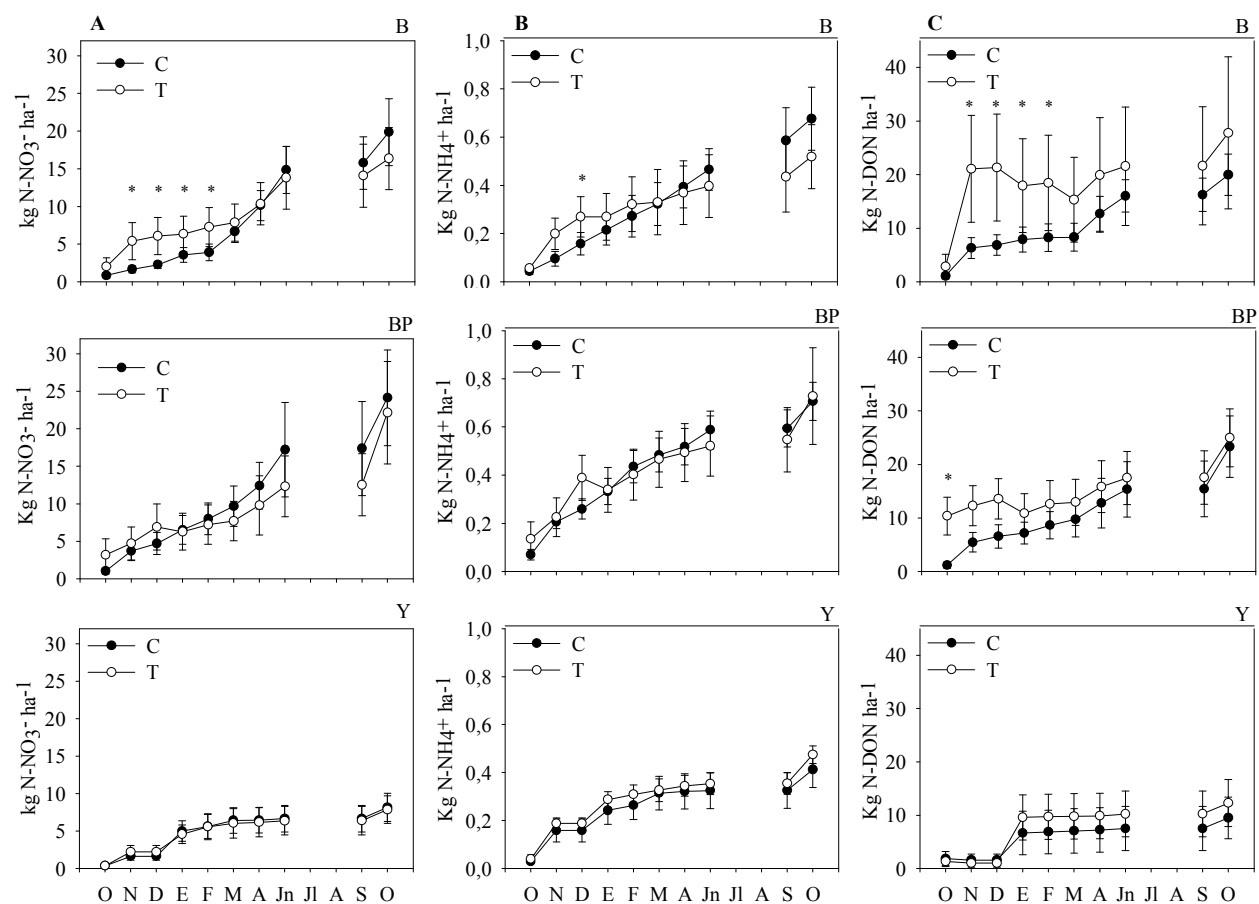


Figura III. 29. Lixiviación mensual acumulada ( $\text{kg N ha}^{-1}$ ) de nitrato (columna A), de amonio (columna B) y de nitrógeno orgánico disuelto-DON (columna C) en el agua de lixiviación en parcelas control (series de datos C) y con tratamiento de adición de N (series T,  $+25 \text{ kg N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1}$ ) de las localidades de estudio (pinsapares B, BP o Y). Fecha de aplicación de tratamientos: principio de octubre 2005. Las barras representan el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos C y T dentro de cada localidad.

Comparando tratamientos y controles a lo largo del período de muestreo, las cifras de lixiviación acumulada de DON tienden a ser mayores en los primeros en los tres pinsapares de estudio (Figura III.29.C). En Sierra Bermeja, esta diferenciación entre tratamientos y controles aparece y alcanza significación muy tempranamente, según informan los test de comparaciones planeadas *a priori* ( $p < 0,05$ ). Así, en BP, se observó que  $T > C$  ya en el primer intervalo de muestreo (octubre de 2005), pero a partir de ese momento, aunque tal tendencia se mantiene, las diferencias dejan de ser significativas. En el caso de B, el patrón significativo  $T > C$  apareció en el segundo intervalo de muestreo y se mantuvo hasta la primavera (desde noviembre de 2005 hasta marzo de 2006). Sin embargo, en Yunquera, la lixiviación acumulada de DON en los tratamientos sólo tiende a ser mayor que la de los controles a partir de enero de 2006, y no llega a alcanzarse la significación en ningún momento.

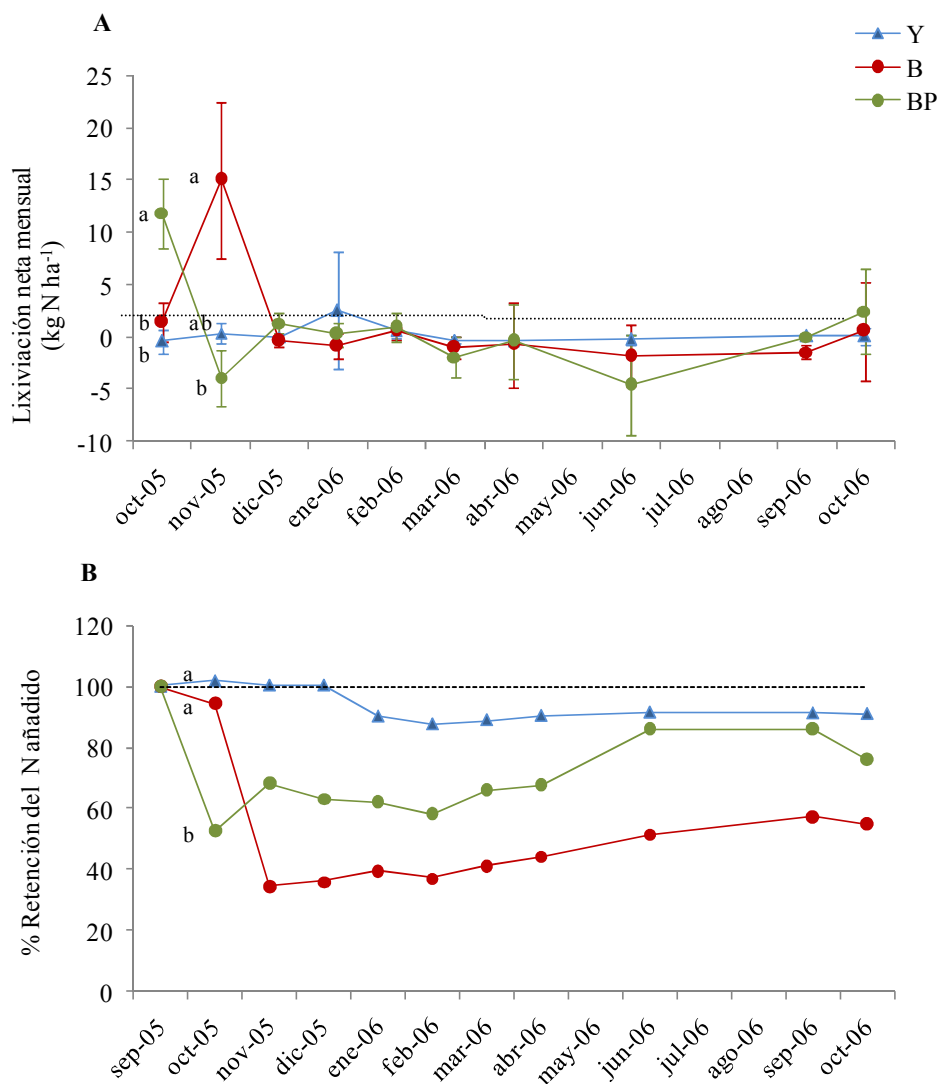
En términos de valores anuales integrados (Tabla III.30), no existieron diferencias significativas entre pinsapares en la lixiviación acumulada de amonio, pero sí se encontraron mayores valores de lixiviación anual total de nitrato y de DON en Sierra Bermeja que en Yunquera tanto en los controles como en los tratamientos, llegando a ser hasta tres veces superiores en Sierra Bermeja. Así, comparando pinsapares a la misma altitud (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ; Tabla III.30), la lixiviación anual de nitrato, tanto en controles como en tratamientos, fue significativamente superior en BP (*ca.* 23 kg N ha<sup>-1</sup>) que en Y (*ca.* 8 kg N ha<sup>-1</sup>), mientras que para el DON las diferencias fueron significativas sólo en los controles (23,3 y 9,5 kg N ha<sup>-1</sup> en BP y en Y, respectivamente). Dentro de cada localidad, no se observaron diferencias entre controles y tratamientos para la lixiviación anual total acumulada de ninguna de la formas de N consideradas (Tabla III.30).

Tabla III.30. Lixiviación anual acumulada de nitrato, amonio y N orgánico disuelto (DON) en los lixiviados de controles (C) y tratamientos (T, +25 kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ha<sup>-1</sup>) de los tres pinsapares de estudio (B, BP e Y). Entre paréntesis se indica el error estándar. Para cada forma de N, las diferencias significativas entre medias (comparaciones planeadas *a priori*, p<0.05) se indican mediante: (i) un asterisco (ó n.s. si p>0.05) para la comparación entre tratamientos dentro de una misma localidad; (ii) letras minúsculas para la comparación de los controles entre localidades diferentes; y (iii) letras mayúsculas para la comparación de los tratamientos entre localidades.

Localidad	Tratamiento	Lixiviación anual acumulada (kg N ha <sup>-1</sup> )		
		N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	DON
B	C	19,9 (4,44) a	0,68 (0,13) a	20,0 (3,86) ab
	T	16,4 (4,11) AB	0,52 (0,13) A	27,8 (14,2) A
	<i>C vs T:</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
BP	C	24,1 (6,40) a	0,71 (0,08) a	23,3 (5,71) a
	T	22,2 (6,84) A	0,73 (0,2) A	25,0 (5,41) AB
	<i>C vs T:</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Y	C	8,15 (1,88) b	0,41 (0,07) a	9,50 (3,89) b
	T	7,85 (1,84) B	0,47 (0,04) A	12,3 (4,40) B
	<i>C vs T:</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

#### III.4.2.D. Retención neta del N añadido

El exceso de N lixiviado (N lixiviado en parcelas fertilizadas con 25 kg N ha<sup>-1</sup> menos N lixiviado en parcelas control no fertilizadas) en Sierra Bermeja fue máximo en los dos meses posteriores al tratamiento (11,8 kg N ha<sup>-1</sup> en octubre 2005 en BP, y 15 kg N ha<sup>-1</sup> en noviembre 2005 en B; Figura III.30.A). Por el contrario, en el caso de Yunquera, la máxima diferencia de lixiviación mensual entre tratamientos y controles fue mucho menor (2,53 kg N ha<sup>-1</sup>) y no se dio a corto plazo tras la fertilización sino en el mes de enero de 2006, tras el período de congelación del suelo observado en diciembre de 2005 en este pinsapar.



**Figura III. 30. (A) Balance neto o exceso de lixiviación mensual (diferencia entre los valores de lixiviación en tratamientos y en controles), y (B) retención neta de la entrada de N (+25 kg N-NO<sub>3</sub> ha<sup>-1</sup>) que representó el tratamiento de fertilización, en las localidades de estudio (pinsapares B, BP o Y). Fecha de aplicación de tratamientos: principio de octubre 2005. Las barras representan el error estándar. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre pinsapares (t-student, p<0,05).**

La lixiviación neta mensual en los dos primeros meses tras la adición de N tendió a ser superior en Sierra Bermeja que en Yunquera (en octubre de 2005: BP > B = Y, t-student p<0,05; en noviembre de 2005: B > BP, p<0,05 y B > Y, p=0,08). Fuera de ese periodo inicial no se volvieron a detectar diferencias significativas entre ninguna de las localidades. En el pinsapar a baja altitud de Sierra Bermeja (BP), tras el pulso inicial de exceso de lixiviación, se observaron valores netamente negativos (más lixiviación en las parcelas control que en las fertilizadas) en el siguiente muestreo. En el pinsapar a

mayor altitud (B), la aparición de valores negativos fue más tardía que en los otros dos pinsapares estudiados. Valores netamente negativos se volvieron a encontrar en los pinsapares de Sierra Bermeja hacia el final de la primavera. Tras el verano, con la entrada del siguiente otoño, apareció una tendencia de incremento en los valores de exceso de lixiviación, hacia valores positivos, pero sin llegar a detectarse diferencias significativas entre localidades.

La evolución temporal de la cantidad del N añadido que, de modo neto, sigue retenido en el suelo en los sucesivos muestreos se muestra en la Figura III.30.B. En general, la retención de N tendió a ser superior en Yunquera (por encima del 90% durante todo el estudio) que en Sierra Bermeja, y en BP mayor que en B. Sin embargo, destaca que tan sólo un mes después de la aplicación del tratamiento en BP se retuvieron sólo 13,2 kg N ha<sup>-1</sup>, el 52,7% del N añadido (t-student  $p < 0,05$ ), mientras que la retención de N estuvo cercana al 100% en Y y en B. Las pérdidas netas del N añadido en B comenzaron en noviembre de 2005, dos meses después de la adición, permaneciendo de modo neto en el sistema tan sólo 8,62 kg N ha<sup>-1</sup>, el 34,5% del N añadido. Por su parte, la retención neta de N en Yunquera disminuyó levemente en enero de 2006, tras el referido evento de congelación del suelo, y a partir de ese momento se mantuvo más o menos constante, con un porcentaje de retención neta de aproximadamente el 90 %, durante el resto del experimento. Sin embargo, en el pinsapar saturado por N, al final del año hidrológico se retuvo una media del 54,9 % del N añadido en B, y del 76,2 % en BP. Tras las caídas iniciales bruscas que se observaron en la retención neta de N en los pinsapares de Sierra Bermeja, hacia el final del año hidrológico hay una tendencia aparente de recuperación del N previamente perdido. Este resultado aparentemente absurdo deriva del carácter neto del cálculo, como diferencia entre las lixivitaciones de parcelas control y fertilizadas dentro de cada localidad, e indica cifras de lixiviación que se hacen mayores en las primeras que en las últimas, posiblemente porque en la localidad saturada por N la fertilización tuvo poco efecto a corto plazo sobre la inmovilización microbiana (al contrario que en Y), pero ésta se incrementaría a más largo plazo reteniéndose entonces mayor proporción del N orgánico mineralizado en las parcelas tratadas con N que en las parcelas control.

#### **III.4.2.E. Porcentaje del $^{15}\text{N}$ añadido recuperado en el agua de lixiviación**

Al igual que ocurría con la aproximación sin empleo de trazador isotópico que se ha reseñado en el apartado anterior, el porcentaje del  $^{15}\text{N}$  añadido a las parcelas fertilizadas ( $+4 \text{ kg}^{15}\text{N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1}$ ) que se recupera con el agua de lixiviación fue máximo en Sierra Bermeja durante los dos meses posteriores a la aplicación del mismo. En ese período, por término medio, aunque con un elevado margen de error, se recuperó en el agua de lixiviación la totalidad del  $^{15}\text{N}$  añadido (Figura III.31.A). También concuerda con la aproximación anterior que en el pinsapar de Sierra Bermeja a mayor altitud (B) se recuperó más  $^{15}\text{N}$  en noviembre que en octubre de 2005, mientras que en el pinsapar a menor altitud (BP) la mayor cantidad de  $^{15}\text{N}$  en el lixiviado se encontró a más corto plazo durante el primer mes tras el marcaje. A partir de diciembre de 2005, la señal de  $^{15}\text{N}$  (% atómico  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) en los lixiviados de las parcelas marcadas no se diferenció de la de los lixiviados de las parcelas control no marcadas (valores en torno a cero a partir de este momento en la Figura III.31.B, indicando una señal isotópica en los lixiviados de las parcelas marcadas que es parecido a la abundancia natural). La recuperación de  $^{15}\text{N}$  en el agua de lixiviación en esos dos primeros meses tras la adición del tratamiento tendió a ser superior en Sierra Bermeja que en Yunquera (Tabla III.31). En todo caso, cabe advertir de nuevo que los porcentajes de recuperación de  $^{15}\text{N}$  estuvieron sujetos a un amplio margen de error debido a un bajo número de réplicas, y a las grandes diferencias registradas en los volúmenes de lixiviados recogidos dentro de cada parcela, por lo que trataremos los resultados desde un punto de vista cualitativo, más que cuantitativo. En el pinsapar de Yunquera, aunque la recuperación del  $^{15}\text{N}$  añadido en los lixiviados también alcanzó sus valores máximos a corto plazo tras el marcaje, las cifras fueron mucho más bajas (3,33 % y 15,8 % de recuperación en octubre y noviembre de 2005) que en Sierra Bermeja. Tras ese periodo inicial, la señal de  $^{15}\text{N}$  vuelve a los valores ambientales, como también ocurría en Sierra Bermeja.

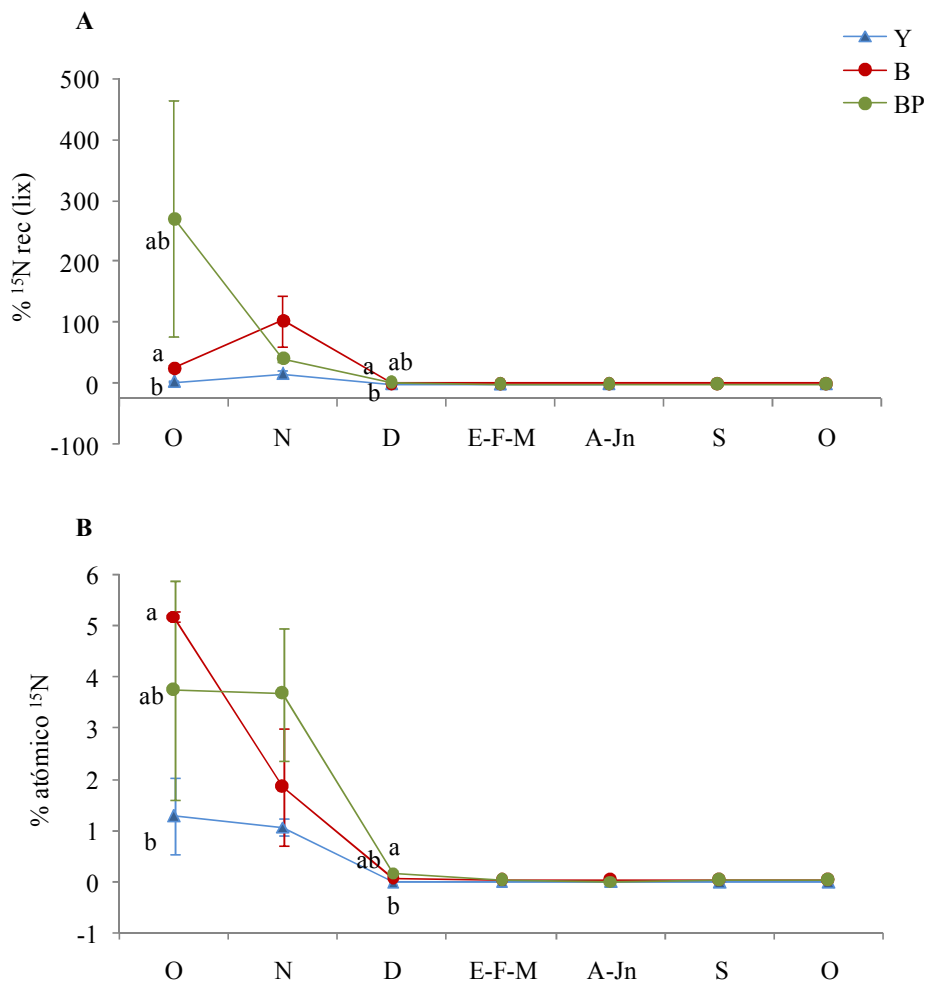


Figura III. 31. Porcentaje de recuperación del marcador isotópico ( $+4 \text{ kg } ^{15}\text{N-NO}_3^- \text{ha}^{-1}$ ) (A) y porcentaje atómico de  $^{15}\text{N}$  (B) en el agua de lixiviación de las parcelas fertilizadas de las localidades de estudio (pinsapares B, BP o Y). Fecha de aplicación de tratamientos: principio de octubre 2005. Las barras representan el error estándar. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre pinsapares (t-student;  $p < 0,05$ ).

Tabla III.31. Resultados de los tests de t-student de comparación de medias entre pares de localidades (pinsapares B, BP, Y) realizados con los datos de % del marcador añadido ( $+4 \text{ kg } ^{15}\text{N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1}$ ) que se recupera en el agua de lixiviación, y a los datos de porcentaje atómico de  $^{15}\text{N}$  en la misma, en los tres primeros períodos de muestreo (octubre, noviembre y diciembre de 2005). Aplicación del marcador: inicios del mes de octubre. En negrita se resaltan los efectos significativos ( $p < 0,05$ ).

	Probabilidad conforme $H_0$ (t-student)					
	% $^{15}\text{N}$ recuperado (lix)			% atómico- $^{15}\text{N}$ (lix)		
	oct-05	nov-05	dic-05	oct-05	nov-05	dic-05
BP vs Y	0,087	0,052	0,134	0,229	0,077	<b>0,023</b>
B vs Y	<b>0,004</b>	0,108	<b>0,014</b>	<b>0,027</b>	0,535	0,077
B vs BP	0,333	0,350	0,161	0,570	0,375	0,062

### III.4.3. Cambios en la disponibilidad de N y en la señal $\delta^{15}\text{N}$ en el suelo. Efecto de la fertilización con N

#### III.4.3.A. Concentraciones de N mineral

La concentración de nitrato en el suelo mostró efectos significativos de los tres factores principales del ANOVA de medidas repetidas (sitio, tratamiento de adición de N, y compartimento del suelo) así como del tiempo (Tabla III.32). El efecto del tratamiento dependió de la localidad, y el del tiempo de la localidad, tratamiento y compartimento considerados (interacciones sitio\*tratamiento y tiempo\*sitio, tiempo\*tratamiento y tiempo\*compartimento significativas).

**Tabla III.32. Efectos de la localidad (pinsapares B, BP o Y), del tratamiento de adición de N (control, +25 kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ha<sup>-1</sup>), del compartimento del suelo (hojarasca, 0-10 cm ó 10-20 cm) y de la fecha de muestreo (diciembre 2005, y enero y marzo 2006) en la concentración de nitrato y de amonio en el suelo (ANOVA de medidas repetidas). En negrita se resaltan los efectos significativos.**

	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		
	g.l.	F	p	g.l.	F	p
Tratamiento	1	12,64	< <b>0,001</b>	1	1,77	0,189
Sitio	2	31,49	< <b>0,001</b>	2	2,08	0,135
Compartimento	2	120,31	< <b>0,001</b>	2	239,7	< <b>0,001</b>
Tratamiento*Sitio	2	7,80	< <b>0,01</b>	2	1,09	0,344
Tratamiento*Compartimento	2	1,60	0,211	2	0,63	0,537
Sitio*Compartimento	4	0,62	0,647	4	3,64	<b>0,011</b>
Tratamiento*Sitio*Compartimento	4	0,34	0,852	4	0,47	0,757
Tiempo	2	16,00	< <b>0,001</b>	2	109	< <b>0,001</b>
Tiempo*Tratamiento	2	4,37	<b>0,015</b>	2	3,73	<b>0,027</b>
Tiempo*Sitio	4	3,34	<b>0,013</b>	4	1,59	0,181
Tiempo*Compartimento	4	8,05	< <b>0,001</b>	4	106,1	< <b>0,001</b>
Tiempo* Tratamiento*Sitio	4	1,79	0,136	4	3,02	<b>0,021</b>
Tiempo*Tratamiento*Compartimento	4	0,83	0,508	4	7,41	< <b>0,001</b>
Tiempo*Sitio*Compartimento	8	1,23	0,290	8	1,99	0,054
Tiempo* Tratamiento*Sitio*Compartimento	8	0,53	0,830	8	2,38	<b>0,021</b>

Globalmente, la concentración de nitrato en el suelo de los tratamientos fue significativamente superior a la de los controles (Tukey,  $p < 0,05$ ). Particularizando, este efecto significativo se observó en las siguientes combinaciones de compartimento, sitio y fecha (comparaciones planeadas *a priori*; Figura III.32): (i) para el compartimento H, en Y en enero y marzo ( $14,8$  y  $12,5 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en controles y  $36,7$  y  $23,2 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en tratamientos, respectivamente), y en BP en diciembre y en marzo ( $16,4$  y  $25,3 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en controles, y  $59,4$  y  $73,5 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en tratamientos, respectivamente); y (ii) para el suelo mineral, a la profundidad de 10-20 cm, en Y en el muestreo de marzo ( $0,56$  y  $2,40 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en controles y tratamientos respectivamente), y en BP en los muestreos de diciembre y enero ( $4,34$  y  $7,18 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en controles, y  $10,4$  y  $19,8 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en tratamientos, respectivamente).

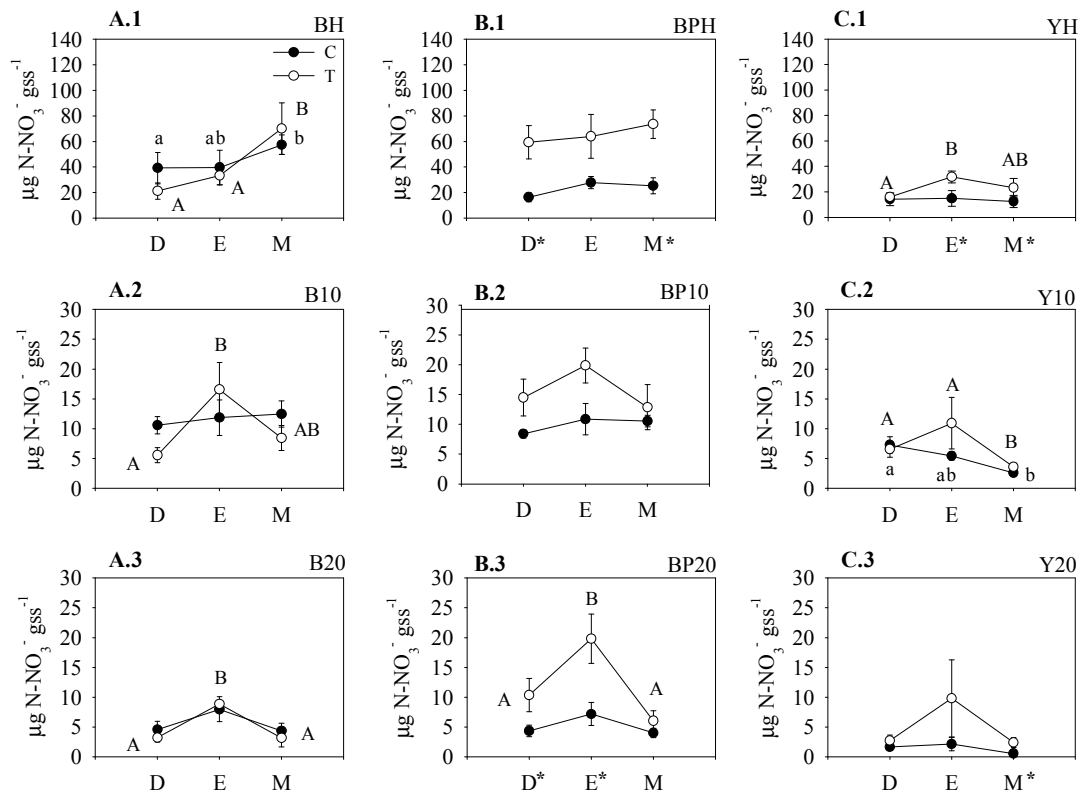


Figura III. 32. Evolución a corto plazo del efecto de la fertilización con N (C: control; T: +25 kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ha<sup>-1</sup>) sobre la concentración de nitrato (µg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> g<sub>ss</sub><sup>-1</sup>) en distintos compartimentos del suelo (H: hojarasca; 10: 0-10 cm; 20: 10-20 cm) de los tres pinsapares de estudio (B, BP e Y). Fecha de aplicación de tratamientos: inicio de Octubre 2005. Fechas de muestreo: D, diciembre de 2005; E, enero 2006; M, marzo 2006. Las barras verticales representan el error estándar. Las diferencias significativas entre medias (comparaciones planeadas *a priori*, p<0.05) se indican mediante: (i) un asterisco para la comparación entre tratamientos dentro de una misma localidad; (ii) letras minúsculas para la comparación de los controles entre fechas; y (iii) letras mayúsculas para la comparación de los tratamientos entre fechas.

En los controles, la concentración de nitrato en el suelo fue generalmente mayor en Sierra Bermeja que en Yunquera, existiendo significación (B y BP > Y, comparaciones planeadas *a priori*, p<0,05) en marzo para el suelo 0-10 cm, y en los tres muestreos para el suelo 10-20cm. En el compartimento H la concentración de nitrato fue significativamente superior en B que en Y en los tres meses, pero entre BP e Y sólo se observaron diferencias significativas en marzo. Dentro de Sierra Bermeja, los valores de nitrato en el compartimento H fueron significativamente superiores a mayor altitud (B > BP) en los muestreos de diciembre y marzo (39,2 y 16,4; y 57,5 y 25,3 µg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> g<sub>ss</sub><sup>-1</sup>, respectivamente) (Figuras III.32. A.1 y B.1).

En los tratamientos también se mantuvo el patrón general de niveles más elevados de nitrato en Sierra Bermeja que en Yunquera (Figura III.32). Así en el muestreo de diciembre (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ), en los tres compartimentos del suelo, los valores de nitrato fueron significativamente superiores en BP ( $59,4 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en H;  $14,5$  y  $10,4 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en los compartimentos 0-10cm y 10-20cm) que en Y ( $15,1 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en H;  $6,57$  y  $2,73 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  de 0-10cm y de 10-20cm de profundidad) y en B ( $21,2 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en H;  $5,55$  y  $3,24 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  de 0-10cm y 10-20cm). En el muestreo de enero sólo se encontró mayor concentración de nitrato en BP ( $19,8 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$ ) que en Y ( $9,81 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$ ) en el compartimento de 10-20cm (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ). También se encontraron diferencias significativas en el muestreo de marzo (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ) entre los pinsapares de Sierra Bermeja y el de Yunquera tanto en la hojarasca (H), con una concentración de nitrato en Sierra Bermeja de alrededor de  $70 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  y en Yunquera de  $25,44 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$ , como en el suelo, con valores en el compartimento de 0-10cm de profundidad dos y tres veces mayores en B ( $8,44 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$ ) y en BP ( $12,9 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$ ), respectivamente, que en Y ( $3,60 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$ ) y en el compartimento de 10-20 cm diez veces más nitrato en BP que en Y ( $6,05$  y  $0,56 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  respectivamente).

En cuanto al efecto global del tiempo en la concentración de nitrato en el suelo, se encontraron valores significativamente superiores en el muestreo de enero que en los muestreos de diciembre y de marzo (Tukey,  $p < 0,05$ ). En los controles sólo se encontraron diferencias significativas entre muestreos en el compartimento de 0-10cm en Yunquera (diciembre  $>$  marzo,  $7,28$  y  $2,60 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$ , respectivamente) y en el compartimento H de B (marzo  $>$  diciembre,  $57,5$  y  $39,2 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$ , respectivamente) (Figuras III.32.A.1 y C.2). En los tratamientos, la concentración de nitrato resultó mayor en el muestreo de enero que en los de diciembre y marzo, en el suelo (0-10 y 10-20cm) de los tres pinsapares, y en el compartimento H de Yunquera. Sin embargo, en el compartimento H de Sierra Bermeja, la concentración de nitrato fue superior en el muestreo de marzo (alrededor de  $70 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en B y BP), siendo significativas las diferencias en B (Figura III.32.A.1).

Respecto a la concentración de amonio en el suelo, se encontró efecto significativo del compartimento y del tiempo, así como de la interacción de los cuatro factores del ANOVA de medidas repetidas (tiempo, sitio, tratamiento y compartimento), entre otras (Tabla III.32). Aunque en general no existió efecto del tratamiento de adición de N sobre la concentración de amonio en el suelo (Tukey,  $p > 0,05$ ), en el mes de diciembre en Y (comparaciones planeadas *a priori*; Figura III.33) se encontraron mayores valores en tratamientos que en controles en el compartimento H (53,0 y 27,3  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  respectivamente), mientras que en los otros dos compartimentos ocurrió justo lo contrario (69,5 y 48  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en los controles y 30,5 y 18,6  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en los tratamientos de 0-10 y de 10-20 cm respectivamente).

Las mayores diferencias en la concentración de amonio en el suelo de los pinsapares se encontraron en el compartimento H. En los controles de diciembre se encontraron grandes diferencias entre los tres pinsapares (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ), con 27,3 y 90,4  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en Y y B respectivamente, siendo intermedia la concentración de amonio en BP (54,8  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$ ). En los tratamientos del mismo mes (Figura III.33.1) se observó la misma tendencia pero sólo se encontraron diferencias significativas entre B e Y (90,4 y 53,0  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  respectivamente). Sin embargo, en los tratamientos de enero la concentración de amonio en ambas localidades de Sierra Bermeja (89,3 y 73,0  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en B y BP respectivamente) fue significativamente superior a la de Yunquera (37,9  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$ ).

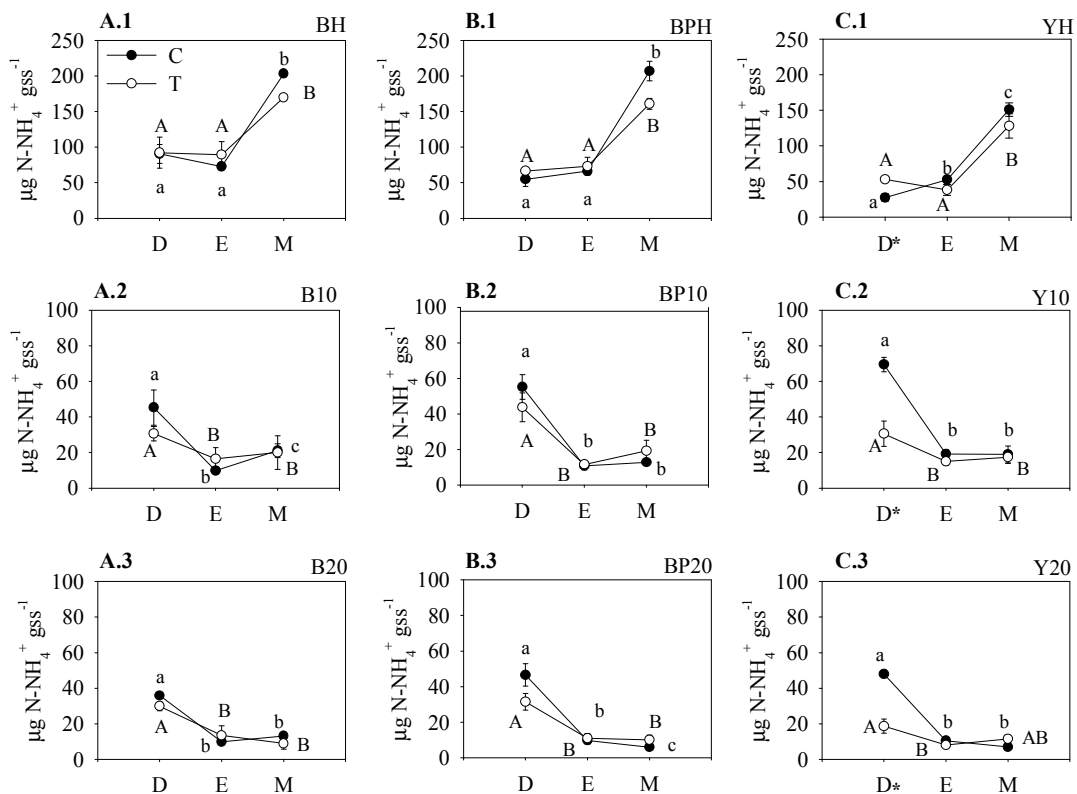


Figura III. 33. Evolución a corto plazo del efecto de la fertilización con N (C: control; T: +25 kg N-NO<sub>3</sub>·ha<sup>-1</sup>) sobre la concentración de amonio ( $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$ ) en distintos compartimentos del suelo (H: hojarasca; 10: 0-10 cm; 20: 10-20 cm) de los tres pinsapares de estudio (B, BP e Y). Fecha de aplicación de tratamientos: inicio de Octubre 2005. Fechas de muestreo: D, diciembre de 2005; E, enero 2006; M, marzo 2006. Las barras verticales representan el error estándar. Las diferencias significativas entre medias (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0.05$ ) se indican mediante: (i) un asterisco para la comparación entre tratamientos dentro de una misma localidad; (ii) letras minúsculas para la comparación de los controles entre fechas; y (iii) letras mayúsculas para la comparación de los tratamientos entre fechas.

En cuanto al efecto global del tiempo en la concentración de amonio, se observaron dos patrones distintos para las muestras de hojarasca y de suelo. Para el compartimento H, los valores de amonio fueron significativamente superiores en el muestreo de marzo que en los muestreos de diciembre y enero tanto en controles como en tratamientos de los tres pinsapares de estudio (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ; Figura III.33.1) alcanzándose valores de amonio en los controles hasta cuatro y seis veces superiores en marzo que en diciembre en BP y en Y respectivamente (207 y 54,8  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en BP; 151 y 27,3  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en Y). Por su parte, en los compartimentos de suelo (0-10 y 10-20cm) la concentración de amonio en diciembre fue significativamente superior, siendo más acusadas las diferencias en los controles que en los tratamientos (Tukey,  $p < 0,05$ ; Figuras III.33.2 y 3). Así la concentración media de

amonio en el suelo de los controles osciló en el compartimento de 0-10cm entre 13 y 57  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  y entre 9 y 43  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  en el compartimento de 10-20cm, mientras que en los tratamientos lo hizo entre 14 y 35  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  y entre 10 y 27  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$  de 0 a 10 y de 10 a 20 cm de profundidad respectivamente.

### III.4.3.B. Concentración de N y relación C/N.

Al analizar el contenido de N en el suelo a lo largo de los meses muestreados (Figura III.34), se encontraron efectos significativos del compartimento, del tratamiento y de la fecha de muestreo, mientras que el efecto de la localidad dependió de dichos factores (interacción tiempo\*sitio\*tratamiento\*compartimento significativa; Tabla III.33). Sin embargo, el efecto de la localidad sobre la relación C/N en el suelo sí fue significativo, así como la fecha de muestreo y la interacción tiempo\*sitio\*tratamiento\*compartimento (Tabla III.33)

**Tabla III.33. Efecto de la localidad, del tratamiento, del compartimento y del muestreo en %N y relación C/N en el suelo (ANOVA de medidas repetidas). En negrita se resaltan los efectos significativos.**

	%N			C/N		
	g.l.	F	p	g.l.	F	p
Tratamiento	1	26,92	<0,001	1	3,16	0,081
Sitio	2	2,10	0,115	2	8,08	<0,001
Compartimento	2	285,66	<0,001	2	105,53	<0,001
Tratamiento*Sitio	2	3,54	0,020	2	2,46	0,095
Tratamiento*Compartimento	2	4,42	0,022	2	0,51	0,602
Sitio*Compartimento	4	2,68	0,037	4	1,44	0,234
Sitio*Tratamiento*Compartimento	4	0,37	0,894	4	1,50	0,214
Tiempo	3	3,81	0,015	3	11,55	<0,001
Tiempo*Tratamiento	3	9,65	<0,001	3	9,76	<0,001
Tiempo*Sitio	6	1,75	0,116	6	5,56	<0,001
Tiempo*Compartimento	6	9,76	<0,001	6	3,62	<0,01
Tiempo*Tratamiento*Sitio	6	2,69	0,018	6	4,37	<0,001
Tiempo*Tratamiento*Compartimento	6	3,06	<0,01	6	2,53	0,025
Tiempo*Sitio*Compartimento	12	1,15	0,324	12	2,56	<0,01
Tiempo*Tratamiento*Sitio*Compartimento	12	2,98	<0,01	12	1,93	0,035

Globalmente, el %N total en el suelo de los tratamientos fue significativamente superior a la de los controles (Tukey,  $p < 0,05$ ). Especificando, este efecto significativo se observó en las siguientes combinaciones de compartimento, sitio y fecha (comparaciones planeadas *a priori*; Figura III.34): (i) para el compartimento H, en Y en diciembre y enero (1,37 % y 1,12 %, y 1,41 % y 0,99 %, en tratamientos y controles, respectivamente), en B en diciembre y marzo (1,36 % y 1,05 %, y 1,60 % y 1,06 %, en tratamientos y controles, respectivamente) y en BP en los tres muestreos (entre 1,26 % y 1,44 % en los tratamientos, y entre 0,84 % y 0,87 % en los controles); y (ii) para el compartimento de 0-10 cm en BP en los muestreos de diciembre y marzo (0,92 % y 0,29 %, y 0,62 % y 0,35 %, en tratamientos y controles, respectivamente).

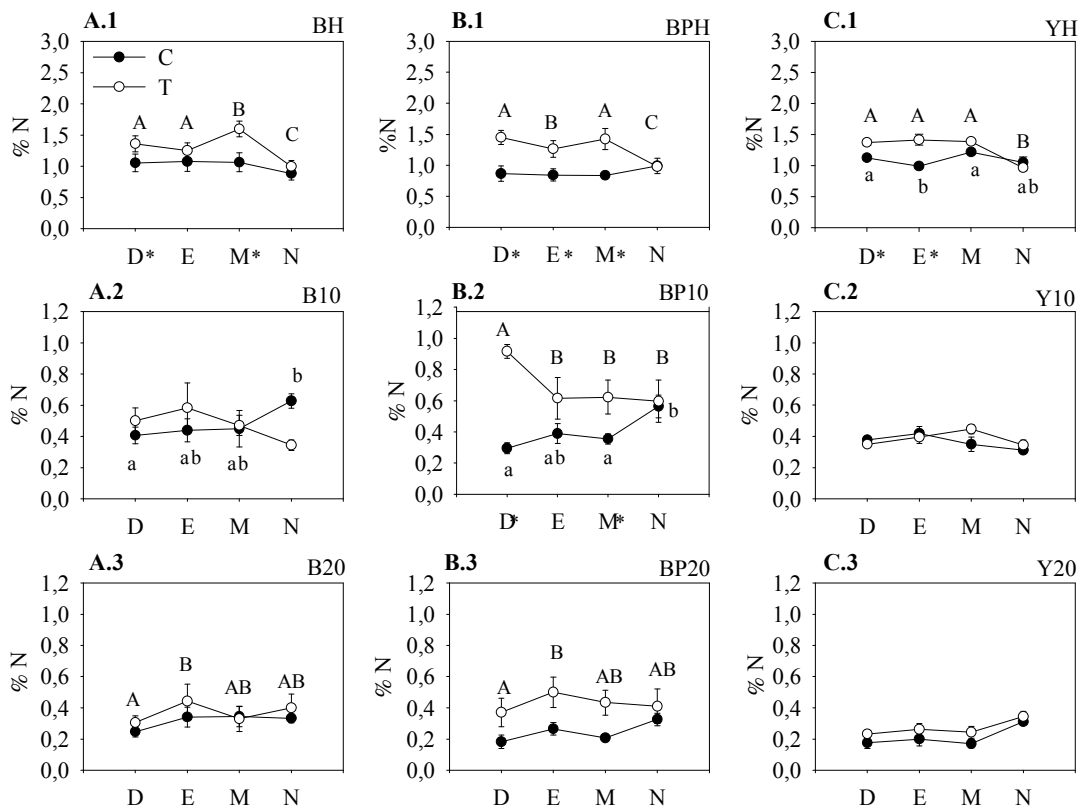


Figura III.34. Evolución a corto plazo del efecto de la fertilización con N (C: control; T: +25 kg N-NO<sub>3</sub> ha<sup>-1</sup>) sobre el porcentaje de N total en distintos compartimentos del suelo (H: hojarasca; 10: 0-10 cm; 20: 10-20 cm) de los tres pinsapares de estudio (B, BP e Y). Fecha de aplicación de tratamientos: inicio de Octubre 2005. Fechas de muestreo: D, diciembre de 2005; E, enero 2006; M, marzo 2006. Las barras verticales representan el error estándar. Las diferencias significativas entre medias (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ) se indican mediante: (i) un asterisco para la comparación entre tratamientos dentro de una misma localidad; (ii) letras minúsculas para la comparación de los controles entre fechas; y (iii) letras mayúsculas para la comparación de los tratamientos entre fechas.

En cuanto al efecto del tiempo en el contenido de N en el suelo, en términos generales se encontraron valores significativamente inferiores en el muestreo de noviembre de 2006 (Tukey,  $p < 0,05$ ). Sin embargo, para el compartimento H este efecto significativo sólo se observó en los tratamientos de los tres pinsapares (comparaciones planeadas *a priori*, Figura III.34). En el suelo de 0-10cm (Figura III.34.2) cabe resaltar por el contrario el mayor %N en noviembre de 2006 en los controles de Sierra Bermeja (0,6 % en noviembre frente a 0,4 % en el resto de muestreos de media), así como el mayor contenido de N total en los tratamientos de diciembre (0,92 %) respecto al resto de meses en BP (0,61 % de media). Por su parte, en el suelo de 10 a 20 cm (Figura III.34.3) el contenido en N total fue significativamente superior en enero que en diciembre en Sierra Bermeja (0,47 % y 0,34 % de media respectivamente).

Sólo se encontraron diferencias significativas en el %N del suelo entre pinsapares en el compartimento H de los controles y en el compartimento de 0-10cm de controles y tratamientos (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ). En el compartimento H de los controles, el %N en BP fue inferior que en Y en diciembre (0,87 y 1,12 respectivamente) y en marzo (0,84 y 1,22 respectivamente) (Figura III.34.1). En cuanto al compartimento de 0-10cm (Figura III.34.2), el %N en Sierra Bermeja fue el doble del encontrado en Yunquera en los controles del muestreo de noviembre de 2006 (0,6 % de media en B y BP y 0,31 % en Y), mientras que en los tratamientos, el contenido de N de BP (0,92 %) superó significativamente el correspondiente a los otros dos pinsapares en el muestreo de diciembre (0,5 % en B y 0,35 % en Y).

En cuanto a la relación C/N, los valores de los tratamientos fueron inferiores en general a los registrados en los controles, pero este efecto fue marginalmente significativo (Tabla III.33). Sin embargo, este efecto sí fue significativo en las siguientes combinaciones de compartimento, sitio y fecha (comparaciones planeadas *a priori*; Tabla III.34): (i) para el compartimento H, en BP en diciembre y en Y en enero, ii) para el compartimento de 0-10 cm, en BP en diciembre y en Y en los muestreos de diciembre y enero, y iii) para el compartimento de 10-20cm, en Y en diciembre.

Tabla III.34. Evolución del efecto de la fertilización con N (C: control; T: +25 kg N-NO<sub>3</sub> ha<sup>-1</sup>) sobre la relación C/N en distintos compartimentos del suelo (H: hojarasca; 10: 0-10 cm; 20: 10-20 cm) de los tres pinsapares de estudio (B, BP e Y). Fecha de aplicación de tratamientos: inicio de Octubre 2005. Fechas de muestreo: D, diciembre de 2005; E, enero 2006; M, marzo 2006, N, noviembre 2006. Entre paréntesis aparece el error estándar. Las diferencias significativas entre medias (comparaciones planeadas *a priori*, p<0.05) se indican mediante: (i) un asterisco para la comparación entre tratamientos dentro de una misma localidad (*n.s.* para p>0,05); (ii) letras minúsculas para la comparación entre fechas de muestreo (filas); y (iii) letras mayúsculas para la comparación entre localidades para cada combinación de compartimento, tratamiento y muestreo (columnas).

Comp.	Sitio	Tto.	C/N				
			D	E	M	N	
H	B	C	19,3 (1,78) a A	22,8 (0,46) b A	21,00 (0,70) ab	24,9 (1,45) b A	
		T	21,1 (1,68) a A	24,6 (1,71) b A	23,4 (0,34) ab	22,5 (0,85) ab	
		C vs T:	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	
	BP	C	26,9 (1,97) a B	27,3 (1,12) a B	23,4 (0,45) ab	20,9 (0,84) b B	
		T	22,7 (0,60) A	25,0 (0,24) A	24,0 (0,69)	24,5 (2,07)	
		C vs T:	*	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	*	
	Y	C	25,4 (0,09) B	25,7 (0,35) AB	26,5 (0,85)	23,3 (0,94) AB	
		T	27,2 (0,92) a B	19,7 (2,52) b B	28,0 (0,69) a	22,5 (1,14) b	
		C vs T:	<i>n.s.</i>	*	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	
	0-10cm	B	C	15,3 (0,32)	16,7 (0,60)	16,4 (0,77)	18,0 (0,13)
			T	13,2 (0,66) a	15,2 (0,81) a	20,4 (6,17) b	16,2 (0,44) ab
			C vs T:	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
BP		C	16,5 (1,04) ab	19,1 (0,86) a	19,2 (0,33) ab	16,1 (0,23) b	
		T	12,7 (2,38) a	16,7 (0,73) b	20,9 (4,45) b	18,7 (0,61) b	
		C vs T:	*	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	
Y		C	18,5 (1,00)	19,3 (0,72)	17,3 (0,95)	17,5 (1,29)	
		T	14,1 (0,55)	14,9 (0,88)	16,2 (0,33)	16,9 (0,29)	
		C vs T:	*	*	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	
10-20cm		B	C	13,1 (0,82) a A	16,1 (0,53) b A	16,2 (0,57) ab	18,42(0,34) b A
			T	10,6(0,81) a	14,2 (1,08) b	12,4 (0,90) ab	16,0(0,84) b
			C vs T:	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
	BP	C	15,5 (0,77) A	17,4 (0,59) A	15,0 (1,16)	15,2 (0,22) B	
		T	13,0 (0,15) a	17,4 (0,75) b	23,7 (6,25) c	19,2 (0,88) bc	
		C vs T:	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	
	Y	C	22,5 (2,01) a B	21,3 (1,02) a B	17,6 (1,20) ab	17,7 (0,62) b AB	
		T	12,5 (0,90) a	19,0 (2,45) b	18,2 (2,85) b	17,6 (0,99) b	
		C vs T:	*	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	

Por su parte, el efecto del tiempo en la relación C/N en términos generales se tradujo en valores significativamente inferiores en el muestreo de diciembre respecto al resto de muestreos (Tukey,  $p < 0,05$ ). En concreto, se observó este efecto (comparaciones planeadas *a priori*, Tabla III.34) en: (i) el compartimento H de B, donde la tendencia general mostró diferencias significativas entre el muestreo de diciembre y los de enero y noviembre en los controles, y entre diciembre y enero para los tratamientos, (ii) el suelo de 0-10 cm en los tratamientos de BP, y (iii) el suelo de 10-20 cm en los tratamientos de los tres pinsapares y en todos los muestreos excepto marzo en los controles de B.

En cuanto a las diferencias entre localidades, de forma global los valores en B fueron significativamente inferiores a los encontrados en Y y en BP (Tukey,  $p < 0,05$ ). Este efecto general se observó (comparaciones planeadas *a priori*, Tabla III. 34) para los tratamientos del compartimento H en diciembre (BP y B<Y), y para los meses de diciembre y enero en (i) los controles del compartimento H (diferencias significativas entre BP y B), y (ii) los controles de 10-20cm (BP y B<Y). Por el contrario, en los tratamientos de H de enero la relación C/N fue significativamente inferior en Y que en Sierra Bermeja.

#### ***III.4.3.C. Recuperación en el suelo del $^{15}\text{N}$ añadido con los tratamientos de fertilización***

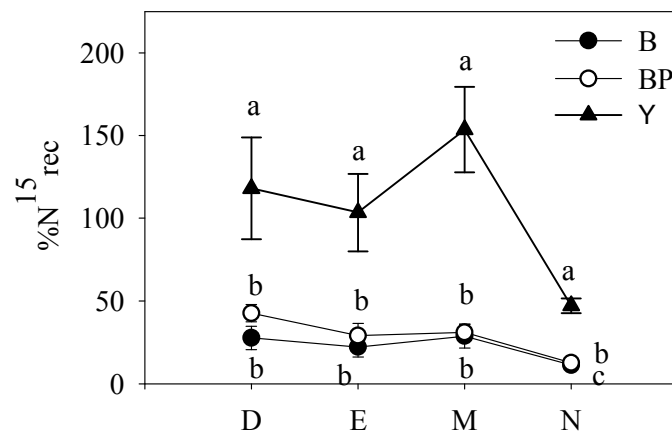
El porcentaje de  $^{15}\text{N}$  añadido que fue recuperado en total desde el suelo (capa de hojarasca L+F y suelo 0-10 y 10-20 cm) mostró efectos significativos (Tabla III.35) de la localidad (pinsapares B, BP e Y) y de la fecha de muestreo (marcaje con  $^{15}\text{N}$  en octubre 2005; muestreos en diciembre 2005 y enero, marzo y noviembre 2006).

**Tabla III.35. Efecto de la localidad (pinsapares B, BP e Y) y de la fecha de muestreo (marcaje inicial: octubre 2005; muestreos en diciembre 2006 y enero, marzo y noviembre 2006) sobre el porcentaje de  $^{15}\text{N}$  añadido que es recuperado desde el suelo (capa de hojarasca L+F y suelo 0-10 y 10-20 cm) (ANOVA de medidas repetidas). En negrita se resaltan los efectos significativos.**

	g.l.	% $^{15}\text{N}$ recuperado	
		F	p
Sitio	2	27,54	<b>&lt;0,001</b>
Tiempo	3	23,07	<b>&lt;0,001</b>
Tiempo*Sitio	6	0,86	0,538

El grado de recuperación de  $^{15}\text{N}$  fue superior en el pinsapar limitado por N (Yunquera) que en la localidad con síntomas de saturación por N (Sierra Bermeja) en los cuatro muestreos realizados (Figura III.35). La recuperación de  $^{15}\text{N}$  fue significativamente inferior tras un año desde el marcaje (noviembre 2006) que en los muestreos previos (Tukey,  $p < 0,05$ ). Desglosando este efecto por localidad, se encontraron diferencias significativas entre noviembre 2006 y los muestreos de diciembre en BP e Y (resultando marginalmente significativa la diferencia con B) y de marzo en los tres pinsapares (Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tan sólo dos meses después de la adición de  $^{15}\text{N}$ , en la hojarasca y 20 cm superficiales de suelo de Sierra Bermeja quedaba menos de la mitad del N añadido (27,7 % en B y 45,9 % en BP). En esta localidad, los valores de retención se mantuvieron bajos durante el período de estudio, quedando tan sólo un 10 % del N añadido en noviembre de 2006, un año después de la adición de N (Figura III.35). Sin embargo, en Yunquera, los valores de retención del N añadido se mantuvieron próximos al 100 % hasta la primavera, recuperándose desde esos compartimentos del suelo cerca de la mitad del N añadido (47,2 %) transcurrido un año desde el marcaje (Figura III.35).



**Figura III. 35. Variación temporal de porcentaje del  $^{15}\text{N}$  añadido que es recuperado desde el suelo (capa de hojarasca más 0-20 cm de profundidad) en los tres pinsapares de estudio (B, BP e Y). Marcaje inicial: octubre 2005. Muestreos en diciembre de 2005 (D) y en enero (E), marzo (M) y noviembre (N) de 2006. Las barras verticales representan el error estándar. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre pinsapares.**

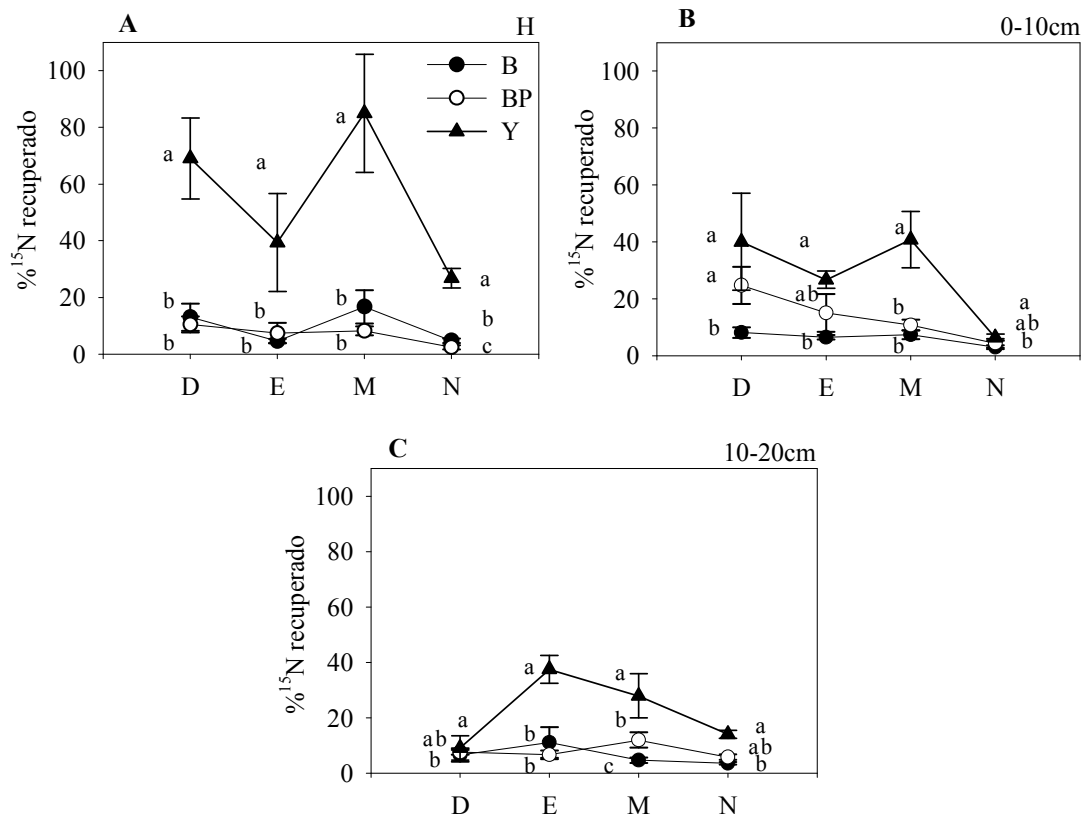
Por otra parte, el ANOVA de medidas repetidas de todos los datos de recuperación del  $^{15}\text{N}$  añadido en los tres compartimentos de suelo mostró efectos principales significativos de la localidad y del tiempo de muestreo, a su vez dependientes del compartimento del suelo que se considere (interacciones sitio\*compartimento y tiempo\*compartimento significativas) (Tabla III.36).

**Tabla III.36. Efecto de la localidad, del compartimento y del muestreo en el porcentaje de  $^{15}\text{N}$  recuperado en el suelo (ANOVA de medidas repetidas). En negrita se resaltan los efectos significativos.**

	% $^{15}\text{N}$ recuperado		
	g.l.	F	p
Sitio	2	46,04	<b>&lt;0,001</b>
Compartimento	2	2,83	0,077
Sitio*Compartimento	4	4,09	<b>0,010</b>
Tiempo	3	24,41	<b>&lt;0,001</b>
Tiempo*Sitio	6	2,13	0,059
Tiempo*Compartimento	6	6,73	<b>&lt;0,001</b>
Tiempo*Sitio*Compartimento	12	1,69	0,084

Así, en los cuatro muestreos realizados, el porcentaje de  $^{15}\text{N}$  recuperado en Yunquera fue superior que el recuperado en Sierra Bermeja en los tres compartimentos estudiados (Figura III.36). En el compartimento H, el porcentaje de  $^{15}\text{N}$  recuperado en B resultó superior en general al encontrado en BP, mientras que en los otros dos compartimentos del suelo ocurrió lo contrario.

Considerando los tres compartimentos del suelo por separado, la tendencia de un menor porcentaje de  $^{15}\text{N}$  recuperado en el muestreo de noviembre respecto a los previos también se mantuvo para los tres pinsapares de estudio (Figura III.36). Sin embargo, la diferencia sólo fue significativa para el compartimento de 0-10cm de profundidad en Y (6,39 % recuperado al cabo de un año, frente al 30 – 40 % de los muestreos anteriores) y en BP (4,38 % en noviembre 2006, frente a 24,7 % en diciembre del año anterior) (Tukey,  $p < 0,05$ ). Por su parte, el porcentaje de  $^{15}\text{N}$  recuperado en el compartimento H resultó superior al de los otros compartimentos, siendo marginalmente significativa la diferencia con el compartimento de 10-20cm (Tukey,  $p = 0,062$ ).



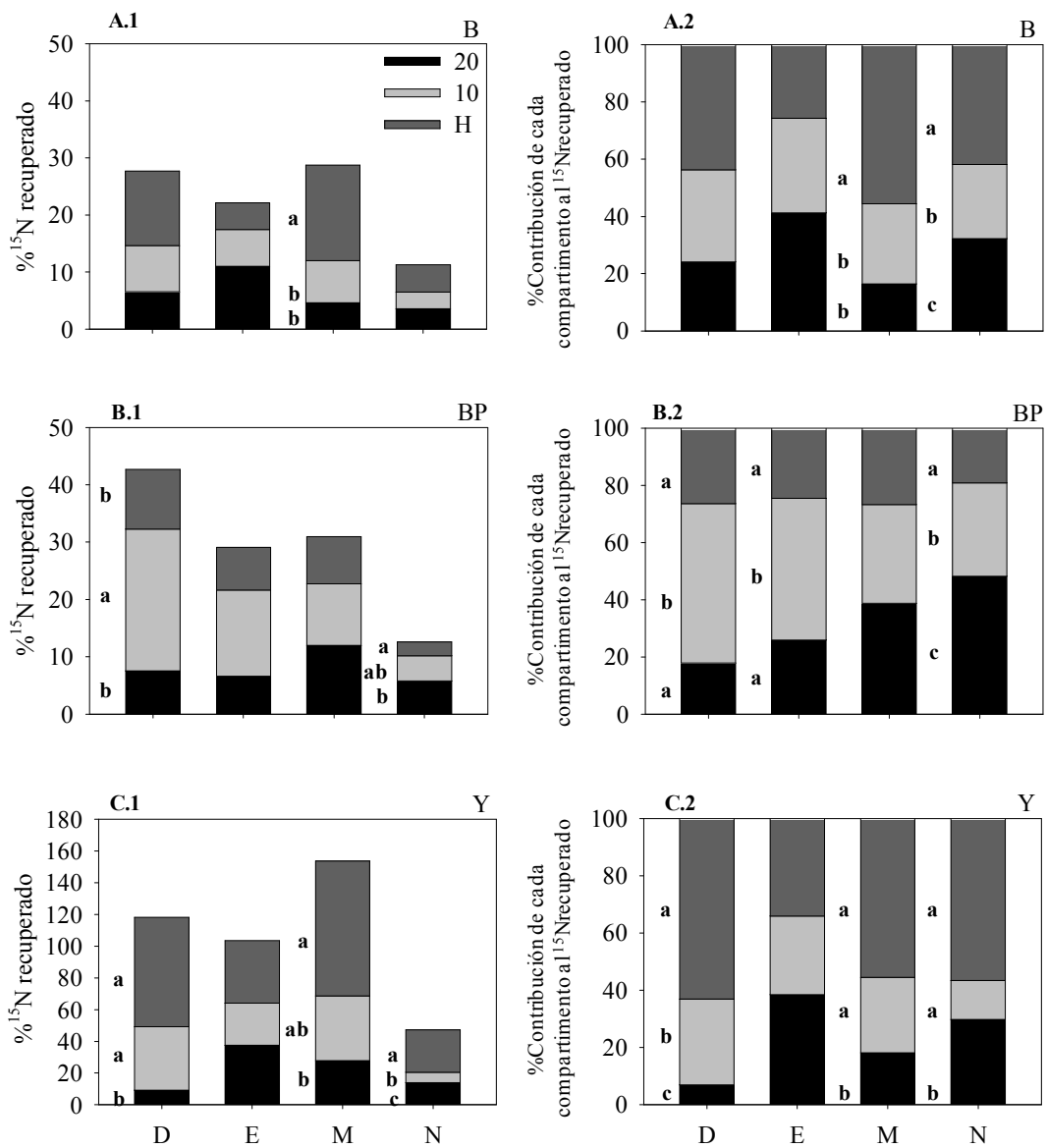
**Figura III. 36. Porcentaje del <sup>15</sup>N recuperado desde la hojarasca (A) y el suelo a 0-10 cm (B) y 10-20 cm (C) de profundidad, en los pinsapares de Yunquera (Y, limitado por N, 1200 m de altitud) y de Sierra Bermeja (B y BP, saturados por N, 1500 y 1200 m de altitud, respectivamente) en diciembre de 2005 (D) y en enero (E), marzo (M) y noviembre (N) de 2006. Las barras verticales representan el error estándar. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre pinsapares.**

El efecto marginalmente significativo de la interacción tiempo\*sitio\*compartimento (Tabla III.36), indica que estas diferencias se debían fundamentalmente al pinsapar de Yunquera, donde el <sup>15</sup>N recuperado en el compartimento H fue superior al de los compartimentos 0-10 y 10-20 cm (Tukey, p<0,05). Efectivamente, en Yunquera se encontró un mayor porcentaje de recuperación de N en el compartimento H que se mantuvo prácticamente todo el período de estudio, siendo significativas las diferencias encontradas con el compartimento de 0-10 cm de profundidad en el muestreo de noviembre de 2006, y con el compartimento de 10-20 cm en todos los muestreos excepto en enero (Figura III.37.C.1). En Sierra Bermeja, sin embargo, hay una rápida migración del <sup>15</sup>N hacia mayores profundidades a corto plazo

después de su adición (Figura III. 37.A.1 y B.1). Así, dos meses después del marcaje, en diciembre, el N recuperado en BP en el compartimento de 0-10 cm de profundidad (24,7 %) resultó significativamente superior al encontrado en los otros dos compartimentos del suelo (10,5 % en el compartimento H y 7,51 % en el compartimento de 10 a 20 cm de profundidad). No obstante, en B no se encontraron diferencias significativas entre compartimentos en dicho muestreo de diciembre.

En la Figura III.37 se muestra cómo cambia el % de contribución de los distintos compartimentos del suelo al total de la retención del  $^{15}\text{N}$  añadido por el conjunto de ellos. Ya desde el primer muestreo se observaron diferencias al respecto entre los tres pinsapares estudiados. Así, en este muestreo de diciembre, cabe destacar que en Yunquera casi dos tercios del  $^{15}\text{N}$  recuperado desde el suelo (63,1 %) aún se encontraban en la capa de hojarasca. Por el contrario, en BP, el suelo a 0-10cm de profundidad ya contribuía a más de la mitad de la retención (55,7 %). En ambos casos se encontraron diferencias significativas entre los compartimentos donde se recuperó más  $^{15}\text{N}$  y los otros compartimentos (comparaciones planeadas *a priori*,  $p < 0,05$ ). Sin embargo, siguiendo todavía con el muestreo de diciembre, en el pinsapar saturado a mayor altitud (B) no se dieron diferencias significativas entre compartimentos para el % de sus contribuciones al total de la retención (H: 43,7 %; 0-10 cm: 32,2 %; 10-20 cm: 24,1 %), lo que también ilustra la migración del  $^{15}\text{N}$  a mayores profundidades del suelo.

El compartimento H de Yunquera mostró una gran capacidad de retención durante todo el período de estudio, siendo su contribución mayor del 50% y significativamente superior a la de los otros dos compartimentos en todos los muestreos salvo en enero (Figura III.37.C.2). Sin embargo, en BP se encontró una migración del N marcado a capas más profundas del suelo a lo largo del período estudiado (Figura III.37.B.2). Dentro de Sierra Bermeja, la contribución de los distintos compartimentos a la retención fue más irregular entre muestreos en B que en BP. Así, en B el compartimento H contribuyó a la retención del  $^{15}\text{N}$  en un 55,6 % en marzo y en un 41,5 % en noviembre, pero en menos del 30 % en enero (Figura III.37.A.2).



**Figura III.37. Cambios temporales en la contribución de cada compartimento del suelo (H: hojarasca; 10: suelo 0-10 cm; 20: suelo 10-20 cm de profundidad) a la retención de N en los tres pinsapares de estudio (B, primera fila; BP, segunda fila; Y, tercera fila). Las gráficas de la columna izquierda muestran el % del  $\text{N}^{15}$  añadido que se recupera desde cada compartimento; las gráficas de la columna derecha muestran el % de contribución de cada compartimento al total de  $\text{N}^{15}$  recuperado desde el conjunto de ellos. Fecha del marcaje: Octubre 2005. Fechas de muestreo: D, diciembre 2005; E, enero 2006; M, marzo 2006; N, noviembre 2006. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre compartimentos dentro de cada pinsapar.**

### III.5. Objetivo 5, “Retención abiótica del nitrato: disipación de dudas metodológicas y de su operatividad en suelos Mediterráneos”

#### II.5.1. Destino del $^{15}\text{N}$ inorgánico añadido al suelo

Para evaluar la existencia y la magnitud del mecanismo de retención abiótica del nitrato que propone la hipótesis de la “rueda de Fe” de Davidson *et al.* (2003), se llevó a cabo un experimento de adición de nitrato marcado isotópicamente empleando muestras de suelo “vivo” y esterilizado de las localidades BP e Y (véase apartado II.7). De media, el 85 % del  $^{15}\text{NO}_3^-$  añadido al suelo fue recuperado en esa misma forma (Tabla III.38), sin que existieran diferencias significativas ni entre tratamientos ni entre localidades ( $p > 0,05$ ). Una de las tres réplicas del suelo vivo de Y mostró una baja recuperación de  $^{15}\text{N}$  (57% como  $^{15}\text{NO}_3^-$ , y 65% como nitrógeno disuelto total-TD $^{15}\text{N}$ ), lo cual hizo caer las recuperaciones medias e incrementó los errores estándar tanto para la localidad como para el tratamiento, pero las diferencias entre localidades y entre tratamientos (y su interacción) no fueron estadísticamente significativas.

En las muestras esterilizadas no se recuperó  $^{15}\text{N}$  como  $\text{NH}_4^+$ , mientras que todas las muestras de suelo vivo mostraron una pequeña cantidad de  $^{15}\text{N}$  recuperado como  $\text{NH}_4^+$  (media =  $0,06 \mu\text{g } ^{15}\text{N g}_{\text{ss}}^{-1}$ ). El ANOVA de los datos transformados por rangos (véase apartado III.7.3) indicó que la recuperación fue significativamente superior en los suelos vivos que en los esterilizados ( $p < 0,01$ ) y superior en los suelos de Y en relación a los de BP ( $p < 0,01$ ). La réplica de suelo de Y que tuvo menor recuperación de TD $^{15}\text{N}$  y  $^{15}\text{NO}_3^-$  tuvo sin embargo la mayor recuperación de  $^{15}\text{NH}_4^+$  ( $0,24 \mu\text{g } ^{15}\text{N g}^{-1}$  suelo seco), lo cual es consistente con una mayor inmovilización biológica del N añadido en esta muestra, que habría ido inicialmente hacia una reserva insoluble de N que no pudo recuperarse, y subsecuentemente hacia una reserva remineralizada de  $^{15}\text{NH}_4^+$ . Todos estos datos indican que en los suelos vivos tuvo lugar una pequeña inmovilización biológica del  $^{15}\text{NO}_3^-$  añadido, así como su remineralización parcial dando  $^{15}\text{NH}_4^+$  como producto, particularmente en el suelo de Y, más limitado por N.

El  $^{15}\text{N}$  recuperado como nitrógeno orgánico disuelto-DON osciló entre 0,6 y 1,5  $\mu\text{g } ^{15}\text{N g}^{-1}$  suelo seco (Tabla III.37). No existieron diferencias significativas entre sitios ni entre tratamientos (suelos esterilizados vs suelos vivos) en el  $^{15}\text{N}$  recuperado como

DON ( $p < 0,05$ ), indicando que esta inmovilización de  $^{15}\text{NO}_3^-$  en  $\text{DO}^{15}\text{N}$  debió haber sido abiótica y de cantidad similar en ambos suelos. La recuperación de  $^{15}\text{N}$  como DON parece ser de alguna forma mayor en las muestras esterilizadas, lo cual podría estar relacionado con la liberación de DOC debido al autoclavado, pero el efecto de la esterilización en  $\text{DO}^{15}\text{N}$  no fue estadísticamente significativo. Todos estos resultados demostrarían una tasa modesta pero detectable de inmovilización abiótica de nitrato hacia DON en los suelos de los pinsapares, independiente de su grado de saturación de N, como se discute en mayor profundidad en el apartado IV.4.2 de la Discusión.

**Tabla III.37.  $^{15}\text{N}$  recuperado como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , TDN y DON ( $\mu\text{g } ^{15}\text{N g}_{\text{ss}}^{-1}$ ) en muestras de suelo controles y esterilizadas de los pinsapares de estudio (Y y BP) a las que se les añadió la tasa de  $^{15}\text{NO}_3^-$  de  $10 \mu\text{g } ^{15}\text{N}$  por gramo de suelo seco. Entre paréntesis aparece el error estándar.**

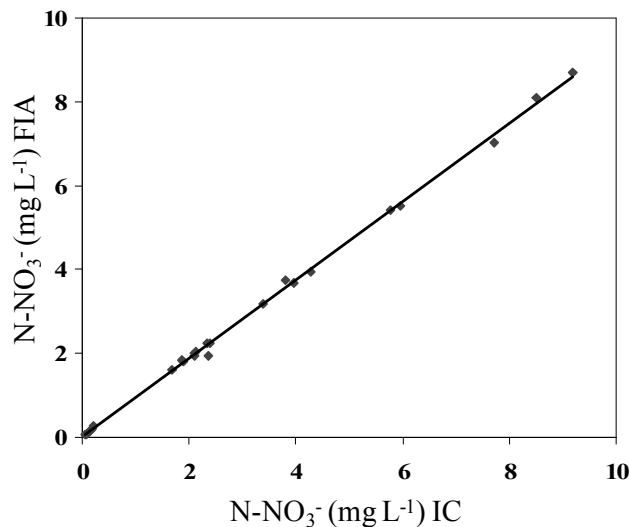
Pretratamiento	Sitio	$\text{NO}_3^-$ añadido	$\text{NO}_3^-$ recuperado	$\text{NH}_4^+$	TDN	DON
Vivo	Y	10,66 (0,22)	7,87 (1,00)	0,10 (0,07)	8,82 (1,00)	0,85 (0,36)
	BP	10,48 (0,06)	9,83 (0,02)	0,02 (0,00)	10,49 (0,43)	0,64 (0,45)
Esterilizado	Y	10,59 (0,10)	9,08 (0,10)	0,00 (0,00)	10,53 (0,15)	1,45 (0,05)
	BP	10,65 (0,19)	9,33 (0,25)	0,00 (0,00)	10,47 (0,12)	1,13 (0,27)

### III.5.2. Cuantificación del nitrato

Como se argumentó en el apartado II.7.3, existe controversia sobre la existencia real del mecanismo de inmovilización abiótica de nitrato en los suelos. Los detractores han argumentado que las estimaciones de recuperación de  $^{15}\text{N}$  como DON, en las que se basa el mecanismo propuesto, pudieran deberse a un problema de interferencia con el Fe en la medida por FIA de la concentración del  $\text{NO}_3^-$ , lo cual llevaría a la subestimación de éste y, por tanto, a una sobre-estimación del DON calculado como diferencia entre el TDN y las formas inorgánicas ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ ) (Colman *et al.* 2007). Para descartar la existencia de dicho problema de interferencia con el Fe en la medida del  $\text{NO}_3^-$ , nosotros seguimos una estrategia triple.

Primero, las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  en los extractos con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada de las muestras incubadas se midieron por dos métodos: por análisis de inyección en flujo (FIA), pero también por cromatografía iónica (IC) que es un método que no se ve afectado por la presencia de hierro soluble. La comparación de los dos análisis

independientes indica un buen acuerdo (Figura III.38). La pendiente de 0,934 sugiere que el análisis FIA podría posiblemente haber subestimado las concentraciones por un 6,6% aunque las diferencias menores al 10% generalmente se consideran dentro del rango de precisión de los instrumentos.



**Figura III.38. Regresión lineal de las medidas de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> llevadas a cabo por análisis de inyección en flujo (FIA) y por cromatografía iónica (IC) en los extractos con H<sub>2</sub>O de las muestras de suelo:  $y = 0,934x + 0,02$ ,  $R^2 = 0,999$ . El error estándar de la estimación para la pendiente = 0,007.**

En segundo lugar, se midió el hierro soluble en los dos tipos de extractos efectuados (con H<sub>2</sub>O destilada, y con solución K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) tanto sobre los suelos “vivos” como sobre los esterilizados. Las concentraciones de hierro soluble oscilaron entre 0,4 y 1,2 mg l<sup>-1</sup> (Tabla III.38), lo cual es más de 10 veces menor que las concentraciones citadas por Colman *et al.* (2007) como problemáticas respecto a la interferencia del hierro en la cuantificación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por FIA. Estos resultados demostraron también que, en promedio, el K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M no extrajo más hierro soluble que el H<sub>2</sub>O. Aunque la comparación entre las cuantificaciones de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por IC y por FIA sólo se llevó a cabo en los extractos de agua (el K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> podría interferir con el análisis IC), las similares concentraciones de Fe tanto en los extractos realizados con agua, como en los extractos

realizados con la disolución salina, indican que la interferencia del Fe en la cuantificación de  $\text{NO}_3^-$  en los extractos realizados con la sal es también improbable.

**Tabla III.38. Concentraciones de Fe soluble en los extractos de suelo realizados con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y en los realizados con  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,5 M. Entre paréntesis aparece el error estándar (n = 3).**

Pretratamiento	Sitio	Extracto	Fe soluble ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Vivo	Y	Agua	1,10 (0,51)
		Sal	0,43 (0,03)
	BP	Agua	1,06 (0,07)
		Sal	0,74 (0,29)
Esterilizado	Y	Agua	0,55 (0,02)
		Sal	0,71 (0,29)
	BP	Agua	0,81 (0,16)
		Sal	1,19 (0,19)
Blanco		Agua	0,05 (0,00)
		Sal	- 0,01 (0,00)

La tercera y más inequívoca aproximación para descartar interferencias significativas por hierro en la cuantificación de  $\text{NO}_3^-$  consistió en llevar a cabo adiciones de un estándar de éste a los extractos de suelo (Davidson *et al.* 2008). Una alícuota de aproximadamente 0,3 mL de un estándar de  $\text{NO}_3^-$  se añadió a cada extracto de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  para incrementar su concentración en aproximadamente  $2 \text{ mg N l}^{-1}$ , y entonces se re-analizaron las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  mediante FIA. La cantidad exacta del estándar añadido fue determinada gravimétricamente. Esto provee de un test de cuantificación de  $\text{NO}_3^-$  con las mismas concentraciones de hierro soluble que estuvieron presentes para el análisis FIA y cuyos resultados se emplearon para estimar DON a partir de la diferencia entre TDN y DIN. El objetivo de las adiciones de este estándar fue evaluar la precisión de la cuantificación de  $\text{NO}_3^-$  mediante FIA sin cambiar las concentraciones de hierro soluble en los extractos de suelo. Debido a esto, la exactitud de la estimación de DON como la diferencia entre TDN y DIN en estos extractos de suelo podría ser también testada. La recuperación del estándar de  $\text{NO}_3^-$  añadido osciló desde el 97 al 103% (Tabla III.39), lo que indicó un error analítico imparcial de aproximadamente el 3%. Estos datos demuestran que el hierro soluble no estuvo presente en cantidades suficientes para afectar la cuantificación de  $\text{NO}_3^-$  en estos extractos.

**Tabla III.39. Recuperación de las adiciones del estándar de  $\text{NO}_3^-$  a los extractos de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,5 M, utilizando análisis de inyección en flujo (FIA). Entre paréntesis aparece el error estándar (n = 3).**

Pretratamiento	Sitio	Porcentaje recuperado
Vivo	Y	102,7 (0,6)
	BP	97,1 (2,5)
Esterilizado	Y	99,8 (1,0)
	BP	96,7 (1,3)
Blanco		100,6 (1,6)



## ***IV. Discusión***



## **IV.1. La mediterraneidad del pinsapar se manifiesta en su patrón estacional de cambios en la disponibilidad de nitrógeno**

### **IV.1.1. Dinámica del N y estacionalidad climática en el pinsapar**

El ciclado natural de nutrientes (incluido el N) y la deposición de N en ecosistemas tipo Mediterráneo son procesos altamente estacionales condicionados por el clima Mediterráneo (Bonilla y Rodà 1992; Gallardo *et al.* 2000). Esto es porque el ciclado de nutrientes está principalmente afectado por la disponibilidad de agua y la materia orgánica del suelo (contenido de C y relación C:N del suelo) durante el ciclo anual más que por el tipo de comunidad vegetal (Rutigliano *et al.* 2009).

Aunque en los pinsapares se observa un patrón ombrotérmico similar al mediterráneo típico, se dan a la vez ciertas características más propias de climas templados. Por un lado, mientras que las temperaturas medias anuales en los pinsapares son similares a las que se dan de manera general en ecosistemas mediterráneos, las mínimas invernales (en torno a  $-5^{\circ}$  C) son más parecidas a las de zonas templadas. Por otro lado, la precipitación total anual en los pinsapares se encuadra dentro del intervalo típico de zonas templadas (ombroclima hiperhúmedo), aunque su distribución estacional es la propia de las zonas con clima mediterráneo, si bien con la particularidad de que la amplitud del periodo de sequía estival es relativamente corta y que su inicio y finalización suele ocurrir con brusquedad. Todo esto se traduce en un peculiar patrón de cambio estacional de las propiedades biogeoquímicas de los pinsapares, que los diferencia de abetales típicos (Figura IV.1, Liétor 2002; García-Ruiz *et al.* 2012). El suministro de N en los suelos forestales está fuertemente controlado por procesos mediados biológicamente muy sensibles a las fluctuaciones periódicas de las condiciones ambientales (Waring y Running 1998). Ello implica una gran variabilidad estacional en la disponibilidad de N en el suelo en los pinsapares (concentraciones de amonio y nitrato, tasas de mineralización y nitrificación).

Generalizando, el modelo de Liétor (2002) propone que existen dos máximos, coincidiendo con las transiciones entre periodos desfavorables a favorables (invierno-primavera y verano-otoño) (Figura IV.1). El ascenso de la temperatura y el mantenimiento de una elevada humedad en el suelo provocan un pulso primaveral

temprano de disponibilidad de N inorgánico en el suelo superficial, debido al incremento de las tasas de mineralización de la materia orgánica y de la hojarasca, y a la rápida nitrificación del amonio producido.

A continuación, a pesar de que las condiciones siguen siendo idóneas para la actividad microbiológica, los niveles de N mineral disminuyen con cierta rapidez durante el resto de la primavera, siendo esta disminución común en ecosistemas bajo estacionalidad mediterránea, como es por ejemplo el caso de matorrales semiáridos del SE de la península ibérica (Carreira *et al.* 1994). Esto puede explicarse si, en este mismo periodo, la absorción de nutrientes por las plantas es alta: los árboles suelen mostrar un pico de acumulación de nutrientes justo antes de iniciar el periodo vegetativo, y niveles relativamente altos durante éste (abril-junio en el pinsapo). Tampoco hay que descartar la contribución de la inmovilización microbiana (secuestro de nutrientes en la biomasa de microorganismos del suelo) durante este periodo climáticamente favorable, ni pérdidas por desnitrificación y lixiviación (Figura IV.1.). El  $\text{N-NO}_3^-$  del suelo (proveniente tanto de la deposición de N como de la nitrificación) es altamente soluble, siendo movilizado en los eventos de altos flujos de lluvia (Fenn y Poth 1999a; Fenn y Poth 1999b; Bernal *et al.* 2002). Así, a pesar de que el periodo primaveral es el de máxima capacidad de retención biótica de N, en nuestro estudio se llegaron a encontrar pérdidas por lixiviación en primavera (abril-junio) entre 8,5 y 9,1  $\text{Kg N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1}$  en el pinsapar saturado por N (Sierra Bermeja, bosques a menor y a mayor altitud, respectivamente), mientras que en el pinsapar limitado por N (Yunqueira) sólo se perdieron 0,74  $\text{Kg N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1}$ . Así, aunque en este último pinsapar, pese a estar limitado por N, se perdieron durante el año hidrológico completo cantidades considerables de N inorgánico (10,9  $\text{kg Ni ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ), la contribución de ese período abril-junio, que coincide con la fase de crecimiento primario del pinsapo, fue insignificante ( $< 1 \text{ kg Ni ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ). Sin embargo, en Sierra Bermeja no sólo se encontraron pérdidas anuales elevadas (24  $\text{kg Ni ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) sino que durante el período de crecimiento del pinsapo se perdió prácticamente la misma cantidad de N que en Yunqueira a lo largo de todo el año hidrológico ( $\sim 9 \text{ kg Ni ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ).

En verano, los niveles de N inorgánico disponible son bajos, porque las condiciones secas y de elevada temperatura en el suelo superficial reducen la actividad microbiológica. La producción de hojarasca muestra un máximo en la primera parte del

periodo otoñal (finales septiembre – finales de noviembre, Figura IV.1) (Liétor 2002). La rehumectación repentina de la hojarasca y del suelo con las primeras lluvias tras el verano provoca entonces pulsos de mineralización del N y de nitrificación típicos de ecosistemas mediterráneos (Gallardo 2000), lo que explicaría los niveles máximos de N inorgánico disponible (en su mayoría nitrato) a finales de septiembre. En este momento, el reinicio de la actividad en los árboles sufre un retardo debido a que han de recobrase del estrés hídrico estival (intensidad bioclimática condicionada). Por ello, es probable que la demanda nutricional de los árboles se mantenga baja. Su coincidencia con fuertes flujos hidrológicos por las lluvias otoñales (hemos registrado hasta 500 mm en un solo mes, Figura III.33), hace que las pérdidas por lixiviación sean máximas (Salido 2007) y, por ello, los niveles de N mineral en el suelo descienden durante el otoño. En nuestro estudio encontramos pérdidas por lixiviación de nitrato con las primeras lluvias tras la sequía estival entre 4,1 y 6,8 Kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ha<sup>-1</sup> en Sierra Bermeja (B y BP respectivamente), mientras que en Yunquera se perdieron 1,49 Kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ha<sup>-1</sup>.

En invierno, las concentraciones de N mineral en el suelo se mantienen bajas, ya que el frío inhibe la actividad microbiológica (la capa de hojarasca y suelo superficial llega a congelarse periódicamente como ocurrió en el muestreo de enero de nuestro experimento).

En resumen, el desajuste temporal entre periodos de máximas demanda y capacidad de secuestro biológica del N (absorción por plantas e inmovilización microbiana), y periodos de máximos flujos hidrológicos y potencial de lixiviación, explicaría la peculiaridad de los pinsapares en cuanto a un ciclo del N relativamente abierto, incluso bajo estados de limitación por N, condicionando la capacidad limitada de sus suelos para retener entradas de N como es propio de ecosistemas mediterráneos (Vourlitis *et al.* 2009).

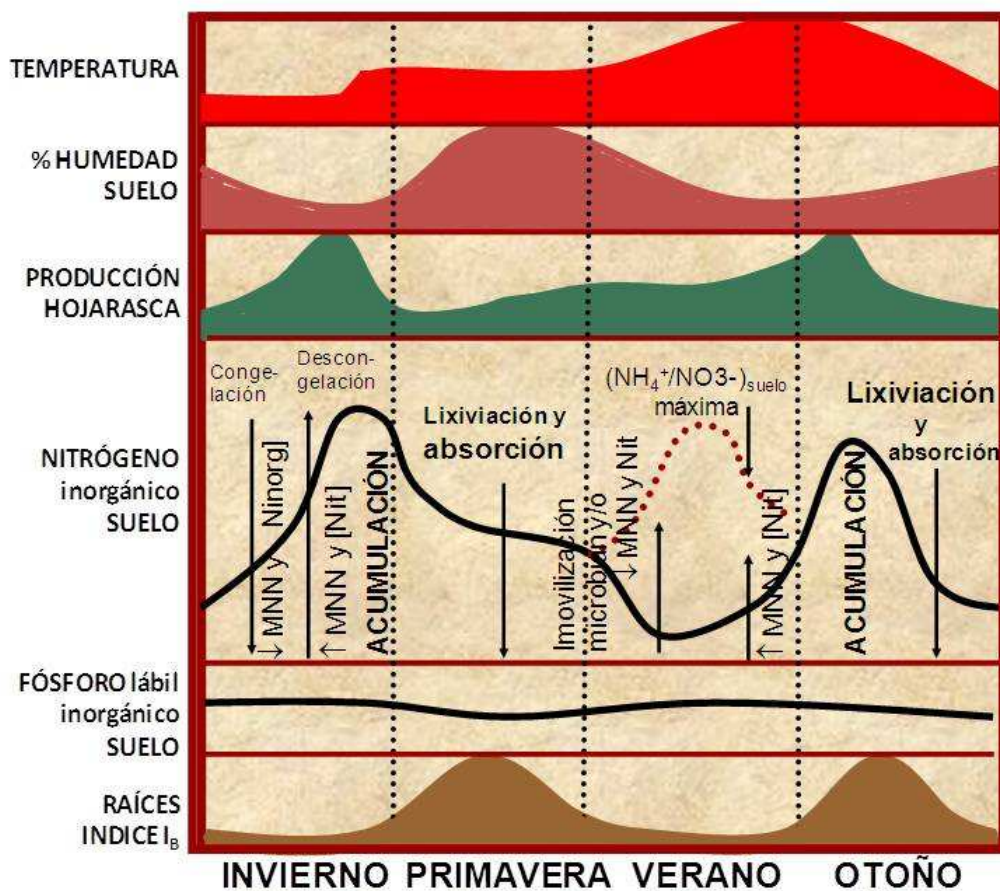


Figura IV 1. Modelo conceptual del patrón típico de cambios estacionales que muestran la producción de hojarasca y la demanda de nutrientes por la vegetación, y las condiciones ombrotérmicas, disponibilidad de N y P, y procesos de pérdida de N en el suelo (Liétor 2002).

#### IV.1.2. Diferencias en la disponibilidad de N en el suelo y la hojarasca entre pinsapares limitados o saturados por N

Las cantidades de N que acumula la hojarasca en los pinsapares son bastante elevadas, en comparación con lo habitual en bosques mediterráneos, encontrándose en nuestro estudio valores de hasta 462 kg N ha<sup>-1</sup> en el compartimento H de rodales maduros (pinsapar de Ronda, concentración de N de 1,2 %; Tabla III.1), mientras que esas cantidades se reducen a la mitad en pinsapares más jóvenes (247 kg N ha<sup>-1</sup> en el pinsapar de Yunquera). En pinsapares jóvenes, las concentraciones de N en el horizonte órgano-mineral (0-10 cm) del suelo encajan en el rango habitual en bosques mediterráneos (0,3-0,5 %); pero no así en los pinsapares más maduros, donde llegan

casi hasta el 1% (Tabla III.1).

La relación C/N observada en el compartimento Ah del suelo de los pinsapares, entre 17 y 20 (Tabla III.1; García-Ruiz *et al.* 2012), es relativamente baja para lo usual en bosques de coníferas, en los cuales dicha relación es igual o superior a 20 (Magill *et al.* 2004). Los resultados obtenidos dentro del marco del proyecto europeo NITREX mostraron que la relación C/N podía predecir con bastante exactitud la lixiviación de  $\text{NO}_3^-$  desde el sistema (Gundersen *et al.* 1998a; Dise *et al.* 1998). Gundersen *et al.* (1998a) encontraron que los ecosistemas forestales templados de coníferas de Europa con relaciones C/N por debajo de 25 lixivaban  $\text{NO}_3^-$  o tenían elevadas concentraciones de N- $\text{NO}_3^-$  en las aguas superficiales. Estos autores sugerían la existencia de un continuo en la relación C/N donde la posibilidad de que ocurriera lixiviación de  $\text{NO}_3^-$  era baja para horizontes orgánicos con una relación C/N por encima de 30, moderada si dicha relación se encontraba entre 25 y 30 y alta para aquellos horizontes con una relación C/N por debajo de 25. En nuestro caso, los suelos (compartimento Ah, organomineral) de las cuatro masas de pinsapar estudiadas muestran relaciones C/N inferiores a 25 tanto en primavera como en verano, correspondiendo con el intervalo de lixiviación de cantidades de N- $\text{NO}_3^-$ , al menos, moderadas. Así, no sólo los pinsapares con alta disponibilidad de N (Sierra Bermeja y Ronda) mostraron relaciones C/N en el umbral inferior bajo el que se produciría lixiviación de N- $\text{NO}_3^-$ , sino que los pinsapares limitados por N también mostraron relaciones C/N relativamente bajas en el suelo independientemente de su litología (Yunquera y Sierra Real). Sin embargo, la relación C/N del compartimento H de los pinsapares con mayor disponibilidad de N (pinsapar saturado por N y pinsapar maduro) sí se diferenció de la correspondiente a los limitados por N. Así, la relación C/N también fue inferior a 25 en el compartimento H de Sierra Bermeja en primavera y en Ronda en las dos estaciones, mientras que en los pinsapares limitados por N (Yunquera y Sierra Real) encontramos relaciones C/N entre 25 y 30 tanto en primavera como en verano.

La hipótesis de saturación de N predice que las adiciones crónicas de N incrementarán la incorporación de N a la materia orgánica, reduciendo su relación C: N, lo que eventualmente incrementará las tasas de mineralización de N y la liberación de éste durante la descomposición (Aber 1992; Aber *et al.* 1998). La relación C: N en el compartimento H (fracciones L –hojarasca poco descompuesta- y F –fragmentos de

hojarasca y restos en estado avanzado de descomposición-) mostró mayores valores en el pinsapar serpentinícola limitado por N que en el saturado en primavera y en verano, lo que sugiere un efecto de las distintas tasas de deposición atmosférica de N en ambos pinsapares. En el compartimento Ah (órgano-mineral) del suelo se mantuvo esta tendencia pero las diferencias fueron significativas sólo en verano (Tabla III.2). Este hecho concuerda con la correlación negativa entre la relación C: N del suelo superficial y la deposición de N encontrada por Ochoa-Hueso *et al.* (2013) en ecosistemas mediterráneos semiáridos de la Península Ibérica a lo largo de un gradiente de deposición de N.

La existencia de bajas concentraciones de N mineral en el suelo y en la hojarasca, y de relaciones  $N-NH_4^+ : N-NO_3^-$  muy por encima de la unidad, constituye el patrón típico en ecosistemas templados no sometidos a entradas atmosféricas antropogénicas de N elevadas y habitualmente limitados por N (Pastor *et al.* 1987; Hart y Stark 1997; Kaye y Hart 1997; Fife y Nambiar 1997). En nuestro estudio, las concentraciones de  $N-NO_3^-$  y de  $N-NH_4^+$  en los pinsapares varían ampliamente, dominando una u otra forma de Ni según la fecha de muestreo, el compartimento y el pinsapar muestreado (Figura III.2). En general, en primavera domina el nitrato y en verano el amonio, lo que es coherente con el patrón temporal de disponibilidad de N descrito previamente (Figura IV.1).

Así, en primavera los valores de la relación  $N-NH_4^+ : N-NO_3^-$  fueron bajos en todos los pinsapares (Figura III.3), con valores mínimos ( $N-NH_4^+ : N-NO_3^- < 1$ ) en los pinsapares con mayor disponibilidad de N (sea por saturación -Sierra Bermeja- o por madurez -Ronda). En los pinsapares jóvenes, las cifras también fueron en general relativamente bajas en primavera (aunque  $> 1$ ), excepto en el compartimento H del pinsapar sobre serpentinas limitado por N (Sierra Real) en el que se alcanzó un valor de 5. Sin embargo, en verano estos valores fueron muy altos ( $> 5$ ) para todos los pinsapares, excepto para el pinsapar saturado por N que mostró un valor de 1 en esa fecha y para el compartimento H en el pinsapar sobre serpentinas limitado por N (Sierra Real) que mostró un valor de 3. No sólo en verano sino también en primavera, a pesar de encontrarse valores bajos de este índice, la relación  $N-NH_4^+ : N-NO_3^-$  de los pinsapares con baja disponibilidad de N independientemente de su litología (Yunqueira y Sierra Real) fue superior que en el saturado por N, poniendo de manifiesto el predominio del

amonio sobre el nitrato en los pinsapares con limitación por N.

En Sierra Bermeja, las relaciones  $N-NH_4^+ : N-NO_3^-$  inferiores o iguales a 1 encontradas en ambos compartimentos del suelo tanto en primavera como en verano son excepcionalmente bajas si se comparan con las cifras generales de bosques templados (por encima de 14; Donaldson y Henderson 1990), y mediterráneos (por encima de 2 y hasta 10; Frazer *et al.* 1990, Carreira *et al.* 1994). Este resultado solo es equiparable al encontrado en algunos bosques templados de coníferas sometidos a elevadas tasas de deposición atmosférica de  $N-NO_3^-$ . Así, por ejemplo, Emmett *et al.* (1998) encontraron relaciones  $N-NH_4^+ : N-NO_3^-$  de 1,3 en el suelo forestal de abetales sometidos a cargas anuales atmosféricas de entre 20 y 30 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>. Por otra parte, en pinares de Massachusetts sometidos durante 4 años a fertilizaciones con 113 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, Magill *et al.* (1997) observaron que la relación  $N-NH_4^+ : N-NO_3^-$  de la solución del suelo descendía bruscamente hasta valores de 0,1-0,2. Asimismo, las relaciones  $N-NH_4^+ : N-NO_3^-$  descendieron desde valores entre 5 y 10 en suelo y hojarasca de parcelas control hasta aproximadamente 1 y 2 en suelo y hojarasca de parcelas fertilizadas, respectivamente.

Se encontraron grandes diferencias en la concentración de nitrato del suelo entre las dos estaciones muestreadas. En primavera, la concentración de  $N-NO_3^-$  en el pinsapar saturado por N fue superior en ambos compartimentos a la encontrada en los pinsapares limitados por N, siendo inusualmente elevados los valores del compartimento H (67 µg  $N-NO_3^-$  g<sub>ss</sub><sup>-1</sup>), muy superior a los encontrados en el resto de pinsapares, incluido el pinsapar maduro de Ronda (Figura III.2.A.2). En verano, la concentración de  $N-NO_3^-$  disminuyó mucho en todos los pinsapares excepto en el compartimento H del pinsapar serpentínicola limitado por N, donde se mantuvieron los mismos valores que en primavera, siendo significativamente superiores que los encontrados en los otros pinsapares. En el compartimento Ah, aunque las concentraciones fueron muy inferiores a las encontradas en primavera, siguieron siendo superiores en el pinsapar saturado por N que en el resto de pinsapares agradativos. Los mayores valores de  $NO_3^-$  del suelo de Sierra Bermeja concuerdan con la mayor deposición de N en las proximidades del Campo de Gibraltar (factor que tuvo un efecto significativo en ambas estaciones en el compartimento Ah) y se explican por el incremento asociado a dicha deposición en unas tasas de nitrificación que son ya de por

sí elevadas en el conjunto de los pinsapares. En Sierra Real y en Yunquera el amonio es la forma dominante de N inorgánico en el suelo en ambas estaciones, lo que concuerda con su estado de limitación por N.

En una revisión del ciclo del N y de la Hipótesis de Saturación de N, Aber (1992) propuso que en suelos limitados por N predomina el  $\text{NH}_4^+$  frente al  $\text{NO}_3^-$  disponible, mientras que, por el contrario, en suelos saturados de N, el  $\text{NO}_3^-$  se acumula en el suelo hasta llegar a representar entre el 25 y el 50 % de la reserva de N inorgánico. Así, el predominio del  $\text{NO}_3^-$  en el suelo es claramente mayor en lugares sometidos a elevadas entradas de N. Como se ha comentado anteriormente, esto se relacionaría con la deposición crónica de N y el incremento en las tasas de nitrificación como consecuencia de ella. En Sierra Bermeja el porcentaje de nitrato osciló entre el 50 y el 80 % de la reserva de N inorgánico en primavera en los compartimentos Ah y H, respectivamente, y no bajó del 50 % en verano. En zonas sometidas a climas más áridos, como sería el clima Mediterráneo, los suelos presentan elevadas tasas de nitrificación durante todos los estados de grado de saturación de N (Figura I.3), de modo que, en principio, una gran parte del N inorgánico presente en el suelo estará en forma de  $\text{NO}_3^-$  incluso en bosques limitados por N (Fenn *et al.* 1998). En este sentido, tanto la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en el suelo como la relación  $\text{N-NH}_4^+:\text{N-NO}_3^-$  han sido propuestos como indicadores del estado de N de un ecosistema forestal (Fenn y Poth 1996). De acuerdo con la propuesta de Fenn y Poth (1996) los valores para esta relación obtenidos en los pinsapares estarían indicando un claro gradiente entre Sierra Bermeja (con un valor medio de este índice en el compartimento Ah de 0,57 en primavera y de 1 en verano, indicativo de cierta saturación de N), y Sierra Real y Yunquera (con valores en el compartimento Ah de 1,93 y 1,34 en primavera, y de 5,28 y 6 en verano, respectivamente; indicativos de un alto grado de limitación por N). A continuación veremos si estas diferencias en la disponibilidad de N entre las masas de pinsapar estudiadas se relacionan con diferencias en las tasas de transformación del N.

### IV.1.3. Diferencias en las tasas de transformación neta del N del suelo entre pinsapares limitados o saturados por N

A diferencia de lo que ocurre en bosques templados no perturbados, los suelos de zonas con clima mediterráneo y de zonas más áridas típicamente nitrifican de forma neta prácticamente todo el N mineralizado, estando así casi todo el N inorgánico en forma de  $\text{NO}_3^-$  (Fenn *et al.* 1998; Vourlitis y Zorba 2006; Vourlitis *et al.* 2007a; Vourlitis *et al.* 2007b; Ochoa-Hueso *et al.* 2013). Este efecto típicamente mediterráneo se observa claramente en todas las parcelas de pinsapar estudiadas, independientemente de su estado de limitación/saturación de N, siendo los valores de las tasas netas de nitrificación muy cercanos a los de las tasas netas de mineralización del N (Tabla III.8). A pesar de esa normalidad mediterránea de activa nitrificación, cabe destacar de nuevo que en el pinsapar de Sierra Bermeja se observan cifras que son ya indicativas de exceso. Así, mientras que las tasas de mineralización y nitrificación neta del N del compartimento H (L+F) en Yunquera y Ronda son similares a las encontradas en suelos de bosques mediterráneos ( $2,68 \mu\text{g N g}_{\text{ss}}^{-1} \text{d}^{-1}$ ; Ochoa-Hueso *et al.* 2014) y las de Sierra Real mucho menores, las tasas de Sierra Bermeja ( $3,93 \mu\text{g N g}_{\text{ss}}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) son altas incluso para ecosistemas mediterráneos. De hecho, la mineralización neta en el pinsapar saturado por N fue ligeramente más elevada que la encontrada por Gundersen (1998) en la capa de hojarasca (L+F) de parcelas fertilizadas ( $+35 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) de un bosque maduro de *Picea abies* considerado limitado por N ( $3,01 \mu\text{g N g}_{\text{ss}}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) mientras que en las parcelas control se encontraron valores de  $1,62 \mu\text{g N g}_{\text{ss}}^{-1} \text{d}^{-1}$  (casi la mitad que las encontradas en el pinsapar maduro de Ronda).

Estas altas tasas podrían estar favorecidas por las peculiares características climáticas a que están sometidos los pinsapares (temperaturas cálidas propias del clima mediterráneo y precipitaciones propias sin embargo de zonas templadas), características que favorecen en gran medida la actividad microbiana. Las mayores tasas de mineralización neta del N y de nitrificación en el suelo del pinsapar de Sierra Bermeja están en concordancia con la teoría general que predice un aumento en las tasas de transformación del N como consecuencia de una adición crónica de N (Aber *et al.* 1998). Así, son numerosos los estudios en los que se asocian incrementos en la nitrificación del N y sobre todo en la mineralización neta del N con aumentos en las entradas externas de N, fundamentalmente por deposición atmosférica, tanto en bosques

templados (Gundersen *et al.* 1998b; Falkengren-Grerup y Diekmann 2003) como mediterráneos (Fenn *et al.* 1996). Además, en un reciente experimentos de fertilización en zonas semiáridas de España (Ochoa-Hueso *et al.* 2013) se ha encontrado que la fertilización con N incrementó significativamente las tasas de nitrificación neta, acumulando  $\text{N-NO}_3^-$  en los suelos, mientras que disminuyó la amonificación neta del N. Estos autores sugieren que esta puede ser una respuesta común a la adición de N en ecosistemas mediterráneos (Vourlitis *et al.* 2009).

La estimulación en la mineralización neta del N como consecuencia de la adición de N inorgánico a los suelos (McNulty *et al.* 1990), se conoce habitualmente como “efecto cebador” o “interacción del N añadido” (Haynes 1986; Rao *et al.* 1991). La naturaleza de este efecto positivo de la adición de N sobre la tasa de mineralización neta del N resulta controvertida. La explicación más general es que este efecto es el resultado de una inmovilización temporal del N añadido, seguido de una remineralización (Haynes 1986). Se ha sugerido también que las entradas crónicas de N contribuyen a incrementar las tasas de nitrificación a través del mantenimiento de mayores poblaciones de microorganismos nitrificantes en el suelo, dada la mayor disponibilidad de nitrato que es el sustrato que promueve su actividad (Johnson 1992; Van Miegroet y Johnson 1993). En caso de ser así, la deposición de N aumentaría de manera indirecta la lixiviación de  $\text{NO}_3^-$  mediante la estimulación de la nitrificación (Fenn *et al.* 1996). Recientemente se ha puesto de manifiesto que la fertilización con N incrementa la abundancia de las bacterias oxidantes del amonio del suelo de diferentes ecosistemas (Shen *et al.* 2011; Tian *et al.* 2013), incluyendo suelos forestales (Wertz *et al.* 2012; Long *et al.* 2012), lo que sostiene esta hipótesis. Esto sugiere que las elevadas tasas de lixiviación de  $\text{N-NO}_3^-$  en Sierra Bermeja podemos también atribuir las a unas mayores tasas de nitrificación debido a las mayores entradas atmosféricas de N en este pinsapar.

En nuestro estudio los valores de nitrificación neta y de mineralización neta del N encontrados en el pinsapar sobre calizas limitado por N (Yunquera) fueron intermedios a los encontrados en los pinsapares sobre serpentinas (Sierra Bermeja y Sierra Real), aunque la elevada variabilidad intra-parcela en Yunquera contribuyó a la ausencia de diferencias significativas (Tabla III.8). A pesar de que las tasas de nitrificación y mineralización neta fueron también bastante elevadas en Yunquera, esto

no llevó aparejadas pérdidas por lixiviación tan elevadas como las encontradas en el pinsapar saturado por N, lo que es coherente con las menores entradas de N registradas en aquél (Tablas III.23 y III.30). Este hecho concuerda con el mayor potencial para la nitrificación en ausencia de limitación por sustrato encontrado para calizas (Yunquera) respecto a serpentinas (Sierra Real) tanto en primavera como en verano en el compartimento H y en primavera en el compartimento Ah (Figura III.5). Recientes estudios moleculares han puesto de manifiesto la vinculación de las tasas de nitrificación potencial en suelos forestales con la abundancia y estructura de la comunidad de microorganismos oxidantes del amonio, AMOA (archaea) (Yao *et al.* 2011) y AMOB (bacteria) (Tian *et al.* 2013). Todo esto apunta a que pueden existir diferentes comunidades de microorganismos nitrificantes en los suelos de pinsapares sobre calizas y sobre serpentinas.

Sin embargo, la tasa potencial de nitrificación en Sierra Bermeja mostró valores superiores a los de Yunquera y Sierra Real en los dos compartimentos en las dos estaciones muestreadas (Figura III.5) lo que sugiere que las mayores entradas atmosféricas de N en este pinsapar están estimulando la nitrificación en Sierra Bermeja. Cabe destacar que este efecto de la deposición de N en el potencial para la nitrificación en los pinsapares sobre serpentinas fue más intenso en primavera que en verano, sobre todo en el suelo superficial. Al analizar las cinéticas de acumulación de N inorgánico bajo incubación aeróbica de muestras del compartimento Ah de los pinsapares serpentínícolas (Tabla III.9), comprobamos que tanto la tasa máxima de nitrificación neta ( $K_{max}$ ) como la nitrificación neta potencial (nNNP) tienden a ser superiores si bien no significativamente en Sierra Bermeja, mostrando de nuevo cómo cambian los patrones de acumulación de  $NO_3^-$  con la disponibilidad de N en el suelo. En Yunquera, de nuevo se encontraron valores intermedios para estos parámetros.

#### **IV.1.4. Comparación de las pérdidas de N por lixiviación del suelo entre pinsapares limitados o saturados por N**

La tasa acumulada de lixiviación al final del año hidrológico de nuestro estudio fue de 24,7 y 10,9 kg N  $ha^{-1}$   $año^{-1}$  en Sierra Bermeja y en Yunquera respectivamente, más del doble en el primer pinsapar. Las pérdidas de N por lixiviación observadas en los pinsapares se consideran moderadas en Yunquera (5-15 kg N  $ha^{-1}$   $año^{-1}$ ) mientras

que las de Sierra Bermeja se consideran elevadas ( $>15 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) para bosques templados europeos según Dise *et al.* (2009). Las pérdidas en Sierra Bermeja son del orden de las observadas en bosques saturados por N de Norte América tanto templados como mediterráneos, aunque se han llegado a registrar valores cercanos a los  $40 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  (Fenn *et al.* 1998). Las pérdidas de N por lixiviación en Sierra Bermeja son muy superiores a las encontradas en pinares sometidos a altas entradas de N por fertilización ( $15 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) durante 15 años en el experimento de fertilización a largo plazo en el Harvard Forest (Magill *et al.* 2004). De hecho, las pérdidas en estos pinares durante la época de crecimiento superaron a las encontradas en Yunquera tan sólo en dos de los 15 años que abarcó el citado estudio (Figura 1. Magill *et al.* 2004).

La concentración media anual de nitrato en el agua de lixiviación fue también superior en Sierra Bermeja que en Yunquera (Figura VII.7.A del Anexo), alcanzando sus valores máximos en dos momentos del año: (i) un máximo absoluto en la primavera tardía (junio), con concentraciones de nitrato en los lixiviados que alcanzaron  $6,9$  y  $7,4 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ l}^{-1}$  en B y en BP, respectivamente; y (ii) un máximo parcial con las primeras lluvias tras el verano. La variación intra-anual de la concentración de nitrato en los lixiviados se distribuyó de manera cualitativamente similar en Yunquera, aunque los valores de primavera ( $1,8 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ l}^{-1}$  en junio) fueron mucho menores que en Sierra Bermeja y con la excepción del pico observado en el mes de enero (relacionado con la ausencia de lixiviación en el periodo anterior –suelo congelado en Yunquera-). Estos dos pulsos de nitrato en el suelo de los pinsapares se relacionan con el patrón estacional en la disponibilidad de N inorgánico en el suelo de estos bosques ya expuesto. Como se ha comentado previamente, estos picos de concentración de nitrato en el agua de lixiviación se tradujeron en pérdidas de N en primavera inferiores a  $1 \text{ kg N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1}$  en el pinsapar limitado por N y de  $9 \text{ kg N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1}$  en el pinsapar saturado por N, mientras que con las primeras lluvias tras el verano se perdieron  $1,5 \text{ kg N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1}$  en el primero y  $4,1 - 6,8 \text{ kg N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1}$  en el segundo (B y BP respectivamente). En Yunquera se perdió más N que en Sierra Bermeja sólo tras el citado período de congelación del suelo ( $4,1 \text{ N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1}$ ).

En los pinsapares estudiados, la hipótesis más probable es que las pérdidas excesivas de N, sobre todo en Sierra Bermeja, sean debidas a una elevada deposición crónica de N y a una elevada nitrificación, a lo que se uniría el hecho del desacople

temporal existente entre los periodos de mayores pérdidas hidrológicas y el momento de mayor demanda biológica. Así, los resultados sugieren que una deposición crónica de N sobre este ecosistema, con fisionomía templada pero sometido a una estacionalidad mediterránea, tiene como consecuencia que el ciclo del N sea más abierto de lo que cabría esperar en un abetal templado-boreal propiamente dicho. En bosques de clima mediterráneo, la cantidad de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> lixiviado por unidad de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> que entra por deposición atmosférica es sensiblemente mayor que en bosques típicamente templados a través de unos muy elevados niveles de nitrificación en los primeros. Nuestros resultados, así como los de Fenn *et al.* (1998) en bosques californianos, sugieren que los bosques de clima mediterráneo no alcanzarán estados de saturación de N tan avanzados como los bosques típicamente templados debido, entre otras cosas, a las mayores tasas relativas de lixiviación del nitrato, procedente de la nitrificación.

#### **IV.1.5. Pérdidas potenciales de N en forma gaseosa (N<sub>2</sub>O) en el suelo de los pinsapares**

Además de por lixiviación, el N puede perderse de los ecosistemas cuando el nitrato es transformado en compuestos gaseosos (N<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>O) por la actividad de bacterias y otros microorganismos desnitrificantes en el suelo. En matorrales (Carreira *et al.* 1994; Vourlitis *et al.* 2007a; Vourlitis *et al.* 2007b) y bosques (Fenn *et al.* 2005) mediterráneos, la nitrificación neta domina sobre la desnitrificación, siendo la última restringida por el bajo contenido de agua (y por tanto elevada aireación) del suelo. Estos microorganismos se inhiben en presencia de oxígeno, que es la situación general en suelos bien drenados como los de los pinsapares. Pero se puede producir una elevada desnitrificación transitoriamente (encharcamiento temporal tras lluvia abundante), en determinados micrositos del suelo (presencia de compuestos orgánicos fácilmente oxidables que proveen la energía necesaria), y si hay nitrato disponible. Todas ellas son condiciones plausibles en el suelo de los pinsapares, en el que los análisis moleculares de la comunidad microbiana edáfica realizados en este estudio han demostrado que existe una comunidad de microorganismos desnitrificantes bien estructurada y en estado funcional (Apartado III.3.2 de Resultados), lo que concuerda con la rapidez con la que sus suelos emiten N<sub>2</sub>O al ser incubados con una fuente de C y N disponibles (0.2 mg de N y 2 mg de C por gramo en peso seco) en condiciones óptimas de laboratorio.

En un estudio sobre las emisiones de  $N_2O$  en bosques saturados por N en Alemania se encontraron máximos de emisión en períodos de congelación del suelo que alcanzaron valores entre 12,5 y 33 nmoles  $N-N_2O\ g^{-1}\ h^{-1}$  en la capa orgánica de un bosque de *Picea abies* (Papen y Butterbach-Bahl 1999). En general, las emisiones potenciales de  $N-N_2O$  del suelo de los pinsapares se enmarcaron en este rango (Figura III.4). Sin embargo, en el compartimento H de las muestras recolectadas en primavera en el pinsapar sobre serpentinas (Sierra Bermeja) se superaron ampliamente estos valores (64 nmoles  $N-N_2O\ g^{-1}\ h^{-1}$ ). Griffiths *et al.* (1998), determinaron un intervalo de tasas de desnitrificación entre 10 y 100 nmoles  $N-N_2O\ g^{-1}\ h^{-1}$  (según el mes de muestreo) en alisedas de la costa Pacífica de Oregón caracterizadas por elevadas reservas de N mineral en el suelo. Por su parte, los suelos de pinsapares limitados por N ofrecen tasas de desnitrificación más típicas de bosques pobres en N. Griffiths *et al.* (1998) fijaron entre 2 y 20 nmoles  $N-N_2O\ g^{-1}\ h^{-1}$  las tasas de desnitrificación de formaciones de abeto de Douglas de Oregón, caracterizadas por una escasez manifiesta de N mineral en sus suelos. Los valores de desnitrificación potencial en las muestras recogidas en verano de los pinsapares limitados por N (de 4 a 5 nmoles  $N-N_2O\ g^{-1}\ h^{-1}$  en Yunquera y Sierra Real) se asemejaron a estas bajas tasas.

La rápida respuesta observada (menos de 5 horas) de incremento del flujo de  $N_2O$  tras la adición de una fuente de N y de C sugiere que la comunidad microbiana de la superficie del suelo de los pinsapares, y especialmente del de Sierra Bermeja, tiene una amplia capacidad de desnitrificación, apoyada en un stock adecuado de enzimas desnitrificantes (Jordan *et al.* 1998; Liétor 2002). En estos casos, las bacterias desnitrificantes parecen seguir una estrategia oportunista, manteniendo una predisposición para explotar condiciones favorables transitorias para la desnitrificación. Según Jordan *et al.* (1998), tal estrategia puede ser ventajosa cuando la desnitrificación depende de la ocurrencia impredecible de pulsos de  $NO_3^-$ , materia orgánica lábil y condiciones de anaerobiosis, como es el caso de bosques mediterráneos caracterizados por una gran variabilidad temporal, con patrones estacionales microclimáticos y de disponibilidad de nutrientes relativamente heterogéneos.

Aunque la tasa de desnitrificación potencial fue superior en las muestras de suelo recolectadas en primavera que en las del verano, en ambas estaciones se encontraron diferencias significativas debidas a las distintas tasas de deposición de N y

al estado sucesional (Figura III.4), con mayores valores en los pinsapares con más N disponible (BP y R). La mayor tasa de desnitrificación potencial observada a mayores entradas de N atmosférico concuerda con los resultados obtenidos por Peterjohn *et al.* (1998) y por Fenn *et al.* (1996), los cuales describían un incremento significativo en las tasas de emisión de N<sub>2</sub>O de suelos sometidos a un proceso de saturación de N, y también con estudios que han observado que el enriquecimiento en N puede incrementar las tasas de desnitrificación en suelos forestales (Fenn *et al.*, 1996; Buckley *et al.* 1998; Nicol y Schleper 2006; He *et al.* 2007).

## **IV. 2. La mediterraneidad del pinsapar condiciona su capacidad para retener las entradas de N atmosférico**

### **IV. 2. 1. Carácter abierto del ciclo del N en los pinsapares**

En ecosistemas mediterráneos, el desacople entre los flujos de N y la demanda biológica condiciona la capacidad limitada de sus suelos para retener entradas de N (Fenn *et al.* 1996; Vourlitis *et al.* 2009). Consecuentemente, las concentraciones de soluto en la escorrentía presentan con frecuencia un pico después de períodos de sequía, aunque las exportaciones de soluto son máximas durante grandes eventos de precipitación (Bernal *et al.* 2002; Butturini y Sabater 2002). En cuencas de bosques y chaparrales del sur de California, donde la deposición de N ha sido elevada durante 60 años, el 40 % del nitrato de arroyos, siguiendo eventos de tormenta, se originan en fuentes atmosféricas que han sido movilizadas de la cuenca sin ninguna asimilación biológica previa (Michalski *et al.* 2004). Esto sugiere que durante los picos de flujos hidrológicos una proporción substancial de deposición crónica de N se pierde desde las cuencas mediterráneas debido a la pobre capacidad de retención. No obstante, el ciclado de N en algunas cuencas forestales Mediterráneas de carácter subhúmedo parece ser muy cerrado, con una retención casi completa para casos con cargas de deposición de N de 15 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (Avila *et al.* 2002; Rodà *et al.* 2002). Asimismo, en bosques mixtos de coníferas de California, el lixiviado incipiente de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> durante períodos pico de escorrentía ha sido observados solamente con deposiciones de N de >17 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, umbral definido como carga crítica para la lixiviación en estos ecosistemas (Fenn *et al.* 2008; Fenn *et al.* 2010). Las entradas de N con el agua de trascolación en el pinsapar saturado por N (Sierra Bermeja) durante el año hidrológico de nuestro estudio

estuvieron próximas a este umbral, mientras que en el limitado por N (Yunquera) se depositaron  $10 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  (Figura III.27), un valor inferior a la carga crítica establecida para la lixiviación en ecosistemas mediterráneos en los escasos estudios previos sobre este tipo de sistemas (Fenn *et al.*, 2008, 2010).

Es bien sabido que el agua de trascolación es una mejor aproximación para determinar las entradas de deposición atmosférica de N que el agua de deposición bruta. Sin embargo, en ecosistemas Mediterráneos, esta aproximación puede llegar a subestimar la entrada de N atmosférico después de períodos largos de sequía incluso hasta un 50% (Fenn *et al.* 2000). Esto es debido a la retención neta del N depositado de forma seca en el dosel forestal a través de los estomas y de la cutícula en bosques con deposición de N de baja a moderada (Rodà *et al.* 2002). Asumiendo que ese grado de subestimación de la entrada de N en el agua de trascolación tras períodos de sequía propuesto por Fenn *et al.* (2000) fuera aplicable en el caso de los pinsapares, la entrada de N atmosférico con las primeras lluvias tras el verano podría llegar a ser hasta el doble de las registradas en nuestro estudio. Si aplicamos este factor de corrección y multiplicamos por dos las entradas de N registradas en nuestro estudio tras la sequía estival, las entradas anuales de N por deposición atmosférica en los pinsapares sí que podrían llegar a superar la carga crítica en el pinsapar saturado por N ( $20 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) mientras que en el limitado por N seguirían por debajo de este umbral incluso en este escenario de máxima subestimación de las entradas de N atmosférico ( $12 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ).

Así, la relación entradas/salidas de N está próxima a la unidad en Yunquera habiendo o no subestimado las entradas (0,9 y 1,1 respectivamente), es decir, sale todo el N que entra. El porcentaje de retención sería del 10 % en caso de haber subestimado las entradas, en caso contrario no se retiene nada. Por su parte, en Sierra Bermeja la relación entradas/salida es inferior a la unidad en ambos casos (0,7 y 0,8), lo que pone de manifiesto la pérdida de nutrientes en este pinsapar (sale más N del que entra). Se han encontrado relaciones próximas a la unidad en bosques templados sometidos a elevadas tasas de deposición de N durante largos períodos de tiempo (Emmett *et al.* 1995), lo que pone una vez más de manifiesto que la estacionalidad de tipo mediterráneo impone a los pinsapares (relictos de carácter originariamente templado) un comportamiento “anómalo” en cuanto a las pérdidas de N. Podemos decir que los

pinsapares son ecosistemas *leaky* (Fenn *et al.* 1998), pues pierden nitrógeno con mucha facilidad y su ciclo sería muy abierto.

#### **IV.2.2. Influencia del grado de saturación de N sobre la eficacia de retención neta del N añadido**

La retención neta del N añadido en el experimento de fertilización (*N añadido* +25 kg N ha<sup>-1</sup> – *Exceso de N lixiviado en parcelas fertilizadas*; apartado III.4.2.d), tendió a ser superior en el bosque limitado por N (siempre por encima del 90% durante todo el año hidrológico tras la aplicación del tratamiento) que en el bosque con síntomas de saturación de N (mayor retención en el pinsapar situado a menor altitud) (Figura III.30.B). A corto plazo tras la adición de N (segundo mes), la retención neta de N fue del 100% en el pinsapar limitado por N, mientras que en el pinsapar saturado por N osciló entre el 34,5% en la posición más elevada y el 68,2% en la de menor altitud. El exceso de N lixiviado en las parcelas fertilizadas respecto a las parcelas control en Sierra Bermeja fue máximo en los dos meses otoñales posteriores al tratamiento (11,8 y 15 kg N ha<sup>-1</sup> a baja y alta altitud, respectivamente). Sin embargo, en Yunquera el pico de lixiviación (2,53 kg N ha<sup>-1</sup>) apareció con más retraso, durante el periodo invernal y asociado a un ciclo de congelación/descongelación del suelo que ocurrió en este pinsapar pero no en el saturado (Figura III.28).

Tras este evento, las cifras de eficacia de retención de N se mantuvieron en el bosque limitado por N durante el resto del año hidrológico. Sin embargo, en el pinsapar saturado por N, y partiendo de los valores mínimos previos, la retención neta del N va aumentando ligeramente desde el final del invierno, manteniéndose esa tendencia durante la primavera, de modo que el balance al final del año hidrológico muestreado fue de una eficacia en la retención del N añadido entre el 54,9 a alta y el 76,2 % a baja altitud (Figura III.30.B). Este incremento en la retención neta de N significa que, durante dicho periodo, la lixiviación pasa a tender a ser mayor en las parcelas control que en las fertilizadas (balance neto negativo). Se ha demostrado que excesos grandes de N inhiben la respiración del suelo y la descomposición de la materia orgánica (Fog 1988; Gallo *et al.* 2004; Moorhead y Sinsabaugh 2006; Craine *et al.* 2007; Meier y Bowman 2008). Así, en un bosque saturado por N, el pulso inicial de N de la fertilización no se inmovilizaría netamente (como sí ocurriría en uno sin este síndrome),

sino que se va perdiendo a corto plazo, provocando que la biomasa microbiana incremente su grado de limitación por carbono. A más largo plazo, éste último efecto irá atenuándose, y conforme se incorpora nueva materia orgánica al suelo (caída de hojarasca, tasa de renovación de la comunidad microbiana del suelo), la biomasa microbiana irá dejando de estar tan fuertemente limitado por C, incrementándose subsecuentemente la inmovilización bruta de N. Por eso, a más largo plazo y al final del año hidrológico (tras la caída de hojarasca en verano), la lixiviación en Sierra Bermeja es algo mayor en los controles (donde ese efecto en todo caso se daría con menor intensidad) que en los fertilizados, de modo que la lixiviación neta se va tornando negativa y, por tanto, la curva de retención neta de N muestra el referido comportamiento ascendente.

Por el contrario, en el bosque limitado por N observamos un patrón muy distinto; en el primer mes tras la fertilización la lixiviación neta es negativa y a lo largo del estudio se va haciendo más positiva o cero (la curva de retención neta en Yunquera no sube hacia el final sino que baja ligeramente o se mantiene). Al añadir N en un sitio fuertemente limitado por N, éste se inmoviliza promoviendo un incremento de biomasa microbiana cuyo mantenimiento y crecimiento requiere más N, y de modo neto, además del N añadido, se estaría inmovilizando también un extra del N nativo, lo que está relacionado con el "efecto cebador" comentado previamente (Haynes 1986; Rao *et al.* 1991). Por eso puede darse el caso de que inicialmente en Yunquera haya más lixiviación en los controles, parcelas donde no se ha inducido ese "efecto cebador", que en las parcelas fertilizadas donde sí se habría inducido. Con el paso del tiempo, ese efecto cebador se va atenuando y, eventualmente, el incremento inicial de biomasa microbiana cesa (se ha inmovilizado el pulso inicial de N de la fertilización) y los microorganismos mueren, se remineraliza esa biomasa microbiana, se libera de nuevo N mineral y entonces la lixiviación en los tratamientos sí comienza a ser mayor que en los controles.

### IV.2.3. Influencia del grado de saturación de N sobre la retención bruta del N en el suelo; aproximación isotópica- $N^{15}$

En la tabla IV.1 se comparan los resultados obtenidos en este estudio con los de experimentos de marcaje isotópico en bosques templados con distinta disponibilidad de N. La adición de  $^{15}N$  se produce en estos experimentos generalmente en forma de trazas a parcelas control y/o a parcelas fertilizadas con N durante tiempos más o menos prolongados (entre 9 meses y dos años). En el marco del proyecto NITREX, por un lado, se añadió N a distintos bosques europeos sujetos a tasas de deposición atmosférica de N consideradas entre bajas y moderadas ( $15$  y  $23$   $kg\ N\ ha^{-1}\ año^{-1}$ , localidades de Klosterhede y de Aber, respectivamente). Por otro lado, para el caso de bosques bajo entradas atmosféricas consideradas elevadas ( $50$  y  $59$   $kg\ N\ ha^{-1}\ año^{-1}$ , Speuld y Ysselstein, respectivamente), los tratamientos consistieron en la exclusión del agua de trascolación mediante tejados y sistemas de intercambio iónico (Dise y Wright 1992). Por su parte, en los bosques norteamericanos (Harvard Forest LTER: Long Term Ecological Research), se realizaron tratamientos de fertilización con  $5$  y  $50$   $kg\ N\ ha^{-1}\ año^{-1}$  en bosques de coníferas y de caducifolios con bajas entradas de N atmosférico ( $8$   $kg\ N\ ha^{-1}\ año^{-1}$ ). En estos estudios, el suelo, fundamentalmente la capa orgánica seguida del suelo mineral, fue el principal sumidero del N añadido.

En nuestro estudio, en el bosque limitado por N se recuperó desde el suelo (0-30 cm de profundidad) un  $47,1\ \%$  del  $^{15}N$  añadido un año después de la adición del marcador. Este porcentaje es similar al obtenido en parcelas de *Pinus resinosa* sometidas a una fertilización con N de  $50$   $kg\ N\ ha^{-1}\ año^{-1}$  (dosis doble a la empleada en nuestro caso) durante cinco años en el Harvard Forest ( $45,9\ \%$ ; Nadelhoffer *et al.* 1999). Sin embargo, el  $^{15}N$  recuperado en el suelo de bosques con distinto grado de saturación de N del experimento NITREX fue inferior al recuperado en Yunquera (Tietema *et al.* 1998). Todo esto sugiere una mayor capacidad de retención de N en el pinsapar de Yunquera respecto a bosques templados sometidos a elevadas entradas de N atmosférico, lo que pone de manifiesto la limitación por N de este ecosistema, aunque esta limitación es inferior al de coníferas de Norte América probablemente debido a la estacionalidad mediterránea propia del pinsapar (Tabla IV.1).

**Tabla IV. I. Comparación de los porcentajes de recuperación del <sup>15</sup>N añadido en los pinsapares con experimentos de fertilización en bosques templados de Norte América (Harvard Forest) y de Europa (proyecto NITREX). Bosques limitados por N aparecen sin sombrear, sombreados en gris oscuro los que muestran síntomas de saturación de N y en gris claro los considerados en un nivel intermedio. Deposición de N atmosférica (atm) o por trascolación (TC); Entradas N totales (exp).**

Lugar	Vegetación	Deposición kg N		Trazas	Fertilización kg N ha <sup>-1</sup> año <sup>-1</sup>	% <sup>15</sup> N recuperado							Tiempo	Referencia			
		ha <sup>-1</sup> año <sup>-1</sup>				total	plantas	suelo	H	capa orgánica	0-10 cm	10-20 cm			suelo mineral	Lixiviado	
		atm/ TC	exp														
Harvard Forest	caducifolios ( <i>Quercus</i> )	8	8	<sup>15</sup> N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		55.4	3.9	<b>51.3</b>		46.1	1.8	3.6	5.4	fertilización: 5 años; trazas: 2 años	Nadelhof fer <i>et al.</i> (1999a)		
		8	58	<sup>15</sup> N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	50	110.6	31.5	<b>79.1</b>		39.6	30.4	9	39.4				
	<i>Pinus resinosa</i>	8	8	<sup>15</sup> N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		38.4	2.05	<b>36.4</b>		32.4	2.9	1.1	4				
		58	58	<sup>15</sup> N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	50	72.1	26.2	<b>45.9</b>		25.6	13.8	6.5	15				
	caducifolios ( <i>Quercus</i> )	8	8	<sup>15</sup> N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		114.7	14.3	<b>100.4</b>	27.3	83.5	14.9	2.1	16.9			2 años adiciones; recuperación tras 7 años	Nadelhof fer <i>et al.</i> (2004)
		8	13	<sup>15</sup> N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5	86.5	13	<b>73.5</b>	31.7	56.1	13.7	3.7	17.4				
<i>Pinus resinosa</i>	8	8	<sup>15</sup> N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		99.9	9.5	<b>90.4</b>	44.3	60.2	21.4	8.8	30.2					
	8	13	<sup>15</sup> N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5	76	15.5	<b>60.5</b>	25.2	33.8	16.8	10	26.7					
Klosterhede	<i>Picea abies</i>	23	20	<sup>15</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> <sup>15</sup> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		82	45	<b>38</b>		26			12	1 año			
			55	<sup>15</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> <sup>15</sup> NO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	35	82	47	<b>33</b>		16			17				
Aber	<i>Picea sitchensis</i>	15	51	<sup>15</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> <sup>15</sup> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	35	105	32	<b>48</b>		47			1	1 año	Tietema <i>et al.</i> (1998)		
			51	<sup>15</sup> N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	35	99	32	<b>32</b>		17			15			35	
			91	<sup>15</sup> N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	75	97	20	<b>26</b>		11			15			50	
Speuld	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	50	35	<sup>15</sup> N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		67	13	<b>35</b>		26			9	19	9 meses	Presente trabajo	
			44	<sup>15</sup> N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		92	29	<b>30</b>		15			15	33	21 meses		
Ysselsteyn	<i>Pinus sylvestris</i>	59	37	<sup>15</sup> N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		65	5	<b>48</b>		28			20	12	9 meses		
			53	<sup>15</sup> N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		66	17	<b>31</b>		21			10	17	21 meses		
S.Nieves	<i>Abies pinsapo</i>	10	35	<sup>15</sup> N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	25			<b>47.1</b>	27		6.4	14	20.4	19	1 año		
S. Bermeja BP	<i>Abies</i>	16.8	41,8	<sup>15</sup> N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	25			<b>12.6</b>	4.7		3	3.6	6.6	>100	1 año		
S. Bermeja B	<i>pinsapo</i>	17.6	42,6	<sup>15</sup> N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	25			<b>11.3</b>	2.4		5.8	4.4	10.1	>100			

Por su parte, en Sierra Bermeja, los niveles de recuperación del trazador un año después de su adición (11,3-12,6 %) son ostensiblemente inferiores a los encontrados en la bibliografía para bosques templados también saturados o con alta disponibilidad de N, remarcando la mayor sensibilidad y vulnerabilidad de los bosques de pinsapos frente a tasas de deposición atmosférica de N elevadas (Tabla IV.1).

La retención de  $^{15}\text{N}$  en la capa orgánica de los bosques europeos osciló entre el 11 y el 47 % (Tabla IV.1), encontrándose las mayores tasas de retención en los experimentos en los que se añadió  $^{15}\text{N-NH}_4^+$  en lugar de  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  (en nuestro estudio se empleó este último). Estos resultados pueden ser explicados por la preferencia de los microorganismos para asimilar amonio en lugar de nitrato, y/o porque en el caso de adiciones de amonio hay que añadir el efecto de la retención abiótica por intercambio catiónico al efecto de los mecanismos de retención biótica (Tietema *et al.* 1998). La capa orgánica es una de las reservas más importantes por su capacidad de retención de grandes cantidades de N, retención que es fundamentalmente biológica: los microorganismos inmovilizan N inorgánico para la asimilación de biomasa o la incorporación a productos de descomposición (Fog 1998). En las parcelas de coníferas del Harvard Forest la recuperación de  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  en el suelo orgánico osciló entre 25,6 y 60,2 %. Al igual que ocurrió en los bosques europeos, en el suelo orgánico también se recuperó más  $^{15}\text{N}$  en las adiciones realizadas en forma de amonio que en las realizadas en forma de nitrato en las parcelas fertilizadas (Nadelhoffer *et al.* 2004, datos no recogidos en la tabla IV.I). En el bosque caducifolio, el horizonte orgánico fue un sumidero más efectivo para las trazas de  $^{15}\text{N}$  que en el pinar, lo que es coherente con una mayor recuperación de  $^{15}\text{N}$  en el suelo mineral del pinar respecto al primero. Las estimas de recuperación de  $^{15}\text{N}$  en dicho estudio (Nadelhoffer *et al.* 2004) fueron mayores que las que los mismos autores observaron en un estudio previo (Nadelhoffer *et al.* 1999a), explicándose la discordancia con argumentos referentes al carácter más fiable y detallado de las estimas, al muestreo más intensivo, y en definitiva a la mejor acotación del error en el estudio posterior.

Según los resultados de un reciente meta-análisis de experimentos con trazas de  $^{15}\text{N}$  en 48 sitios en diferentes ecosistemas naturales de cuatro continentes (Templer *et al.* 2012) la recuperación de trazas de  $^{15}\text{N}$  en el suelo y la vegetación de bosques perennes es de un 74 % en experimentos a largo plazo (3-18 meses). Este meta-análisis muestra

que en estudios de fertilización a largo plazo se recuperó alrededor del 20 % del  $^{15}\text{N}$  en la hojarasca, el 30 % en el suelo orgánico y el 20 % en el suelo mineral, siendo el suelo el principal sumidero del  $^{15}\text{N}$  añadido en los bosques. Comparando con nuestro estudio, en Yunquera en los compartimento H + 0-5cm del suelo se recuperó el 27 % del  $^{15}\text{N}$  añadido, en el compartimento de 0-10cm (5-15cm) el 6,4% y en el compartimento de 10-20cm (15-30cm) el 14%, lo que concuerda con lo encontrado en el meta-análisis, pues en los dos compartimentos más profundos de suelo se recupera un 20% del  $^{15}\text{N}$  añadido. En Sierra Bermeja, sin embargo, tan solo se recupera en el compartimento H entre el 2,4 % a baja altitud y el 4,7 % a mayor altitud, en el suelo de 0-10cm entre el 5,8 y el 3,0 %, y en el suelo de 10-20 cm entre el 4,4 y el 3,6 %, respectivamente. Estos porcentajes son muy inferiores a lo predicho en el meta-análisis de Templer poniendo una vez más de manifiesto en el estado alterado del pinsapar de Sierra Bermeja.

#### **IV.2.4. Influencia del grado de saturación de N sobre la lixiviación bruta del N; aproximación isotópica- $\text{N}^{15}$**

La recuperación en los lixiviados del  $^{15}\text{N}$  añadido a las parcelas fertilizadas fue máxima en los dos primeros meses muestreados en los tres pinsapares, aunque con valores medios claramente superiores en Sierra Bermeja (> 100 %) que en Yunquera (19 %) (Tabla IV.1). Hay que advertir de nuevo que estos resultados (véase apartado III.4.2.d) se interpretan aquí únicamente en términos cualitativos, dado que las cifras obtenidas tienen asociados amplios márgenes de error (insuficiente nivel de replicación para la elevada variabilidad observada intra-parcela en los volúmenes de lixiviación por lisímetro y fecha).

Tras ese pulso inicial de pérdida, la señal de  $^{15}\text{N}$  en los lixiviados de las parcelas sometidas a tratamiento no se diferenció de la señal ambiental (Figura III.31.B). Así, las pérdidas del  $^{15}\text{N}$  añadido se concentraron en los pinsapares en muy corto plazo tras el marcaje a inicios del mes de octubre, apoyando la idea del fuerte potencial de lixiviación de las primeras lluvias de otoño en ecosistemas sujetos a estacionalidad de tipo mediterráneo. Al comparar estos valores con los obtenidos en otros estudios en bosques templados, vemos como el  $^{15}\text{N}$  lixiviado en Yunquera fue superior al encontrado en el marco del proyecto NITREX en un bosque de *Picea abies* limitado por N, pero inferior a los correspondientes al bosque de *Picea sitchensis* con una

disponibilidad de N intermedia. Por el contrario, el  $^{15}\text{N}$  recuperado en los lixiviados de Sierra Bermeja fue muy superior al lixiviado en bosques europeos saturados por N (Tabla IV.1). Todo esto pone de manifiesto el carácter mediterráneo de los pinsapares en cuanto a la pérdida de nutrientes además del estado alterado del ciclo del N en el pinsapar de Sierra Bermeja.

Según Templer *et al.* (2012), los estudios que han cuantificado el  $^{15}\text{N}$  lixiviado han encontrado en promedio que  $<10\%$  del  $^{15}\text{N}$  aplicado a parcelas no fertilizadas (Tietema *et al.* 1998; Zak *et al.* 2004; Providoli *et al.* 2005), y el  $16\%$  del  $^{15}\text{N}$  aplicado a parcelas fertilizadas (Lamontagne *et al.* 2000), se pierde por lixiviación. Los valores encontrados en los lixiviados de las parcelas fertilizadas de Yunquera superan ligeramente lo encontrado en este estudio. El bajo porcentaje de  $^{15}\text{N}$  recuperado en los lixiviados en estos estudios sugiere que el N que permanece en los ecosistemas evaluados podría haber sido transportado por debajo de la profundidad de muestreo del suelo o perdido debido a la traslocación dentro de las raíces hacia fuera de las parcelas experimentales, al movimiento con artrópodos fuera de las parcelas, al viento (por ejemplo, el polen o la hojarasca llevados fuera de las parcelas por el viento), a la volatilización del  $\text{NH}_3$ , o convertido en productos gaseosos ( $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$ ) por nitrificación o desnitrificación (Templer *et al.* 2012). En todo caso, se considera que la contribución de la desnitrificación a las pérdidas del isótopo aplicado debe ser pequeña. Por ejemplo, Tietema *et al.* (1998) registraron flujos de  $\text{N}_2\text{O}$  de  $<4\text{ kg N ha}^{-1}\text{ año}^{-1}$  en bosques europeos, y estimaron que sólo el  $2,6\%$  del  $^{15}\text{N}$  aplicado podría haberse perdido como  $\text{N}_2\text{O}$  en un bosque caducifolio mixto de los Estados Unidos. De forma alternativa, también podría haberse subestimado el  $^{15}\text{N}$  incorporado a la biomasa vegetal.

### **IV.3. Actividad y estructura de la comunidad microbiana del suelo de los pinsapares**

#### **IV.3.1. Efecto de la estacionalidad Mediterránea y la adición de sustratos lábiles de C y/o N en la respiración del suelo de los pinsapares**

La tasa de respiración de los suelos de los pinsapares de estudio (tras una semana de incubación en laboratorio a la humedad de campo) fue significativamente superior en las muestras de primavera que en las de verano (independientemente del tratamiento de adición de sustratos, pero con la excepción de los controles del compartimento Ah), lo que es coherente con una mayor actividad microbológica en condiciones de mayor humedad en el suelo. La disminución en la tasa de respiración del suelo por estrés hídrico en verano es un hecho comúnmente observado (Davidson *et al.* 1998; Savage y Davidson 2001; Xu y Qi 2001; Borken *et al.* 2002; Irvine y Law 2002; Rey *et al.* 2002; Hanson *et al.* 2003; Janssens y Pilegaard 2003; Subke *et al.* 2003; Curiel yuste *et al.* 2004; Borken *et al.* 2006). La sequía estival propia de ecosistemas mediterráneos limita tanto el comportamiento fisiológico de las plantas (Nikolova *et al.* 2008; Brunner *et al.* 2009) y de los microorganismos del suelo (Rey *et al.* 2002; Reichstein *et al.* 2002; Curiel Yuste *et al.* 2007), como la liberación de nutrientes (Davidson y Janssens 2006) y el comportamiento de las enzimas (Sardans y Peñuelas 2005; Sardans *et al.* 2008) en el espacio poroso del suelo.

Las diferencias en la actividad microbiana del suelo entre pinsapares también dependieron fuertemente del compartimento considerado, siendo las tasas de respiración basal (controles) en la hojarasca en torno a un orden de magnitud superiores que las del suelo superficial. Los principales factores que controlan la producción de CO<sub>2</sub> del suelo – suministro de sustrato, temperatura y contenido de agua- varían verticalmente dentro del perfil del suelo, con las mayores variaciones temporales de estos factores generalmente cerca de la superficie del suelo (Davidson *et al.* 2006). Así, en nuestro estudio, las diferencias en la respiración basal observadas entre pinsapares de distinta litología se mantuvieron en el compartimento Ah del suelo tanto en primavera como en verano. Sin embargo, la disminución en la tasa de respiración debido a la sequía estival en el compartimento H, mucho más acusada en los pinsapares calcáreos, hizo que las diferencias en las tasas de respiración entre pinsapares de distinta litología se observaran

en primavera pero no en verano (Figura III.8). Varios estudios han demostrado que la humectación y secado del horizonte orgánico en bosques de regiones templadas contribuye a la variación temporal en el flujo de CO<sub>2</sub> del suelo forestal en verano (Borken *et al.* 2003; Lee *et al.* 2004; Borken *et al.* 2006), y que las grandes variaciones interanuales en las estimas de la producción de CO<sub>2</sub> del horizonte O del suelo indican que esta capa podría ser una importante fuente o sumidero transitorio interanual del C del ecosistema (Davidson *et al.* 2006). Así, en los períodos de sequía estival, el horizonte O se convierte en un sumidero temporal de C debido a una ralentización de la descomposición y la consiguiente disminución de las entradas de C al suelo (Davidson *et al.* 2006). En los pinsapares no existe una fracción húmica propiamente dicha y con continuidad intra-parcela en la capa de hojarasca, pero sí suele aparecer una diferenciación neta entre las fracciones L y F (hojarasca poco descompuesta, y hojarasca fragmentada y en estado de descomposición más avanzado), que podrían tener un papel similar como fuente o sumidero de C según la estación del año.

Al añadir una fuente de carbono orgánico lábil (glucosa) al suelo de los pinsapares, la actividad del suelo se disparó en primavera en ambos compartimentos (H y Ah), y también, aunque en menor medida, en el compartimento Ah en verano. Sin embargo, en el compartimento H en verano se mantuvo igual a la respiración basal (controles) en Sierra Bermeja y en Ronda, que son los dos pinsapares con mayor disponibilidad de N en el suelo, mientras que en los pinsapares limitados por N, la actividad de los microorganismos del suelo descendió significativamente al añadir la glucosa. Esto puede estar relacionado con el posible papel como sumidero de carbono que adopta el compartimento H durante la sequía estival, ya que la falta de agua provoca la incompleta descomposición de las entradas de carbono al suelo (Davidson *et al.* 2006). Además, la adición de glucosa puede exacerbar más aún el grado de limitación por N de la biomasa microbiana en el suelo de Yunquera y Sierra Real, estando además en condiciones de escasa humedad, lo que inhibiría la actividad microbiana. Esta explicación es coherente con el hecho de que al añadir nitrógeno además de carbono (glucosa+nitrato), la tasa de respiración en el compartimento Ah de Sierra Real aumentó respecto al tratamiento con sólo carbono, es decir, la actividad microbiana del suelo se reforzó significativamente al combinar la adición de carbono fácilmente asimilable con una fuente de nitrógeno ( $G+N > G$ ), lo que pone de manifiesto la mayor limitación por

N existente en este pinsapar (o al menos una colimitación por C y por N) respecto al de Sierra Bermeja (saturado por N), en el que no se observó tal tipo de efecto sinérgico de la adición conjunta de N.

Aunque en general no existieron diferencias en las tasas de respiración entre los dos pinsapares serpentínícolas (altas y bajas tasas de deposición de N en BP y SR respectivamente), las tasas de respiración de la hojarasca de verano fueron significativamente menores en el saturado que en el limitado por N bajo cualquiera de los tratamientos de adición, siendo la magnitud de éste efecto más marcada en el tratamiento control (de un -24%, con 192,8 y 253,1  $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}_{\text{ss}}^{-1} \text{d}^{-1}$  en SR y BP, respectivamente). El enriquecimiento en N típicamente desciende la actividad microbiana del suelo en ecosistemas en estado de saturación de N (Zak *et al.* 2011; Ramirez *et al.* 2012; Cederlund *et al.* 2014). La menor actividad microbiana en el pinsapar de Sierra Bermeja concuerda con este hecho, y con lo encontrado por Bowden *et al.* (2004) en dos bosques templados en el Harvard Forest, en los que las adiciones crónicas de N redujeron la respiración del suelo respecto a los suelos control.

#### **IV.3.2. Efecto de la adición de sustratos lábiles de C y/o N sobre las tasas netas de transformación del N del suelo de los pinsapares**

La disponibilidad de C y de N en el suelo como nutrientes para el crecimiento microbiano es un factor muy importante en la regulación del ciclo de los nutrientes en los bosques (Magill y Aber 2000). Estos autores, en un estudio de campo de adiciones crónicas de N, observaron un incremento inicial en las tasas de mineralización neta del N al fertilizar con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , seguido de un descenso en dichas tasas al tercer año de fertilización, lo que ponía de manifiesto que algún otro factor distinto a la disponibilidad de N estaba limitando la mineralización. Si la disponibilidad de N es superior a la demanda por parte de la microflora, pero la disponibilidad de C no aumenta vía trascolación, exudados de las raíces o por la descomposición, entonces la mineralización del N estaría limitada en cambio por la ausencia de una fuente lábil de C (Magill y Aber 2000).

Nuestros resultados concuerdan con los resultados de Salido (2007), según los cuales los microorganismos del suelo de los pinsapares de Yunquera y de Sierra Real

están limitados por N y por C, mientras que en Sierra Bermeja la limitación por C sólo se daría a dosis muy altas de N añadido. En nuestro estudio la adición de una dosis alta de C en forma lábil ( $8 \text{ mg C-C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \text{ g}_{\text{ss}}^{-1}$ ) provocó una disminución de las tasas de transformación del N, resultando negativas tanto las tasas de nitrificación neta como de mineralización neta del N en todos los pinsapares, es decir, tuvo lugar un reforzamiento de la inmovilización bruta del N. Nuestros resultados (Tabla III.8) muestran una mayor inmovilización bruta (tasas netas de mineralización y nitrificación más negativas) en Sierra Bermeja (alta deposición de N) que en Sierra Real (baja deposición de N) en los tratamientos de adición (G y G+N) en los dos compartimentos estudiados. Por su lado, en los tratamientos control (C) se encontraron mayores tasas de nitrificación neta y de mineralización neta del N en Sierra Bermeja que en Sierra Real. Sin embargo, las tasas de nitrificación neta y de mineralización neta del N fueron superiores tanto en controles como en tratamientos (C, G y G+N) en el pinsapar agradativo (Y) que en el pinsapar maduro (R). Por lo tanto, de forma general, al añadir una fuente de carbono fácilmente asimilable, la inmovilización bruta del mismo fue superior cuando también lo fue la disponibilidad de N, ya sea por mayores tasas de deposición atmosférica o por el estado sucesional.

#### **IV.3.3. Variabilidad en la estructura de la comunidad bacteriana y relaciones estructura/función**

Mediante la aplicación de un análisis de componentes principales (ACP) al conjunto de los datos T-RFLP, las comunidades bacterianas de los distintos sitios de estudio se ordenaron claramente en función del compartimento, de la localidad y de la estación del año. Cabe destacar que el grado de segregación debido a diferencias de fecha de muestreo fue de la misma magnitud que el debido a la localidad o al compartimento del suelo considerado.

Recientes estudios han puesto de manifiesto la influencia de la estacionalidad en la estructura de la comunidad bacteriana del suelo de bosques templados (Kaiser *et al.* 2010; Rasche *et al.* 2011; Collignon *et al.* 2011; Koranda *et al.* 2013), así como también, aunque los estudios son muchos menos, en el caso bosques mediterráneos (Curiel Yuste *et al.* 2014). Generalmente las variaciones estacionales se atribuyen a cambios en las condiciones ambientales edáficas, como la temperatura o la humedad. No obstante, en

ecosistemas forestales templados se ha observado que el patrón de cambio estacional en la estructura de las comunidades microbianas está relacionado también con la variabilidad temporal que muestra la disponibilidad de los distintos sustratos (Kaiser *et al.* 2010; Kaiser *et al.* 2011). La variación estacional en la disponibilidad de estos recursos (sustratos para la actividad microbiana) esta principalmente controlada por las plantas a través de la exudación radicular de compuestos de C, el incremento en la absorción de nutrientes durante la estación de crecimiento, y la caída de hojarasca en otoño. Recientemente se ha demostrado experimentalmente que una variación en la disponibilidad de recursos, mimetizando esos cambios estacionales observados en el suelo de bosques templados, se traduce en cambios estacionales en la funcionalidad microbiológica del suelo, como resultado de cambios en la estructura de la comunidad y la consiguiente acomodación fisiológica de dichas comunidades al suministro alterado de recursos (Koranda *et al.* 2013).

En los ecosistemas Mediterráneos, la disponibilidad de agua es el principal factor ambiental limitante debido a la combinación en verano de altas temperaturas y bajas precipitaciones (Specht y Moll 1983; Larcher 2000). Es bien conocido que la sequía limita fuertemente la actividad fisiológica de los microorganismos y la difusión de los nutrientes en el espacio poroso del suelo, afectando en último lugar la actividad metabólica (Sardans y Peñuelas 2005; Davidson y Janssens 2006; Sardans y Peñuelas 2010) y a las emisiones de CO<sub>2</sub> (Asensio *et al.* 2007; Curiel Yuste *et al.* 2007) del suelo. En los pinsapares, como ya se ha comentado, los resultados sobre la tasas de respiración concuerdan con este patrón típicamente mediterráneo (cifras significativamente superiores en primavera -condiciones óptimas de humedad- que en verano -sequía prolongada-). En este estudio se ha comprobado que la mayor actividad microbiana en primavera se relaciona con cambios estructurales en la comunidad bacteriana (correlación negativa significativa entre las tasas de respiración y el primer eje del ACP sobre los datos T-RFLP de bacterias,  $r=-0,74$ ,  $p<0,05$ ; Tabla III.23). Así, en el suelo de los pinsapares estudiados tanto la funcionalidad como la estructura de la comunidad bacteriana estuvieron fuertemente determinadas por los intensos cambios ambientales a corto plazo propios de la estacionalidad típicamente mediterránea, lo cual coincide con lo encontrado en recientes estudios en bosques mediterráneos (Curiel Yuste *et al.* 2014).

Sin embargo, los cambios en la estructura de la comunidad bacteriana del suelo de los pinsapares entre estaciones no estuvieron acompañados por cambios en los índices de diversidad. Esto sugiere que el cambio estructural consistió más en un cambio de identidades, en la substitución de unas especies por otras, que en variaciones en el número total de especies o en el grado de equitatividad entre ellas. Esto contrasta radicalmente con lo encontrado en suelos de bosques típicamente mediterráneos (Curiel Yuste *et al.* 2014), en los que se registró una caída en la riqueza y diversidad de la comunidad bacteriana en primavera, (el período cuando son máximas la humedad del suelo, las emisiones de CO<sub>2</sub> del suelo y la actividad fotosintética de las plantas) lo que confirmó que menos taxones dominaban bajo condiciones óptimas mientras que en verano, bajo las condiciones de humedad más bajas del año, las comunidades bacterianas fueron más ricas y diversas. Los resultados obtenidos por estos autores sugieren que las condiciones microclimáticas subóptimas del verano favorecieron una comunidad más diversa y más distante filogenéticamente que las condiciones microclimáticas de otros períodos del año y que las comunidades bacterianas tuvieron un perfil general tolerante a la temperatura y a la sequía. Estas evidencias apoyaron la hipótesis de que las particulares condiciones del clima Mediterráneo, con fuertes cambios estacionales en la temperatura y en la disponibilidad del agua, pero también caracterizados por condiciones ambientales extremas en verano, estaban actuando como una fuerza potente sobre la comunidad microbiana, seleccionando fenotipos adaptados a las condiciones semiáridas que caracterizan a los ecosistemas Mediterráneos (Curiel Yuste *et al.* 2012). Esto no ocurrió en el suelo de los pinsapares, lo que nos lleva a conjeturar que los perfiles bacterianos en el suelo de los pinsapares no tienen ese perfil tan termotolerante y tan adaptado a la sequía que parece ser propio de los bosques típicamente mediterráneos (según indican los recientes pero aún escasos estudios en este tipo de sistemas).

Este fuerte efecto de la estacionalidad en la estructura y funcionalidad de la comunidad bacteriana en un bosque de abetos relíctico, originariamente de carácter templado, tiene importancia por un lado a la hora de considerar la fecha del muestreo como un criterio principal a la hora de diseñar protocolos de muestreo para la caracterización de las comunidades bacterianas del suelo en ecosistemas mediterráneos y, por otro, como indicio sobre posibles efectos que, sobre la estructura de la comunidad

bacteriana de bosques templados de coníferas, pudieran tener los incrementos de temperatura y estacionalidad por cambio climático predichos en ese tipo de regiones (IPC 2014).

Por otra parte, las diferencias observadas entre los compartimentos H (capas L y F) y Ah (horizonte organomineral) de pinsapares con diferente disponibilidad de N concuerdan, a su vez, con recientes estudios de adición de N en campo en los que se registraron diferencias en la estructura de la comunidad bacteriana entre los horizontes orgánico y mineral del suelo (Campbell *et al.* 2010; Fierer *et al.* 2012; Swathi Anuradha Turlapati 2015), siendo la comunidad microbiana del horizonte orgánico la que experimentó mayores cambios después de la fertilización con N (Fierer *et al.* 2012; Swathi Anuradha Turlapati 2015). En este caso de comparación entre compartimentos del suelo, nuestro estudio sí arrojó concordancia entre diferencias respecto a la estructura de la comunidad bacteriana, y respecto a la riqueza específica (S) y a los índices de diversidad ( $H'$ , 1-D), con mayores valores en general en el compartimento H que en el Ah (Tukey,  $p < 0,05$ ; Tabla III.11).

En relación con los efectos de la disponibilidad de N, el primer componente principal (CP1) mostró un fuerte efecto de segregación debido a diferencias entre sitios de estudio (CP1 también discriminó en función de la estacionalidad, pero no de la litología). Así, la segregación fue significativa para los efectos debidos a diferencias de disponibilidad de N, bien fuera esta atribuible al estado sucesional (Y vs R) o a las distintas tasas de deposición de N (Y vs BP). De hecho, el %C, el %N y la relación C/N en el suelo se correlacionaron de forma considerable y significativa ( $r > -0,6$ ,  $p < 0,05$ ) con el primer componente principal (Tabla III.21). Todo ello sugiere que la diferente disponibilidad de N en el suelo (por diferencias de estado sucesional o de deposición atmosférica) es el principal factor determinante de las variaciones observadas en la estructura de la comunidad bacteriana del suelo.

Nuestros resultados son coherentes con lo observado en otros estudios, ya que está bien establecido mediante experimentos de adición de N, que el enriquecimiento en N puede alterar la composición de la comunidad bacteriana del suelo (Frey *et al.* 2004; Waldrop *et al.* 2004; Nemergut *et al.* 2008; Krumins *et al.* 2009; Eisenlord y Zak 2010; Campbell *et al.* 2010; Weand *et al.* 2010; Zak *et al.* 2011; Fierer *et al.* 2012;

Ramirez *et al.* 2012; Freedman *et al.* 2013; Cederlund *et al.* 2014; Turlapati *et al.* 2015). La mayor parte de estos estudios son experimentos de fertilización en campo en bosques templados, pero recientemente se ha realizado un experimento de adición de N en laboratorio que incluye un amplio rango de suelos de distintos ecosistemas en los que se incluye un suelo de matorral mediterráneo y en el que también se observó ese patrón (Ramírez *et al.* 2012).

Pero el enriquecimiento en N no sólo influencia la composición de la comunidad microbiana, sino que también tiene un fuerte impacto en la dinámica del C mediada por los microorganismos, ya que el enriquecimiento en N típicamente desciende la actividad microbiana (Zak *et al.* 2011; Ramirez *et al.* 2012; Cederlund *et al.* 2014), estando la magnitud de la reducción de la respiración y de la biomasa microbiana fuertemente relacionada con la duración y la cantidad de N añadido al ecosistema (Treseder 2008; Janssens *et al.* 2010) y siendo esta reducción de la respiración del suelo independiente de la forma de N añadido (Ramirez, Craine, y Fierer 2010). En nuestro estudio, la tasa de respiración también mostró una fuerte correlación inversa ( $r=-0,74$ ,  $p<0,05$ ) con el CP1 (Tabla III.20), eje que separó significativamente los pinsapares con mayor disponibilidad de N de los de menor disponibilidad de N. En general, se encontró una menor respiración en suelos más ricos en N.

Asimismo, las actividades enzimáticas microbianas pueden ser altamente sensibles a incrementos en N, especialmente aquellas enzimas que degradan compuestos complejos de C (Sinsabaugh *et al.* 2002; Waldrop y Zak 2006). Además, Craine *et al.* (2007) encontraron que las adiciones de N disminuyeron la mineralización de C recalcitrante, causando un declive general en las tasas de descomposición del suelo. Esta supresión de la actividad microbiana comúnmente observada bajo el enriquecimiento en N podría ser considerada de algún modo contraria al sentido común, dado que la productividad de las plantas generalmente incrementa con la adición de N (Gough *et al.* 2000) tal y como indica la teoría tradicional de limitación de nutrientes (Vitousek y Howarth, 1991). Esta teoría establece que el N limita la productividad en ecosistemas forestales y que la mineralización del N controla la disponibilidad de otros nutrientes. Según esta teoría cabría esperar que la mayor disponibilidad de N en el suelo propiciase una mayor mineralización del N y una descomposición de la hojarasca más rápida (Gadgil y Gadgil 1978, Hunt *et al.* 1988).

Dado que la teoría tradicional de limitación de nutrientes no explica el declive en la actividad microbiana del suelo frente a incrementos de disponibilidad de N, se han propuesto una serie de hipótesis para explicar esta paradoja. Por ejemplo, las adiciones de N pueden tener efectos indirectos en las comunidades microbianas mediante la alteración de la composición de la comunidad vegetal y/o los tipos de entradas de C vegetal a los suelos, reduciendo los niveles de actividad microbiana (Meier y Bowman 2008). Otra hipótesis involucra los cambios en la fisiología microbiana y/o en la composición de la comunidad microbiana inducidos por la adición de N, que están directamente asociados con el incremento en la disponibilidad de N. Por ejemplo, la hipótesis de la inhibición enzimática propone que las adiciones de N directamente inhiben aquellas enzimas necesarias para la descomposición del C recalcitrante (e.g., fenoloxidasas), reduciendo por tanto la actividad microbiana en general (Fog 1988; Gallo *et al.* 2004). De forma similar, la hipótesis de la minería del N, sugiere que bajo enriquecimiento en N, los microbios reducen la descomposición de C recalcitrante en respuesta a sus menores requerimientos en N (los microbios ya no ‘explotan’ la materia orgánica recalcitrante para obtener N), resultando en un cambio hacia la descomposición de C lábil y una reducción general en la actividad microbiana (Moorhead y Sinsabaugh 2006; Craine *et al.* 2007).

Una hipótesis similar, la hipótesis copiotrófica, sugiere que las adiciones de N provocan un decremento en las actividades microbianas cambiando directamente la composición de la comunidad microbiana (Fontaine *et al.* 2003; Fierer *et al.* 2007; Ramirez *et al.* 2010a; Ramirez *et al.* 2010b; Fierer *et al.* 2012). Bajo esta teoría, los incrementos en N reducen (directa o indirectamente) la abundancia relativa de taxones oligotróficos (aquellos taxones que son expertos en catabolizar las reservas de C más recalcitrantes) conforme el alivio en la limitación por N permite que taxones más copiotróficos (aquellos taxones que tienen mayores demandas de N y que están más restringidos en sus capacidades catabólicas, especializándose en reservas de C más lábiles) los excluyan por competencia (Ramírez *et al.* 2012). Estos autores, mediante la adición de N y la incubación controlada en laboratorio de un amplio rango de suelos de distintos climas, demostraron que las actividades, biomasa y composición de la comunidad microbiana pueden cambiar independientemente de las alteraciones en la calidad de la hojarasca y de las entradas de C, siendo una respuesta directa al

incremento en N. Los análisis de secuenciación revelaron que con la adición de N hay cambios consistentes a nivel de filo en las comunidades bacterianas de los suelos. Generalmente, *Actinobacteria* y *Firmicutes* (copiotróficos) incrementan en abundancia, y *Acidobacteria* y *Verrucomicrobia* (oligotróficos) disminuyen en abundancia.

Estos descubrimientos son similares a los encontrados en estudios de campo, donde se observaron incrementos y decrementos comparables en los mismos grupos bacterianos (Nemergut *et al.* 2008; Campbell *et al.* 2010; Ramírez *et al.* 2010b; Zak *et al.* 2011). En general, los cambios observados en los experimentos de adición de N apoyan la hipótesis copiotrófica. El hecho de que en nuestro estudio se verificaran cambios en la estructura microbiana del suelo pero no en sus valores de riqueza y diversidad también es consistente con esta hipótesis. Por último, el cambio desde comunidades oligo- a copio-tróficas podría conducir a un incremento en el secuestro de C bajo adiciones de N (Liu y Greaver 2010), mediante mecanismos que implican cambios en la comunidad bacteriana y que son independientes de los cambios en la productividad vegetal inducida por el N (Ramírez *et al.* 2012).

En nuestro estudio también tuvo un efecto importante la litología, segregándose de forma significativa en el CP2 y en el CP3 las muestras de los pinsapares serpentínicos de las de los pinsapares calcícolas. Está bien establecido que el tipo de suelo o de ecosistema tiene un efecto importante en la estructura de las comunidades bacterianas que lo habitan, pero más que el tipo de suelo, son sus características físicoquímicas, en particular el pH, las que controlan la composición, riqueza y diversidad de las comunidades bacterianas del suelo (Fierer y Jackson 2006; Högberg *et al.* 2006). El pH en el suelo de los pinsapares estudiados es más bajo en serpentinas (pH~6) que en calizas (pH~7) (Tabla II.1.B), lo que podría explicar las diferencias a nivel litológico observadas en la estructura de la comunidad bacteriana del suelo. Sin embargo, la relación encontrada entre los indicadores de disponibilidad de N y el CP1 (Tabla III.20) y la correlación significativa ( $r=-0,67$  y  $p<0,0001$ ) entre las coordenadas del CP1 del perfil de la comunidad bacteriana y las coordenadas del CP1 de las variables biogeoquímicas (Figura III.22) indican que los cambios observados en la estructura de la comunidad bacteriana del suelo de los pinsapares estuvieron más influenciados por la disponibilidad de N, ya fuera debida a diferencias sucesionales (Y vs R) o a distintas tasas de deposición de N (BP vs SR), que por diferencias litológicas

(que son recogidas por los CP2 y CP3, pero no por el CP1).

Aunque se encontró que la equitatividad (E) de la comunidad bacteriana del pinsapar maduro fue significativamente menor que la del agradativo, no se encontraron grandes cambios ni en la riqueza específica ni en ninguno de los índices de diversidad ( $H'$ , 1-D) entre pinsapares. Las comunidades bacterianas mostraron una dominancia muy baja (valores de E entre 0,7 y 0,8) para cualquiera de las combinaciones de sitio, compartimento y estación del año (Tabla III.11). Sin embargo, tal y como ya hemos comentado, las huellas dactilares de las comunidades bacterianas resultaron ser claramente distintas. Este resultado es consistente con lo encontrado en estudios de fertilización con N en los que el incremento en las entradas de N provocó cambios en la estructura de las comunidades bacterianas pero no en los índices de diversidad (Fierer *et al.* 2012) o en las abundancias relativas de los genes de bacterias y de hongos (Zak *et al.* 2011), siendo la información proporcionada por los análisis con T-RFLP mucho más completa que un mero índice de diversidad (Hartmann y Widmer 2006).

#### **IV.3.4. Variabilidad en la estructura de la comunidad bacteriana desnitrificante y relaciones estructura/función**

Al igual que en el caso de la comunidad bacteriana, las comunidades desnitrificantes de los distintos pinsapares fueron claramente diferenciadas en función de la localidad, la estación del año y el compartimento del suelo, mediante el uso conjunto de T-RFLP y del análisis de componentes principales (ACP) (Tabla III.16).

La diferenciación encontrada en cuanto a la estación del año es coherente con un reciente estudio en el suelo de un bosque templado, que mostró el control que ejerce la estacionalidad en la disponibilidad de recursos también sobre el gremio de bacterias y de *archaeas* desnitrificantes (Rasche *et al.* 2011). Estos autores observaron que la distribución de C bajo el suelo, junto con las influencias climáticas estacionales, modulan la abundancia de bacterias y *archaeas* nitrificantes y desnitrificantes. Sin embargo, no existen estudios previos de los genes desnitrificantes en ecosistemas forestales mediterráneos, siendo el presente uno de los primeros al respecto.

A pesar de que el primer componente principal (CP1) del ACP de la comunidad desnitrificante segregó los pinsapares sobre serpentinas de los calcícolas, también

encontramos un fuerte efecto de la disponibilidad de N. Así, en el compartimento H de las muestras de primavera encontramos un efecto significativo de la deposición de N (BP vs SR) (Figura III.18.A), mientras que en las de verano fueron claramente distintas las huellas dactilares de la comunidad desnitrificante entre pinsapares con diferente estado sucesional (R vs Y) (Figura III.18.B). En los dos siguientes componentes principales (CP2 y CP3), las coordenadas de pinsapares con distintas tasas de deposición de N también fueron significativamente diferentes (Figura III.17). Por otra parte, los cambios observados en las huellas dactilares de las comunidades desnitrificantes en los pinsapares se correlacionaron con variables indicadoras de disponibilidad de N (Tabla III.21), lo que sugiere que los cambios observados en la estructura de la comunidad desnitrificante también estuvieron influenciados por la diferente disponibilidad de N, ya fuera debida a diferencias sucesionales o a las distintas tasas de deposición de N.

Al contrario de lo ocurrido con la comunidad bacteriana del suelo, los cambios en la estructura de la comunidad desnitrificante sí estuvieron acompañados de cambios en los índices de diversidad. Aunque en general se encontró una mayor diversidad y equitatividad de genes desnitrificantes en el suelo de los pinsapares sobre serpentinas (BP, SR) que en el de los pinsapares calizos (Y, R), se encontró un efecto significativo tanto de la deposición de N como del estado sucesional en los índices calculados en las muestras de suelo de primavera. Así, el valor de los índices casi se duplicó a menores tasas de deposición de N (SR > BP) y en el pinsapar maduro respecto al agradativo (R > Y). También se encontraron mayores valores de equitatividad a menores entradas de N atmosférico en ambos compartimentos.

Los cambios observados en las huellas dactilares de las comunidades desnitrificantes en pinsapares bajo distintas tasas de deposición de N, así como en sus índices de diversidad y equitatividad, con menores valores a mayores tasas de deposición, está en concordancia con lo encontrado recientemente en experimentos de adición de N en ecosistemas forestales templados (Freedman *et al.* 2013). Estos autores encontraron que la deposición de N experimental disminuyó la abundancia y la riqueza de genes en *Archaea* y *Bacteria* que codifican para proteínas clave responsables de la fijación de N, la amonificación, la desnitrificación y la reducción asimilativa del nitrato, además de en los genes que median la nitrificación y la reducción disimilativa del

nitrate. Sin embargo, el grado en que la deposición experimental de N disminuyó la abundancia y la riqueza dependió del sitio de estudio. Así, en los sitios sometidos a tasas relativamente elevadas de deposición de N ambiental (deposición húmeda+seca: 7,6 y 7,8 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) durante una década, no se encontraron efectos en la comunidad desnitrificante. Según estos autores, ello pudo deberse a que los microorganismos previamente expuestos a una deposición ambiental relativamente elevada habrían sido insensibles (o el cambio no detectable) al tratamiento de fertilización de N, o a que dichas comunidades microbianas puedan haberse aclimatado a esta perturbación antropogénica, mientras que en los sitios sometidos a menores tasas de deposición atmosférica de N (deposición húmeda+seca: 3,8 y 5,8 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) no se habría desarrollado esta aclimatación previa.

La forma de N en el suelo y su efecto sobre el pH del mismo desempeñan un papel fundamental en la respuesta de la comunidad microbiana a adiciones de N y puede explicar algunos de los resultados contradictorios que se han observado entre estudios. Por ejemplo, Kandeler *et al.* (2009) no encontraron efectos significativos de la restricción de la deposición de N sobre la abundancia de genes desnitrificantes del suelo de un bosque templado de *Picea abies*. La fertilización de un suelo agrícola sueco con 80 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> como (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> disminuyó el pH del suelo y redujo significativamente la abundancia de los genes narG, nirK, nirS y nosZ, mientras que fertilizantes orgánicos con pH aproximadamente neutro sí la incrementaron excepto para el caso de nirS (Hallin *et al.* 2009). Los niveles de humedad y de C<sub>orgánico</sub> también pueden influenciar la respuesta de la comunidad desnitrificante a la adición de N. Siguiendo a la enmienda de un suelo forestal templado con N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> o N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Szukics *et al.* (2009) incubaron el suelo bajo dos tratamientos de humedad equivalentes a un 40 % o a un 70 % del volumen poroso saturado de agua (WFPS). El mayor número de copias nirK/g<sub>suelo</sub> se obtuvo en los suelos con 70 % WFPS y elevado nivel de C<sub>orgánico</sub> inicial (16 %), lo que se correlacionó significativamente con una mayor actividad nitrato reductasa y emisión de NO, independientemente de la adición de N. El suelo con un menor contenido de C<sub>orgánico</sub> inicial (3,8 %) no mostró diferencias significativas en la abundancia de los genes nirK tras la adición de N, aunque ésta sí indujo una subida significativa en la emisión de NO. Los suelos con bajo contenido en C<sub>orgánico</sub> que no habían sido sometidos a enmienda nitrogenada empezaron a producir NO cuando se

incubaron al 70 % de WFPS. Estos resultados sugieren que la abundancia de *napA*, *nirS* y *nirK* y *nosZ* se incrementa cuando suben las concentraciones de N total y de amonio en el suelo por entradas externas, pero sólo si la humedad, el pH y la disponibilidad de  $C_{orgánico}$  son favorables para que ocurra la desnitrificación (Levy-Booth *et al.* 2014).

Por otra parte, mientras que las tasas de desnitrificación han sido intensamente estudiadas, poco se sabe de como los genes involucrados están influenciados por el medio ambiente del suelo o afectan a las tasas del proceso (Levy-Booth *et al.* 2014). Dado que la enzima nitrito reductasa (NIR) se ha considerado la enzima más importante en el estudio de la ruta de la desnitrificación debido a su papel en la formación de gases nitrogenados (el nitrito es transformado a NO o  $N_2O$  por la NIR), los genes *nirS/K* ha sido utilizados para ligar la comunidad desnitrificante con las emisiones de NO y  $N_2O$  desde el suelo (Braker *et al.* 2000; Bothe *et al.* 2000).

Recientes estudios en bosques templados han encontrado correlaciones entre la actividad nitrito reductasa y la abundancia de genes desnitrificantes *nirS/K*, observándose mayor emisión de  $N_2O$  a mayor abundancia del gen *nirS* (Morales *et al.* 2010; Rasche *et al.* 2011), y mayor emisión de NO a mayor abundancia del gen *nirK* (Szukics *et al.* 2009). En nuestro estudio observamos una correlación de las tasas de desnitrificación potencial o producción de  $N_2O$  con la abundancia de genes *nirK*. Dado que los genes *nirK* y *nirS* son ejemplos de evolución convergente y generalmente no aparecen en el mismo organismo (Levy-Booth *et al.* 2014), no tiene por que existir contradicción entre el hecho de que en este estudio se haya encontrado para los pinsapares correlación de la producción de  $N_2O$  con los genes *nirK*, mientras que en los estudios sobre bosques templados previamente comentados la correlación se encontrara con los genes *nirS/K*.

El análisis de los genes funcionales para la ruta de la desnitrificación revela complejas interacciones entre el ambiente del suelo y la comunidad desnitrificante. Las cantidades de los genes *nirS* y *nirK* están influenciadas por una gama de factores, incluyendo humedad del suelo y temperatura (Szukics *et al.* 2009; Rasche *et al.* 2011), concentración total N (Kandeler *et al.* 2009; Levy-Booth y Winder 2010), la concentración de amonio y de nitrato en el suelo (Morales *et al.* 2010), la concentración de fósforo disponible (P), la materia orgánica del suelo (SOM) (Petersen *et al.* 2012), el

carbono orgánico disuelto (DOC) (Bárta *et al.* 2010) y el pH (Kandeler *et al.* 2009; Bárta *et al.* 2010), todo ello a su vez porque dichas variaciones en condiciones y recursos del suelo pueden seleccionar unos u otros tipos de microorganismos desnitrificantes que porten y/o expresen diferencialmente ambos genes.

Por último, las tendencias principales de variación en la estructura de la comunidad desnitrificante del suelo de los pinsapares se deben a cambios en una fracción pequeña de los OTUs (el 10% del total), al igual que ocurría con la estructura de la comunidad bacteriana.

#### **IV.4. Mecanismos de retención abiótica del nitrato en bosques de *Abies pinsapo***

##### **IV.4.1. Disipación de dudas metodológicas**

Dado que se han planteado dudas acerca de que la detección de retención abiótica de nitrato en los suelos pueda ser espuria, siendo simplemente la consecuencia de una imprecisión metodológica (efecto de interferencias del hierro en las medidas analíticas, que llevan a la sobrestimación de la concentración de  $\text{DO}^{15}\text{N}$  que se calcula substrayendo por diferencia el  $^{15}\text{NO}_3^-$  y el  $\text{TD}^{15}\text{N}$ ; Colman *et al.* 2007), se tuvo especial cuidado de abordar este problema (apartado II.7.3 de Material y Métodos).

Nuestros resultados apoyan que no existe tal problema de interferencia con el hierro en la cuantificación del  $\text{NO}_3^-$  (apartado III.7.2 de Resultados). Por un lado, las concentraciones de hierro soluble fueron bajas en los extractos salinos de los suelos, sugiriendo que la interferencia del Fe en la cuantificación de  $\text{NO}_3^-$  por análisis de inyección en flujo (FIA) es improbable (Tabla III.38). Además, un análisis independiente de extractos de los suelos en agua, utilizando cromatografía iónica (IC), indicó que la cuantificación de  $\text{NO}_3^-$  por FIA estuvo dentro del 7 % de los resultados obtenidos por IC (Figura III.38). Por otra parte, el análisis de las adiciones de un estándar de concentración conocida de  $\text{NO}_3^-$  a los extractos salinos de los suelos, para medir la recuperación de esas cantidades conocidas mediante FIA (Davidson *et al.* 2008), reveló un porcentaje de recuperación del 100 % ( $\pm 3$ ) del  $\text{NO}_3^-$  añadido, siendo aleatorio el término de error del 3 % (Tabla III.39). En contraste, estimamos que un 11–14% del  $^{15}\text{NO}_3^-$  añadido fue recuperado como  $\text{DO}^{15}\text{N}$  en los suelos esterilizados (Tabla III.37). Considerados en conjunto, estos resultados excluyen la posibilidad de que

nuestro cálculo de recuperación del N marcado como  $\text{DO}^{15}\text{N}$  pudiera deberse a un artefacto debido a una cuantificación incompleta del  $\text{NO}_3^-$ .

#### IV.4.2. Destino del $^{15}\text{NO}_3^-$ añadido al suelo

Un alto porcentaje del N marcado añadido fue recuperado como  $\text{NO}_3^-$ , indicando tasas bajas de inmovilización de  $\text{NO}_3^-$  tanto en los suelos de Sierra Bermeja como en los de Yunquera, lo cual es consecuente con nuestra primera hipótesis de que estos suelos sujetos a la estacionalidad típicamente mediterránea exhibirían menores tasas de inmovilización abiótica de  $\text{NO}_3^-$  en comparación con los resultados publicados de bosques más mésicos. Por ejemplo, un 30-60 % del  $^{15}\text{NO}_3^-$  añadido desapareció de la reserva de N inorgánico extraíble de los suelos del Harvard Forest en 15 minutos (Dail *et al.* 2001). Asimismo, existen ejemplos en la literatura de similares pérdidas rápidas de  $^{15}\text{NO}_3^-$ , en suelos del Harvard Forest (Berntson y Aber 2000), en suelos de bosques tropicales (Sotta *et al.* 2008) y en suelos orgánicos (62 %) y minerales (43 %) de un bosque de hayas (Corre *et al.* 2003). No obstante, otros estudios han referido recuperaciones más bajas de  $^{15}\text{NO}_3^-$  (desde no detectables hasta un 10 %) en suelos de bosques tropicales (Hall y Matson 2003; Corre *et al.* 2006).

Colman *et al.* (2007) no encontró evidencias de inmovilización abiótica de  $\text{NO}_3^-$  en una variedad de suelos minerales, aunque sus incubaciones de laboratorio fueron llevadas a cabo con suelos bien mezclados, tamizados y bajo condiciones aeróbicas, lo cual probablemente habría destruido los microsítios anaeróbicos necesarios para la reducción del  $\text{NO}_3^-$  (Davidson *et al.* 2008).

Las tasas de inmovilización de  $^{15}\text{NO}_3^-$  fueron bajas en el pinsapar en comparación con otros estudios pero aún así fueron detectables. En la mayoría de las muestras de suelo de ambos pinsapares, tanto controles como esterilizadas, la recuperación como  $\text{TD}^{15}\text{N}$  de casi el 100% del N marcado añadido indica que una fracción significativa fue recuperada como  $\text{DO}^{15}\text{N}$  (Tabla III.37).

También encontramos una falta de efectos significativos entre tratamientos (suelos vivos vs esterilizados), lo que significa que la transformación del  $^{15}\text{NO}_3^-$  en  $\text{DO}^{15}\text{N}$  observado solo cabe explicarla por un mecanismo de carácter abiótico. Si hubiese existido un proceso biológico, no se habría detectado  $\text{DO}^{15}\text{N}$  en los extractos

de los suelos esterilizados. Como la tasa de retención obtenida fue similar en los suelos de un pinsapar limitado por N y de un pinsapar saturado por N, podemos concluir que la diferente disponibilidad de N entre los suelos analizados no ejerce un papel importante en la modulación de la retención abiótica del  $\text{NO}_3^-$  en el horizonte Ah de los pinsapares bajo nuestras condiciones experimentales.

Una pequeña cantidad de  $^{15}\text{N}$  fue recuperada como  $\text{NH}_4^+$  en las muestras de suelo vivo, lo que sugiere algo de inmovilización biológica y re-mineralización durante el transcurso de las incubaciones de 24 h. También es posible que esta transformación en los suelos vivos hubiera sido debida a una reducción disimilativa de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NH}_4^+$ . Aunque las diferencias fueron pequeñas, esta inmovilización biológica fue estadísticamente superior en el suelo limitado por N de Yunquera, lo cual apoya parcialmente nuestra segunda hipótesis, que las tasas de inmovilización de  $\text{NO}_3^-$  en los suelos sería más baja en el sitio saturado por N (BP) comparado con el sitio limitado por N (Y). Sin embargo, los resultados no apoyaron esta hipótesis respecto a las tasas de inmovilización abiótica de  $\text{NO}_3^-$  en el suelo, las cuales no fueron diferentes entre sitios.

#### **IV.4.3. Factores que afectan a la retención abiótica de $\text{NO}_3^-$**

Otros estudios han referido porcentajes más altos de retención abiótica del  $\text{NO}_3^-$  añadido a muestras del horizonte O (orgánico) de suelos de bosques templados, en comparación con muestras del horizonte A (mineral), sugiriendo que este proceso podría ser más importantes en suelos ricos en C (Dail *et al.* 2001; Perakis y Hedin 2001; Davidson *et al.* 2003; Sotta *et al.* 2008). Nuestro experimento fue llevado a cabo utilizando muestras de suelo de un horizonte Ah (horizonte órgano-mineral) debido a que no existen horizontes O bien diferenciados en los perfiles de suelo de los bosques de *Abies pinsapo*. La falta de un horizonte rico en C y el pH aproximadamente neutro de nuestros suelos, lo que está relacionado con el clima estacionalmente seco, podrían explicar las bajas tasas de retención abiótica registradas en este estudio sobre el caso de los pinsapares. Davidson *et al.* (2003) establecieron la hipótesis de que el DOC conduce la incorporación abiótica del  $\text{NO}_3^-$  a la materia orgánica del suelo mediante los siguientes tres pasos: la materia orgánica del suelo (SOM) reduce el Fe(III) a Fe(II) en micrositios del suelo; el Fe(II) reduce  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  en estos micrositios anaeróbicos; el  $\text{NO}_2^-$  reacciona inmediata y abióticamente con la materia orgánica del suelo (Thorn y

Mikita 2000; Dail *et al.* 2001). La retención abiótica del  $\text{NO}_3^-$  puede depender de la calidad y de la cantidad de SOM además de depender de la disponibilidad de agentes reductores y del estado de N del suelo (Dail *et al.* 2001; Corre *et al.* 2007).

Otros estudios han demostrado que altas tasas de deposición crónica de N pueden reducir la capacidad del suelo para la inmovilización de  $\text{NO}_3^-$ . Berntson y Aber (2000) demostraron que 9 años de altas adiciones de N ( $150 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) redujeron la capacidad del suelo para inmovilizar  $\text{NO}_3^-$  en el Harvard Forest. Corre *et al.* (2007) encontraron que la retención abiótica del  $\text{NO}_3^-$  en la reserva de DON en suelos orgánicos y minerales de bosques de píceas (*Picea abies*) disminuyó a lo largo de un gradiente de enriquecimiento de N (indicado por ratios de N lixiviado:N trascolación).

Nuestros resultados de no efecto del estado de saturación de N en la inmovilización abiótica del  $\text{NO}_3^-$  son contrarios a nuestra hipótesis original, la cual se basaba en la publicación de trabajos previos. Una explicación para esto puede ser que, a pesar de las diferencias en la disponibilidad de N entre nuestros sitios de estudio, las entradas de N son en todo caso moderadas ( $10$  y  $17,6 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  en Yunquera y en Sierra Bermeja-BP, respectivamente) comparadas con el rango ( $26\text{--}32 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) considerado por Corre *et al.* (2007). Mientras estas entradas han sido suficientes en relación a la capacidad de retención de N en Sierra Bermeja para provocar síntomas de saturación de N (las entradas en este pinsapar se encuentran justo en el límite de la carga crítica para la lixiviación de nitrato descrita para ecosistemas mediterráneos), aparentemente no han afectado todavía significativamente la modesta capacidad de retención abiótica registrada en ambos sitios, Sierra Bermeja y Yunquera en la Sierra de las Nieves.

Habíamos esperado tasas bajas de retención de N en suelos bajo estos bosques, debido al clima Mediterráneo, limitado estacionalmente por el agua, y a la ausencia de un horizonte O sustancial, en relación a otras estimaciones publicadas de bosques templados y tropicales, lo cual fue confirmado. Sin embargo, nuestros resultados indicaron que la incorporación abiótica de  $\text{NO}_3^-$  es un mecanismo plausible para la retención de una pequeña fracción de deposición atmosférica de N también en ambientes mediterráneos, como se ha puesto de manifiesto con los suelos de los bosques de *Abies pinsapo*. El mecanismo de inmovilización abiótica de  $\text{NO}_3^-$  permanece

sin confirmar y controvertido (Colman *et al.* 2007; Davidson *et al.* 2008), pero existen evidencias que sugieren que el fenómeno es común, y que la inmovilización abiótica del nitrato ocurre a altas tasas sólo cuando las condiciones ideales de carbono plenamente disponible, minerales reducidos en micrositios anaeróbicos, y un suministro adecuado de nitrato ocurren simultáneamente.

## ***V. Conclusiones***



1. Las entradas de N atmosférico por trascolación en Sierra Bermeja ( $17 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) se corresponden con el umbral de la carga crítica para la lixiviación establecida en la bibliografía para ecosistemas mediterráneos, mientras que en Yunquera son inferiores ( $10 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ), lo que concuerda con el gradiente de deposición de N puesto de manifiesto en los pinsapares trabajos anteriores.

2. Las pérdidas anuales de N por lixiviación, fundamentalmente en forma de nitrato, observadas en los pinsapares se consideran moderadas en Yunquera ( $\sim 11 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) y elevadas en Sierra Bermeja ( $\sim 25 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) en comparación con la información bibliográfica, lo que refleja la mayor disponibilidad de N en el pinsapar de Sierra Bermeja (síntomas de saturación de N). La estacionalidad mediterránea confiere al ciclo del N de los pinsapares un carácter abierto incluso en el caso de pinsapares limitados por N, como es el caso de Yunquera. Sin embargo, en el período primaveral de máxima demanda de N por las plantas apenas se pierde N por lixiviación en el pinsapar que permanece limitado por N ( $< 1 \text{ kg N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1}$ ), mientras que en el saturado se lixivía prácticamente la misma cantidad de N que se lixivía anualmente en el limitado ( $10 \text{ kg N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1}$ ).

3. La variabilidad biogeoquímica observada entre las diversas tipologías de pinsapares analizadas se refleja claramente en cambios en la estructura o *huella dactilar* de la comunidad bacteriana de sus suelos. El principal gradiente que ordena las distintas comunidades bacterianas se relaciona con variaciones entre pinsapares en la disponibilidad de N, independientemente de que tales variaciones se deban a la posición de los pinsapares a lo largo de un gradiente de deposición atmosférica de N o al estado sucesional (mayor disponibilidad de N hacia estados maduros). La litología (serpentinias *versus* sustratos calcáreos) aparece como un segundo factor importante que explica la variabilidad en las comunidades bacterianas en los pinsapares. A estos patrones de variabilidad general se superponen otros a escala intra-parcela (diferencias entre horizontes del suelo) e intra-anual (diferencias entre primavera y verano) cuya magnitud es del mismo orden pero coherente con la que existe entre parcelas.

4. A pesar de que en ecosistemas mediterráneos la nitrificación domina sobre la desnitrificación, el análisis molecular de los genes *nirK* del suelo demuestra que existe

una comunidad de microorganismos desnitrificantes bien estructurada y en estado funcional en los pinsapares, lo que concuerda con la rapidez con la que sus suelos emiten  $N_2O$  al ser incubados con una fuente de C y N disponibles en condiciones óptimas de laboratorio. Aunque en este caso la litología fue un factor de ordenamiento principal, los cambios observados en la estructura de la comunidad desnitrificante están también influenciados por la diferente disponibilidad de N, al igual que ocurre con la comunidad bacteriana en general.

5. El fuerte efecto de la fecha de muestreo (primavera vs verano) en la estructura y funcionalidad de la comunidad de bacterias y desnitrificantes de los pinsapares, destaca la importancia de considerar el factor “estacionalidad” para caracterizar las comunidades edafomicrobiológicas en ecosistemas mediterráneos. Además, ilustra los posibles efectos sobre la estructura de la comunidad microbiana de bosques templados de coníferas de materializarse los incrementos de temperatura y estacionalidad predichos en relación al cambio climático en zonas templadas.

6. La recuperación en el suelo del pinsapar de Yunquera al cabo de un año del ~50 % del  $^{15}N$  añadido indica una capacidad de retención de N relativamente elevada y pone de manifiesto la limitación por N de este ecosistema. No obstante esa cifra es inferior a lo observado en bosques de coníferas limitados por N de Norte América, probablemente debido a la estacionalidad mediterránea propia del pinsapar. Por su parte, los niveles de recuperación del trazador (11-13 %) en el suelo de Sierra Bermeja son ostensiblemente inferiores a los encontrados en bosques templados también saturados o con alta disponibilidad de N, remarcando la mayor sensibilidad y vulnerabilidad de los pinsapares sometidos a mayores tasas de deposición atmosférica de N a desarrollar síntomas de saturación de N.

7. Las tasas de retención abiótica de  $N-NO_3^-$  en suelos de bosques de *Abies pinsapo* son modestas pero detectables, lo que confirma nuestra hipótesis de baja capacidad de inmovilización abiótica en relación a otras estimaciones publicadas de bosques templados y tropicales debido al clima mediterráneo y a la ausencia de un horizonte orgánico sustancial. Nuestros resultados indican que la incorporación abiótica de  $NO_3^-$  es un mecanismo plausible para la retención de una pequeña fracción de deposición

atmosférica de N también en ambientes mediterráneos, como se ha puesto de manifiesto en los pinsapares.

8. Al contrario de lo esperado, la capacidad de retención abiótica de  $\text{N-NO}_3^-$  no disminuyó con la disponibilidad de N del suelo del pinsapar. Puede que la mayor deposición de N en el pinsapar saturado por N no sea lo suficientemente elevada como para haber colmado la capacidad del suelo para inmovilizar abióticamente  $\text{NO}_3^-$ .



## ***VI. Referencias Bibliográficas***



- Aber, J. D. (1992). Nitrogen cycling and nitrogen saturation in temperate forest ecosystems. *Trends in Ecology & Evolution*, 7(7), 220-224.
- Aber, J. D., Goodale, C. L., Ollinger, S. V., Smith, M. L., Magill, A. H., Martin, M. E., Stoddard, J. L. (2003). Is Nitrogen Deposition Altering the Nitrogen Status of Northeastern Forests? *BioScience*, 53(4), 375-389.
- Aber, J. D., Magill, A., McNulty, S. G., Boone, R. D., Nadelhoffer, K. J., Downs, M., & Hallett, R. (1995). Forest biogeochemistry and primary production altered by nitrogen saturation. *Water, Air, and Soil Pollution*, 85(3), 1665-1670.
- Aber, J. D., Nadelhoffer, K. J., Steudler, P., & Melillo, J. M. (1989). Nitrogen Saturation in Northern Forest Ecosystems: Excess nitrogen from fossil fuel combustion may stress the biosphere. *BioScience*, 39(6), 378-386.
- Aber, J., McDowell, W., Nadelhoffer, K., Magill, A., Berntson, G., Kamakea, M., ... Fernandez, I. (1998). Nitrogen Saturation in Temperate Forest Ecosystems. *BioScience*, 48(11), 921-934.
- Aerts, R., & Chapin III, F. S. (1999). The Mineral Nutrition of Wild Plants Revisited: A Re-evaluation of Processes and Patterns. En A. H. F. and D. G. Raffaelli (Ed.), *Advances in Ecological Research* (Vol. 30, pp. 1-67). Academic Press.
- Ågren, G. I., & Bosatta, E. (1988). Nitrogen saturation of terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, 54(3-4), 185-197.
- Alewel, C., Paul, S., Lischeid, G., Küsel, K., & Gehre, M. (2006). Characterizing the Redox Status in Three Different Forested Wetlands with Geochemical Data. *Environmental Science & Technology*, 40(24), 7609-7615.
- Alewel, C., Paul, S., Lischeid, G., & Storck, F. R. (2008). Co-regulation of redox processes in freshwater wetlands as a function of organic matter availability? *The Science of the Total Environment*, 404(2-3), 335-342.
- Allen, E. B., Padgett, P. E., Bytnerowicz, A., & Minnich, R. A. (1996). Nitrogen deposition effects on coastal sage vegetation of southern California. *Ecosystems*.
- Allen, E. B., Sirulnik, L., Egerton-Warburton, L., Kee, S., Bytnerowicz, A., & Padgett, P. E. (2005). Air pollution and vegetation change in California shrublands. En B. E. Kus & Beyers (Eds.), *Planning for Biodiversity: Bringing Research and Management Together. General Technical Reports PSW-GTR-195* (p. 274). Pacific Southwest Research Station, Forest Service, U.S., Department of Agriculture, Albany, CA.
- Anderson, J. P. E. (1982). Soil respiration. En A. L. Page, R. H. Miller, & Keeney (Eds.), *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties* (pp. 831-871). Madison, WI: American Society of Agronomy, Soil Science Society of America.
- Arista, M., Ortiz, P. L., & Talavera, S. (1997). Reproductive isolation of two sympatric subspecies of *Juniperus phoenicea* (Cupressaceae) in southern Spain. *Plant*

- Systematics and Evolution*, 208(3-4), 225-237.
- Asensio, D., Peñuelas, J., Ogaya, R., & Llusà, J. (2007). Seasonal soil and leaf CO<sub>2</sub> exchange rates in a Mediterranean holm oak forest and their responses to drought conditions. *Atmospheric Environment*, 41(11), 2447-2455.
- Asman, W. a. H., Sutton, M. A., & Schjørring, J. K. (1998). Ammonia: emission, atmospheric transport and deposition. *New Phytologist*, 139(1), 27-48.
- Aubert, M., Bureau, F., & Vincelas-Akpa, M. (2005). Sources of spatial and temporal variability of inorganic nitrogen in pure and mixed deciduous temperate forests. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(1), 67-79.
- Avila, A., Rodrigo, A., & Rodà, F. (2002). Nitrogen circulation in a Mediterranean holm oak forest, La Castanya, Montseny, northeastern Spain. *Hydrology and Earth System Sciences*, 6(3), 551-558.
- Azhar, S. E., Verhe, R., Proot, M., Sandra, P., & Verstraete, W. (1986). Binding of nitrite-N on polyphenols during nitrification. *Plant and Soil*, 94(3), 369-382.
- Bárta, J., Melichová, T., Vaněk, D., Pícek, T., & Šantrůčková, H. (2010). Effect of pH and dissolved organic matter on the abundance of nirK and nirS denitrifiers in spruce forest soil. *Biogeochemistry*, 101(1-3), 123-132.
- Beauchamp, E. G., & Drury, C. F. (1991). Ammonium Fixation, Release, Nitrification, and Immobilization in High- and Low-Fixing Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 55(1), 125-129.
- Bergh, J., Linder, S., Lundmark, T., & Elfving, B. (1999). The effect of water and nutrient availability on the productivity of Norway spruce in northern and southern Sweden. *Forest Ecology and Management*, 119(1-3), 51-62.
- Bernal, S., Butturini, A., & Sabater, F. (2002). Variability of DOC and nitrate responses to storms in a small Mediterranean forested catchment. *Hydrology and Earth System Sciences Discussions*, 6(6), 1031-1041.
- Berntson, G. M., & Aber, J. D. (2000). Fast nitrate immobilization in N saturated temperate forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(2), 151-156. [http://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00132-7](http://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00132-7)
- Binkley, D., & Högberg, P. (1997). Does atmospheric deposition of nitrogen threaten Swedish forests? *Forest Ecology and Management*, 92(1-3), 119-152.
- Blake, G. R., & Hartge, K. H. (s. f.). Bulk Density. En A. Klute (Ed.), *Methods of soil analysis. Part 1. Physical and mineralogical methods*. (pp. 363-375). Madison, WI, USA: Soil Science Society of America.
- Blanes, M. C. (2010). *Alternativas de manejo de síntomas de saturación de N en bosques de Abies pinsapo Boiss.: respuesta a la fertilización compensatoria con P*. Universidad de Jaén, Jaén.

- Blanes, M. C., Emmett, B. A., Viñepla, B., & Carreira, J. A. (2012). Alleviation of P limitation makes tree roots competitive for N against microbes in a N-saturated conifer forest: A test through P fertilization and <sup>15</sup>N labelling. *Soil Biology and Biochemistry*, *48*, 51-59.
- Blanes, M. C., Viñepla, B., Merino, J., & Carreira, J. A. (2012). Nutritional status of *Abies pinsapo* forests along a nitrogen deposition gradient: do C/N/P stoichiometric shifts modify photosynthetic nutrient use efficiency? *Oecologia*, *171*(4), 797-808.
- Blanes, M. C., Viñepla, B., Salido, M. T., & Carreira, J. A. (2012). Coupled soil-availability and tree-limitation nutritional shifts induced by N deposition: insights from N to P relationships in *Abies pinsapo* forests. *Plant and Soil*, *366*(1-2), 67-81.
- Bobbink, R., Ashmore, M. R., Braun, S., Fluckiger, W., & van der Wyngaert, I. J. J. (2003). Empirical nitrogen critical loads for natural and semi-naturecosystems: 2002 update. En B. Achermann & R. Bobbink (Eds.), *Empirical critical loads for nitrogen* (pp. 43-170). Berne: Swiss Agency for Environment, Forest and Landscape SAEFL.
- Bobbink, R., & Hettelingh, J. P. (2011). *Review and revision of empirical critical loads and dose-response relationships* (Proceedings of an expert workshop, Noordwijkerhout, 23-25 June 2010) (p. 246). Noordwijkerhout.
- Bobbink, R., Hicks, K., Galloway, J., Spranger, T., Alkemade, R., Ashmore, M., ... De Vries, W. (2010). Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecological Applications*, *20*(1), 30-59.
- Bobbink, R., Hornung, M., & Roelofs, J. G. M. (1998). The effects of air-borne nitrogen pollutants on species diversity in natural and semi-natural European vegetation. *Journal of Ecology*, *86*(5), 717-738.
- Bonilla, D., & Rodà, F. (1992). Soil nitrogen dynamics in a holm oak forest. En F. Romane & J. Terradas (Eds.), *Quercus ilex L. ecosystems: function, dynamics and management* (Vol. 13, pp. 247-257). Springer Netherlands.
- Bonito, G. M., Coleman, D. C., Haines, B. L., & Cabrera, M. L. (2003). Can nitrogen budgets explain differences in soil nitrogen mineralization rates of forest stands along an elevation gradient? *Forest Ecology and Management*, *176*(1), 563-574.
- Borken, W., Davidson, E., Savage, K., Gaudinski, J., & Trumbore, S. (2003). Drying and wetting effects on carbon dioxide release from organic horizons. *Soil Science Society of America Journal*, *67*(6), 1888-1896.
- Borken, W., Savage, K., Davidson, E. A., & Trumbore, S. E. (2006). Effects of experimental drought on soil respiration and radiocarbon efflux from a temperate forest soil. *Global Change Biology*, *12*(2), 177-193.
- Borken, W., XU, Y., Davidson, E. A., & Beese, F. (2002). Site and temporal variation of soil respiration in European beech, Norway spruce, and Scots pine forests.

- Global Change Biology*, 8(12), 1205-1216.
- Bothe, H., Jost, G., Schloter, M., Ward, B. B., & Witzel, K.-P. (2000). Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(5), 673-690.
- Bowden, R. D., Davidson, E., Savage, K., Arabia, C., & Steudler, P. (2004). Chronic nitrogen additions reduce total soil respiration and microbial respiration in temperate forest soils at the Harvard Forest. *Forest Ecology and Management*, 196(1), 43-56.
- Boxman, A. W., Krabbendam, H., Bellemakers, M. J. S., & Roelofs, J. G. M. (1991). Effects of ammonium and aluminium on the development and nutrition of *Pinus nigra* in hydroculture. *Environmental Pollution*, 73(2), 119-136.
- Braker, G., Fesefeldt, A., & Witzel, K.-P. (1998). Development of PCR Primer Systems for Amplification of Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) To Detect Denitrifying Bacteria in Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3769-3775.
- Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A. H., & Tiedje, J. M. (2000). Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) as Functional Markers To Investigate Diversity of Denitrifying Bacteria in Pacific Northwest Marine Sediment Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2096-2104.
- Britton, A. J., & Fisher, J. M. (2010). Terricolous alpine lichens are sensitive to both load and concentration of applied nitrogen and have potential as bioindicators of nitrogen deposition. *Environmental Pollution*, 158(5), 1296-1302.
- Brunner, I., Pannatier, E. G., Frey, B., Rigling, A., Landolt, W., Zimmermann, S., & Dobbertin, M. (2009). Morphological and physiological responses of Scots pine fine roots to water supply in a dry climatic region in Switzerland. *Tree Physiology*, 29(4), 541-550.
- Buckley, D. H., Graber, J. R., & Schmidt, T. M. (1998). Phylogenetic Analysis of Nonthermophilic Members of the Kingdom Crenarchaeota and Their Diversity and Abundance in Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4333-4339.
- Butturini, A., & Sabater, F. (2002). Nitrogen concentrations in a small Mediterranean stream: 1. Nitrate 2. Ammonium. *Hydrology and Earth System Sciences*, 6(3), 539-550.
- Bytnerowicz, A., & Fenn, M. E. (1996). Nitrogen deposition in California forests: A review. *Environmental Pollution*, 92(2), 127-146.
- Cameron, K. C., & Haynes, R. J. (1986). Retention and movement of nitrogen in soils. En R. J. Haynes (Ed.), *Mineral nitrogen in the plant-soil system* (pp. 166-241). Orlando: Academic Press.
- Campbell, B. J., Polson, S. W., Hanson, T. E., Mack, M. C., & Schuur, E. A. G. (2010).

- The effect of nutrient deposition on bacterial communities in Arctic tundra soil. *Environmental Microbiology*, 12(7), 1842-1854.
- Carreira, J. A., Niell, F. X., & Lajtha, K. (1994). Soil nitrogen availability and nitrification in Mediterranean shrublands of varying fire history and successional stage. *Biogeochemistry*, 26(3), 189-209.
- Cederlund, H., Wessén, E., Enwall, K., Jones, C. M., Juhanson, J., Pell, M., ... Hallin, S. (2014). Soil carbon quality and nitrogen fertilization structure bacterial communities with predictable responses of major bacterial phyla. *Applied Soil Ecology*, 84, 62-68.
- Chan, O. C., Yang, X., Fu, Y., Feng, Z., Sha, L., Casper, P., & Zou, X. (2006). 16S rRNA gene analyses of bacterial community structures in the soils of evergreen broad-leaved forests in south-west China. *FEMS Microbiology Ecology*, 58(2), 247-259.
- Collignon, C., Uroz, S., Turpault, M.-P., & Frey-Klett, P. (2011). Seasons differently impact the structure of mineral weathering bacterial communities in beech and spruce stands. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(10), 2012-2022. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.05.008>
- Colman, B. P., Fierer, N., & Schimel, J. P. (2007). Abiotic nitrate incorporation in soil: is it real? *Biogeochemistry*, 84(2), 161-169.
- Compton, J. E., & Boone, R. D. (2002). Soil nitrogen transformations and the role of light fraction organic matter in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(7), 933-943. [http://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00025-1](http://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00025-1)
- Corre, M. D., Beese, F. O., & Brumme, R. (2003). Soil nitrogen cycle in high nitrogen deposition forest: changes under nitrogen saturation and liming. *Ecological Applications*, 13(2), 287-298.
- Corre, M. D., Brumme, R., Veldkamp, E., & Beese, F. O. (2007). Changes in nitrogen cycling and retention processes in soils under spruce forests along a nitrogen enrichment gradient in Germany. *Global Change Biology*, 13(7), 1509-1527.
- Corre, M. D., Dechert, G., & Veldkamp, E. (2006). Soil Nitrogen Cycling following Montane Forest Conversion in Central Sulawesi, Indonesia. *Soil Science Society of America Journal*, 70(2), 359-366.
- Craine, J. M., Morrow, C., & Fierer, N. (2007). Microbial nitrogen limitation increases decomposition. *Ecology*, 88(8), 2105-2113. <http://doi.org/10.1890/06-1847.1>
- Curiel Yuste, J., Baldocchi, D. D., Gershenson, A., Goldstein, A., Misson, L., & Wong, S. (2007). Microbial soil respiration and its dependency on carbon inputs, soil temperature and moisture. *Global Change Biology*, 13(9), 2018-2035.
- Curiel Yuste, J., Barba, J., Fernandez-Gonzalez, A. J., Fernandez-Lopez, M., Mattana, S., Martinez-Vilalta, J., ... Lloret, F. (2012). Changes in soil bacterial community triggered by drought-induced gap succession preceded changes in soil C stocks

- and quality. *Ecology and Evolution*, 2(12), 3016-3031.
- Curiel Yuste, J., Fernandez-Gonzalez, A. J., Fernandez-Lopez, M., Ogaya, R., Penuelas, J., Sardans, J., & Lloret, F. (2014). Strong functional stability of soil microbial communities under semiarid Mediterranean conditions and subjected to long-term shifts in baseline precipitation. *Soil Biology and Biochemistry*, 69, 223-233.
- Curiel yuste, J., Janssens, I. A., Carrara, A., & Ceulemans, R. (2004). Annual Q10 of soil respiration reflects plant phenological patterns as well as temperature sensitivity. *Global Change Biology*, 10(2), 161-169.
- Curtis, C. J., Evans, C. D., Goodale, C. L., & Heaton, T. H. E. (2011). What Have Stable Isotope Studies Revealed About the Nature and Mechanisms of N Saturation and Nitrate Leaching from Semi-Natural Catchments? *Ecosystems*, 14(6), 1021-1037.
- Dail, D. B., Davidson, E. A., & Chorover, J. (2001a). Rapid abiotic transformation of nitrate in an acid forest soil. *Biogeochemistry*, 54(2), 131-146.
- Dail, D. B., Davidson, E. A., & Chorover, J. (2001b). Rapid abiotic transformation of nitrate in an acid forest soil. *Biogeochemistry*, 54(2), 131-146.
- Davidson, E. A., Belk, E., & Boone, R. D. (1998). Soil water content and temperature as independent or confounded factors controlling soil respiration in a temperate mixed hardwood forest. *Global Change Biology*, 4(2), 217-227.
- Davidson, E. A., Chorover, J., & Dail, D. B. (2003). A mechanism of abiotic immobilization of nitrate in forest ecosystems: the ferrous wheel hypothesis. *Global Change Biology*, 9(2), 228-236.
- Davidson, E. A., Dail, D. B., & Chorover, J. (2008). Iron interference in the quantification of nitrate in soil extracts and its effect on hypothesized abiotic immobilization of nitrate. *Biogeochemistry*, 90(1), 65-73.
- Davidson, E. A., Hart, S. C., & Firestone, M. K. (1992). Internal cycling of nitrate in soils of a mature coniferous forest. *Ecology*, 73(4), 1148-1156.
- Davidson, E. A., Hart, S. C., Shanks, C. A., & Firestone, M. K. (1991). Measuring gross nitrogen mineralization, and nitrification by 15 N isotopic pool dilution in intact soil cores. *Journal of Soil Science*, 42(3), 335-349.
- Davidson, E. A., & Janssens, I. A. (2006). Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature*, 440(7081), 165-173.
- Davidson, E. A., Savage, K. E., Trumbore, S. E., & Borken, W. (2006). Vertical partitioning of CO<sub>2</sub> production within a temperate forest soil. *Global Change Biology*, 12(6), 944-956.
- Davidson, E., David, M. B., Galloway, J. N., Goodale, C. L., Haeuber, R., Harrison, J. A., ... Ward, M. H. (2012). Excess nitrogen in the US environment: trends, risks, and solutions. *Ecological Society of America. Issues in Ecology*, 15, 1-16.

- D'Elia, C., Steudler, P. A., & Corwin, N. (1976). Determination of total nitrogen in aqueous samples using persulfate digestion. *American Society of Limnology and Oceanography*, 22, 760-764.
- DeLuca, T. H., Zackrisson, O., Gundale, M. J., & Nilsson, M.-C. (2008). Ecosystem Feedbacks and Nitrogen Fixation in Boreal Forests. *Science*, 320(5880), 1181-1181.
- De Schrijver, A., Nachtergale, L., Staelens, J., Luysaert, S., & De Keersmaeker, L. (2004). Comparison of throughfall and soil solution chemistry between a high-density Corsican pine stand and a naturally regenerated silver birch stand. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 131(1), 93-105.
- de Vries, W., Solberg, S., Dobbertin, M., Sterba, H., Laubhann, D., van Oijen, M., ... Sutton, M. A. (2009). The impact of nitrogen deposition on carbon sequestration by European forests and heathlands. *Forest Ecology and Management*, 258(8), 1814-1823.
- Dise, N. B., Matzner, E., & Forsius, M. (1998). Evaluation of organic horizon C:N ratio as an indicator of nitrate leaching in conifer forests across Europe. *Environmental Pollution*, 102(1, Supplement 1), 453-456.
- Dise, N. B., Matzner, E., & Gundersen, P. (1998). Synthesis of Nitrogen Pools and Fluxes from European Forest Ecosystems. *Water, Air, and Soil Pollution*, 105(1-2), 143-154.
- Dise, N. B., Rothwell, J. J., Gauci, V., van der Salm, C., & de Vries, W. (2009). Predicting dissolved inorganic nitrogen leaching in European forests using two independent databases. *The Science of the Total Environment*, 407(5), 1798-1808.
- Dise, N. B., & Wright, R. F. (Eds.). (1992). *The NITREX project (Nitrogen saturation experiments)*. *Ecosystem Research Report*, 2. Brussels: Commission of the European Communities.
- Dise, N. B., & Wright, R. F. (1995). Nitrogen leaching from European forests in relation to nitrogen deposition. *Forest Ecology and Management*, 71(1-2), 153-161.
- Donaldson, J. M., & Henderson, G. S. (1990). Nitrification potential of secondary-succession upland oak forests: I. Mineralization and nitrification during laboratory incubations. *Soil Science Society of America Journal*, 54(3), 892-897.
- Draaijers, G. P. J., Ivens, W. P. M. F., & Bleuten, W. (1988). Atmospheric deposition in forest edges measured by monitoring canopy throughfall. *Water, Air, and Soil Pollution*, 42(1-2), 129-136.
- Driscoll, C. T., Lawrence, G. B., Bulger, A. J., Butler, T. J., Cronan, C. S., Eagar, C., ... Weathers, K. C. (2001). Acidic Deposition in the Northeastern United States: Sources and Inputs, Ecosystem Effects, and Management Strategies. *BioScience*, 51(3), 180-198.
- Driscoll, C. T., Whitall, D., Aber, J., Boyer, E., Castro, M., Cronan, C., ... Ollinger, S.

- (2003). Nitrogen Pollution in the Northeastern United States: Sources, Effects, and Management Options. *BioScience*, 53(4), 357-374.
- Drury, C. F., Voroney, R. P., & Beauchamp, E. G. (1991). Availability of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N to microorganisms and the soil internal N cycle. *Soil Biology and Biochemistry*, 23(2), 165-169.
- EEA. (2010). Critical load exceedance for nitrogen (SEBI 009) - Assessment published May 2010 — European Environment Agency (EEA).
- Eisenlord, S. D., & Zak, D. R. (2010). Simulated Atmospheric Nitrogen Deposition Alters Actinobacterial Community Composition in Forest Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 74(4), 1157.
- Ekschmitt, K., Kandeler, E., Poll, C., Brune, A., Buscot, F., Friedrich, M., ... Wolters, V. (2008). Soil-carbon preservation through habitat constraints and biological limitations on decomposer activity. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 171(1), 27-35.
- EMEP. (2010). *EMEP Report 1/2010. Transboundary Acidification, Eutrophication and Ground Level Ozone in Europe in 2008*. Norwegian Meteorological Institute.
- Emmett, B. A. (2007). Nitrogen Saturation of Terrestrial Ecosystems: Some Recent Findings and Their Implications for Our Conceptual Framework. En P. Brimblecombe, H. Hara, D. Houle, & M. Novak (Eds.), *Acid Rain - Deposition to Recovery* (pp. 99-109). Springer Netherlands. Recuperado a partir de
- Emmett, B. A., Beier, C., Estiarte, M., Tietema, A., Kristensen, H. L., Williams, D., ... Sowerby, A. (2004). The Response of Soil Processes to Climate Change: Results from Manipulation Studies of Shrublands Across an Environmental Gradient. *Ecosystems*, 7(6), 625-637.
- Emmett, B. A., Boxman, D., Bredemeier, M., Gundersen, P., Kjønås, O. J., Moldan, F., ... Wright, R. F. (1998). Predicting the Effects of Atmospheric Nitrogen Deposition in Conifer Stands: Evidence from the NITREX Ecosystem-Scale Experiments. *Ecosystems*, 1(4), 352-360.
- Emmett, B. A., Brittain, S. A., Hughes, S., Görres, J., Kennedy, V., Norris, D., ... Stevens, P. A. (1995). Nitrogen additions (NaNO<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) at Aber forest, Wales: I. Response of throughfall and soil water chemistry. *Forest Ecology and Management*, 71(1-2), 45-59.
- Erismann, J. W., Sutton, M. A., Galloway, J., Klimont, Z., & Winiwarter, W. (2008). How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geoscience*, 1(10), 636-639.
- Falkengren-Grerup, U., & Diekmann, M. (2003). Use of a gradient of N-deposition to calculate effect-related soil and vegetation measures in deciduous forests. *Forest Ecology and Management*, 180(1-3), 113-124.
- Fenn, M. E., Allen, E. B., Weiss, S. B., Jovan, S., Geiser, L. H., Tonnesen, G. S., ...

- Bytnerowicz, A. (2010). Nitrogen critical loads and management alternatives for N-impacted ecosystems in California. *Journal of Environmental Management*, 91(12), 2404-2423.
- Fenn, M. E., Baron, J. S., Allen, E. B., Rueth, H. M., Nydick, K. R., Geiser, L., ... Neitlich, P. (2003). Ecological Effects of Nitrogen Deposition in the Western United States. *BioScience*, 53(4), 404-420.
- Fenn, M. E., Haeuber, R., Tonnesen, G. S., Baron, J. S., Grossman-Clarke, S., Hope, D., ... Sickman, J. O. (2003). Nitrogen Emissions, Deposition, and Monitoring in the Western United States. *BioScience*, 53(4), 391-403.
- Fenn, M. E., Jovan, S., Yuan, F., Geiser, L., Meixner, T., & Gimeno, B. S. (2008). Empirical and simulated critical loads for nitrogen deposition in California mixed conifer forests. *Environmental Pollution*, 155(3), 492-511.
- Fenn, M. E., Lambert, K. F., Blett, T. F., Burns, D. A., Pardo, L. H., Lovett, G. M., ... Jeffries, D. S.; (2011). *Setting limits: Using air pollution thresholds to protect and restore U.S.*
- Fenn, M. E., & Poth, M. A. (1996).; Indicators of nitrogen status in California forests. *Proceedings: Air Pollution and Climate Change Effects on Forest Ecosystems*, 5-9.
- Fenn, M. E., & Poth, M. A.; (1999a). Temporal and spatial trends in streamwater nitrate concentrations in the San Bernardino mountains, southern California. *Journal of Environmental Quality*, 28(3), 822-836.
- Fenn, M. E., & Poth, M. A. (1999b). Temporal and Spatial Trends in Streamwater Nitrate Concentrations in the San Bernardino Mountains, Southern California. *Journal of Environmental Quality*, 28(3), 822-836.
- Fenn, M. E., & Poth, M. A.; (2004). Monitoring nitrogen deposition in throughfall using ion exchange resin columns: a field test in the San Bernardino Mountains. *Journal of Environmental Quality*, 33, 2007-2014.
- Fenn, M. E., Poth, M. A., Aber, J. D., Baron, J. S., Bormann, B. T., Johnson, D. W., ... Stottleyer, R. (1998). Nitrogen excess in north american ecosystems: predisposing factors, ecosystem responses, and management strategies. *Ecological Applications*, 8(3), 706-733.
- Fenn, M. E., Poth, M. A., Bytnerowicz, A., Sickman, J. O., & Takemoto, B. K. (2003). Effects of ozone, nitrogen deposition, and other stressors on montane ecosystems in the Sierra Nevada. En M. J. A. Rocio Alonso Andrzej Bytnerowicz (Ed.), *Developments in Environmental Science* (Vol. 2, pp. 111-155). Elsevier.
- Fenn, M. E., Poth, M. A., & Johnson, D. W. (1996). Evidence for nitrogen saturation in the San Bernardino Mountains in southern California. *Forest Ecology and Management*, 82(1-3), 211-230.
- Fenn, M. E., Poth, M. A., Schilling, S. L., & Grainger, D. B. (2000). Throughfall and

- fog deposition of nitrogen and sulfur at an N-limited and N-saturated site in the San Bernardino Mountains, southern California. *Canadian Journal of Forest Research*, 30(9), 1476-1488.
- Fenn, M. E., Poth, M. A., Terry, J. D., & Blubaugh, T. J. (2005). Nitrogen mineralization and nitrification in a mixed-conifer forest in southern California: controlling factors, fluxes, and nitrogen fertilization response at a high and low nitrogen deposition site. *Canadian Journal of Forest Research*, 35(6), 1464-1486.
- Fenn, M. E., Sickman, J. O., Bytnerowicz, A., Clow, D. W., Molotch, N. P., Pleim, J. E., ... Campbell, D. H.; (2009). Methods for measuring atmospheric nitrogen deposition inputs in arid and montane ecosystems of western North America (pp. 179-228).
- Fenn, M., & Poth, M. A. (1999). Nitrogen deposition and cycling in Mediterranean forests: the new paradigm of nitrogen excess. En P. R. Miller & J. R. McBride (Eds.), *Oxidant Air Pollution Impacts in the Montane Forests of Southern California: a Case Study of the San Bernardino Mountains*. (Vol. 134, pp. 353-372). New York, NY: Springer-Verlag.
- Fernandez, I. J., Simmons, J. A., & Briggs, R. D. (2000). Indices of forest floor nitrogen status along a climate gradient in Maine, USA. *Forest Ecology and Management*, 134(1-3), 177-187.
- Fierer, N., Bradford, M. A., & Jackson, R. B. (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 88(6), 1354-1364.
- Fierer, N., & Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), 626-631.
- Fierer, N., Lauber, C. L., Ramirez, K. S., Zaneveld, J., Bradford, M. A., & Knight, R. (2012). Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *The ISME Journal*, 6(5), 1007-1017. <http://doi.org/10.1038/ismej.2011.159>
- Fife, D. N., & Nambiar, E. K. S. (1997). Changes in the canopy and growth of *Pinus radiata* in response to nitrogen supply. *Forest Ecology and Management*, 93(1-2), 137-152.
- Fisher, R. F., & Binkley, D. (2000). *Ecology and Management of Forest Soils*. John Wiley & Sons.
- Fog, K. (1988). The Effect of Added Nitrogen on the Rate of Decomposition of Organic Matter. *Biological Reviews*, 63(3), 433-462.
- Fontaine, S., Mariotti, A., & Abbadie, L. (2003). The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology and Biochemistry*, 35(6), 837-843.
- Fowler, D., Dragosits, U., Pitcairn, C., Sutton, M. A., Hall, J. R., Roy, D. B., &

- Weidemann, A. (2002). *Deposition of acidity and nitrogen and exposure of terrestrial surfaces to ozone in Scotland: mapping critical loads, critical levels and exceedances*. (Vol. 169). Scottish Natural Heritage.
- Fowler, D., Pyle, J. A., Raven, J. A., & Sutton, M. A. (2013). The global nitrogen cycle in the twenty-first century: introduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1621).
- Frazer, D. W., McColl, J. G., & Powers, R. F. (1990). Soil nitrogen mineralization in a clearcutting chronosequence in a northern California conifer forest. *Soil Science Society of America Journal*, 54(4), 1145–1152.
- Freedman, Z., Eisenlord, S. D., Zak, D. R., Xue, K., He, Z., & Zhou, J. (2013). Towards a molecular understanding of N cycling in northern hardwood forests under future rates of N deposition. *Soil Biology and Biochemistry*, 66(0), 130-138.
- Frey, S. D., Knorr, M., Parrent, J. L., & Simpson, R. T. (2004). Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests. *The Harvard Forest (USA) Nitrogen Saturation Experiment: Results from the First 15 Years*, 196(1), 159-171.
- Gadgil, R. L., & Gadgil, P. D. (1975). Suppression of litter decomposition by mycorrhizal roots of *Pinus radiata*. *New Zealand journal of forestry science*.
- Gallardo, A. (2000). Descomposición de la hojarasca en ecosistemas mediterráneos. En R. Zamora Rodríguez & F. I. Pugnaire (Eds.), *Ecosistemas Mediterráneos. Análisis Funcional. Simposio de la Asociación Española Ecología Terrestre*. Granada: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Gallardo, A., Rodríguez-Saucedo, J. J., Covelo, F., & Fernández-Alés, R. (2000). Soil nitrogen heterogeneity in a Dehesa ecosystem. *Plant and Soil*, 222(1-2), 71-82.
- Gallo, M., Amonette, R., Lauber, C., Sinsabaugh, R. L., & Zak, D. R. (2004). Microbial Community Structure and Oxidative Enzyme Activity in Nitrogen-amended North Temperate Forest Soils. *Microbial Ecology*, 48(2), 218-229.
- Galloway, J. N. (1998). The global nitrogen cycle: changes and consequences. En K. W. V. der Hoek, J. W. Erisman, S. Smeulders, J. R. Wisniewski, & J. Wisniewski (Eds.), *Nitrogen, the Confer-N-s* (pp. 15-24). Amsterdam: Elsevier.
- Galloway, J. N., Aber, J. D., Erisman, J. W., Seitzinger, S. P., Howarth, R. W., Cowling, E. B., & Cosby, B. J. (2003). The Nitrogen Cascade. *BioScience*, 53(4), 341-356.
- Galloway, J. N., & Cowling, E. B. (2002). Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. *Ambio*, 31(2), 64-71.
- Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., ... Vöösmary, C. J. (2004). Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry*, 70(2), 153-226. Galloway, J. N., Leach, A. M., Bleeker, A., & Erisman, J. W. (2013). A chronology of human understanding of the nitrogen cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological*

- Sciences*, 368(1621), 20130120.
- Galloway, J. N., Schlesinger, W. H., Levy, H., Michaels, A., & Schnoor, J. L. (1995). Nitrogen fixation: Anthropogenic enhancement-environmental response. *Global Biogeochemical Cycles*, 9(2), 235-252.
- García-Ruiz, R., Centeno, M. B. H., Cañabate, P. T., Ochoa, M. V., Escobar, C. S., & Fuente, J. A. C. de la. (2012). Disponibilidad, transformación y flujos de nutrientes en el pinsapar. En *Los pinsapares en Andalucía (Abies pinsapo Boiss.): Conservación y sostenibilidad en el siglo XXI* (Vol. Capítulo 20, pp. 337-355). Universidad de Córdoba-Consejería de Medio Ambiente. Sevilla.
- Gardner, W. H. (1986). Water content. En A. L. Klute (Ed.), *Methods of Soil Analysis. Part 1. Physical and mineralogical methods*. (2nd ed., pp. 493-544). Madison, WI: American Society of Agronomy, Soil Science Society of America.
- Gömöryová, E., Ujházy, K., Martinák, M., & Gömöry, D. (2013). Soil microbial community response to variation in vegetation and abiotic environment in a temperate old-growth forest. *Applied Soil Ecology*, 68, 10-19. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.03.005>
- Goodale, C. L., Aber, J. D., & McDowell, W. H. (2000). The Long-term Effects of Disturbance on Organic and Inorganic Nitrogen Export in the White Mountains, New Hampshire. *Ecosystems*, 3(5), 433-450.
- Gough, L., Osenberg, C. W., Gross, K. L., & Collins, S. L. (2000). Fertilization effects on species density and primary productivity in herbaceous plant communities. *Oikos*, 89(3), 428-439.
- Griffiths, R. P., Homann, P. S., & Riley, R. (1998). Denitrification enzyme activity of Douglas-fir and Red Alder Forest soils of the Pacific Northwest. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(8-9), 1147-1157.
- Gundersen, P., Callesen, I., & de Vries, W. (1998a). Nitrate leaching in forest ecosystems is related to forest floor CN ratios. *Environmental Pollution*, 102(1, Supplement 1), 403-407.
- Gundersen, P., Emmett, B. A., Kjønnaas, O. J., Koopmans, C. J., & Tietema, A. (1998b). Impact of nitrogen deposition on nitrogen cycling in forests: a synthesis of NITREX data. *Forest Ecology and Management*, 101(1-3), 37-55.
- Gundersen P (1998). Effects of enhanced nitrogen deposition in a spruce forest at Klosterhede, Denmark, examined by moderate NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> addition. *Forest Ecology and Management* 101:251-268.
- Hackl, E., Zechmeister-Boltenstern, S., Bodrossy, L., & Sessitsch, A. (2004). Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5057-5065.

- Hallin, S., Jones, C. M., Schloter, M., & Philippot, L. (2009). Relationship between N-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment. *The ISME Journal*, 3(5), 597-605.
- Hall, S. J., & Matson, P. A. (2003). Nutrient status of tropical rain forests influences soil n dynamics after n additions. *Ecological Monographs*, 73(1), 107-129.
- Hanson, P. J., O'Neill, E. G., Chambers, M. L. S., Riggs, J. S., Joslin, J. D., & Wolfe, M. H. (2003). Soil Respiration and Litter Decomposition. En P. J. Hanson & S. D. Wullschleger (Eds.), *North American Temperate Deciduous Forest Responses to Changing Precipitation Regimes* (pp. 163-189). Springer New York
- Hartmann, M., & Widmer, F. (2006). Community Structure Analyses Are More Sensitive to Differences in Soil Bacterial Communities than Anonymous Diversity Indices. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7804-7812.
- Hart, S. C., & Stark, J. M. (1997). Nitrogen limitation of the microbial biomass in an old-growth forest soil. *Ecoscience*, 91-98.
- Hart, S. C., Stark, J. M., Davidson, E. A., & Firestone, M. K. (1994a). Nitrogen Mineralization, Immobilization, and Nitrification. En *Methods of Soil Analysis: Part 2—Microbiological and Biochemical Properties* (pp. 985-1018). Madison, WI: Soil Science Society of America.
- Haynes, R. (1986). The decomposition process: mineralization, immobilization, humus formation, and degradation. *Mineral nitrogen in the plant-soil system.*, 52-126.
- He, C.-E., Liu, X., Fangmeier, A., & Zhang, F. (2007). Quantifying the total airborne nitrogen input into agroecosystems in the North China Plain. *Agriculture, ecosystems & environment*, 121(4), 395-400.
- Högberg, M. N., Högberg, P., & Myrold, D. D. (2006). Is microbial community composition in boreal forest soils determined by pH, C-to-N ratio, the trees, or all three? *Oecologia*, 150(4), 590-601.
- Holland, E. A., Braswell, B. H., Lamarque, J.-F., Townsend, A., Sulzman, J., Müller, J.-F., ... Roelofs, G.-J. (1997). Variations in the predicted spatial distribution of atmospheric nitrogen deposition and their impact on carbon uptake by terrestrial ecosystems. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 102(D13), 15849-15866.
- Houlton, B. Z., Sigman, D. M., & Hedin, L. O. (2006). Isotopic evidence for large gaseous nitrogen losses from tropical rainforests. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(23), 8745-8750.
- Hunt, H. W., Ingham, E. R., Coleman, D. C., Elliott, E. T., & Reid, C. P. P. (1988). Nitrogen limitation of production and decomposition in prairie, mountain meadow, and pine forest. *Ecology*, 69(4), 1009-1016.
- Huygens, D., Boeckx, P., Templer, P., Paulino, L., Van Cleemput, O., Oyarzún, C., ... Godoy, R. (2008). Mechanisms for retention of bioavailable nitrogen in volcanic

- rainforest soils. *Nature Geoscience*, 1(8), 543-548.
- IPCC. (2007a). *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (p. 996). Cambridge.
- Irvine, J., & Law, B. (2002). Contrasting soil respiration in young and old-growth ponderosa pine forests. *Global Change Biology*, 8(12), 1183-1194.
- Janssens, I. A., Dieleman, W., Luysaert, S., Subke, J.-A., Reichstein, M., Ceulemans, R., ... Law, B. E. (2010). Reduction of forest soil respiration in response to nitrogen deposition. *Nature Geoscience*, 3(5), 315-322.
- Janssens, I. A., & Pilegaard, K. (2003). Large seasonal changes in Q10 of soil respiration in a beech forest. *Global Change Biology*, 9(6), 911-918.
- Johnson, D. W. (1992). Nitrogen retention in forest soils. *Journal of Environmental Quality*, 21(1), 1-12.
- Johnson, D. W., Cheng, W., & Burke, I. C. (2000). Biotic and Abiotic Nitrogen Retention in a Variety of Forest Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 64(4), 1503-1514.
- Jordan, T. E., Weller, D. E., & Correll, D. L. (1998). Denitrification in surface soils of a riparian forest: Effects of water, nitrate and sucrose additions. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(7), 833-843.
- Kaiser, C., Fuchslueger, L., Koranda, M., Gorfer, M., Stange, C. F., Kitzler, B., ... Richter, A. (2011). Plants control the seasonal dynamics of microbial N cycling in a beech forest soil by belowground C allocation. *Ecology*, 92(5), 1036-1051.
- Kaiser, C., Koranda, M., Kitzler, B., Fuchslueger, L., Schnecker, J., Schweiger, P., ... Richter, A. (2010). Belowground carbon allocation by trees drives seasonal patterns of extracellular enzyme activities by altering microbial community composition in a beech forest soil. *New Phytologist*, 187(3), 843-858.
- Kaiser, K., & Zech, W. (2000). Dissolved organic matter sorption by mineral constituents of subsoil clay fractions. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163(5), 531-535.
- Kandeler, D. D. E. (1996). Potential Nitrification. En D. R. Margesin (Ed.), *Methods in Soil Biology* (pp. 144-161). Springer Berlin Heidelberg. Recuperado a partir de
- Kandeler, E., Brune, T., Enowashu, E., Dörr, N., Guggenberger, G., Lamersdorf, N., & Philippot, L. (2009). Response of total and nitrate-dissimilating bacteria to reduced N deposition in a spruce forest soil profile. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(3), 444-454.
- Kaye, J. P., & Hart, S. C. (1997). Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends in Ecology & Evolution*, 12(4), 139-143.

- Keeney, D. R., & Nelson, D. W. (1982). Nitrogen. Inorganic Forms. En *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties* (pp. 643-699). Madison: Soil Science Society of America.
- Kelly, J. M., & Henderson, G. S. (1978). Effects of nitrogen and phosphorous addition on deciduous litter decomposition. *Soil Science Society of America Journal*, 42, 972-976.
- Kelly, V. R., Lovett, G. M., Weathers, K. C., & Likens, G. E. (2005). Trends in atmospheric ammonium concentrations in relation to atmospheric sulfate and local agriculture. *Environmental Pollution*, 135(3), 363-369.
- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., & Trevors, J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of microbiological methods*, 58(2), 169-188.
- Klemetsson, L., Svensson, B. H., Lindberg, T., & Roswall, T. (1977). The use of acetylene inhibition of nitrous oxide reductase in quantifying denitrification in soils., 7, 179-185.
- Knoepp, J. D., & Swank, W. T. (1998). Rates of nitrogen mineralization across an elevation and vegetation gradient in the Southern Appalachians. *Plant and Soil*, 204, 235-241.
- Kopáček, J., Cosby, B. J., Evans, C. D., Hruška, J., Moldan, F., Oulehle, F., ... Wright, R. F. (2013). Nitrogen, organic carbon and sulphur cycling in terrestrial ecosystems: linking nitrogen saturation to carbon limitation of soil microbial processes. *Biogeochemistry*, 115(1-3), 33-51.
- Koranda, M., Kaiser, C., Fuchslueger, L., Kitzler, B., Sessitsch, A., Zechmeister-Boltenstern, S., & Richter, A. (2013). Seasonal variation in functional properties of microbial communities in beech forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 60(0), 95-104.
- Krumins, J. A., Dighton, J., Gray, D., Franklin, R. B., Morin, P. J., & Roberts, M. S. (2009). Soil microbial community response to nitrogen enrichment in two scrub oak forests. *Forest Ecology and Management*, 258(7), 1383-1390.
- Lamontagne, S., Schiff, S. L., & Elgood, R. J. (2000). Recovery of <sup>15</sup>N-labelled nitrate applied to a small upland boreal forest catchment. *Canadian Journal of Forest Research*, 30(7), 1165-1177.
- Larcher, W. (2000). Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 134(3), 279-295.
- Laughlin, R. J., Stevens, R. J., & Zhuo, S. (1997). Determining Nitrogen-15 in Ammonium by Producing Nitrous Oxide. *Soil Science Society of America Journal*, 61(2), 462-465.
- LeBauer, D. S., & Treseder, K. K. (2008). Nitrogen limitation of net primary

- productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. *Ecology*, 89(2), 371-379.
- Lee, X., Wu, H., Sigler, J., Oishi, C., & Siccama, T. (2004). Rapid and transient response of soil respiration to rain. *Global Change Biology*, 10(6), 1017-1026.
- Lehmann, C. M. B., Bowersox, V. C., & Larson, S. M. (2005). Spatial and temporal trends of precipitation chemistry in the United States, 1985–2002. *Environmental Pollution*, 135(3), 347-361.
- Levy-Booth, D. J., Prescott, C. E., & Grayston, S. J. (2014). Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 75, 11-25.
- Levy-Booth, D. J., & Winder, R. S. (2010). Quantification of Nitrogen Reductase and Nitrite Reductase Genes in Soil of Thinned and Clear-Cut Douglas-Fir Stands by Using Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 7116-7125.
- Liétor, J. (2002). *Patrones de disponibilidad y limitación por nutrientes como indicadores de estado en masas de pinsapar (Abies pinsapo Boiss)*. Universidad de Jaén, Jaén.
- Liétor, J., García-Ruiz, R., Linares, J. C., Fuente, J. A. C. de la, & García, J. M. M. (2003). Relaciones Suelo-Planta en Bosques de Abies pinsapo Boiss. Disponibilidad de Nutrientes y Estatus Nutricional. *Acta botánica malacitana*, (28), 89-104.
- Liétor, J., Ochoa, V., Salido, M. T., García-Ruiz, R., Pérez, B. V., Linares, J. C., ... Fuente, J. A. C. de la. (2002). Variabilidad bioquímica en masas de pinsapar: efecto de la litología y el estado sucesional. *Ecología*, (16), 45-58.
- Likens, G. E., & Bornman, F. H. (1995). *Biogeochemistry of a Forested Ecosystem*. New York, NY: Springer.
- Linares, J. C. (2008). *Efectos del cambio global sobre la dinámica poblacional y la ecofisiología de bosques relictos de Abies pinsapo Boiss*. Universidad de Jaén, Jaén.
- Linares, J. C. (2011). Biogeography and evolution of Abies (Pinaceae) in the Mediterranean Basin: the roles of long-term climatic change and glacial refugia. *Journal of Biogeography*, 38(4), 619-630.
- Linares, J. C., & Carreira, J. A. (2006). El pinsapo, abeto endémico andaluz. O, ¿Qué hace un tipo como tú en un sitio como éste? *Revista Ecosistemas*, 15(3).
- Linares, J. C., & Carreira, J. A. (2009). Temperate-like stand dynamics in relict Mediterranean-fir (Abies pinsapo, Boiss.) forests from southern Spain. *Annals of Forest Science*, 66(6), 610-610. <http://doi.org/10.1051/forest/2009040>
- Lindberg, S. E., Bredemeier, M., Schaefer, D. A., & Qi, L. (1990). Atmospheric

- concentrations and deposition of nitrogen and major ions in conifer forests in the United States and Federal Republic of Germany. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics*, 24(8), 2207-2220.
- Lindberg, S. E., Lovett, G., Richter, D. D., & Johnson. (1986). Atmospheric deposition and canopy interaction of major ions in a forest. *Science*, 231, 141-145.
- Liu, L., & Greaver, T. L. (2010). A global perspective on belowground carbon dynamics under nitrogen enrichment. *Ecology Letters*, 13(7), 819-828.
- Liu, X., Duan, L., Mo, J., Du, E., Shen, J., Lu, X., ... Zhang, F. (2011). Nitrogen deposition and its ecological impact in China: An overview. *Environmental Pollution*, 159(10), 2251-2264.
- Long, X., Chen, C., Xu, Z., Oren, R., & He, J.-Z. (2012). Abundance and community structure of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in a temperate forest ecosystem under ten-years elevated CO<sub>2</sub>. *Soil Biology and Biochemistry*, 46, 163-171.
- Lovett, G. M., & Goodale, C. L. (2011). A New Conceptual Model of Nitrogen Saturation Based on Experimental Nitrogen Addition to an Oak Forest. *Ecosystems*, 14(4), 615-631.
- MacDonald, J. A., Dise, N. B., Matzner, E., Armbruster, M., Gundersen, P., & Forsius, M. (2002). Nitrogen input together with ecosystem nitrogen enrichment predict nitrate leaching from European forests. *Global Change Biology*, 8(10), 1028-1033.
- Magill, A. H., & Aber, J. D. (2000). Variation in soil net mineralization rates with dissolved organic carbon additions. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(5), 597-601. [http://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00186-8](http://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00186-8)
- Magill, A. H., Aber, J. D., Currie, W. S., Nadelhoffer, K. J., Martin, M. E., McDowell, W. H., ... Steudler, P. (2004). Ecosystem response to 15 years of chronic nitrogen additions at the Harvard Forest LTER, Massachusetts, USA. *Forest Ecology and Management*, 196(1), 7-28.
- Magill, A. H., Aber, J. D., Hendricks, J. J., Bowden, R. D., Melillo, J. M., & Steudler, P. A. (1997). Biogeochemical response of forest ecosystems to simulated chronic nitrogen deposition. *Ecological applications*, 7(2), 402-415.
- Magill, A. H., Downs, M. R., Nadelhoffer, K. J., Hallett, R. A., & Aber, J. D. (1996). Forest ecosystem response to four years of chronic nitrate and sulfate additions at Bear Brooks Watershed, Maine, USA. *Forest Ecology and Management*, 84(1-3), 29-37.
- McNulty, S. G., Aber, J. D., McLellan, T. M., & Katt, S. M. (1990). Nitrogen Cycling in High Elevation Forests of the Northeastern US in Relation to Nitrogen Deposition. *Ambio*, 19(1), 38-40.
- McNulty, S. G., Aber, J. D., & Newman, S. D. (1996). Nitrogen saturation in a high

- elevation New England spruce-fir stand. *Forest Ecology and Management*, 84(1), 109-121.
- Meier, C. L., & Bowman, W. D. (2008). Links between plant litter chemistry, species diversity, and below-ground ecosystem function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(50), 19780-19785.
- Meixner, T., Fenn, M., & Poth, M. (2001). Nitrate in Polluted Mountainous Catchments with Mediterranean Climates. *The Scientific World Journal*, 1, 564-571.
- Michalski, G., Meixner, T., Fenn, M., Hernandez, L., Sirulnik, A., Allen, E., & Thiemens, M. (2004). Tracing atmospheric nitrate deposition in a complex semiarid ecosystem using  $\Delta^{17}\text{O}$ . *Environmental science & technology*, 38(7), 2175-2181.
- Miegroet, H. V., Johnson, D. W., & Cole, D. W. (1990). Soil nitrification as affected by N fertility and changes in forest floor C/N ratio in four forest soils. *Canadian Journal of Forest Research*, 20(7), 1012-1019.
- Moldan, F., & Wright, R. F. (2011). Nitrogen leaching and acidification during 19 years of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  additions to a coniferous-forested catchment at Gårdsjön, Sweden (NITREX). *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 159(2), 431-440.
- Moorhead, D. L., & Sinsabaugh, R. L. (2006). A theoretical model of litter decay and microbial interaction. *Ecological Monographs*, 76(2), 151-174.
- Morales, S. E., Cosart, T., & Holben, W. E. (2010). Bacterial gene abundances as indicators of greenhouse gas emission in soils. *The ISME Journal*, 4(6), 799-808.
- Moreno, G., & Gallardo, J. F. (2002). Atmospheric deposition in oligotrophic *Quercus pyrenaica* forests: implications for forest nutrition. *Forest Ecology and Management*, 171(1-2), 17-29.
- Moreno, G., Gallardo, J. F., & Bussotti, F. (2001). Canopy modification of atmospheric deposition in oligotrophic *Quercus pyrenaica* forests of an unpolluted region (central-western Spain). *Forest Ecology and Management*, 149(1-3), 47-60.
- Morier, I., Schleppi, P., Siegwolf, R., Knicker, H., & Guenat, C. (2008).  $^{15}\text{N}$  immobilization in forest soil: a sterilization experiment coupled with  $^{15}\text{C}$ PMAS NMR spectroscopy. *European Journal of Soil Science*, 59(3), 467-475.
- Nadelhoffer, K. J., Colman, B. P., Currie, W. S., Magill, A., & Aber, J. D. (2004). Decadal-scale fates of  $^{15}\text{N}$  tracers added to oak and pine stands under ambient and elevated N inputs at the Harvard Forest (USA). *Forest Ecology and Management*, 196(1), 89-107.
- Nadelhoffer, K. J., Downs, M. R., & Fry, B. (1999a). Sinks for  $^{15}\text{N}$ -enriched additions to an oak forest and a red pine plantation. *Ecological Applications*, 9(1), 72-86.
- Nadelhoffer, K. J., Emmett, B. A., Gundersen, P., Kjønaas, O. J., Koopmans, C. J., Schleppi, P., ... Wright, R. F. (1999b). Nitrogen deposition makes a minor

- contribution to carbon sequestration in temperate forests. *Nature*, 398(6723), 145–148.
- Nadelhoffer, K. J., Downs, M. R., Fry, B., Aber, J. D., Magill, A. H., & Melillo, J. M. (1995). The fate of <sup>15</sup>N-labelled nitrate additions to a northern hardwood forest in eastern Maine, USA. *Oecologia*, 103(3), 292-301.
- Nadelhoffer, K. J., & Fry, B. (1994). Nitrogen isotope studies in forest ecosystems. En K. Latha & Michener (Eds.), *Stable isotopes in ecology and environmental science*. (pp. 22-44). Oxford, UK: Blackwell Scientificl.
- Näsholm, T., Kielland, K., & Ganeteg, U. (2009). Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist*, 182(1), 31-48.
- Navarro, R. M., Fernández, A. L., Oyonarte, P. B., Martínez, C. C., Quintanilla, J. L., Cancio, A. F., ... Salguero, R. S. (2006). Aproximación a la definición del hábitat fisiográfico del «Albies pinsapo» Boiss. en Andalucía. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales*, 15(1), 137-152.
- Nemergut, D. R., Townsend, A. R., Sattin, S. R., Freeman, K. R., Fierer, N., Neff, J. C., ... Schmidt, S. K. (2008). The effects of chronic nitrogen fertilization on alpine tundra soil microbial communities: implications for carbon and nitrogen cycling. *Environmental Microbiology*, 10(11), 3093-3105.
- Nicol, G. W., & Schleper, C. (2006). Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trends in Microbiology*, 14(5), 207-212.
- Nikolova, P. S., Raspe, S., Andersen, C. P., Mainiero, R., Blaschke, H., Matyssek, R., & Häberle, K.-H. (2008). Effects of the extreme drought in 2003 on soil respiration in a mixed forest. *European Journal of Forest Research*, 128(2), 87-98.
- Nilsson, J., & Grennfelt, P. (1988). *Critical loads for sulphur and nitrogen. Report from a workshop held at Skokloster, Sweden, 19-24 March 1988*. Sweden.
- Nommik, H., & Vahtras, K. (1982). *Retention and fixation of ammonium and ammonia in soils*.
- Ochoa-Hueso, R., Allen, E. B., Branquinho, C., Cruz, C., Dias, T., Fenn, M. E., ... Stock, W. D. (2011). Nitrogen deposition effects on Mediterranean-type ecosystems: An ecological assessment. *Environmental Pollution*, 159(10), 2265-2279.
- Ochoa-Hueso, R., Bell, M. D., & Manrique, E. (2014). Impacts of increased nitrogen deposition and altered precipitation regimes on soil fertility and functioning in semiarid Mediterranean shrublands. *Journal of Arid Environments*, 104, 106-115.
- Ochoa-Hueso, R., Maestre, F. T., de los Ríos, A., Valea, S., Theobald, M. R., Vivanco, M. G., ... Bowker, M. A. (2013b). Nitrogen deposition alters nitrogen cycling and reduces soil carbon content in low-productivity semiarid Mediterranean ecosystems. *Environmental Pollution*, 179, 185-193.

- Pardo, L. H., Robin-Abbott, M. J., & Driscoll, C. T. (2011). *Assessment of Nitrogen deposition effects and empirical critical loads of Nitrogen for ecoregions of the United States*.
- Pastor, J., Gardner, R. H., Dale, V. H., & Post, W. M. (1987). Successional changes in nitrogen availability as a potential factor contributing to spruce declines in boreal North America. *Canadian Journal of Forest Research*, 17(11), 1394-1400.
- Patricia Micks, J. D. A. (2004). Short-term soil respiration and nitrogen immobilization response to nitrogen applications in control and nitrogen-enriched temperate forests. *Forest Ecology and Management*, 196(1), 57-70.
- Pennanen, T., Caul, S., Daniell, T. J., Griffiths, B. S., Ritz, K., & Wheatley, R. E. (2004). Community-level responses of metabolically-active soil microorganisms to the quantity and quality of substrate inputs. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(5), 841-848.
- Perakis, S. S., & Hedin, L. O. (2001). Fluxes and fates of nitrogen in soil of an unpolluted old-growth temperate forest, southern Chile. *Ecology*, 82(8), 2245-2260.
- Pérez, C. A., Hedin, L. O., & Armesto, J. J. (1998). Original Articles: Nitrogen Mineralization in Two Unpolluted Old-Growth Forests of Contrasting Biodiversity and Dynamics. *Ecosystems*, 1(4), 361-373.
- Peterjohn, W. T., McGervey, R. J., Sexstone, A. J., Christ, M. J., Foster, C. J., & Adams, M. B. (1998). Nitrous oxide production in two forested watersheds exhibiting symptoms of nitrogen saturation. *Canadian Journal of Forest Research*, 28(11), 1723-1732. <http://doi.org/10.1139/x98-158>
- Petersen, D. G., Blazewicz, S. J., Firestone, M., Herman, D. J., Turetsky, M., & Waldrop, M. (2012). Abundance of microbial genes associated with nitrogen cycling as indices of biogeochemical process rates across a vegetation gradient in Alaska. *Environmental Microbiology*, 14(4), 993-1008.
- Peterson, B. J., & Melillo, J. M. (1985). The potential storage of carbon caused by eutrophication of the biosphere. *Tellus B*, 37B(3), 117-127. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0889.1985.tb00060.x>
- Phoenix, G. K., Hicks, W. K., Cinderby, S., Kuylenskierna, J. C. I., Stock, W. D., Dentener, F. J., ... Ineson, P. (2006). Atmospheric nitrogen deposition in world biodiversity hotspots: the need for a greater global perspective in assessing N deposition impacts. *Global Change Biology*, 12(3), 470-476.
- Potvin, C., & Roff, D. A. (1993). Distribution-Free and Robust Statistical Methods: Viable Alternatives to Parametric Statistics. *Ecology*, 74(6), 1617-1628.
- Prescott, C. E., Chappell, H. N., & Vesterdal, L. (2000). Nitrogen turnover in forest floors of coastal Douglas-fir at sites differing in soil nitrogen capital. *Ecology*, 81(7), 1878-1886.

- Priemé, A., Braker, G., & Tiedje, J. M. (2002). Diversity of Nitrite Reductase (nirK and nirS) Gene Fragments in Forested Upland and Wetland Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1893-1900. <http://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1893-1900.2002>
- Providoli, I., Bugmann, H., Siegwolf, R., Buchmann, N., & Schleppi, P. (2005). Flow of Deposited Inorganic N in Two Gleysol-dominated Mountain Catchments Traced with  $^{15}\text{NO}_3^-$  and  $^{15}\text{NH}_4^+$ . *Biogeochemistry*, 76(3), 453-475.
- Rabe, E., & Lovatt, C. J. (1986). Increased Arginine Biosynthesis during Phosphorus Deficiency 1. *Plant Physiology*, 81(3), 774-779.
- Radulovich, R., & Sollins, P. (1987). Improved Performance of Zero-Tension Lysimeters 1. *Soil Science Society of America Journal*, 51(5), 1386.
- Raich, J., Riley, R., & Vitousek, P. (1994). Use of root-ingrowth cores to assess nutrient limitations in forest ecosystems. *Canadian Journal of Forest Research*, 24(10), 2135-2138.
- Ramirez, K. S., Craine, J. M., & Fierer, N. (2010). Nitrogen fertilization inhibits soil microbial respiration regardless of the form of nitrogen applied. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), 2336-2338.
- Ramirez, K. S., Craine, J. M., & Fierer, N. (2012). Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. *Global Change Biology*, 18(6), 1918-1927. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2012.02639.x>
- Ramirez, K. S., Lauber, C. L., Knight, R., Bradford, M. A., & Fierer, N. (2010). Consistent effects of nitrogen fertilization on soil bacterial communities in contrasting systems. *Ecology*, 91(12), 3463-3470. <http://doi.org/10.1890/10-0426.1>
- Rao, A. C. S., Smith, J. L., Papendick, R. I., & Parr, J. F. (1991). Influence of Added Nitrogen Interactions in Estimating Recovery Efficiency of Labeled Nitrogen. *Soil Science Society of America Journal*, 55(6), 1616-1621.
- Rasche, F., Knapp, D., Kaiser, C., Koranda, M., Kitzler, B., Zechmeister-Boltenstern, S., ... Sessitsch, A. (2011). Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest. *The ISME Journal*, 5(3), 389-402.
- Reichstein, M., Tenhunen, J. D., Roupsard, O., Ourcival, J., Rambal, S., Miglietta, F., ... Valentini, R. (2002). Severe drought effects on ecosystem CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O fluxes at three Mediterranean evergreen sites: revision of current hypotheses? *Global Change Biology*, 8(10), 999-1017. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2486.2002.00530.x>
- Rennenberg, H., Dannenmann, M., Gessler, A., Kreuzwieser, J., Simon, J., & Papen, H. (2009). Nitrogen balance in forest soils: nutritional limitation of plants under climate change stresses. *Plant Biology*, 11, 4-23.

- Rey, A., Pegoraro, E., Tedeschi, V., De Parri, I., Jarvis, P. G., & Valentini, R. (2002). Annual variation in soil respiration and its components in a coppice oak forest in Central Italy. *Global Change Biology*, 8(9), 851-866.
- Riggan, P. J., Lockwood, R. N., & Lopez, E. N. (1985). Deposition and processing of airborne nitrogen pollutants in Mediterranean-type ecosystems of southern California. *Environmental Science & Technology*, 19(9), 781-789.
- Rodà, F., Avila, A., & Rodrigo, A. (2002a). Nitrogen deposition in Mediterranean forests. *Environmental Pollution*, 118(2), 205-213.
- Rodà, F., Avila, A., & Rodrigo, A. (2002b). Nitrogen deposition in Mediterranean forests. *Environmental Pollution*, 118(2), 205-213.
- Rodrigo, A., Àvila, A., & Rodà, F. (2003). The chemistry of precipitation, throughfall and stemflow in two holm oak (*Quercus ilex* L.) forests under a contrasted pollution environment in NE Spain. *Science of The Total Environment*, 305(1-3), 195-205.
- Roelofs, J. G. M., Kempers, A. J., Houdijk, A. L. F. M., & Jansen, J. (1985). The effect of air-borne ammonium sulphate on *Pinus nigra* var. *maritima* in the Netherlands. *Plant and Soil*, 84(1), 45-56.
- Rosuá, J. L., López de Hierro, L., Martín, J. C., Serrano, F. A., & Sánchez, A. (2001). *Procedencias de las especies vegetales autóctonas de Andalucía utilizadas en restauración de la cubierta vegetal*. Publicaciones de la Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.
- Rustad, L. E., Campbell, J. L., Marion, G. M., Norby, R. J., Mitchell, M. J., Hartley, A. E., ... Gcte-News. (2001). A Meta-Analysis of the Response of Soil Respiration, Net Nitrogen Mineralization, and Aboveground Plant Growth to Experimental Ecosystem Warming. *Oecologia*, 126(4), 543-562.
- Rutigliano, F. A., Castaldi, S., D'Ascoli, R., Papa, S., Carfora, A., Marzaioli, R., & Fioretto, A. (2009). Soil activities related to nitrogen cycle under three plant cover types in Mediterranean environment. *Applied Soil Ecology*, 43(1), 40-46.
- Salido, M. T. (2007). *Evaluación de estado de saturación de nitrógeno en masas de pinsapar (*Abies pinsapo* Boiss.) del sur de la Península Ibérica: patrones generales de entrada, circulación interna y salida del nitrógeno en el ecosistemal*. Universidad de Jaén, Jaén.
- Sanz, M. J., Carratalá, A., Gimeno, C., & Millán, M. M. (2002). Atmospheric nitrogen deposition on the east coast of Spain: relevance of dry deposition in semi-arid Mediterranean regions. *Environmental Pollution*, 118(2), 259-272.
- Sardans, J., & Peñuelas, J. (2005). Drought decreases soil enzyme activity in a Mediterranean *Quercus ilex* L. forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 455-461.
- Sardans, J., & Peñuelas, J. (2010). Soil Enzyme Activity in a Mediterranean Forest after

- Six Years of Drought. *Soil Science Society of America Journal*, 74(3), 838.
- Sardans, J., Peñuelas, J., & Ogaya, R. (2008). Experimental drought reduced acid and alkaline phosphatase activity and increased organic extractable P in soil in a *Quercus ilex* Mediterranean forest. *European Journal of Soil Biology*, 44(5–6), 509-520.
- Savage, K., & Davidson, E. (2001). Interannual variation of soil respiration in two New England forests. *Global Biogeochemical Cycles*, 15(2), 337-350.
- Schimann, H., Ponton, S., Hättenschwiler, S., Ferry, B., Lensi, R., Domenach, A.-M., & Roggy, J.-C. (2008). Differing nitrogen use strategies of two tropical rainforest late successional tree species in French Guiana: Evidence from <sup>15</sup>N natural abundance and microbial activities. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(2), 487-494.
- Schimel, J. (1995). Ecosystems consequences of microbial diversity and community structure. En F. S. Chapin & C. Korner (Eds.), *Arctic and alpine biodiversity: patterns, causes and consequences* (pp. 239-254). Berlín: Springer-Verlag.
- Schimel, J. P., & Bennett, J. (2004). Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. *Ecology*, 85(3), 591-602.
- Schimel, J. P., Bennett, J., & Fierer, N. (2005). Microbial community composition and soil nitrogen cycling: is there really a connection? *Ecological Reviews*, 171-188.
- Schimel, J. P., & Firestone, M. K. (1989). Nitrogen incorporation and flow through a coniferous forest soil profile. *Soil Science Society of America Journal*, 53(3), 779-784.
- Schindler, D. W., & Bayley, S. E. (1993). The biosphere as an increasing sink for atmospheric carbon: Estimates from increased nitrogen deposition. *Global Biogeochemical Cycles*, 7(4), 717-733.
- Schulze, E.-D., Oren, R., & Lange, O. L. (1989). Nutrient Relations of Trees in Healthy and Declining Norway Spruce Stands. En P. D. E.-D. Schulze, P. D. O. L. Lange, & P. D. R. Oren (Eds.), *Forest Decline and Air Pollution* (pp. 392-417). Springer Berlin Heidelberg.
- Shen, X.-Y., Zhang, L.-M., Shen, J.-P., Li, L.-H., Yuan, C.-L., & He, J.-Z. (2011). Nitrogen loading levels affect abundance and composition of soil ammonia oxidizing prokaryotes in semiarid temperate grassland. *Journal of Soils and Sediments*, 11(7), 1243-1252.
- 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), 1-24.
- Söderström, B., Bååth, E., & Lundgren, B. (1983). Decrease in soil microbial activity and biomasses owing to nitrogen amendments. *Canadian Journal of*

- Microbiology*, 29(11), 1500-1506.
- Sotta, E. D., Corre, M. D., & Veldkamp, E. (2008). Differing N status and N retention processes of soils under old-growth lowland forest in Eastern Amazonia, Caxiuanã, Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(3), 740-750.
- Specht, R. L., & Moll, E. J. (1983). Mediterranean-Type Heathlands and Sclerophyllous Shrublands of the World: An Overview. En F. J. Kruger, P. D. T. Mitchell, & P. J. U. M. Jarvis (Eds.), *Mediterranean-Type Ecosystems* (pp. 41-65). Springer Berlin Heidelberg.
- Stark, J. M., & Hart, S. C. (1996). Diffusion Technique for Preparing Salt Solutions, Kjeldahl Digests, and Persulfate Digests for Nitrogen-15 Analysis. *Soil Science Society of America Journal*, 60(6), 1846-1855.
- Stark, J. M., & Hart, S. C. (1997). High rates of nitrification and nitrate turnover in undisturbed coniferous forests. *Nature*, 385(6611), 61-64.
- Stevenson, F. J. (1986). *Cycles of soils. Carbon, nitrogen phosphorus, sulfur, micronutrients*. New York, NY. Recuperado a partir de
- Stevenson, F. J., & Cole, M. A. (1999). *Cycles of Soils: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients*. John Wiley & Sons.
- Stevens, R. J., & Laughlin, R. J. (1994). Determining Nitrogen-15 in Nitrite or Nitrate by Producing Nitrous Oxide. *Soil Science Society of America Journal*, 58(4), 1108-1116.
- Stoddard, J. L. (1994). Long-term changes in watershed retention of nitrogen. Its causes and aquatic consequences. *Advances in Chemistry[ADV. CHEM. SER.]*. 1994.
- Subke, J.-A., Reichstein, M., & Tenhunen, J. D. (2003). Explaining temporal variation in soil CO<sub>2</sub> efflux in a mature spruce forest in Southern Germany. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(11), 1467-1483.
- Swathi Anuradha Turlapati, R. M. (2015). Oligotyping reveals stronger relationship of organic soil bacterial community structure with N-amendments and soil chemistry in comparison to that of mineral soil at Harvard Forest, MA, USA. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Takemoto, B. K., Bytnerowicz, A., & Fenn, M. E. (2001). Current and future effects of ozone and atmospheric nitrogen deposition on California's mixed conifer forests. *Forest Ecology and Management*, 144(1-3), 159-173.
- Tamm, C. O. (1991). *Nitrogen in terrestrial ecosystems: questions of productivity, vegetational changes, and ecosystem stability*. Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Templer, P. H., Lovett, G. M., Weathers, K. C., Findlay, S. E., & Dawson, T. E. (2005). Influence of Tree Species on Forest Nitrogen Retention in the Catskill Mountains, New York, USA. *Ecosystems*, 8(1), 1-16.

- Templer, P. H., Mack, M. C., III, F. S. C., Christenson, L. M., Compton, J. E., Crook, H. D., ... Zak, D. R. (2012). Sinks for nitrogen inputs in terrestrial ecosystems: a meta-analysis of  $^{15}\text{N}$  tracer field studies. *Ecology*, *93*(8), 1816-1829.
- Tian, X.-F., Hu, H.-W., Ding, Q., Song, M.-H., Xu, X.-L., Zheng, Y., & Guo, L.-D. (2013). Influence of nitrogen fertilization on soil ammonia oxidizer and denitrifier abundance, microbial biomass, and enzyme activities in an alpine meadow. *Biology and Fertility of Soils*, *50*(4), 703-713.
- Tiedje, J. M., Asuming-Brempong, S., Nüsslein, K., Marsh, T. L., & Flynn, S. J. (1999). Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*, *13*(2), 109-122.
- Tietema, A., Emmett, B. A., Gundersen, P., Kjonaas, O. J., & Koopmans, C. J. (1998). The fate of  $^{15}\text{N}$ -labelled nitrogen deposition in coniferous forest ecosystems. *Forest Ecology and Management*, *101*(1-3), 19-27.
- Tilman, D. (1987). Secondary succession and the pattern of plant dominance along experimental nitrogen gradients. *Ecological monographs*, *57*(3), 189-214.
- Torres-Cañabate, P., Davidson, E. A., Bulygina, E., García-Ruiz, R., & Carreira, J. A. (2008). Abiotic immobilization of nitrate in two soils of relic *Abies pinsapo*-fir forests under Mediterranean climate. *Biogeochemistry*, *91*(1), 1-11.
- Townsend, A. R., Braswell, B. H., Holland, E. A., & Penner, J. E. (1996). Spatial and Temporal Patterns in Terrestrial Carbon Storage Due to Deposition of Fossil Fuel Nitrogen. *Ecological Applications*, *6*(3), 806-814.
- Treseder, K. K. (2008). Nitrogen additions and microbial biomass: a meta-analysis of ecosystem studies. *Ecology Letters*, *11*(10), 1111-1120.
- Turlapati, S. A., Minocha, R., Long, S., Ramsdell, J., & Minocha, S. C. (2015). Oligotyping reveals stronger relationship of organic soil bacterial community structure with N-amendments and soil chemistry in comparison to that of mineral soil at Harvard Forest, MA, USA. *Systems Microbiology*, *6*, 49.
- Ulrich, B. (1983). Interaction of Forest Canopies with Atmospheric Constituents:  $\text{SO}_2$ , Alkali and Earth Alkali Cations and Chloride. En B. Ulrich & J. Pankrath (Eds.), *Effects of Accumulation of Air Pollutants in Forest Ecosystems* (pp. 33-45). Springer Netherlands. Recuperado a partir de
- UNEP Annual Report 2005. (2005).
- UNEP, & WHRC. (2007). *Reactive Nitrogen in the Environment: Too Much Or Too Little of a Good Thing*. (E. A. Davidson, C. Arden-Clarke, & E. Braun, Eds.). Paris, France: The United Nations Environment Programme.
- van Dijk, H. F. G., & Roelofs, J. G. M. (1988). Effects of excessive ammonium deposition on the nutritional status and condition of pine needles. *Physiologia Plantarum*, *73*(4), 494-501.

- Van Miegroet, H., Cole, D., & Foster, N. (1992). Nitrogen Distribution and Cycling. *Atmospheric Deposition and Nutrient Cycling in Forest Ecosystems -- A Synthesis of the Integrated Forest Study*, 178-196.
- Van Miegroet, H., & Johnson, D. (1993). Nitrate Dynamics in Forest Soils. En T. P. Burt, A. L. Heathwaite, & Trudgill (Eds.), *Nitrate: Process, Patterns, and Management* (pp. 76-97).
- Viñebla, B., García-Ruiz, R., Liétor, J., Ochoa, V., & Carreira, J. A. (2006a). Soil Phosphorus Availability and Transformation Rates in Relictic Pinsapo Fir Forests from Southern Spain. *Biogeochemistry*, 78(2), 151-172.
- Viñebla, B., García-Ruiz, R., Liétor, J., Ochoa, V., & Carreira, J. A. (2006b). Soil Phosphorus Availability and Transformation Rates in Relictic Pinsapo Fir Forests from Southern Spain. *Biogeochemistry*, 78(2), 151-172.
- Vitousek, P. (1982). Nutrient cycling and nutrient use efficiency. *American Naturalist*, 553-572.
- Vitousek, P. M., & Howarth, R. W. (1991). Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry*, 13(2), 87-115.
- Vitousek, P. M., Matson, P. A., & Cleve, K. V. (1989). Nitrogen availability and nitrification during succession: Primary, secondary, and old-field seres. *Plant and Soil*, 115(2), 229-239.
- Vitousek, P. M., Menge, D. N. L., Reed, S. C., & Cleveland, C. C. (2013). Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 368(1621), 20130119.
- Vitousek, P. M., & Reiners, W. A. (1975). Ecosystem Succession and Nutrient Retention: A Hypothesis. *BioScience*, 25(6), 376-381.
- Vourlitis, G. L., Pasquini, S. C., & Mustard, R. (2009). Effects of Dry-Season N Input on the Productivity and N Storage of Mediterranean-Type Shrublands. *Ecosystems*, 12(3), 473-488.
- Vourlitis, G. L., Pasquini, S., & Zorba, G. (2007). Plant and Soil N Response of Southern Californian Semi-arid Shrublands After 1 Year of Experimental N Deposition. *Ecosystems*, 10(2), 263-279.
- Vourlitis, G. L., & Zorba, G. (2006). Nitrogen and carbon mineralization of semi-arid shrubland soil exposed to long-term atmospheric nitrogen deposition. *Biology and Fertility of Soils*, 43(5), 611-615.
- Vourlitis, G. L., Zorba, G., Pasquini, S. C., & Mustard, R. (2007). Carbon and nitrogen storage in soil and litter of southern Californian semi-arid shrublands. *Journal of Arid Environments*, 70(1), 164-173.
- Vries, W. de, Reinds, G. J., Salm, C. van der, Dobben, H. F. van, Erisman, J. W., Zwart,

- D., ... Haussmann, T. (2003). Results on nitrogen impacts in the EC and UNECE ICP forests programme. En B. Achermann & R. Bobbink (Eds.), (pp. 199-207). Presentado en Empirical critical loads for nitrogen; expert workshop, Berne, 11-13 November 2002; proceedings, SAEFL.
- Wachendorf, C., Taube, F., & Wachendorf, M. (2005). Nitrogen Leaching from <sup>15</sup>N Labelled Cow Urine and Dung Applied to Grassland on a Sandy Soil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 73(1), 89-100.
- Waldrop, M. P., & Zak, D. R. (2006). Response of Oxidative Enzyme Activities to Nitrogen Deposition Affects Soil Concentrations of Dissolved Organic Carbon. *Ecosystems*, 9(6), 921-933.
- Waldrop, M. P., Zak, D. R., & Sinsabaugh, R. L. (2004). Microbial community response to nitrogen deposition in northern forest ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(9), 1443-1451.
- Waring, R. H., & Running, S. W. (1998). Forest ecosystems: analysis at multiple scales.
- Weand, M. P., Arthur, M. A., Lovett, G. M., McCulley, R. L., & Weathers, K. C. (2010). Effects of tree species and N additions on forest floor microbial communities and extracellular enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), 2161-2173.
- Weathers, K. C., & Lynch, J. A. (2011). Deposition. En L. H. Pardo, M. J. Robin-Abbott, & C. T. Driscoll (Eds.), *Assessment of Nitrogen deposition effects and empirical critical loads of Nitrogen for ecoregions of the United States. General Technical Report NRS-80* (pp. 15-24). Northern Research Station, Newtown Square, Pennsylvania, USA.: USDA Forest Service.
- Wertz, S., Leigh, A. K. K., & Grayston, S. J. (2012). Effects of long-term fertilization of forest soils on potential nitrification and on the abundance and community structure of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(1), 142-154.
- Wilhelm, E., Battino, R., & Wilcock, R. J. (1977). Low-pressure solubility of gases in liquid water. *Chemical Reviews*, 77(2), 219-262.
- Wolf, D., & Skipper. (1994). Soil sterilization. En R. W. Weaver, S. Angle, & P. Bottomley (Eds.), *Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties* (pp. 41-51). Madison, WI: Soil Science Society of America.
- Xu, M., & Qi, Y. (2001). Soil-surface CO<sub>2</sub> efflux and its spatial and temporal variations in a young ponderosa pine plantation in northern California. *Global Change Biology*, 7(6), 667-677.
- Zak, D. R., Blackwood, C. B., & Waldrop, M. P. (2006). A molecular dawn for biogeochemistry. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(6), 288-295.
- Zak, D. R., Pregitzer, K. S., Burton, A. J., Edwards, I. P., & Kellner, H. (2011).

Microbial responses to a changing environment: implications for the future functioning of terrestrial ecosystems. *Decomposition in Forest Ecosystems*, 4(6), 386-395.

Zak, D. R., Pregitzer, K. S., Holmes, W. E., Burton, A. J., & Zogg, G. P. (2004). Anthropogenic N Deposition and the Fate of  $^{15}\text{NO}_3^-$  in a Northern Hardwood Ecosystem. *Biogeochemistry*, 69(2), 143-157.

Zogg, G. P., Zak, D. R., Pregitzer, K. S., & Burton, A. J. (2000). Microbial immobilization and the retention of anthropogenic nitrate in a northern hardwood forest. *Ecology*, 81(7), 1858-1866.

## ***VII. Anexo-Material Suplementario***



**Tabla VII. 1. Efectos de los factores compartimento, sitio y estación del año sobre las concentraciones en distintas fracciones y tasas de transformación del N (apartado III.1.2.). ANOVA de medidas repetidas.**

	%N	%C	C/N	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ni	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	TDP	TPN	TR
compartimento	***	***	***	***	***	***	n.s.	***	n.s.	***
sitio	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
sitio*compartimento	***	**	n.s.	**	n.s.	*	***	n.s.	***	n.s.
estación del año	n.s.	n.s.	n.s.	***	***	***	n.s.	***	n.s.	***
estación del año*compartimento	*	n.s.	n.s.	***	n.s.	**	**	n.s.	*	***
estación del año*sitio	n.s.	n.s.	n.s.	***	***	***	***	*	*	**
estación del año*sitio*compartimento	n.s.	n.s.	**	*	***	***	n.s.	*	n.s.	*

Niveles de significación: ns: p>0,05; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

TDP: Tasa de desnitrificación potencial

TPN: Tasa potencial de nitrificación

TR: Tasa de respiración

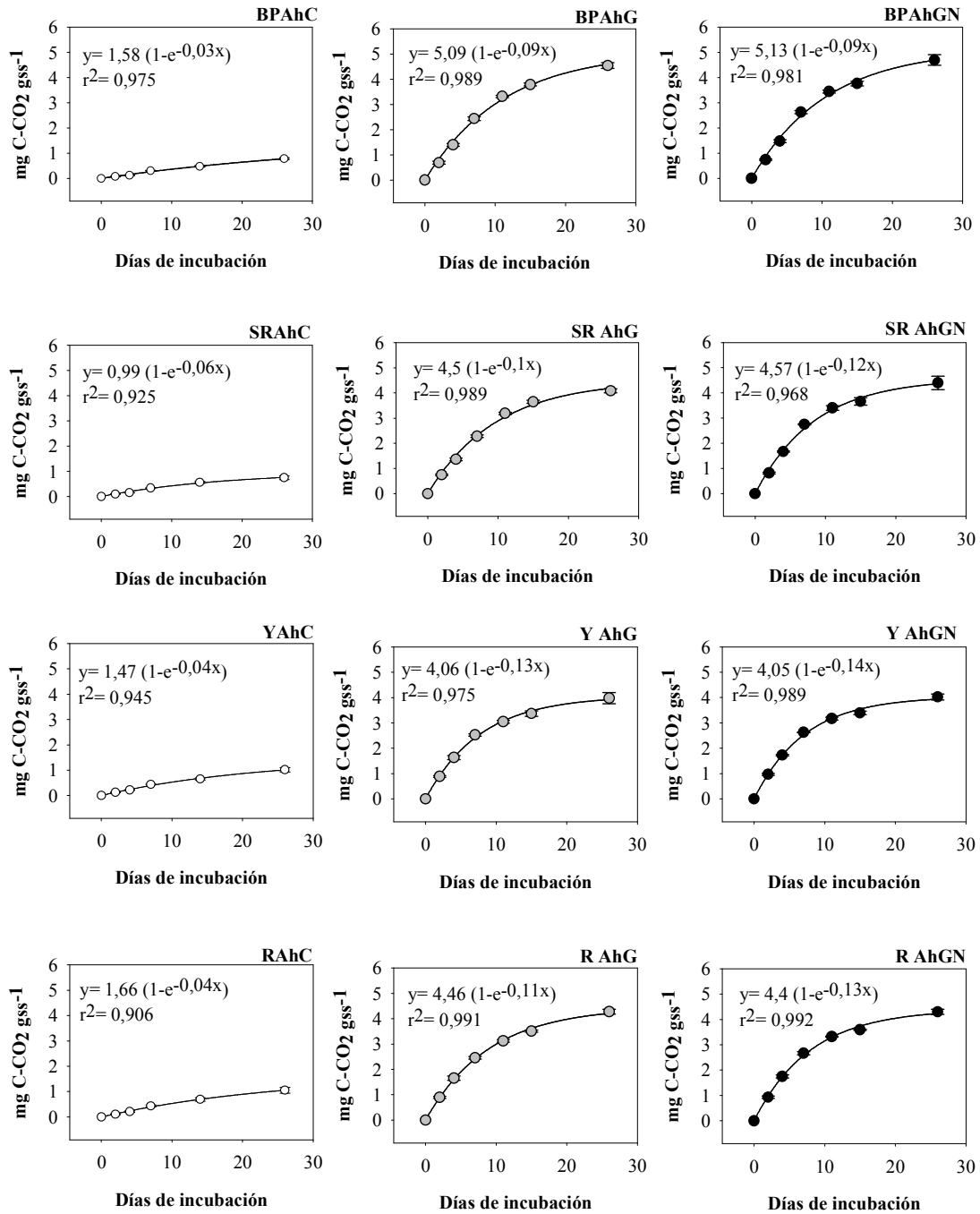


Figura VII. 1. Curvas de regresión,  $y = a (1 - e^{-bx})$  del CO<sub>2</sub> producido a lo largo del período de incubación (mg C-CO<sub>2</sub> g suelo seco<sup>-1</sup>) en los controles (C), tratamientos con glucosa (G) y tratamientos con glucosa y nitrato (G+N) de las muestras del compartimento Ah del suelo de los cuatro pinsapares de estudio. Las barras verticales indican el error estándar.

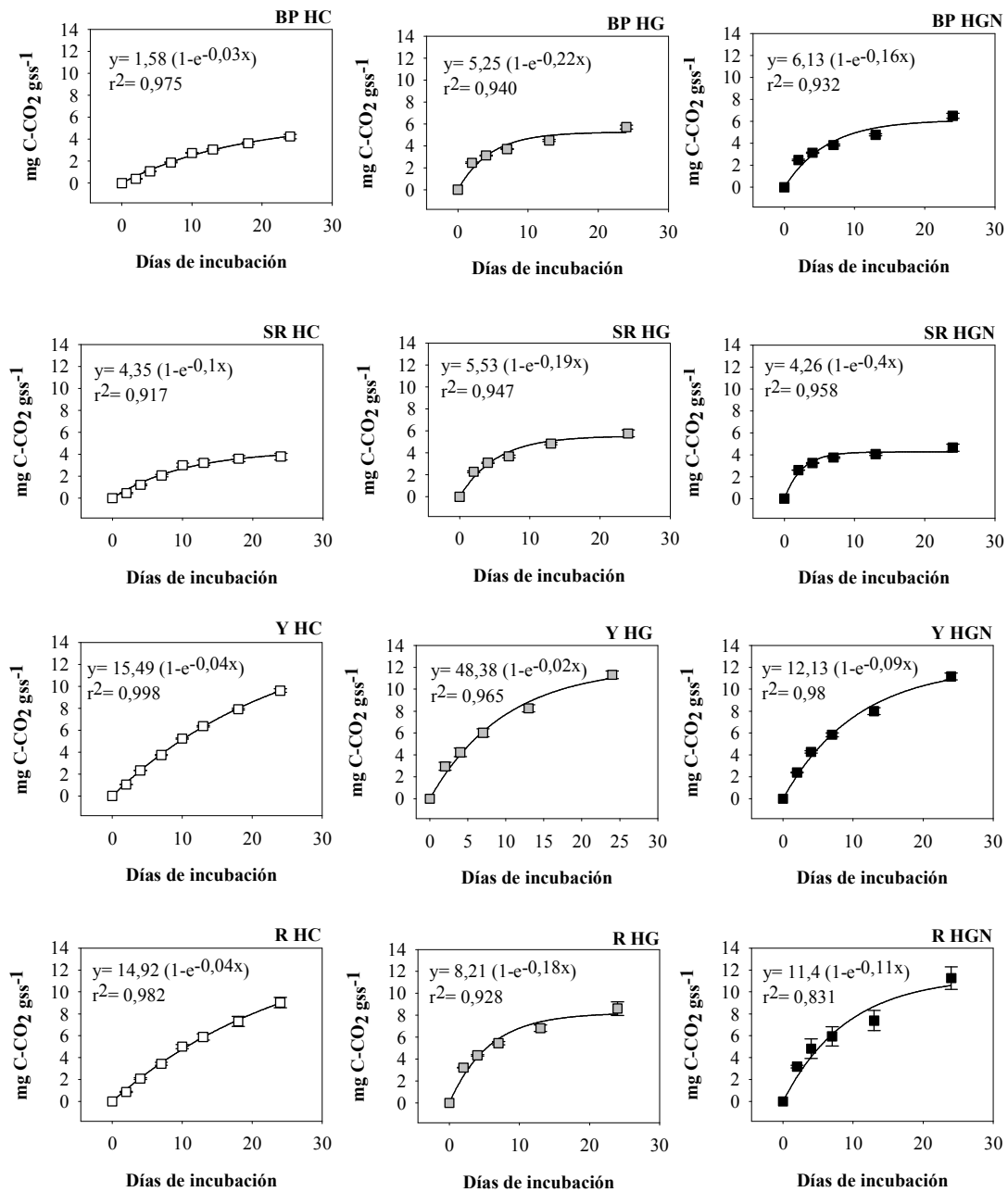


Figura VII. 2. Curvas de regresión,  $y = a (1 - e^{-bx})$  del CO<sub>2</sub> producido a lo largo del período de incubación (mg C-CO<sub>2</sub> g suelo seco<sup>-1</sup>) en los controles (C), tratamientos con glucosa (G) y tratamientos con glucosa y nitrato (G+N) de las muestras del compartimento H del suelo de los cuatro pinsapares de estudio. Las barras verticales indican el error estándar.

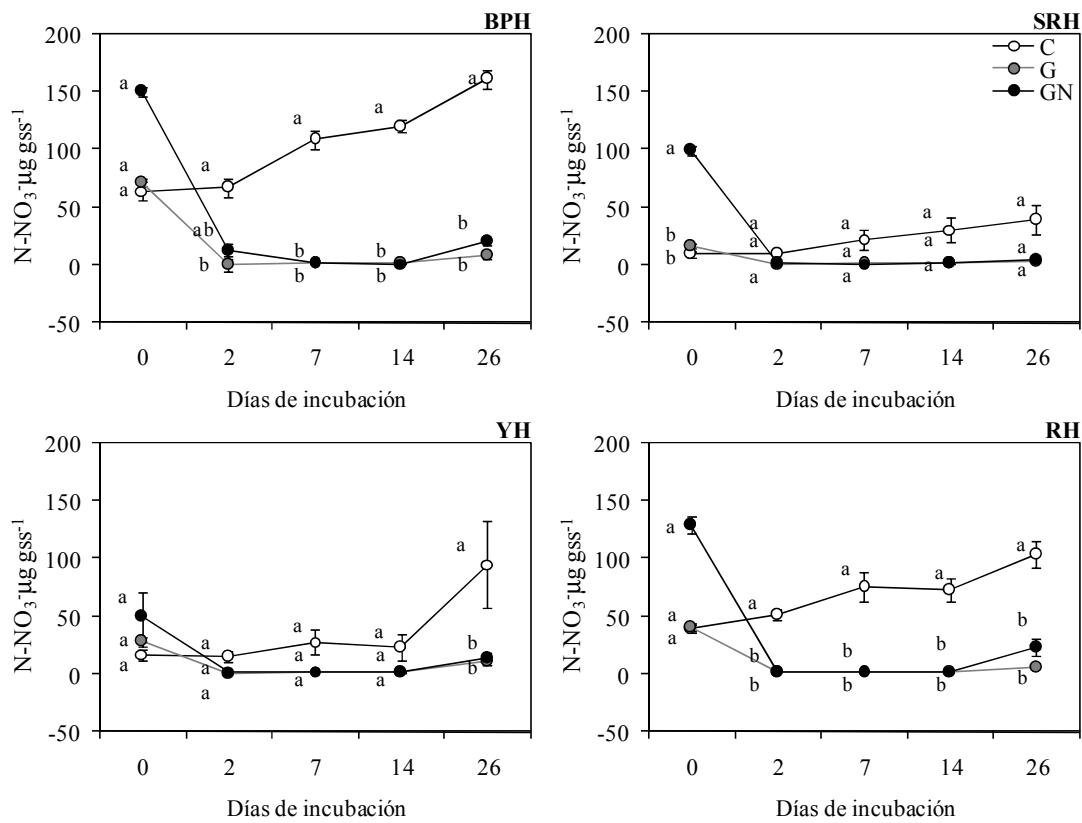
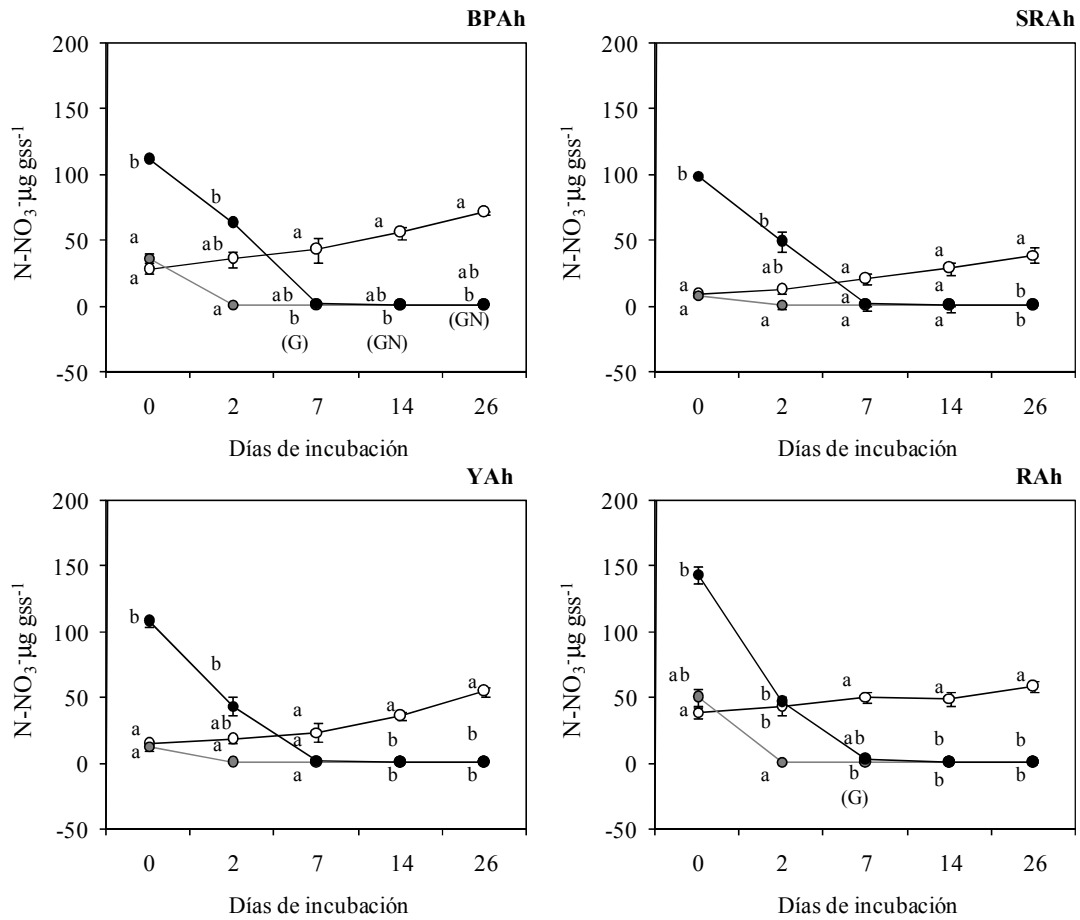


Figura VII. 3. Concentración de nitrato ( $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{ gss}^{-1}$ ) en el compartimento H en controles (C) y tratamientos con glucosa (G) y con glucosa y nitrato (G+N) de los cuatro sitios de estudio a lo largo del periodo de incubación de las muestras. Las barras verticales representan el error estándar. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada medida ( $p < 0,05$ ).



**Figura VII. 4. Concentración de nitrato ( $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{ gss}^{-1}$ ) en el compartimento Ah en controles (C) y tratamientos con glucosa (G) y con glucosa y nitrato (G+N) de los cuatro sitios de estudio a lo largo del período de incubación de las muestras. Las barras verticales representan el error estándar. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada medida ( $p < 0,05$ ).**

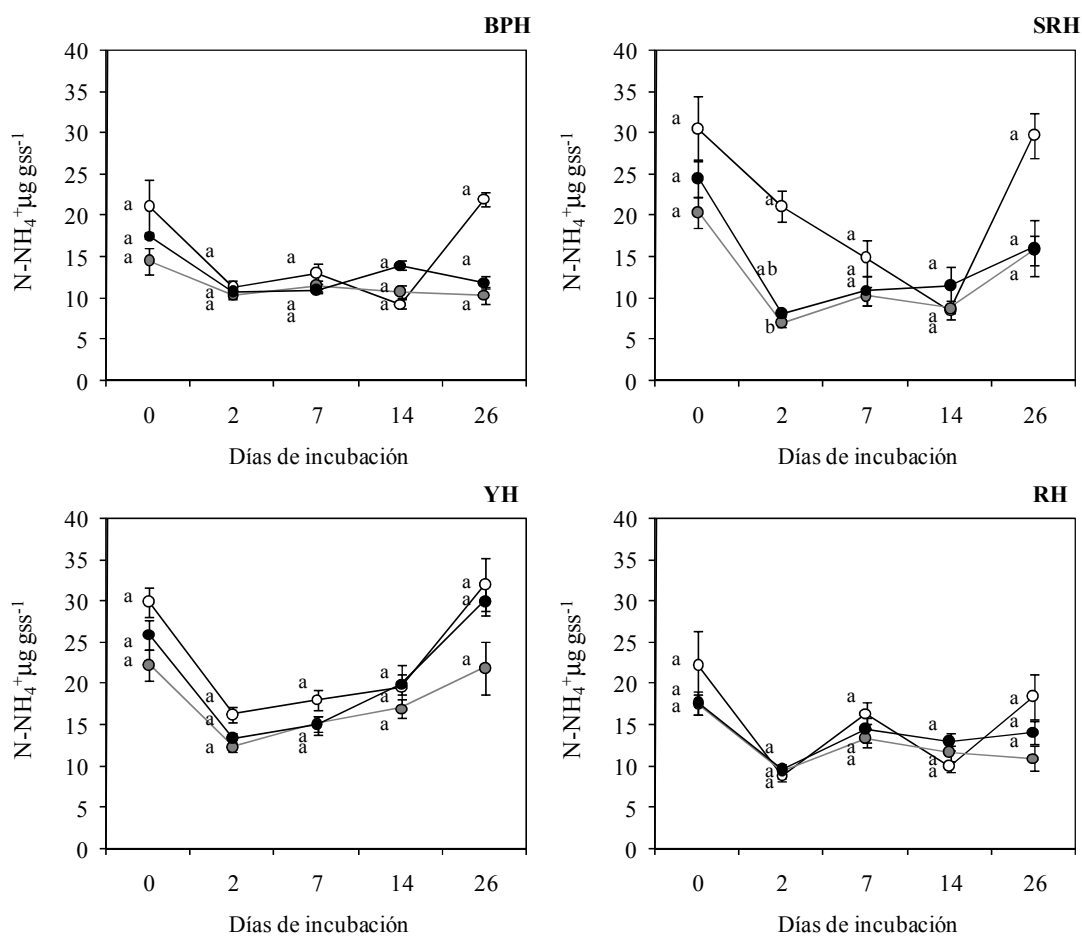


Figura VII. 5. Concentración de amonio ( $\mu g\ N-NH_4^+ gss^{-1}$ ) en el compartimento H en controles (C) y tratamientos con glucosa (G) y con glucosa y nitrato (G+N) de los cuatro sitios de estudio a lo largo del período de incubación de las muestras. Las barras verticales representan el error estándar. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada medida ( $p < 0,05$ ).

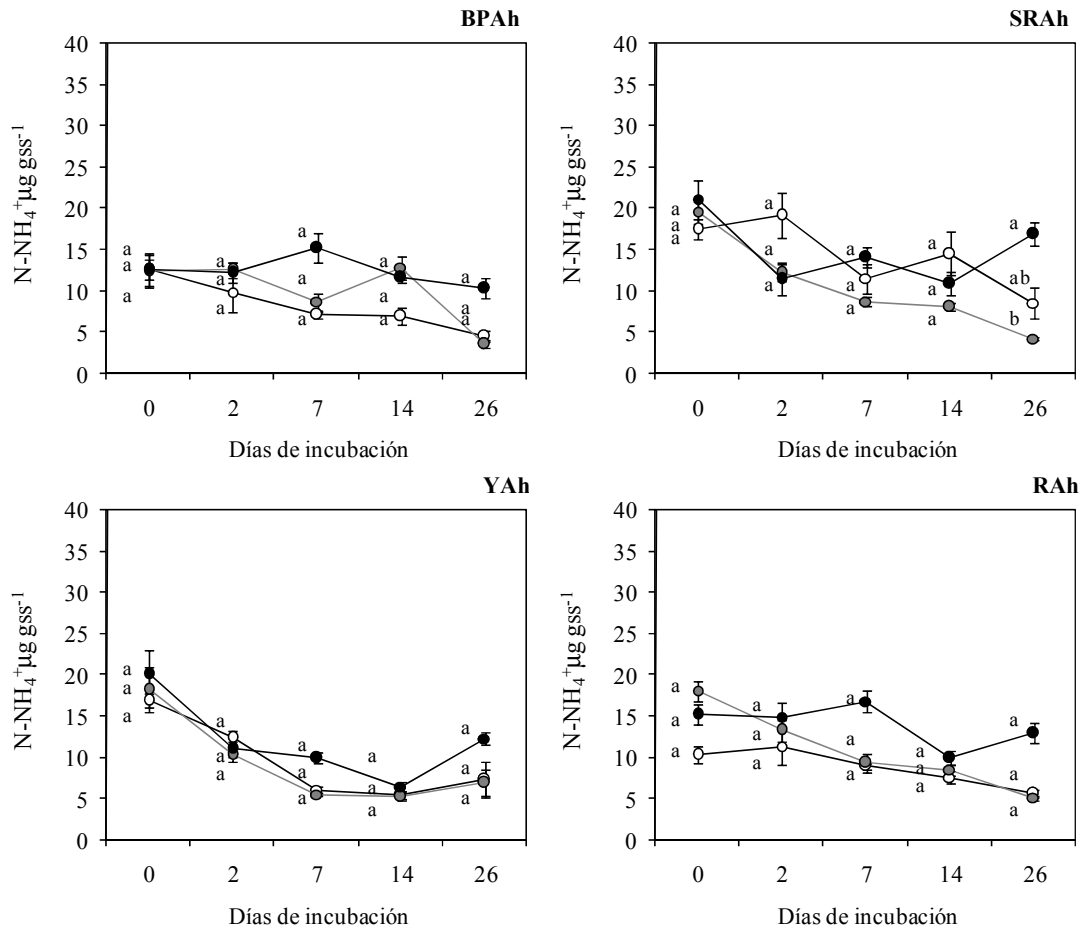


Figura VII. 6. Concentración de amonio ( $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1}$ ) en el compartimento Ah en controles (C) y tratamientos con glucosa (G) y con glucosa y nitrato (G+N) de los cuatro sitios de estudio a lo largo del periodo de incubación de las muestras. Las barras verticales representan el error estándar. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada medida ( $p < 0,05$ ).



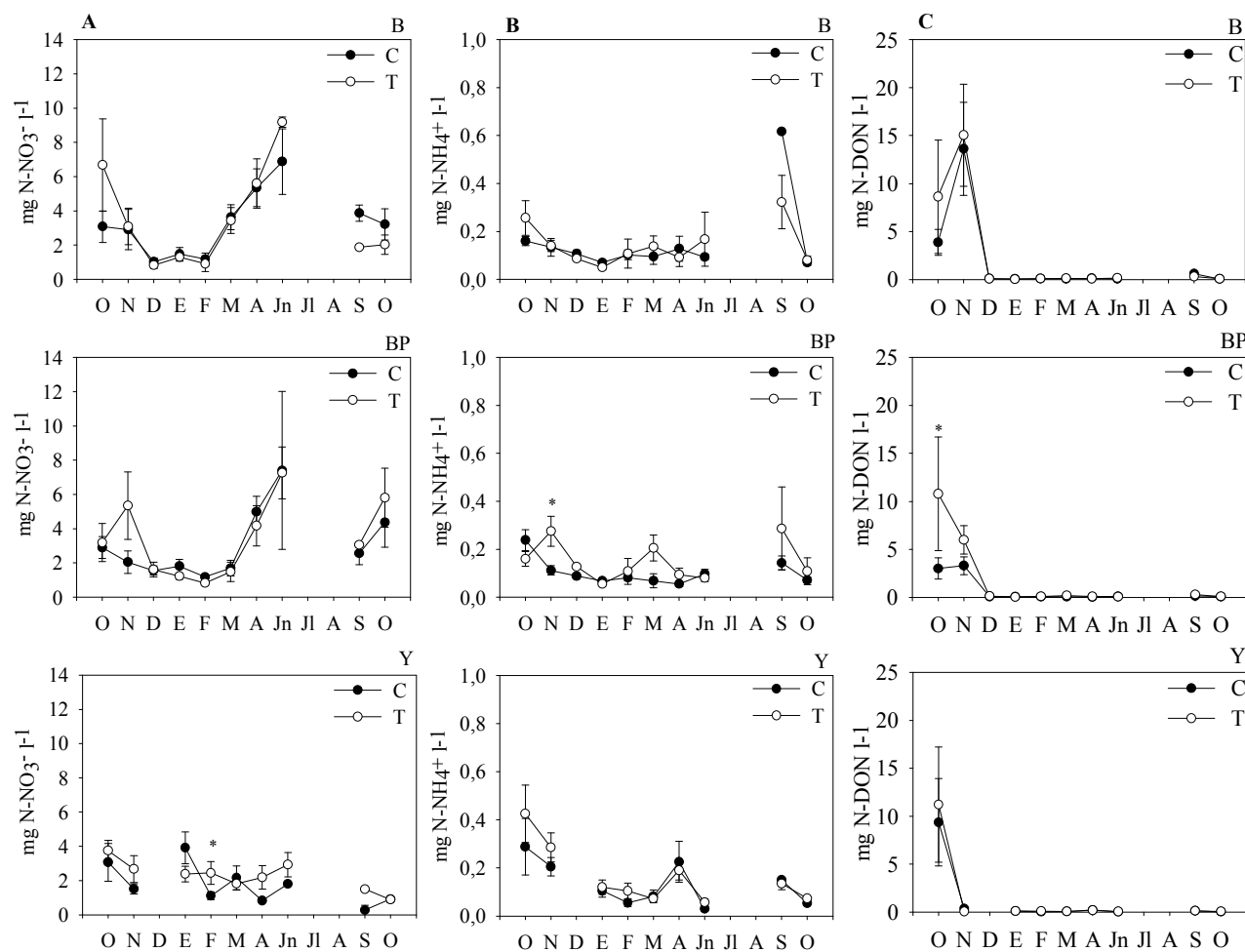


Figura VII. 7. Concentración media mensual (mg l<sup>-1</sup>) de nitrato (columna A), amonio (columna B) y nitrógeno orgánico disuelto (DON, columna C) en el agua de lixiviación de los sitios de estudio. Las barras representan el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas entre C y T dentro de cada localidad.





