



Universidad
de Alcalá



Universidad
Rey Juan Carlos

Efecto del N y el P en la microfauna edáfica de sistemas de montaña en Parques Nacionales

Master Universitario en Restauración de Ecosistemas

Presentado por: Miguel Iglesias Esteban

Directora: Sara Sánchez Moreno

Codirectora: Cristina Armas Kulik

Tutor académico: María Dolores Jiménez Escobar

En Madrid, a 30 de junio de 2020

ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	SUMMARY	2
3.	INTRODUCCIÓN	3
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	9
4.1.	Zonas de estudio y diseño experimental.....	9
4.2.	Muestreo de suelos	11
4.3.	Extracción, recuento e identificación de nematodos edáficos.....	12
4.4.	Propiedades del suelo	14
4.5.	Análisis estadístico.....	14
5.	RESULTADOS.....	15
5.1.	Propiedades ecológicas, fisicoquímicas, y microbiológicas.....	15
5.2.	Composición de la comunidad de nematodos edáficos.....	22
5.3.	Índices ecológicos basados en la comunidad de nematodos.....	29
5.4.	Relaciones entre la comunidad de nematodos y la comunidad microbiana.....	30
6.	DISCUSIÓN	32
6.1.	Abundancia de nematodos	33
6.2.	Diversidad de la comunidad de nematodos	34
6.3.	Índices ecológicos y propiedades fisicoquímicas y microbiológicas	35
7.	CONCLUSIONES	37
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	38
9.	ANEXOS.....	43
9.1.	Anexo I.....	43
9.1.1.	Nutrientes del suelo.....	43
9.1.2.	Análisis de la actividad enzimática	43
9.1.3.	Estima de la abundancia de hongos y bacterias mediante PCR cuantitativa.....	44

1. RESUMEN

El cambio global y sus efectos, como la deposición de fósforo y nitrógeno atmosféricos, y el cambio climático, están provocando la pérdida de biodiversidad y servicios ecosistémicos de los sistemas alpinos. El estudio de los efectos de estos procesos sobre la diversidad es fundamental, y, en este trabajo, se han utilizado los nematodos edáficos para estudiar el efecto de la deposición de P y N sobre el suelo, simulando distintos escenarios de deposición atmosférica en cuatro parques nacionales españoles de alta montaña siguiendo un gradiente latitudinal de aridez: Teide, Sierra Nevada, Guadarrama, y Picos de Europa. Los nematodos son los animales pluricelulares más abundantes del planeta, y tienen algunas propiedades que los convierten en excelentes bioindicadores, como su ubicuidad, sus múltiples posiciones en la red trófica edáfica, su respuesta rápida frente a cambios y perturbaciones en el medio, y su capacidad para sobrevivir en condiciones extremas. Se dividió una zona de cada parque en parcelas, que recibieron diferentes tratamientos de fertilización en un diseño factorial de N y P (0, 10 y 20 kg ha⁻¹ año⁻¹ de N y 0 y 10 kg ha⁻¹ año⁻¹ de P), de donde fueron tomadas las muestras. Posteriormente al recuento e identificación de los nematodos, mediante análisis estadístico y cálculo de índices ecológicos, se observó que los tratamientos no tuvieron, en general, un efecto significativo sobre la abundancia y composición de la comunidad de nematodos edáficos, mientras que el gradiente de aridez y recursos definido por el conjunto de parques sí tuvo un efecto significativo y relevante en la comunidad de nematodos. Así, la abundancia y diversidad de nematodos fue mayor en los ecosistemas con mayor cantidad de recursos y condiciones más favorables, mientras que decreció en los ambientes más extremos.

Palabras clave: Nematodos, cambio global, deposición de fósforo, deposición de nitrógeno, índices ecológicos.

2. SUMMARY

Global change and its effects, such as the deposition of atmospheric phosphorous and nitrogen, and climate change, are causing the loss of biodiversity and ecosystem services of alpine systems. The study of the effects of these processes on diversity is fundamental, and, in this work, edaphic nematodes have been used to study the effect of P and N deposition in the soil, simulating different atmospheric deposition scenarios in four Spanish high mountain National Parks following a latitudinal aridity gradient: Teide, Sierra Nevada, Guadarrama and Picos de Europa. Nematodes are the most abundant multicellular animal son the planet, and have some properties that make them excellent bioindicators, such as their ubiquity, their multiple positions in the soil food web, their rapid response to changes and disturbances in the environment, and their ability to survive in extreme conditions. An area of each park was divided into plots, which received different fertilization treatments in a factorial design of N and P (0, 10 and 20 kg ha⁻¹ year⁻¹ of N and 10 kg ha⁻¹ year⁻¹ from P), where the samples were taken. Subsequent to the count and identification of the nematodes, through statistical analysis and calculation of ecological indices, it was observed that the treatments did not, in general, have a significant effect on the abundance and composition of the soil nematode community, while the aridity gradient and the amount of available resources had a significant and relevant effect on the nematode community. Thus, the abundance and diversity of nematodes was greater in ecosystems with more resources and more favorable climatic conditions, while decreased in more extreme environments.

Key words: Nematodes, global climate change, phosphorous deposition, nitrogen deposition, ecological indices.

3. INTRODUCCIÓN

Las actividades realizadas por el ser humano en las últimas décadas están fomentando lo que se conoce como cambio global, cuyos principales fenómenos adversos para el planeta (como el cambio climático, la contaminación de los ecosistemas por deposición de nitrógeno atmosférico y otros contaminantes, y los numerosos cambios en el uso de suelo) están provocando pérdidas alarmantes de biodiversidad global y fenómenos de extinción, simplificación de las redes de interacción entre organismos, disrupciones en los ciclos biogeoquímicos y desertización. Estas consecuencias comienzan a ser claramente visibles en muchos lugares del planeta, y se espera que crezcan en los próximos años (Sala et al., 2000). Así, el cambio global afecta prácticamente a la totalidad de componentes del medio natural, tanto bióticos como abióticos. Uno de los efectos más alarmantes es la pérdida de biodiversidad, ya sea biodiversidad estricta (diversidad de especies, y diversidad genética dentro de ellas), o biodiversidad más “laxa” (diversidad funcional relacionada con los procesos e interacciones del ecosistema, patrones naturales resultado de miles de millones de años de evolución, y la resiliencia de los ecosistemas a perturbaciones y a las actividades antrópicas crecientes) (Sala et al., 2000).

Los ecosistemas alpinos o de alta montaña, en concreto, son entornos particularmente vulnerables al cambio global y climático (Körner, 2003). Estos ecosistemas ofrecen numerosos bienes y servicios ecosistémicos a la sociedad, por ejemplo: servicios ecosistémicos de abastecimiento (alimentos, agua y materia prima, entre otros); servicios de regulación (climática, hídrica, polinización, etc.); servicios de soporte, que engloban procesos como el ciclo del agua, la formación del suelo o los ciclos biogeoquímicos de nutrientes; y servicios culturales (conocimiento científico, ecoturismo, educación ambiental, etc.) (Da Silveira, 2018).

Los ecosistemas alpinos se ubican a una altitud superior a la línea de vegetación arbórea, presentan una gran biodiversidad y se caracterizan por los múltiples microhábitats que los conforman. La vegetación propia de estos ecosistemas suele ser variada, con diversos tipos fisiológicos, morfológicos y reproductivos, aunque en la Península e Islas Canarias, los tipos más abundantes son los grupos de arbustos leñosos, las gramíneas, las plantas perennes herbáceas, y los líquenes (Da Silveira, 2018).

La diversidad de microhábitats y condiciones bióticas en los suelos alpinos, también determinan que exista una gran diversidad de microorganismos del suelo (Donhauser & Frey, 2018). La comunidad de microorganismos (principalmente bacterias, arqueas y hongos) son los principales encargados de descomponer la materia orgánica, tienen un papel fundamental en el ciclo de los nutrientes y en la formación de suelos, con mucho mayor protagonismo respecto al resto de seres vivos (Bell et al., 2013). A medida que aumenta la altitud en estos ecosistemas alpinos, este protagonismo se hace aún mayor (Da Silveira, 2018). En los sistemas alpinos, también pueden ser encontrados todos los tipos existentes de micorrizas, aunque su diversidad disminuye con el aumento de la elevación sobre la línea arbolada. En cuanto a las bacterias son muy diversas y abundantes, llegando a encontrarse incluso en los niveles más altos, lo que demuestra una buena capacidad metabólica en condiciones muy extremas (Armas et al., 2015, Donhauser & Frey 2018, Hagerdon et al., 2019)

Sin embargo, el aumento de la contaminación atmosférica debido a ciertas actividades humanas está provocando un incremento en la deposición atmosférica de sustancias en el suelo, entre los principales el N. Esto provoca cambios en los ciclos biogeoquímicos y, a mayor escala, en los ecosistemas, siendo una gran amenaza para la biodiversidad de estos (Mahowald, 2011).

La deposición de este elemento se ha triplicado en el último siglo, y se calcula que podría duplicarse respecto a la cifra actual para el año 2050, si las tendencias persisten (Zong, Shi y Chai, 2018). La contaminación atmosférica por N es el tercer factor en importancia que afecta a la pérdida de biodiversidad en España (Gracia-Gomez et al., 2017) (Figura 1).

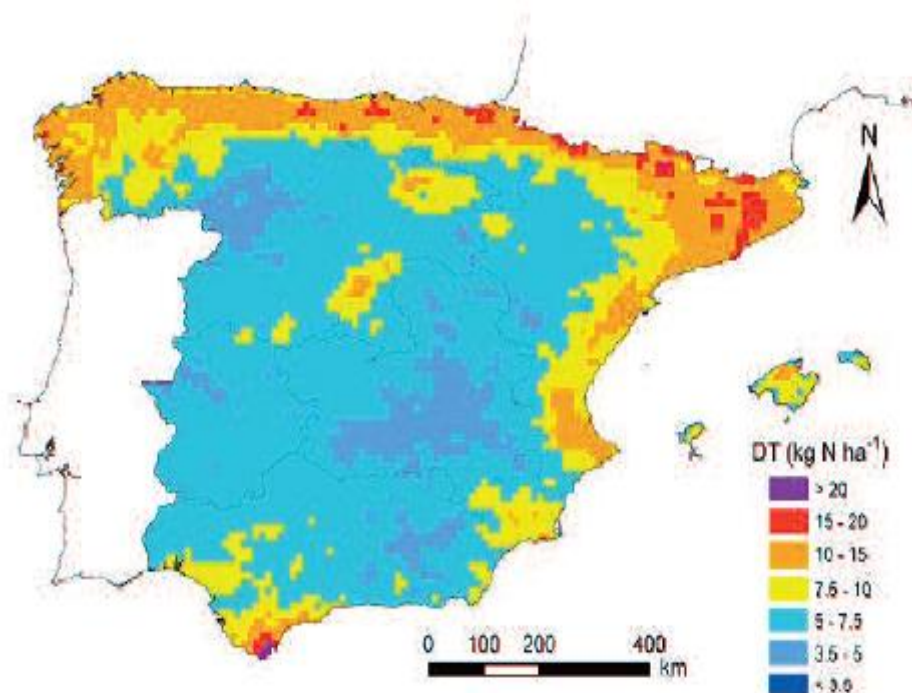


Figura 1: Deposición de N total estimada para el año 2008 en España, medida en Kg N ha⁻¹ (Fuente: García-Gomez al., 2017)

Este incremento en la deposición del nitrógeno podría tener un impacto muy severo en los ecosistemas terrestres, de forma tanto directa como indirecta a través de la alteración de procesos asociados al correcto funcionamiento de los ecosistemas. El efecto negativo de la deposición de N está asociado, entre otros, al desplazamiento de especies autóctonas por otras más nitrófilas, y a la pérdida de biodiversidad. No obstante, hay una falta de estudios y experimentos que prueben cómo podría afectar el aumento de la deposición a la estructura y función de los ecosistemas alpinos templados que se encuentran en las latitudes de España (Armas al., 2015).

Los ciclos del N y el P son muy diferentes. Por un lado, el N tiene formas gaseosas, lo que determina que su principal fuente primaria para los ecosistemas sean las entradas atmosféricas. Por el contrario, el P no dispone de ciclo gaseoso, y aunque puede ser depositado ocasionalmente en forma de polvo atmosférico (proveniente del desierto del Sahara en el caso del fósforo depositado en la península Ibérica y las Islas Canarias (Dorta et al., 2002)), su principal forma de entrada a los ecosistemas es a través de la meteorización de rocas con contenido en fósforo (Gallardo et al, 2009).

En el suelo, la deposición de N a escala regional provoca un declive de hongos nitrofóbicos y de otros organismos edáficos, como los nematodos, que aumentan la disponibilidad de nitrógeno orgánico en el suelo. De esta forma, la deposición de N y P incrementa la degradación de los suelos, y fomenta la pérdida, tanto de biodiversidad, como de calidad de las poblaciones de microfauna edáficas que se alojan en el suelo (Armas al., 2015). Cabe resaltar que la mayoría de estudios sobre el efecto de la deposición de N y P en las comunidades del suelo, se han realizado mayoritariamente en zonas de climas fríos y no existe apenas información para ecosistemas de latitudes cercanas a la de España.

Así, la deposición de N y de P afecta a una de las unidades básicas en el funcionamiento y en la dinámica de los ecosistemas, ya que proporciona el sustento físico y biológico para las comunidades de seres vivos que lo habitan. Los microorganismos edáficos son los principales responsables de la mineralización del carbono y nitrógeno, son capaces de suprimir o inducir plagas, realizan secuestro de carbono, pueden ayudar en la reparación biológica de suelos degradados y contaminados y, en última instancia, están ligados al rendimiento de las producciones agrícolas (Sánchez-Moreno y Talavera, 2013).

Existe mucha información acerca de cómo afectan las actividades humanas a la componente abiótica del suelo, sin embargo, existen pocas herramientas capaces de medir el impacto de estas prácticas en la biodiversidad del ecosistema edáfico (Rincón y Gutierrez, 2011). Los organismos que viven en el suelo resultan claves para el correcto funcionamiento de los ecosistemas.

Existe una gran variabilidad en los grupos funcionales de nematodos en los ecosistemas, y todos tienen un papel importante en las redes tróficas, además de contribuir a la obtención de muchos servicios ecosistémicos (Figura 2). Los nematodos más estudiados históricamente han sido los herbívoros, o también denominados fitoparásitos, que se alimentan de la materia vegetal como su propio nombre indica.

Otros grupos funcionales son los bacterívoros y fungívoros, que se alimentan de bacterias y de hongos respectivamente. Éstos incrementan la disponibilidad de nitrógeno amónico en el suelo y regulan y aceleran la descomposición de la materia orgánica al promover el aumento de las poblaciones de microorganismos. También son importantes en el aspecto

de controlar enfermedades causadas por la aparición de algunos tipos de hongos o bacterias.

Por último, los nematodos que ocupan un nivel más alto en la cadena alimentaria son los nematodos predadores y omnívoros, que se alimentan principalmente de otros nematodos y juegan un papel fundamental en el ecosistema edáfico, ejerciendo un control frente a plagas de nematodos y otros microorganismos (Sánchez-Moreno Talavera, 2013).

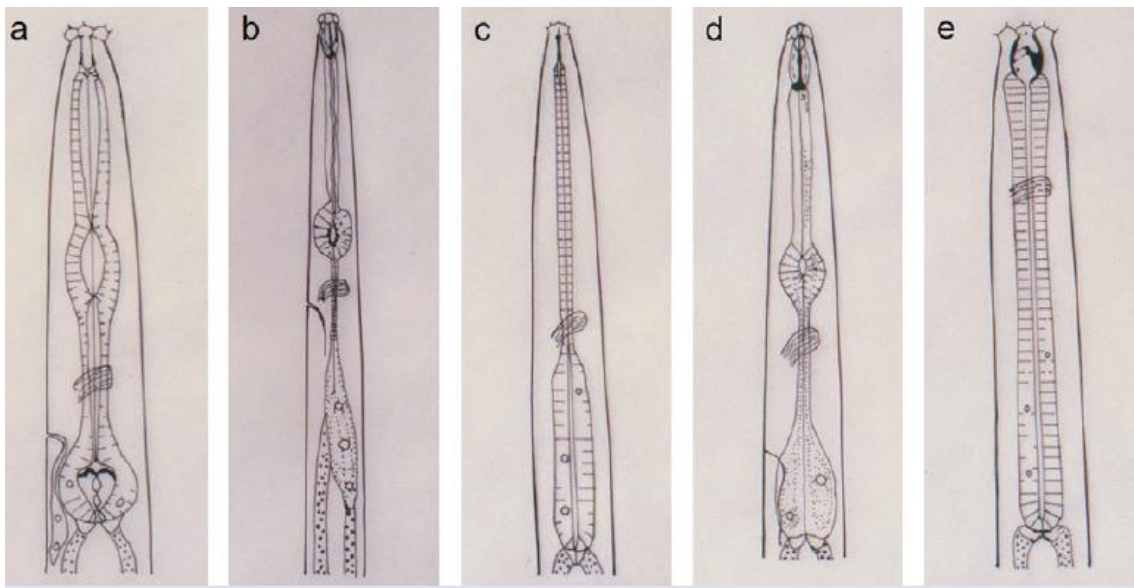


Figura 2: Detalle del esófago de los diferentes grupos funcionales de nematodos. (Fuente: Sánchez-Moreno y Talavera, 2013)

Los nematodos presentan una capacidad bioindicadora de los cambios inducidos en la red trófica edáfica, es decir, son un buen indicador del estado del suelo y del nivel de degradación de éste, debido a la contaminación o a otras actividades antrópicas. Esta capacidad bioindicadora se debe a varios motivos según Sánchez-Moreno y Talavera (2013):

- Sus elevadas abundancias en cualquier tipo de suelo, ya sea agrícola o natural.
- Su gran diversidad taxonómica y funcional, que les permite aparecer en todos los eslabones de la cadena trófica edáfica.
- Presentan estrategias vitales diferentes: existen nematodos con estrategias colonizadoras (ecológicamente conocidas como estrategias de la *r*), las cuales se centran en una elevada producción de descendientes, con ciclos de vida muy

cortos, y resistentes frente a perturbaciones; y estrategias persistentes (ecológicamente conocidas como estrategias de la *k*), que apuestan por una menor producción de descendientes, con ciclos de vida muy largos, y delicados frente a perturbaciones.

- Su gran diversidad ha permitido el desarrollo de múltiples índices ecológicos que han demostrado su utilidad como bioindicadores del estado y la calidad del suelo.

Algunos trabajos previos enmarcados en otros climas, como el de Zhao y colaboradores (2014), han estudiado el efecto de la adición artificial de nitrógeno y fósforo en las comunidades de nematodos de suelos de bosques tropicales ricos en nitrógeno y, pobres en fósforo. Las comunidades de nematodos allí presentes se vieron afectadas negativamente, ya que la estructura de la red trófica fue degradada, así como las conexiones entre los distintos eslabones de esta.

El objetivo principal de este trabajo es analizar las consecuencias de un aumento de la disponibilidad de nitrógeno (N) y fósforo (P) provenientes de la deposición atmosférica sobre las comunidades de microfauna edáfica de cuatro sistemas alpinos, de la red de parques nacionales españoles: dos bajo clima mediterráneo, uno más continental (Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama) y otro más árido (Parque Nacional de Sierra Nevada), y dos atlánticos, uno más húmedo (Parque Nacional de Picos de Europa) y otro semiárido (Parque Nacional del Teide). De los ciclos bioquímicos del N y el P depende la disponibilidad de recursos y nutrientes para muchas formas de vida. En ecosistemas naturales, el nitrógeno y el fósforo son elementos importantes limitando la producción primaria de los ecosistemas. El nitrógeno es uno de los elementos más importantes del planeta, ya que limita la productividad en los ecosistemas terrestres.

Como hipótesis de partida se propone que, en un escenario de mayor deposición de nitrógeno y fósforo, su disponibilidad en el suelo será mayor, y afectará negativamente a la diversidad de nematodos presentes, induciendo una degradación de la red trófica edáfica, y que implicará pérdidas de servicios ecosistémicos aportados por el suelo y su comunidad biológica.

Como segunda hipótesis, se plantea que, aunque los cuatro ecosistemas están en zonas alpinas, existe un gradiente de aridez y de condiciones límite (siendo Teide y Sierra

Nevada los más áridos, y Guadarrama y Picos de Europa los parques con condiciones relativas menos severas). Esto tendrá un efecto sobre las comunidades de nematodos, apareciendo nematodos más adaptados a condiciones extremas pero vulnerables a perturbaciones (k estrategias) en los parques con condiciones más extremas, y comunidades de nematodos estrategias de la r en los dos parques con condiciones algo más suaves.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Zonas de estudio y diseño experimental

En este proyecto se trabaja con muestras de cuatro Parques Nacionales de la Red de Parques Nacionales de España: Teide, Sierra Nevada, Sierra de Guadarrama, y, por último, Picos de Europa (Figura 3).

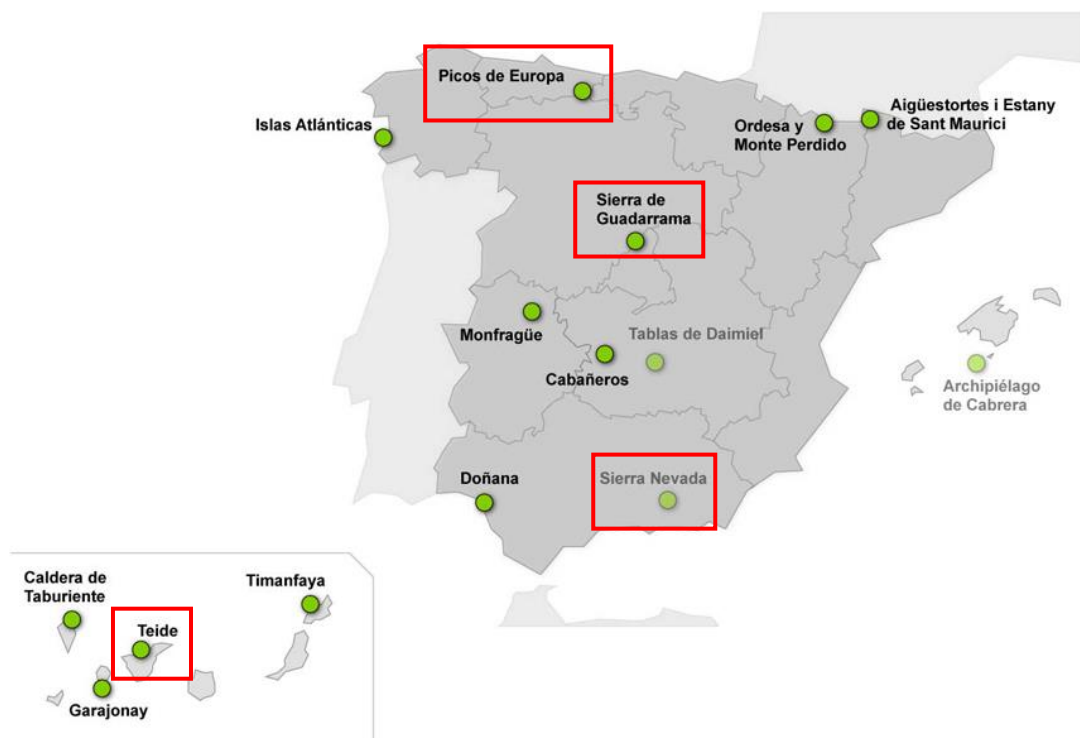


Figura 3: Mapa de ubicación de los parques nacionales españoles. Fuente: Instituto Geográfico Nacional (IGN)

El clima de estos Parques Nacionales se resume en la Tabla 1. El Teide presenta un clima subalpino, con grandes variaciones térmicas. Sierra Nevada posee características propias de un clima continental frío en sus zonas más elevadas, con grandes contrastes en cuanto a precipitación y temperatura en función de la altitud y la orientación. Al parque de Guadarrama se le puede atribuir un clima alpino oroborealoide subnemoral. Por último, el parque de Picos de Europa presenta un clima puramente de alta montaña en sus cumbres, con inviernos muy fríos y grandes contrastes en verano (OAPN; <https://www.miteco.gob.es/es/parques-nacionales-oapn/>).

	Tª MÁXIMA MEDIA (°C)	Tª MEDIA ANUAL (°C)	Tª MÍNIMA MEDIA (°C)	PRECIPITACIÓN MEDIA ANUAL (mm)
TEIDE	18,3	10,9	4,6	400
SIERRA NEVADA	10,4	3,8	-2,8	800
GUADARRAMA	9,9	6,4	-2,5	1050
PICOS DE EUROPA	9,0	3,8	-5,2	1200

Tabla 1: Resumen climático de los parques. (Fuente: OAPN)

Para cada Parque Nacional se seleccionó, entre mayo y junio de 2016, una zona de una hectárea, con el fin de comparar la respuesta a la deposición de nitrógeno y fósforo a lo largo de un gradiente climático latitudinal (puesto que cada parque tiene un clima diferente) y de disponibilidad de recursos (en este caso fósforo y nitrógeno).

En todas las zonas (figura 4), se establecieron a su vez seis bloques (B1, B2, B3, B4, B5 y B6). Cada uno de los bloques fue dividido en seis parcelas de fertilización de 2,5 x 2,5 m; y cada una de ellas recibió diferentes tratamientos con cantidades variables de nitrógeno y fósforo (combinación factorial con valores 0, 10 y 20 kg ha⁻¹ año⁻¹ de N y 0 y 10 kg ha⁻¹ año⁻¹ de P), simulando escenarios de deposición atmosférica de estos elementos. Los productos utilizados para realizar la fertilización fueron el NH₄NO₃ para la fertilización con nitrógeno, y KH₂PO₄ para la fertilización con fósforo.

En este trabajo se seleccionaron los siguientes tratamientos y parcelas: 0P-0N (control), 10P-0N, 0P-20N, y 10P-20N (kg ha⁻¹ año⁻¹).

Entre junio de 2016 a julio-agosto de 2019, la fertilización se aplicó en dos tandas anuales, una en primavera tardía (mayo-junio), en el comienzo del crecimiento vegetativo en estos ecosistemas alpinos, y otra a mediados de otoño (octubre-noviembre) antes de que se

produjeran las primeras nevadas. Las fechas concretas de la fertilización se seleccionaron dependiendo del año meteorológico (deshielo y comienzo de nevadas).

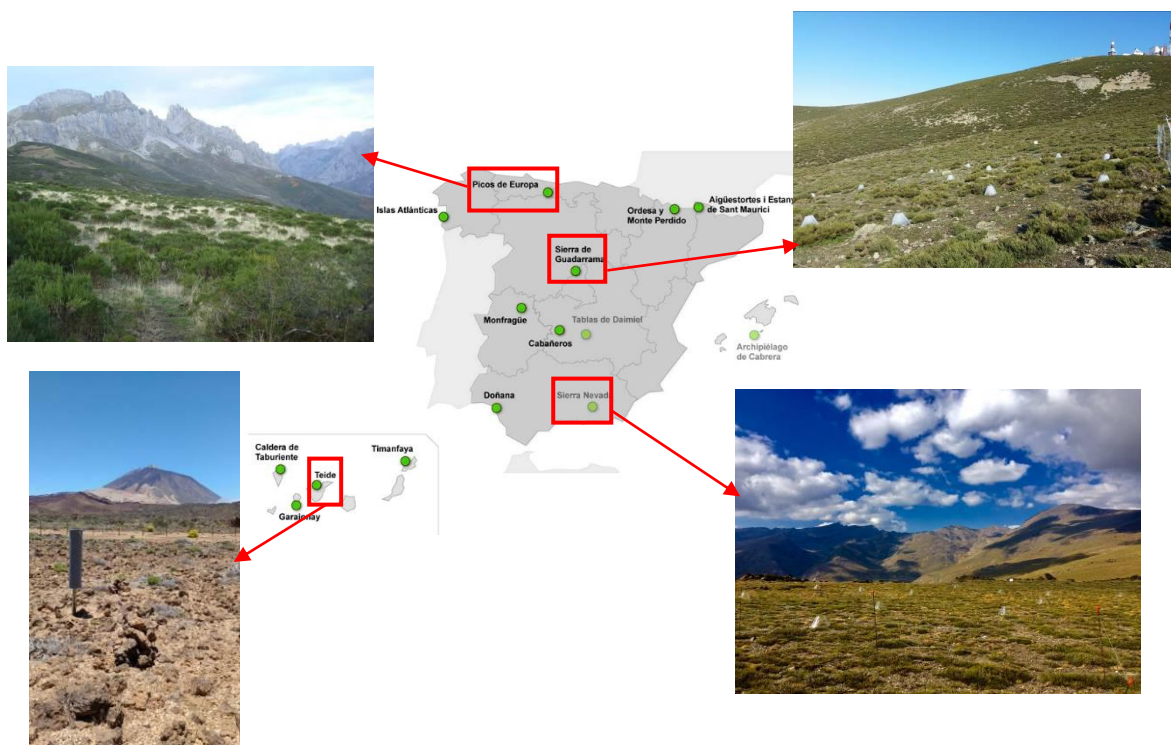


Figura 4: Panorámicas de las parcelas de experimentación en los distintos Parques Nacionales.

Fuente fotografías: Armas, C., 2015. Consecuencias de la deposición atmosférica de nitrógeno y fósforo en las comunidades vegetales y microbiota del suelo en sistemas de alta montaña. Memoria científico-técnica del proyecto de investigación financiado por Organismo Autónomo de Parques Nacionales (ref OAPN 1578/2015)

4.2. Muestreo de suelos

En el verano de 2019 se recogieron 24 muestras por parque (4 tratamientos de fertilización por 6 réplicas o parcelas por tratamiento), siendo un total de 96 muestras de suelo. Las fechas exactas de muestreo fueron, en orden cronológico, el 25/06/2019 en el caso de Guadarrama, 27/06/2019 para Picos de Europa, 10/07/2019 en el caso de Sierra Nevada, y por último el 05/08/2019 en el Teide.

Cada muestra se tomó insertando un anillo de PVC de 25 centímetros de diámetro en el suelo. Se extrajo todo el suelo de los primeros 5 centímetros de profundidad, y la muestra resultante se dividió en dos partes. Una muestra de aproximadamente 200 gramos se

conservó intacta para la extracción de nematodos edáficos, y el resto de muestra se tamizó con un tamiz de una luz de 2 centímetros. Para completar la muestra se añadió todo el suelo presente debajo del anillo a una profundidad entre 5 y 10 centímetros, y esta parte de la muestra no se tamizó.

Cada muestra tamizada resultante consistió en, aproximadamente, 200 gramos de suelo (cantidad variable dependiendo del parque) que se utilizaron para otros análisis (actividades enzimáticas, abundancia de hongos y bacterias, y análisis fisicoquímicos, ver Anexo I. Materiales y Métodos). Todas las muestras fueron transportadas en bolsas aislantes en frío hasta el momento de su procesado.

El material para la recolección de los suelos (palas, PVC guía, tamices y cubos) se esterilizó con alcohol 96°C al pasar a la siguiente parcela de muestreo. La secuencia de muestreo fue en parcelas en orden ascendente de fertilización, primero se muestreaban las 6 parcelas control (0P-0N) y las últimas en ser muestreadas fueron las 10P-20N.

4.3. Extracción, recuento e identificación de nematodos edáficos

De los 200 gramos de muestra, aproximadamente 25 g fueron utilizados para estimar la humedad relativa del suelo de cada muestra, comprobando el peso antes y después de mantener la submuestra en una estufa a 70°C durante un día. Del resto, se extrajeron los nematodos siguiendo un proceso de decantación, tamizado y embudado con embudos de Baermann.

Todos los nematodos de cada una de las muestras se contaron bajo una lupa binocular. Después se identificaron cien nematodos de cada muestra, mediante un microscopio óptico, a nivel de género, con la excepción de algunas familias.

Los nematodos se clasificaron según sus hábitos tróficos, y en grupos colonizador-persistente (CP).

Según sus hábitos tróficos, los nematodos se pueden clasificar en: herbívoros, o también llamados parásitos de las plantas y que se alimentan de plantas vasculares; fungívoros, que se alimentan de hongos, penetrando en las hifas de estos; bacterívoros, que se alimentan de bacterias y de cualquier tipo de organismo procariota; predadores, que se

alimentan de invertebrados como protozoos, rotíferos, u otros nematodos; y, por último, los omnívoros, que tienen un amplio rango de hábitos alimenticios (Yeates et al., 1993).

La escala colonizador-persistente (CP) clasifica las familias de nematodos en cinco grupos de forma gradual, en un gradiente desde estrategias de la r (bajo valor CP) hasta estrategias de la k (alto valor CP): desde nematodos, con ciclos de vida muy cortos, que se alimentan de microorganismos (grupos 1 y 2), hasta nematodos predadores y omnívoros, con ciclos de vida largos y que son muy sensibles a perturbaciones en el medio (grupos 4 y 5) (Bongers, 1990).

Basándose en estos grupos funcionales se calcularon varios índices:

El índice de madurez (MI), basado en la proporción de nematodos en los diferentes grupos CP en la comunidad, indica el estado de sucesión ecológica en el suelo, y el Plant Parasite Index (PPI) indica la complejidad de la comunidad de nematodos que se alimentan de organismos vegetales (Bongers et al., 1997).

Además, se estimaron cuatro índices de la red trófica (Ferris et al, 2001), que se calcularon de acuerdo con las abundancias relativas de nematodos en cada uno de los grupos tróficos: El índice de estructura (SI) se calcula en función de las abundancias relativas de los nematodos de los grupos tróficos más altos dentro de la red trófica edáfica, e indica la complejidad de dicha red trófica y la resiliencia del suelo. El índice del canal (CI) se calcula basado en la proporción de nematodos fungívoros y bacterívoros oportunistas, e indica el principal canal de descomposición de la materia orgánica. Valores altos del CI indican que la descomposición está mediada por hongos (canal fúngico), en cambio, valores bajos del CI indican que los agentes principales de descomposición de la materia orgánica son bacterias (canal bacteriano). El índice basal (BI) es indicador de la prevalencia de nematodos oportunistas que son tolerantes a perturbaciones en el suelo. Por último, el índice de enriquecimiento (EI) es un indicador de la aparición de nematodos oportunistas, tanto fungívoros como bacterívoros, que responden rápidamente a aumentos en la cantidad de recursos.

4.4. Propiedades del suelo

Se analizaron algunas propiedades físico-químicas del suelo, que son necesarias para comprender, y relacionarlas con la comunidad edáfica.

Las propiedades analizadas fueron la humedad y temperatura del suelo, nutrientes, actividad enzimática, carbono total, nitrógeno total, materia orgánica del suelo, carbono orgánico y pH. Además, también se estimó la abundancia de genes marcadores de hongos y bacterias en los suelos mediante análisis de qPCR.

Tanto la estima de los nutrientes, las actividades enzimáticas, como las abundancias de microorganismos se realizaron en el marco del proyecto (Armas, 2019), no como parte del presente trabajo de fin de máster. Los métodos generales se presentan en el Anexo I.

4.5. Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron utilizando el software estadístico *R* (R Core Team, 2020), con la interfaz *RStudio* y los paquetes *vegan*, *ggplot2*, y *car*.

Los datos de abundancia de nematodos, y los índices ecológicos fueron transformados con la fórmula $\ln(x + 1)$ para normalizarlos antes de llevar a cabo los análisis estadísticos.

La función *Anova* (Analisis of Variance) permite calcular el efecto de uno o varios factores sobre una o más variables, y determinar si este efecto es o no significativo.

Para analizar la composición de la comunidad de nematodos se utilizó la función *Permanova* (Permutational multivariate analysis of variance) de las abundancias de nematodos. Esta función se utiliza para observar si las variables cualitativas tienen efecto sobre la comunidad. También se realizó un análisis con la función *Betadisper* para estudiar la dispersión en las distintas variables.

Los análisis *rda* (redundancy analysis) constreñidos, son una serie de regresiones lineales donde las abundancias son representadas frente a las variables ambientales. El resultado de estos análisis se descompone en variación explicada por las variables ambientales

(representada en ejes constreñidos) y variación no explicada por las variables ambientales. El número de ejes constreñidos es igual o inferior al número de variables. Permiten analizar la variabilidad de composición de la comunidad de nematodos, y de los índices ecológicos, en un entorno vectorial, con respecto a múltiples variables ecológicas, fisicoquímicas, y microbiológicas.

5. RESULTADOS

5.1. Propiedades ecológicas, fisicoquímicas, y microbiológicas.

En primer lugar, las Tablas 1, 2, 3, 4 y 5 recogen los datos de las medias (\bar{X}) de las variables ecológicas, fisicoquímicas, y microbiológicas y sus desviaciones estándar (SD).

Estas variables son, desarrollando esta clasificación:

- Variables ecológicas: los índices ecológicos basados en la comunidad de nematodos (Maturity Index o Índice de madurez (MI), Plant Parasite Index o índice de los parásitos de las plantas (PPI), Channel Index o índice del canal (CI), Basal Index o índice basal (BI), Enrichment Index o índice de enriquecimiento (EI), y Structure Index o índice de estructura (SI)), el número total de individuos por cada cien gramos de peso seco (TOT/100gDW), el porcentaje de aportación al total de cada uno de los cinco grupos tróficos en los que se clasifican los nematodos en tanto por ciento (bacterívoros, fungívoros, herbívoros, omnívoros, y predadores), y la riqueza de taxones de nematodos identificados.
- Variables fisicoquímicas: nitrógeno total, carbono total, fósforo total (medidos en gramos por cada cien gramos de peso seco); y el pH.
- Variables microbiológicas: la fosfatasa del ciclo del fósforo (PHOS), el potencial de ciclado de las actividades enzimáticas relacionadas con ciclo del carbono (Cenz), el potencial de ciclado de las actividades enzimáticas relacionadas con ciclo del nitrógeno (Nenz) (medidos en μmol de actividad/g de suelo seco \cdot hora ($\mu\text{molA/gDS}\cdot\text{h}$)), y la abundancia de las comunidades de bacterias y hongos estimadas por qpcr (medida en número de copias de ADN bacteriano o fúngico/g de suelo (#ADN/gS)).

La primera de las tablas (Tabla 2) muestra las medias de las variables anteriormente descritas en función del parque. El P valor es muy bajo para la práctica totalidad de las variables, lo que indica que el parque tiene un efecto muy significativo sobre la mayoría de variables.

Las otras cuatro tablas (Tablas 3, 4, 5, y 6) recogen las medias de las variables con respecto a los distintos tratamientos, teniendo una tabla por cada parque. El P valor para la mayoría de variables en los cuatro parques indica que el efecto del tratamiento no tiene un efecto significativo sobre las variables.

El parque del Teide sólo es significativo en cuanto a tratamiento-parámetro en las variables pH y total de individuos. En el caso del parque de Sierra Nevada, las variables significativas fueron el pH, el fósforo total. En cuanto a Guadarrama, sólo la riqueza tuvo un resultado significativo. Por último, Picos de Europa presenta significatividad para la variable de bacterias estimadas por qPCR.

Tabla 2: Datos ecológicos, fisicoquímicos, y microbiológicos por parques. Los primeros 13 parámetros se refieren a la comunidad de nematodos. Fuente: Propia

	TEIDE		SIERRA NEVADA		GUADARRAMA		PICOS DE EUROPA		ANOVA	
	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	F	P
Índice de Madurez	2,08	$\pm 0,18$	2,25	$\pm 0,24$	2,32	$\pm 0,25$	2,13	$\pm 0,10$	7,16	2,25E-04
Índice Parásitos Plantas	1,33	$\pm 0,96$	2,13	$\pm 0,19$	2,05	$\pm 0,09$	2,21	$\pm 0,14$	15,49	2,55E-08
Índice Canal	38,89	$\pm 48,82$	91,99	$\pm 23,95$	83,60	$\pm 37,48$	99,02	$\pm 4,80$	16,04	1,81E-08
Índice basal	84,88	$\pm 19,64$	62,46	$\pm 18,91$	55,67	$\pm 18,72$	70,29	$\pm 12,48$	12,11	9,50E-07
Índice enriquecimiento	7,15	$\pm 10,31$	11,24	$\pm 8,02$	12,57	$\pm 13,35$	14,49	$\pm 9,28$	2,13	0,10
Índice Estructura	9,65	$\pm 19,53$	32,04	$\pm 20,43$	38,72	$\pm 20,36$	20,01	$\pm 13,30$	11,47	1,86E-06
TOT/100DW	153,50	$\pm 178,45$	557,30	$\pm 326,59$	319,29	$\pm 298,05$	2107,03	$\pm 933,54$	70,34	<2E-16
% Herbívoros	17,61	$\pm 27,68$	45,01	$\pm 18,78$	25,55	$\pm 15,23$	20,55	$\pm 9,35$	10,15	7,72E-06
% Fungívoros	5,36	$\pm 7,39$	6,98	$\pm 6,59$	18,57	$\pm 13,17$	13,60	$\pm 10,75$	9,27	2,04E-05
% Bacterívoros	74,67	$\pm 28,16$	42,97	$\pm 18,16$	54,51	$\pm 21,47$	62,32	$\pm 14,42$	9,52	1,54E-05
% Predadores	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,06	$\pm 0,21$	2,08	0,11
% Omnívoros	2,37	$\pm 6,49$	5,06	$\pm 4,04$	1,40	$\pm 1,97$	3,47	$\pm 3,12$	3,29	0,02
Riqueza	3,13	$\pm 1,39$	7,42	$\pm 1,77$	6,58	$\pm 1,28$	9,71	$\pm 2,27$	60,22	<2E-16
N total (g/100gDW)	0,05	$\pm 0,02$	0,36	$\pm 0,19$	0,79	$\pm 0,31$	0,75	$\pm 0,23$	64,81	<2E-16
C total (g/100gDW)	0,33	$\pm 0,10$	4,89	$\pm 3,05$	12,3	$\pm 5,14$	8,99	$\pm 4,17$	51,050	<2E-16
P total (g/100gDW)	0,09	$\pm 0,01$	0,07	$\pm 0,01$	0,05	$\pm 0,01$	0,10	$\pm 0,01$	110,80	<2E-16
pH	6,96	$\pm 0,20$	5,93	$\pm 0,17$	4,48	$\pm 0,21$	4,44	$\pm 0,25$	823,80	<2E-16
PHOS ($\mu\text{molA/gDW}\cdot\text{h}$)	93,75	$\pm 28,96$	469,46	$\pm 139,33$	524,73	$\pm 173,40$	556,52	$\pm 129,80$	65,83	<2E-16
Cenz ($\mu\text{molA/gDW}\cdot\text{h}$)	34,37	$\pm 22,45$	481,32	$\pm 102,78$	644,54	$\pm 263,41$	444,85	$\pm 137,19$	65,15	<2E-16
Nenz ($\mu\text{molA/gDW}\cdot\text{h}$)	22,40	$\pm 9,23$	90,72	$\pm 17,12$	127,70	$\pm 47,50$	132,89	$\pm 41,71$	56,95	<2E-16
Bacterias (#ADN/gS)	2,721E+08	$\pm 7,340E+07$	1,382E+09	$\pm 4,372E+08$	4,038E+09	$\pm 1,439E+09$	2,441E+09	$\pm 7,381E+08$	87,79	<2E-16
Hongos (#ADN/gS)	5,529E+04	$\pm 7,517E+04$	4,272E+06	$\pm 8,243E+06$	9,005E+06	$\pm 7,157E+06$	6,152E+06	$\pm 5,472E+06$	9,073	2,53E-05

*TOT/100DW: Número total de individuos por cada cien gramos de peso seco, PHOS: la fosfatasa del ciclo del fósforo, Cenz: el potencial de ciclado de las actividades enzimáticas relacionadas con ciclo del carbono, Nenz: el potencial de ciclado de las actividades enzimáticas relacionadas con ciclo del nitrógeno (medidos en μmol de actividad/g de peso seco \cdot hora ($\mu\text{molA/gDS}\cdot\text{h}$)), bacterias: abundancia de las comunidades de bacterias estimadas por qpcr, Hongos: abundancia de las comunidades de hongos estimadas por qpcr (medida en número de copias de ADN bacteriano o fúngico/g de suelo (#ADN/gS))

Tabla 3: Datos ecológicos, fisicoquímicos, y microbiológicos en función del tratamiento, para el parque del Teide. Fuente: Propia

TEIDE										
	0-0		10-0		0-20		10-20		ANOVA	
	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	F	P
Índice de Madurez	2,11	$\pm 0,27$	2,02	$\pm 0,05$	2,02	$\pm 0,04$	2,16	$\pm 0,26$	0,79	0,52
Índice Parásitos Plantas	2,00	$\pm 0,00$	2,00	$\pm 0,00$	2,00	$\pm 0,00$	2,00	$\pm 0,00$	-	-
Índice Canal	83,32	$\pm 33,36$	100,00	$\pm 0,00$	100,00	$\pm 0,00$	100,00	$\pm 0,00$	0,40	0,76
Índice basal	78,21	$\pm 27,83$	91,37	$\pm 12,31$	95,06	$\pm 6,80$	74,90	$\pm 21,29$	1,63	0,21
Índice enriquecimiento	15,55	$\pm 14,53$	5,19	$\pm 8,95$	1,53	$\pm 3,74$	6,32	$\pm 8,08$	2,36	0,10
Índice Estructura	11,77	$\pm 28,82$	4,15	$\pm 8,40$	3,42	$\pm 6,69$	19,27	$\pm 24,68$	0,85	0,48
TOT/100DW	49,62	$\pm 38,34$	66,97	$\pm 58,43$	183,64	$\pm 185,14$	313,79	$\pm 231,22$	3,88	0,02
% Herbívoros	25,37	$\pm 31,96$	7,42	$\pm 9,98$	13,77	$\pm 26,76$	23,88	$\pm 37,77$	0,53	0,66
% Fungívoros	6,98	$\pm 6,13$	5,87	$\pm 9,64$	1,55	$\pm 3,80$	7,03	$\pm 9,07$	0,71	0,56
% Bacterívoros	62,38	$\pm 34,25$	85,53	$\pm 11,76$	83,72	$\pm 26,08$	67,05	$\pm 34,16$	1,04	0,40
% Predadores	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	-	-
% Omnívoros	5,27	$\pm 12,90$	1,20	$\pm 2,48$	0,95	$\pm 1,92$	2,07	$\pm 1,85$	0,53	0,67
Riqueza	3,50	$\pm 2,07$	3,17	$\pm 1,33$	2,33	$\pm 1,03$	3,50	$\pm 0,84$	0,93	0,44
N total (g/100gDW)	0,04	$\pm 0,02$	0,05	$\pm 0,01$	0,05	$\pm 0,01$	0,05	$\pm 0,01$	1,59	0,22
C total (g/100gDW)	0,29	$\pm 0,14$	0,33	$\pm 0,07$	0,34	$\pm 0,06$	0,36	$\pm 0,12$	0,48	0,70
P total (g/100gDW)	0,08	$\pm 0,01$	0,09	$\pm 0,01$	0,08	$\pm 0,01$	0,09	$\pm 0,00$	1,69	0,20
pH	7,07	$\pm 0,14$	7,09	$\pm 0,18$	6,79	$\pm 0,15$	6,89	$\pm 0,18$	4,88	0,01
PHOS ($\mu\text{molA/gDW}\cdot\text{h}$)	89,13	$\pm 9,39$	92,50	$\pm 14,29$	109,35	$\pm 27,46$	84,03	$\pm 48,77$	0,84	0,49
Cenz ($\mu\text{molA/gDW}\cdot\text{h}$)	26,05	$\pm 8,19$	30,33	$\pm 5,10$	45,20	$\pm 27,63$	35,89	$\pm 34,88$	0,79	0,51
Nenz ($\mu\text{molA/gDW}\cdot\text{h}$)	20,51	$\pm 4,74$	21,32	$\pm 3,82$	25,97	$\pm 8,82$	21,81	$\pm 15,99$	0,38	0,76
Bacterias (#ADN/gS)	2,647E+08	$\pm 4,745E+07$	2,474E+08	$\pm 4,747E+07$	2,896E+08	$\pm 1,120E+08$	2,867E+08	$\pm 7,941E+07$	0,40	0,75
Hongos (#ADN/gS)	2,140E+04	$\pm 1,380E+04$	2,512E+04	$\pm 1,150E+04$	9,791E+04	$\pm 1,261E+05$	7,672E+04	$\pm 6,765E+04$	1,67	0,21

*Ver leyenda Tabla 2

Tabla 4: Datos ecológicos, fisicoquímicos, y microbiológicos en función del tratamiento, para el parque de Sierra Nevada. Fuente: Propia

SIERRA NEVADA										
	0-0		10-0		0-20		10-20		ANOVA	
	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	F	P
Índice de Madurez	2,45	$\pm 0,35$	2,14	$\pm 0,19$	2,20	$\pm 0,15$	2,22	$\pm 0,11$	2,32	0,11
Índice Parásitos Plantas	2,19	$\pm 0,24$	2,22	$\pm 0,26$	2,09	$\pm 0,09$	2,03	$\pm 0,06$	1,24	0,32
Índice Canal	89,75	$\pm 25,12$	83,33	$\pm 40,82$	94,87	$\pm 12,57$	100,00	$\pm 0,00$	0,50	0,69
Índice basal	47,32	$\pm 20,30$	75,13	$\pm 18,87$	65,66	$\pm 17,45$	61,72	$\pm 9,56$	2,75	0,07
Índice enriquecimiento	12,63	$\pm 5,75$	7,17	$\pm 6,41$	13,38	$\pm 12,13$	11,78	$\pm 6,84$	0,70	0,56
Índice Estructura	48,30	$\pm 23,89$	19,44	$\pm 20,36$	28,64	$\pm 15,46$	31,80	$\pm 13,21$	2,49	0,09
TOT/100DW	718,50	$\pm 448,02$	390,91	$\pm 269,72$	573,23	$\pm 268,98$	546,55	$\pm 282,81$	1,01	0,41
% Herbívoros	62,18	$\pm 13,99$	39,30	$\pm 15,15$	40,98	$\pm 18,35$	37,58	$\pm 19,56$	2,79	0,07
% Fungívoros	4,28	$\pm 2,44$	5,05	$\pm 4,72$	8,48	$\pm 6,59$	10,08	$\pm 10,02$	1,06	0,39
% Bacterívoros	26,60	$\pm 14,60$	52,32	$\pm 16,48$	45,63	$\pm 20,07$	47,33	$\pm 13,15$	2,88	0,06
% Predadores	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	-	-
% Omnívoros	6,97	$\pm 4,96$	3,37	$\pm 4,18$	4,92	$\pm 4,30$	5,00	$\pm 2,55$	0,78	0,52
Riqueza	8,50	$\pm 2,07$	6,00	$\pm 1,10$	7,67	$\pm 1,37$	7,50	$\pm 1,76$	2,48	0,09
N total (g/100gDW)	0,25	$\pm 0,08$	0,42	$\pm 0,24$	0,40	$\pm 0,20$	0,37	$\pm 0,19$	0,92	0,45
C total (g/100gDW)	3,21	$\pm 1,13$	5,71	$\pm 4,11$	5,60	$\pm 3,25$	5,02	$\pm 3,04$	0,88	0,49
P total (g/100gDW)	0,07	$\pm 0,01$	0,07	$\pm 0,01$	0,07	$\pm 0,01$	0,08	$\pm 0,00$	5,79	0,01
pH	6,07	$\pm 0,10$	5,94	$\pm 0,14$	5,77	$\pm 0,07$	5,93	$\pm 0,20$	4,99	0,01
PHOS ($\mu\text{molA/gDW}\cdot\text{h}$)	425,55	$\pm 171,23$	458,39	$\pm 104,60$	504,55	$\pm 164,69$	489,35	$\pm 132,28$	0,35	0,79
Cenz ($\mu\text{molA/gDW}\cdot\text{h}$)	443,88	$\pm 167,55$	498,50	$\pm 74,71$	471,89	$\pm 64,98$	510,99	$\pm 86,72$	0,47	0,71
Nenz ($\mu\text{molA/gDW}\cdot\text{h}$)	80,86	$\pm 22,63$	95,42	$\pm 11,35$	91,24	$\pm 16,91$	95,35	$\pm 15,89$	0,96	0,43
Bacterias (#ADN/gS)	1,203E+09	$\pm 3,644\text{E}+08$	1,753E+09	$\pm 5,810\text{E}+08$	1,187E+09	$\pm 3,038\text{E}+08$	1,384E+09	$\pm 2,589\text{E}+08$	2,64	0,08
Hongos (#ADN/gS)	1,265E+06	$\pm 1,534\text{E}+06$	1,041E+07	$\pm 1,485\text{E}+07$	2,251E+06	$\pm 3,831\text{E}+06$	3,159E+06	$\pm 3,560\text{E}+06$	1,66	0,21

*Ver leyenda Tabla 2

Tabla 5: Datos ecológicos, fisicoquímicos, y microbiológicos en función del tratamiento, para el parque de Guadarrama. Fuente: Propia

GUADARRAMA										
	0-0		10-0		0-20		10-20		ANOVA	
	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	F	P
Índice de Madurez	2,38	$\pm 0,22$	2,42	$\pm 0,35$	2,14	$\pm 0,07$	2,32	$\pm 0,24$	1,56	0,23
Índice Parásitos Plantas	2,06	$\pm 0,13$	2,04	$\pm 0,06$	2,05	$\pm 0,09$	2,06	$\pm 0,11$	0,10	0,96
Índice Canal	66,67	$\pm 51,64$	100,00	$\pm 0,00$	84,40	$\pm 38,22$	83,33	$\pm 40,82$	0,77	0,52
Índice basal	53,04	$\pm 16,59$	50,10	$\pm 19,82$	67,34	$\pm 20,20$	52,20	$\pm 17,67$	1,07	0,38
Índice enriquecimiento	5,58	$\pm 4,93$	11,48	$\pm 6,23$	15,53	$\pm 19,12$	17,71	$\pm 17,00$	0,95	0,44
Índice Estructura	44,74	$\pm 18,89$	46,11	$\pm 21,28$	25,23	$\pm 13,54$	38,81	$\pm 24,23$	1,38	0,28
TOT/100DW	204,15	$\pm 239,64$	311,24	$\pm 366,75$	345,27	$\pm 217,14$	416,48	$\pm 376,08$	0,49	0,69
% Herbívoros	23,72	$\pm 19,98$	37,75	$\pm 14,30$	21,55	$\pm 8,59$	19,17	$\pm 11,77$	2,05	0,14
% Fungívoros	17,82	$\pm 7,90$	16,65	$\pm 9,02$	12,58	$\pm 15,19$	27,23	$\pm 16,87$	1,40	0,27
% Bacterívoros	58,22	$\pm 17,95$	42,88	$\pm 14,99$	64,25	$\pm 23,07$	52,68	$\pm 27,28$	1,08	0,38
% Predadores	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	-	-
% Omnívoros	0,28	$\pm 0,44$	2,73	$\pm 2,88$	1,63	$\pm 1,72$	0,93	$\pm 1,58$	1,90	0,16
Riqueza	5,83	$\pm 1,17$	7,83	$\pm 1,17$	6,33	$\pm 1,03$	6,33	$\pm 1,03$	3,70	0,03
N total (g/100gDW)	0,65	$\pm 0,41$	0,93	$\pm 0,32$	0,78	$\pm 0,23$	0,79	$\pm 0,27$	0,62	0,61
C total (g/100gDW)	9,61	$\pm 6,03$	15,34	$\pm 5,48$	12,26	$\pm 3,89$	12,03	$\pm 4,51$	1,30	0,30
P total (g/100gDW)	0,05	$\pm 0,01$	0,06	$\pm 0,02$	0,05	$\pm 0,01$	0,05	$\pm 0,01$	0,09	0,97
pH	4,39	$\pm 0,17$	4,54	$\pm 0,23$	4,53	$\pm 0,14$	4,46	$\pm 0,29$	0,67	0,58
PHOS ($\mu\text{molA/gDW}\cdot\text{h}$)	505,29	$\pm 219,38$	531,45	$\pm 170,63$	566,60	$\pm 193,89$	495,58	$\pm 140,89$	0,18	0,91
Cenz ($\mu\text{molA/gDW}\cdot\text{h}$)	615,31	$\pm 460,39$	636,86	$\pm 237,33$	672,04	$\pm 150,45$	653,95	$\pm 161,68$	0,04	0,99
Nenz ($\mu\text{molA/gDW}\cdot\text{h}$)	113,45	$\pm 64,64$	123,23	$\pm 44,52$	146,74	$\pm 52,18$	127,38	$\pm 28,15$	0,48	0,70
Bacterias (#ADN/gS)	3,552E+09	$\pm 1,261E+09$	5,187E+09	$\pm 1,402E+09$	3,800E+09	$\pm 1,654E+09$	3,615E+09	$\pm 1,040E+09$	1,95	0,15
Hongos (#ADN/gS)	5,901E+06	$\pm 4,205E+06$	1,433E+07	$\pm 1,186E+07$	7,344E+06	$\pm 3,642E+06$	8,446E+06	$\pm 3,855E+06$	1,76	0,19

*Ver leyenda Tabla 2

Tabla 6: Datos ecológicos, fisicoquímicos, y microbiológicos en función del tratamiento, para el parque de Picos de Europa. Fuente: Propia

PICOS DE EUROPA										
	0-0		10-0		0-20		10-20		ANOVA	
	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	F	P
Índice de Madurez	2,14	$\pm 0,17$	2,10	$\pm 0,05$	2,11	$\pm 0,06$	2,15	$\pm 0,11$	0,25	0,86
Índice Parásitos Plantas	2,13	$\pm 0,07$	2,26	$\pm 0,17$	2,21	$\pm 0,17$	2,23	$\pm 0,14$	0,84	0,49
Índice Canal	100,00	$\pm 0,00$	100,00	$\pm 0,00$	100,00	$\pm 0,00$	96,08	$\pm 9,61$	1,00	0,41
Índice basal	65,43	$\pm 15,83$	73,64	$\pm 9,84$	71,62	$\pm 13,49$	70,47	$\pm 11,97$	0,44	0,73
Índice enriquecimiento	21,15	$\pm 10,33$	11,70	$\pm 8,69$	14,72	$\pm 10,50$	10,39	$\pm 4,60$	1,76	0,19
Índice Estructura	20,08	$\pm 20,69$	18,28	$\pm 8,47$	18,86	$\pm 9,98$	22,85	$\pm 14,10$	0,12	0,94
TOT/100DW	2032,14	$\pm 736,17$	2155,61	$\pm 276,27$	2485,97	$\pm 1294,45$	1754,39	$\pm 1176,41$	0,60	0,62
% Herbívoros	22,23	$\pm 13,72$	18,05	$\pm 8,01$	23,85	$\pm 8,97$	18,08	$\pm 6,15$	0,56	0,65
% Fungívoros	22,02	$\pm 13,65$	10,80	$\pm 9,89$	12,90	$\pm 10,66$	8,68	$\pm 3,09$	2,03	0,14
% Bacterívoros	51,55	$\pm 13,27$	68,05	$\pm 13,14$	60,53	$\pm 17,04$	69,15	$\pm 8,89$	2,21	0,12
% Predadores	0,25	$\pm 0,39$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	2,48	0,09
% Omnívoros	3,97	$\pm 4,97$	3,97	$\pm 1,19$	2,73	$\pm 1,79$	4,10	$\pm 3,73$	0,25	0,86
Riqueza	9,17	$\pm 3,43$	9,17	$\pm 1,72$	9,83	$\pm 2,32$	10,67	$\pm 1,37$	0,55	0,65
N total (g/100gDW)	0,71	$\pm 0,15$	0,90	$\pm 0,39$	0,75	$\pm 0,11$	0,66	$\pm 0,10$	1,00	0,41
C total (g/100gDW)	8,19	$\pm 2,14$	11,73	$\pm 7,57$	8,80	$\pm 1,71$	7,25	$\pm 1,23$	1,35	0,28
P total (g/100gDW)	0,09	$\pm 0,01$	0,10	$\pm 0,01$	0,10	$\pm 0,01$	0,10	$\pm 0,01$	1,49	0,25
pH	4,43	$\pm 0,38$	4,42	$\pm 0,15$	4,44	$\pm 0,26$	4,45	$\pm 0,22$	0,01	1,00
PHOS ($\mu\text{molA/gDW}\cdot\text{h}$)	590,71	$\pm 130,55$	540,64	$\pm 98,22$	582,34	$\pm 133,28$	512,38	$\pm 167,92$	0,44	0,72
Cenz ($\mu\text{molA/gDW}\cdot\text{h}$)	482,59	$\pm 187,53$	436,81	$\pm 140,71$	427,99	$\pm 74,51$	431,99	$\pm 154,04$	0,18	0,91
Nenz ($\mu\text{molA/gDW}\cdot\text{h}$)	153,15	$\pm 47,60$	125,31	$\pm 55,01$	122,22	$\pm 23,66$	130,89	$\pm 38,07$	0,64	0,60
Bacterias (#ADN/gS)	1,91E+09	$\pm 5,62\text{E}+08$	2,67E+09	$\pm 7,00\text{E}+08$	2,14E+09	$\pm 6,48\text{E}+08$	3,05E+09	$\pm 5,76\text{E}+08$	4,06	0,02
Hongos (#ADN/gS)	4,26E+06	$\pm 1,89\text{E}+06$	6,70E+06	$\pm 4,58\text{E}+06$	3,99E+06	$\pm 1,26\text{E}+06$	9,67E+06	$\pm 9,30\text{E}+06$	1,49	0,25

*Ver leyenda Tabla 2

5.2. Composición de la comunidad de nematodos edáficos.

En el caso del parque del Teide, como se puede observar en la Tabla 7, se identificaron 12 taxones diferentes de nematodos, de los cuales 4 son bacterívoros, 2 fungívoros, 3 herbívoros, y 3 omnívoros. Los bacterívoros son los más abundantes (50%), y los fungívoros los más escasos, siendo los predadores el único grupo trófico ausente.

PARQUE	TEIDE								GRUPO TRÓFICO Y CP
	0-0		10-0		0-20		10-20		
	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	
<i>Mesorhabditis</i>	0,47	$\pm 1,15$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	Bacterívoros 1
<i>Acrobeloides</i>	25,98	$\pm 27,11$	54,74	$\pm 50,16$	115,79	$\pm 103,42$	189,87	$\pm 210,37$	Bacterívoros 2
<i>Cervidellus</i>	0,00	$\pm 0,00$	1,05	$\pm 1,25$	5,29	$\pm 12,96$	2,30	$\pm 3,72$	Bacterívoros 2
<i>Plectus</i>	0,47	$\pm 1,15$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	Bacterívoros 2
<i>Aphelenchus</i>	5,08	$\pm 6,10$	5,03	$\pm 12,32$	5,88	$\pm 14,40$	18,54	$\pm 20,93$	Fungívoros 2
<i>Aphelenchoides</i>	0,21	$\pm 0,52$	0,36	$\pm 0,89$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	Fungívoros 2
<i>Paratylenchus</i>	0,00	$\pm 0,00$	1,09	$\pm 1,70$	56,26	$\pm 118,22$	7,48	$\pm 9,39$	Herbívoros 2
Tylenchidae	2,30	$\pm 2,10$	0,92	$\pm 1,53$	0,00	$\pm 0,00$	0,79	$\pm 1,92$	Herbívoros 2
<i>Eudorylaimus</i>	0,00	$\pm 0,00$	0,41	$\pm 0,64$	0,29	$\pm 0,71$	4,83	$\pm 3,90$	Omnívoros 4
<i>Mesodorylaimus</i>	2,81	$\pm 6,88$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	Omnívoros 4
<i>Prodorylaimus</i>	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,13	$\pm 0,33$	0,00	$\pm 0,00$	Omnívoros 4
<i>Gracilacus</i>	12,31	$\pm 14,94$	3,37	$\pm 7,01$	0,00	$\pm 0,00$	89,99	$\pm 220,43$	Herbívoros 2

Tabla 7: Abundancia media de los nematodos identificados, para cada tratamiento. Parque del Teide.

En el parque de Sierra Nevada (Tabla 8) la riqueza de taxones de nematodos fue de 20 grupos. De estos 20 taxones 10 son bacterívoros, 3 fungívoros, 5 herbívoros, 1 omnívoros y 1 predadores; siendo los bacterívoros los más abundantes (50%), y los predadores y omnívoros los más escasos.

PARQUE	SIERRA NEVADA								GRUPO TRÓFICO Y CP
	0-0		10-0		0-20		10-20		
	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	
<i>Panagrolaimus</i>	1,05	$\pm 2,57$	0,00	$\pm 0,00$	1,21	$\pm 2,97$	0,00	$\pm 0,00$	Bacterívoros 1
<i>Acrobelloides</i>	149,78	$\pm 58,55$	203,88	$\pm 160,12$	248,99	$\pm 162,79$	244,06	$\pm 130,90$	Bacterívoros 2
<i>Cervidellus</i>	2,19	$\pm 2,68$	0,00	$\pm 0,00$	5,58	$\pm 8,60$	1,10	$\pm 2,69$	Bacterívoros 2
<i>Plectus</i>	3,73	$\pm 9,13$	0,80	$\pm 1,96$	2,13	$\pm 5,23$	1,43	$\pm 2,50$	Bacterívoros 2
<i>Prismatolaimus</i>	0,53	$\pm 1,29$	0,00	$\pm 0,00$	2,13	$\pm 5,23$	1,16	$\pm 2,84$	Bacterívoros 3
<i>Aphelenchus</i>	13,74	$\pm 14,07$	20,22	$\pm 25,10$	10,09	$\pm 8,77$	34,06	$\pm 51,37$	Fungívoros 2
<i>Aphelenchoides</i>	14,28	$\pm 26,83$	4,13	$\pm 7,24$	37,53	$\pm 49,64$	12,93	$\pm 14,69$	Fungívoros 2
<i>Pratylenchus</i>	2,29	$\pm 5,61$	18,75	$\pm 39,04$	0,92	$\pm 2,26$	0,00	$\pm 0,00$	Herbívoros 3
<i>Paratylenchus</i>	3,36	$\pm 3,71$	0,58	$\pm 1,42$	1,21	$\pm 2,97$	1,02	$\pm 2,49$	Herbívoros 2
<i>Tylenchidae</i>	352,39	$\pm 279,88$	107,41	$\pm 70,69$	208,85	$\pm 112,70$	198,35	$\pm 168,22$	Herbívoros 2
<i>Tylenchorhynchus</i>	1,49	$\pm 3,65$	0,58	$\pm 1,42$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	Herbívoros 3
<i>Eudorylaimus</i>	55,33	$\pm 57,90$	7,72	$\pm 7,62$	29,99	$\pm 31,03$	32,62	$\pm 27,44$	Omnívoros 4
<i>Aporcelaimidae</i>	1,27	$\pm 3,11$	0,39	$\pm 0,95$	0,00	$\pm 0,00$	0,20	$\pm 0,49$	Predadores 5
<i>Tylencholaimus</i>	7,92	$\pm 16,50$	1,85	$\pm 2,95$	4,92	$\pm 4,60$	3,11	$\pm 3,41$	Fungívoros 4
<i>Chiloplacus</i>	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,78	$\pm 1,91$	0,00	$\pm 0,00$	Bacterívoros 2
<i>Eumonhystera</i>	2,01	$\pm 3,27$	0,32	$\pm 0,78$	0,00	$\pm 0,00$	6,97	$\pm 9,25$	Bacterívoros 2
<i>Chromadonidae</i>	1,04	$\pm 2,55$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	Bacterívoros 3
<i>Heterocephalobus</i>	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,42	$\pm 1,02$	Bacterívoros 2
<i>Rotylenchus</i>	102,26	$\pm 136,88$	24,29	$\pm 48,02$	18,89	$\pm 23,91$	7,10	$\pm 14,66$	Herbívoros 3
<i>Cephalobus</i>	4,89	$\pm 8,04$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	2,03	$\pm 4,98$	Bacterívoros 2

Tabla 8: Abundancia media de los nematodos identificados, para cada tratamiento. Parque de Sierra Nevada.

En Guadarrama, como se puede ver en la Tabla 9, se identificaron 18 taxones diferentes de nematodos, de los cuales 8 son bacterívoros, 3 fungívoros, 4 herbívoros, 2 omnívoros y 1 predadores; siendo los bacterívoros los más abundantes, y los predadores los más escasos.

PARQUE	GUADARRAMA								
	0-0		10-0		0-20		10-20		GRUPO TRÓFICO Y CP
	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	
<i>Panagrolaimus</i>	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	3,97	$\pm 9,72$	0,00	$\pm 0,00$	Bacterívoros 1
<i>Acrobeles</i>	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	23,44	$\pm 57,41$	0,00	$\pm 0,00$	Bacterívoros 2
<i>Acrobeloides</i>	113,70	$\pm 152,44$	99,70	$\pm 124,36$	155,20	$\pm 159,67$	246,69	$\pm 306,85$	Bacterívoros 2
<i>Heterocephalobus</i>	0,16	$\pm 0,39$	2,98	$\pm 6,31$	1,15	$\pm 2,82$	0,00	$\pm 0,00$	Bacterívoros 2
<i>Cephalobus</i>	0,65	$\pm 1,59$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	Bacterívoros 2
<i>Cervidellus</i>	0,00	$\pm 0,00$	4,02	$\pm 9,33$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	Bacterívoros 2
<i>Plectus</i>	29,70	$\pm 56,19$	26,45	$\pm 30,84$	22,74	$\pm 26,15$	24,17	$\pm 37,92$	Bacterívoros 2
<i>Prismatolaimus</i>	0,00	$\pm 0,00$	0,64	$\pm 1,57$	0,00	$\pm 0,00$	1,59	$\pm 2,90$	Bacterívoros 3
<i>Aphelenchus</i>	0,32	$\pm 0,78$	1,49	$\pm 3,15$	0,77	$\pm 1,88$	0,00	$\pm 0,00$	Fungívoros 2
<i>Aphelenchoides</i>	15,90	$\pm 33,94$	16,02	$\pm 14,57$	42,97	$\pm 88,87$	50,45	$\pm 64,98$	Fungívoros 3
<i>Pratylenchus</i>	0,16	$\pm 0,39$	13,41	$\pm 28,40$	2,73	$\pm 4,33$	1,41	$\pm 3,46$	Herbívoros 3
<i>Paratylenchus</i>	0,00	$\pm 0,00$	1,35	$\pm 2,58$	0,36	$\pm 0,88$	1,40	$\pm 2,69$	Herbívoros 2
Tylenchidae	25,82	$\pm 26,82$	124,68	$\pm 181,05$	73,89	$\pm 71,25$	55,18	$\pm 46,35$	Herbívoros 2
<i>Eudorylaimus</i>	0,00	$\pm 0,00$	4,44	$\pm 2,43$	4,45	$\pm 6,94$	1,69	$\pm 2,83$	Omnívoros 4
Aporcelaimidae	0,27	$\pm 0,67$	0,00	$\pm 0,00$	0,71	$\pm 1,73$	4,52	$\pm 11,06$	Predadores 5
<i>Tylencholaimus</i>	16,82	$\pm 10,12$	16,06	$\pm 4,66$	12,91	$\pm 12,75$	27,11	$\pm 21,19$	Fungívoros 4
<i>Meloidogyne</i>	0,48	$\pm 1,18$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	2,26	$\pm 5,53$	Herbívoros 3
<i>Mesodorylaimus</i>	0,18	$\pm 0,43$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	Omnívoros 4

Tabla 9: Abundancia media de los nematodos identificados, para cada tratamiento. Parque de Guadarrama.

En el parque de Picos de Europa (Tabla 10), se identificaron un total de 21 taxones de nematodos, de los cuales 9 son bacterívoros, 3 fungívoros, 6 herbívoros, 1 omnívoros y 2 predadores; siendo los bacterívoros los más abundantes, y los omnívoros los menos abundantes. Picos de Europa es, de los cuatro parques, el que mayor riqueza de taxones presenta, lo que implica una mayor biodiversidad edáfica.

PARQUE	PICOS DE EUROPA								
TRATAMIENTO	0-0		10-0		0-20		10-20		GRUPO TRÓFICO Y CP
	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	\bar{X}	$\pm SD$	
dauer	2,21	$\pm 5,40$	43,94	$\pm 41,50$	78,15	$\pm 131,19$	59,50	$\pm 78,89$	
<i>Panagrolaimus</i>	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	1,10	$\pm 2,71$	Bacterívoros 1
<i>Acrobeloides</i>	989,05	$\pm 599,59$	1174,84	$\pm 381,14$	1094,85	$\pm 601,28$	1073,56	$\pm 793,31$	Bacterívoros 2
<i>Heterocephalobus</i>	14,35	$\pm 24,59$	0,00	$\pm 0,00$	4,60	$\pm 11,28$	33,47	$\pm 66,44$	Bacterívoros 2
<i>Cervidellus</i>	13,37	$\pm 21,13$	33,16	$\pm 39,70$	69,33	$\pm 130,68$	12,98	$\pm 21,76$	Bacterívoros 2
<i>Plectus</i>	62,14	$\pm 74,92$	219,66	$\pm 160,72$	171,03	$\pm 147,00$	74,60	$\pm 84,14$	Bacterívoros 2
<i>Prismatolaimus</i>	3,35	$\pm 8,20$	12,61	$\pm 30,89$	36,40	$\pm 39,30$	4,89	$\pm 10,34$	Bacterívoros 3
<i>Aphelenchoides</i>	478,51	$\pm 374,96$	235,93	$\pm 228,69$	373,67	$\pm 432,98$	139,57	$\pm 84,22$	Fungívoros 2
<i>Diphterophora</i>	3,62	$\pm 8,88$	0,00	$\pm 0,00$	4,60	$\pm 11,28$	0,00	$\pm 0,00$	Fungívoros 3
<i>Pratylenchus</i>	34,43	$\pm 27,21$	38,23	$\pm 42,35$	145,39	$\pm 207,55$	49,46	$\pm 58,76$	Herbívoros 3
<i>Paratylenchus</i>	19,78	$\pm 16,89$	131,24	$\pm 141,06$	113,72	$\pm 95,96$	25,29	$\pm 21,76$	Herbívoros 2
Tylenchidae	313,41	$\pm 211,12$	139,15	$\pm 103,25$	361,77	$\pm 231,88$	227,19	$\pm 179,02$	Herbívoros 2
<i>Tylenchorhynchus</i>	13,10	$\pm 16,15$	64,18	$\pm 88,86$	24,69	$\pm 40,06$	12,07	$\pm 14,45$	Herbívoros 3
<i>Eudorylaimus</i>	52,90	$\pm 72,58$	66,42	$\pm 26,03$	66,42	$\pm 69,55$	44,55	$\pm 49,33$	Omnívoros 4
Aporcelaimidae	14,79	$\pm 20,91$	0,00	$\pm 0,00$	1,26	$\pm 3,08$	3,55	$\pm 8,69$	Predadores 5
<i>Tylencholaimus</i>	1,85	$\pm 4,53$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	6,38	$\pm 10,14$	Fungívoros 4
<i>Eumonhystera</i>	2,21	$\pm 5,40$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	8,87	$\pm 21,73$	Bacterívoros 2
<i>Clarcus</i>	3,13	$\pm 5,42$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	Predadores 4
<i>Teratocephalus</i>	0,00	$\pm 0,00$	10,78	$\pm 26,41$	13,00	$\pm 20,78$	4,45	$\pm 10,90$	Bacterívoros 3
<i>Metateratocephalus</i>	3,35	$\pm 8,20$	29,40	$\pm 46,24$	5,23	$\pm 12,81$	31,29	$\pm 35,96$	Bacterívoros 3
<i>Gracilacus</i>	8,82	$\pm 21,61$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	Herbívoros 2
<i>Xiphinema</i>	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	1,10	$\pm 2,71$	Herbívoros 5

Tabla 10: Abundancia media de los nematodos identificados, para cada tratamiento. Parque de Picos de Europa.

El principal resultado del análisis *permanova* para analizar la comunidad de nematodos ofrece que la variable parque nacional tiene un efecto muy significativo ($P < 0,01$) sobre la comunidad de nematodos, y la interacción parque nacional por tratamiento también tiene un efecto significativo ($P < 0,05$) en la comunidad. Sin embargo, la variable tratamiento es no significativa ($P > 0,1$) (Tabla 11).

	Df	R ²	F	Pr (>F)
Parque	3	0,50224	33,0797	0,001 ***
Tratamiento	3	0,02215	1,4586	0,116
Parque · Tratamiento	9	0,07074	1,5532	0,008 **
Residual	80	0,40487		
Total	95	1		

Tabla 11: Datos asociados al análisis permanova

El resultado del análisis *rda* constreñido (Figura 5) argumenta el hecho de que la composición de la comunidad edáfica pueda ser explicado con la suma de las variables cualitativas parque nacional y tratamiento, con una alta significancia ($P < 0,01$).

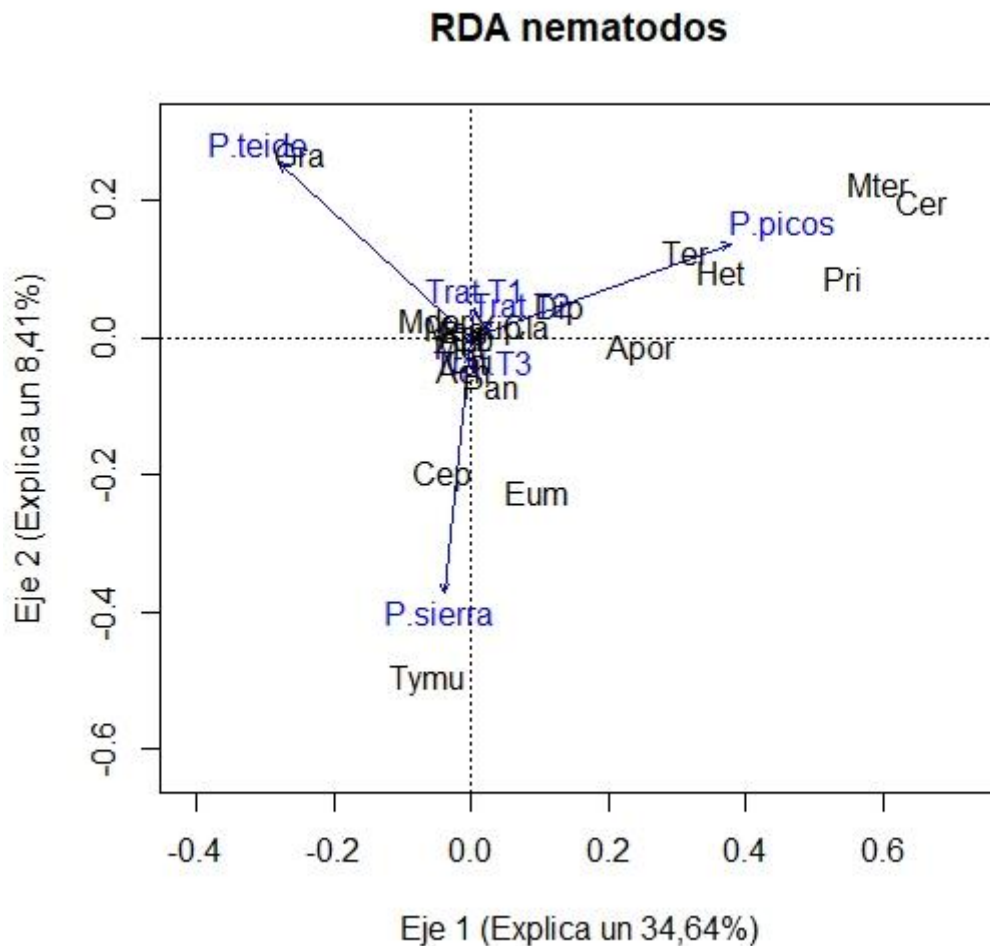


Figura 5: Análisis multivariante de la composición de la comunidad edáfica en función de las variables cualitativas parque y tratamiento. Fuente: propia. (Gra=Grailacus, Cep=Cephalobus, Tym=Tylencholaimus, Eum= Eumonhystera, Ter= Teratocephalus, Het= Heterocephalobus, Pri= Pristomatolaimus, Mter= Metateratocephalus, Cer= Cervidellus)

Las variables parque y tratamiento explican la composición de la comunidad edáfica en un 49,88%. Los ejes del entorno vectorial que tienen mayor importancia en la explicación de la composición de la comunidad son los dos primeros, que explican un 34,64% el eje uno, y un 8,41% el segundo eje.

Como se puede observar en la Figura 5, el género de nematodos más característico del parque del Teide es el *Gracilacus*. El parque de Sierra Nevada se puede relacionar con la presencia de los géneros *Tylencholaimus*, *Cephalobus*, y *Eumonhystera*. El parque de Picos de Europa presenta varios géneros característicos, al ser el parque con mayor diversidad, y son *Heterocephalobus*, *Teratocephalus*, *Metateratocephalus*, *Cervidellus*, y *Prismatolaimus*.

El análisis *betadisper* es muy significativo ($P < 0,01$) para la variable cualitativa “parque nacional”, de forma que los taxones de nematodos se dispersan de forma homogénea en una nube de puntos en función del parque (Figura 6).

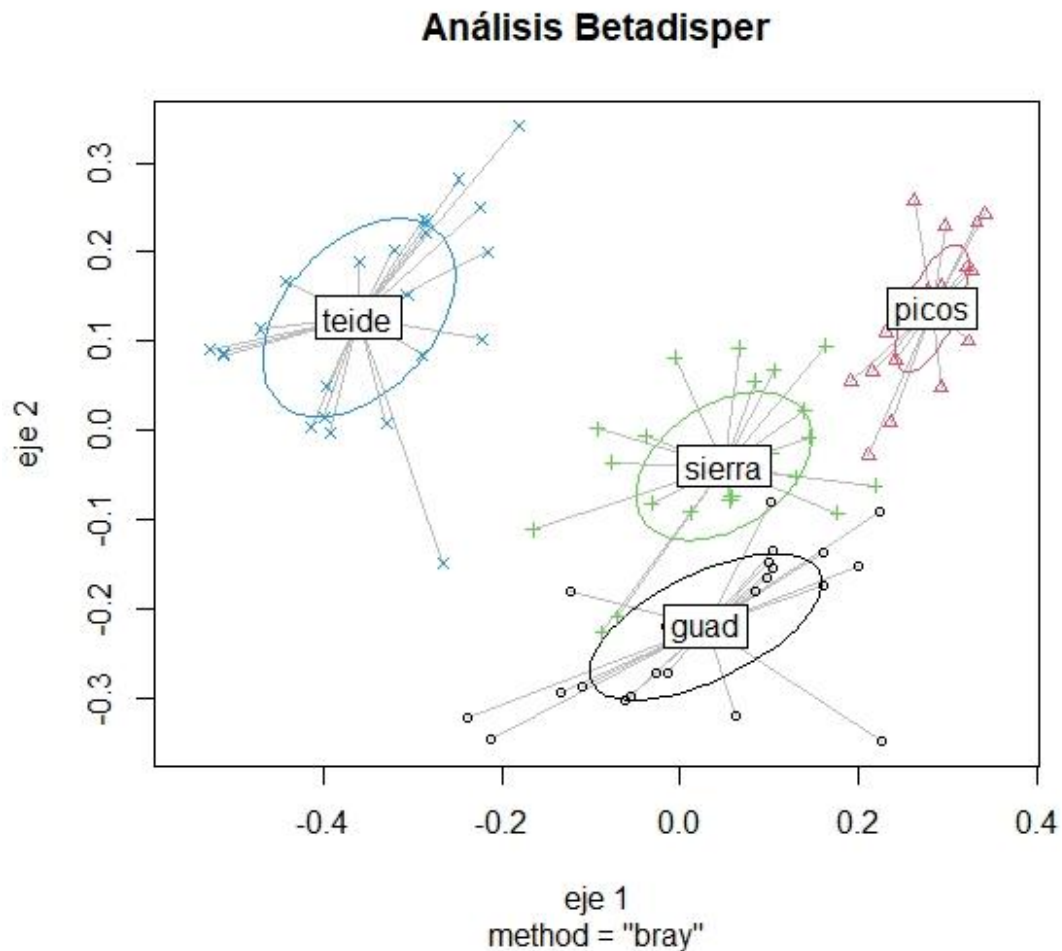


Figura 6: Análisis betadisper de la dispersión de las variables. Fuente: Propia.

Tomando como datos, el total de nematodos por cada cien gramos de peso seco para cada parque y cada tratamiento, se obtiene la Figura 7.

En dicha Figura 3 se puede observar como el parque con mayor cantidad de nematodos por cada cien gramos de peso seco, sin atender al tratamiento, es el parque de Picos de Europa, con una gran diferencia respecto a los otros tres parques.

También, teniendo en cuenta el tratamiento empleado, se puede ver reflejado en la figura un aumento del total de nematodos con la adición de fósforo y nitrógeno en los parques de Teide y Guadarrama. Por el contrario, este crecimiento no tiene lugar en los parques de Sierra Nevada y Picos de Europa, produciéndose en este último un pronunciado descenso del número de individuos en el tratamiento más fertilizante (10P-20N).

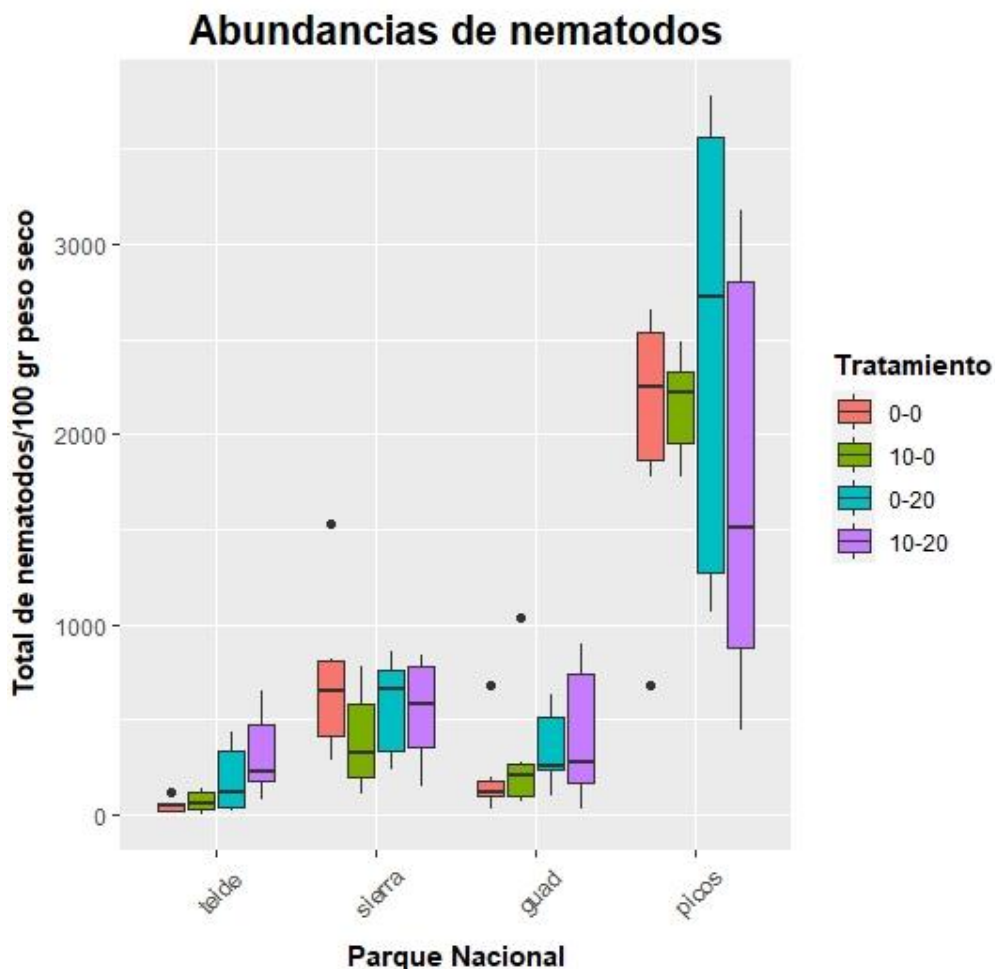


Figura 7: Boxplot de las abundancias de nematodos en función del parque y el tratamiento. Fuente: propia.

5.3. Índices ecológicos basados en la comunidad de nematodos.

El resultado del análisis *rda* constreñido de la Figura 8 muestra argumentos que defienden el hecho de que los índices ecológicos basados en la comunidad edáfica de nematodos pueden ser explicados con la suma de las variables cualitativas parque nacional, el tratamiento, y las propiedades fisicoquímicas del suelo con una alta significancia ($P < 0,01$).

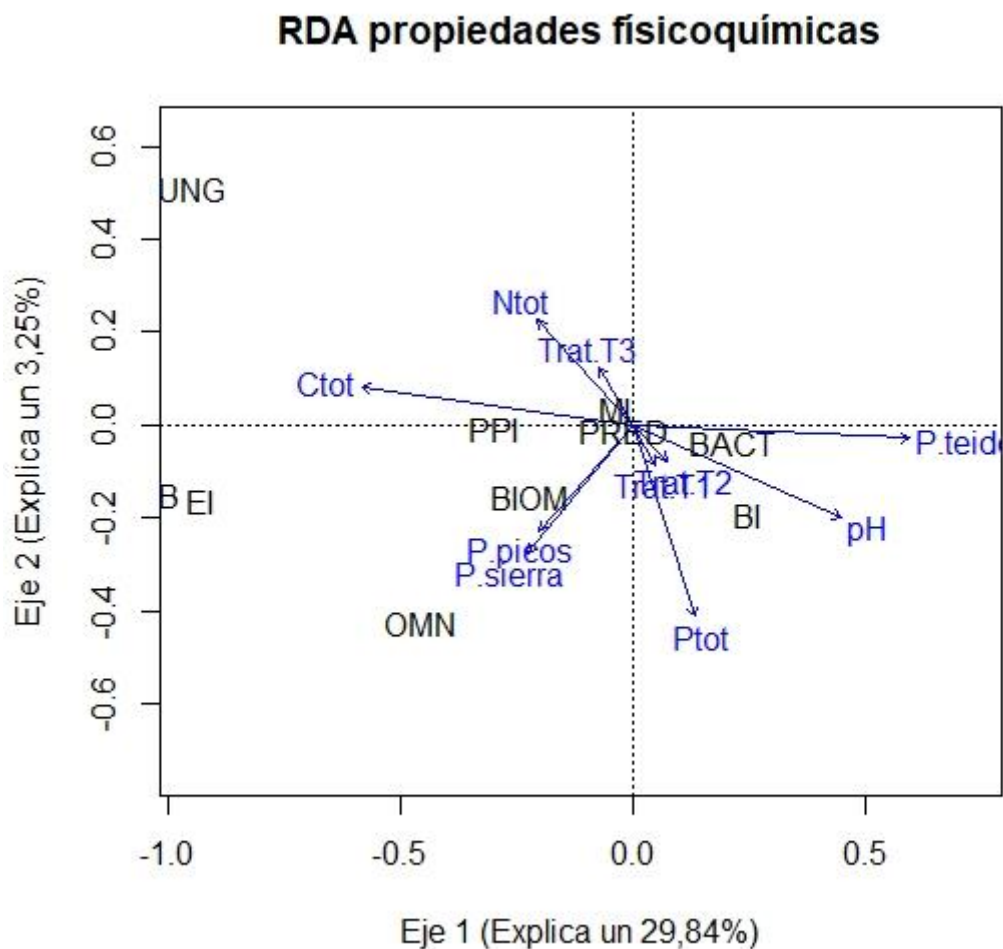


Figura 8: Análisis multivariante de los índices ecológicos basados en los nematodos, en función de las variables cualitativas parque y tratamiento y las propiedades fisicoquímicas del suelo (C, N, P total en el suelo y pH) Fuente: propia.

Las variables ambientales parque, tratamiento, y propiedades fisicoquímicas carbono total, nitrógeno total, fósforo total, y pH explican la variabilidad de los índices ecológicos edáficos en un 37,22%.

Los ejes del entorno vectorial que tienen mayor importancia en la explicación de la variabilidad de los índices ecológicos son el eje uno y el eje dos, que explicaron un 29,84%, y un 3,25%, respectivamente.

Se puede apreciar en la Figura 8 algunas relaciones entre los índices y los parques, los tratamientos y las propiedades fisicoquímicas del suelo. El parque del Teide está negativamente relacionado con los nematodos herbívoros y fungívoros, y en menor medida con el índice de enriquecimiento. A su vez, el pH tiene estas mismas relaciones.

El índice basal, y los bacterívoros tienen una relación negativa con el nitrógeno total. El parque de Picos de Europa es el que mayor número de individuos presenta, y por tanto el que mayor biomasa de nematodos tiene. El parque de Sierra Nevada presenta relación con los nematodos omnívoros.

5.4. Relaciones entre la comunidad de nematodos y la comunidad microbiológica.

El resultado del análisis *rda* constreñido (Figura 9) muestra los índices ecológicos basados en la comunidad edáfica de nematodos explicados con la suma de las variables cualitativas parque nacional, el tratamiento, y las propiedades microbiológicas del suelo (carbono enzimático, nitrógeno enzimático, fósforo enzimático, comunidad bacteriana estimada por qpcr, y comunidad de hongos estimada por qpcr) con una alta significancia ($P < 0,01$).

Las variables ambientales parque, tratamiento, y propiedades microbiológicas; explican la variabilidad de los índices ecológicos en un 38,33%.

Los ejes del entorno vectorial que tienen mayor peso en la explicación de la variabilidad de los índices son el eje uno, que explica un 30,55%, y el eje dos, que explica un 3,37%.

RDA activ. enzimáticas

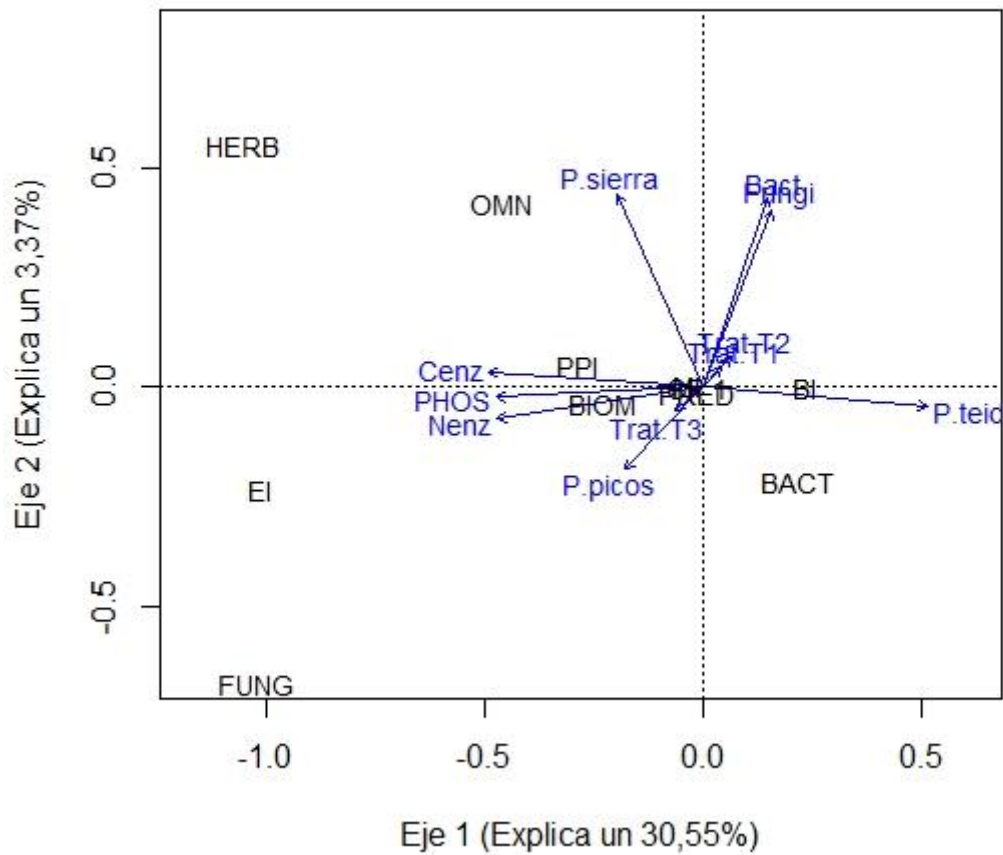


Figura 9: Análisis multivariante de los índices ecológicos basados en los nematodos, en función de las variables cualitativas parque y tratamiento y las propiedades microbiológicas del suelo (actividades enzimáticas y abundancia de hongos y bacterias) Fuente: propia.

La abundancia de bacterias estimada por qpcr está relacionada con los bacterívoros y el índice de estructura. Sin embargo, de forma poco intuitiva, la abundancia de hongos estimada por qpcr no está relacionada con la presencia de nematodos fungívoros.

El potencial de ciclado de las actividades enzimáticas relacionadas con ciclo del carbono, la fosfatasa, y el potencial de ciclado de las actividades enzimáticas relacionadas con ciclo del nitrógeno, presentan relación con el índice de parásitos de las plantas; pero tienen una relación negativa con los bacterívoros y el índice basal.

6. DISCUSIÓN

Los efectos del cambio global, están produciendo alteraciones en los ecosistemas terrestres (debido a incrementos del CO₂ atmosférico, deposición de N atmosférico, aumento de la temperatura y sequías, etc.). Estos vectores de cambio global influyen a su vez en la biología de los nematodos y en sus funciones dentro de la red trófica edáfica (Sánchez-Moreno y Talavera, 2013). Sin embargo, existe muy poca información sobre cómo influye uno de los principales efectos de dicho cambio global, la deposición de nitrógeno (N) atmosférico (y, por ende, deposición de fósforo (P)), a las comunidades de nematodos edáficos y al funcionamiento de la red trófica en general (Xiong et al., 2019).

En primer lugar, los resultados de los análisis con la función estadística *anova* muestran que los efectos de los distintos tratamientos sobre las variables ecológicas, fisicoquímicas y microbiológicas no son demasiado significativos; mientras que el efecto del parque frente a la práctica totalidad de las variables es muy significativo. Esto contradice la primera hipótesis planteada, puesto que la deposición artificial de nitrógeno y fósforo no afectó negativamente a la biodiversidad de las comunidades de nematodos en este estudio. La principal fuente de variación en los distintos parámetros medidos de la comunidad de nematodos fueron las características edáficas y de los ecosistemas de los parques y, en particular, el gradiente de recursos y aridez que se produce a medida que aumenta la latitud, corroborando las expectativas que se plantean en la segunda. Además, la respuesta de cada uno de los ecosistemas a los agentes de cambio global puede estar influenciada por las interacciones con los diversos componentes del entorno y no únicamente por factores directos (Ochoa-Hueso & Stevens, 2015).

Hay que tener en cuenta que la perturbación artificial realizada en este experimento de deposición de nitrógeno y fósforo, sólo se ha llevado a cabo a lo largo de tres años. Existe la posibilidad de que un tratamiento continuado y prolongado durante un periodo superior, pueda significar un cambio en los efectos de estos tratamientos sobre los distintos ecosistemas alpinos del estudio. Es de necesario conocimiento que la velocidad y la magnitud de las respuestas de los ecosistemas ante perturbaciones de cualquier tipo, y también su capacidad de adaptación frente a nuevas condiciones, son distintas (Bardgett et al., 2013).

Además, estudios anteriores presentan que la cantidad de deposición de nitrógeno necesaria para influir de manera significativa en la densidad de las comunidades de nematodos en ecosistemas alpinos es varias veces superior a la utilizada en este proyecto (>80 kg N/ha·año) (Lokupitiya et al., 2000). Estas cantidades de deposición atmosférica podrían llegar a producirse si el ritmo de los niveles de contaminación atmosférica continúa aumentando, y se podría alcanzar la cantidad de 50 kg N/ha·año para el año 2050 (Sutton *et al.*, 2007).

6.1. Abundancia de nematodos

En primer lugar, se ha demostrado en anteriores estudios que la abundancia de nematodos es muy variable a lo largo de los ecosistemas terrestres del mundo, pudiendo variar desde docenas hasta miles de individuos en cien gramos de suelo (Van den Hoogen et al., 2019). Factores como los animales, o las condiciones climáticas influyen en esta abundancia; pero el factor más importante, con mucha diferencia, es el suelo, y sus propiedades. Este nivel de variación demuestra la necesidad de tener unos grandes marcos de datos en estos análisis, para que los resultados puedan ser relacionados con patrones a mayor escala (Van den Hoogen et al., 2019). En otros estudios basados en ecosistemas alpinos similares a los tratados en el presente trabajo, se observó que otro factor que influye de forma positiva en la abundancia de nematodos es la altura (Kergunteuil et al., 2016),

El parque de Picos de Europa es el más rico en cuanto a recursos, materia orgánica y vegetación, lo que se traduce en una mayor abundancia de nematodos. Sin embargo, el siguiente parque con mayor riqueza de recursos y más benigno en cuanto a condiciones ambientales es el parque de Guadarrama, y cabría esperar una mayor abundancia de nematodos en este parque frente a los dos con condiciones más adversas (Sierra Nevada y Teide), pero los resultados muestran que Sierra Nevada le supera en ambos aspectos.

Esto podría deberse a que el parque de la Sierra de Guadarrama es de los parques de la Península Ibérica el que mayor presión antrópica y contaminación soporta, ya que se encuentra cercano a uno de los núcleos urbanos más importantes, como es Madrid.

En cuanto a diferencias en la abundancia de nematodos según el tratamiento utilizado, el único parque que respondió significativamente fue el Teide ($P = 0,02$). Es el parque de recursos más escasos, y con unas condiciones más duras, de forma que no es sorprendente

que una fertilización no demasiado perturbadora afecte de forma positiva mediante mecanismos “bottom-up” vía crecimiento vegetal o aumento de la actividad microbiana (Vestergård et al., 2004). Por otro lado, la perturbación por deposición de fósforo y nitrógeno afecta negativamente en mayor medida a los nematodos predadores y omnívoros en ecosistemas subalpinos (Yang et al., 2019) como el del Teide, por lo que los crecimientos en abundancia de este parque son fruto del incremento de nematodos herbívoros, fungívoros y sobre todo bacterívoros; a costa de una pérdida en la complejidad de la red trófica por el descenso en abundancia de grupos que adquieren una posición más alta dentro de la red trófica edáfica (Shaw et al., 2019).

6.2. Diversidad de la comunidad de nematodos

La mayor riqueza de taxones encontrada en el parque de Picos de Europa se puede argumentar de la misma forma que en el apartado anterior. Es el parque con mayores recursos y condiciones más favorables para los nematodos. Por ello la comunidad de nematodos es más diversa, y se pueden encontrar un mayor número de géneros característicos, que son poco abundantes o inexistentes en el resto de parques nacionales estudiados.

Por el contrario, en el parque del Teide la riqueza de taxones es mínima, y el gradiente de aridez y de recursos actúa como condicionante, esta vez en cuanto a la diversidad en la comunidad de nematodos. No obstante, esta pérdida de abundancia y riqueza en las comunidades de nematodos a medida que aumenta la aridez, no afecta por igual a todos los grupos tróficos, siendo los nematodos bacterívoros más resistentes en este aspecto (Xiong et al., 2019).

Sólo uno de los géneros de nematodos identificados en el Teide podría definirse como característico de este parque. Los taxones de nematodos que aparecen en las condiciones de aridez, baja fertilidad, y elevado pH del Teide, son los géneros más ubicuos, resistentes, y adaptados a múltiples condiciones. Son nematodos capaces de soportar la deshidratación y/o que han desarrollado mecanismos de supervivencia para colonizar estos hábitats tan extremos (Bongers y Bongers, 1998).

Además, es el único parque del estudio que no presenta representación de los cinco grupos tróficos de nematodos, ya que no se identificó ningún nematodo predador. Esto sugiere una menor complejidad en la red trófica edáfica, y diverge de la segunda hipótesis planteada, puesto que los nematodos predadores suelen ser nematodos poco resistentes a perturbaciones, pero con ciclos de vida largos (k estrategias) (Ferris et al., 2001).

6.3. Índices ecológicos y propiedades fisicoquímicas y microbiológicas

Los índices basados en la comunidad de nematodos también resaltan la gran diferencia existente entre los parques, más que entre los tratamientos empleados.

En el caso del índice de enriquecimiento (EI) es un índice que se puede relacionar con la fertilidad del suelo, y con una descomposición de la materia orgánica mediada por bacterias (Sánchez-Moreno y Ferris, 2018). La relación negativa de este índice con el parque del Teide manifiesta las condiciones extremas que posee este parque. Esto también se manifiesta en su relación inversa con los nutrientes del suelo, y los porcentajes de fungívoros y herbívoros, puesto que es el parque con menor presencia fúngica y vegetal de los cuatro parques estudiados.

Otros resultados a discutir son las relaciones de los índices basal (BI) y de estructura (SI). Son contrarios, mientras que el de estructura refleja la persistencia de nematodos omnívoros y predadores, complejidad de la red trófica edáfica (Sánchez-Moreno, 2018), y un correcto funcionamiento del ecosistema (Hanel, 2017); el índice basal indica un agotamiento en la red trófica edáfica, mala salud del ecosistema (Hanel, 2017), y aumenta con la presencia de nematodos que ocupan los primeros escalones de esta red trófica (Ferris et al., 2001).

Los parques de Picos de Europa y Sierra Nevada están relacionados con los nematodos omnívoros, que ocupan escalones altos en la red trófica edáfica, y también tienen mayor relación que el Teide con el índice de estructura, lo que confirma que la complejidad de la red trófica es mucho mayor en Picos de Europa y Sierra Nevada que en el Teide, ya que, como se ha visto anteriormente, este parque presenta los niveles más altos de la red trófica vacíos, al no identificarse ningún nematodo predador. El índice basal es mayor en el Teide también por este motivo.

También es importante conocer las respuestas de las comunidades microbianas de bacterias y hongos a cambios en los nutrientes del suelo, puesto que algunos nematodos dependen de ellas. Estas comunidades son especialmente sensibles a la adición de nitrógeno y fósforo (Leff et al., 2015). De ahí que estén negativamente relacionadas con el tratamiento de mayores cantidades (10P-20N).

En cuanto a las actividades enzimáticas extracelulares relacionadas con los ciclos del fósforo, nitrógeno y carbono, son sintetizadas por los microorganismos del suelo, y están vinculadas con procesos biogeoquímicos, como el procesamiento de la materia orgánica o con los ciclos de nutrientes. Por tanto, son fundamentales para comprender la dinámica funcional del suelo (Bell et al., 2013).

En el presente estudio, las diferencias en actividad enzimática se producen entre parques y siguen el gradiente de abundancia de recursos, aumentando al incrementarse la cantidad de nutrientes en el suelo. Así, los parques de Sierra Nevada y Picos de Europa presentan una cantidad de recursos y unos niveles de actividad enzimática superiores a los de Teide. Además, algunas de estas actividades enzimáticas, como la fosfatasa del ciclo del fósforo, están estrechamente ligadas con las propiedades del suelo y el pH (Deng et al., 2017), cuyas características y valores son muy distintos entre parques.

7. CONCLUSIONES

Aún sigue habiendo mucha incertidumbre sobre los efectos que puede tener el cambio global en ecosistemas tan ricos y delicados como son los de alta montaña.

Los efectos de los distintos tratamientos de deposición de fósforo y nitrógeno no tuvieron la significatividad esperada, ya que no afectaron en gran medida a las abundancias y biodiversidades de las comunidades de nematodos.

En cambio, el efecto del parque, es decir, el gradiente de aridez y recursos entre ellos, y las grandes diferencias ambientales, sí que fue muy significativo. A medida que aumenta la disponibilidad de recursos y las condiciones se hacen más benignas, como en Picos de Europa, la comunidad de nematodos se hace más abundante y rica en taxones tanto colonizadores (r estrategias) como persistentes (k estrategias). Por el contrario, en condiciones extremas, y con suelos de recursos muy limitados, como en el caso del Teide, la abundancia de nematodos disminuyó, y los taxones que aparecieron son los nematodos más ubicuos, colonizadores, y resistentes a condiciones extremas.

Por todo lo anterior, se debe continuar investigando los efectos del cambio global, y más concretamente los efectos de la deposición de nitrógeno y fósforo sobre los ecosistemas alpinos. La importancia de estos ecosistemas en cuanto a la biodiversidad, servicios ecosistémicos y potencial ecológico, los hace lugares de mucho valor.

Comparar resultados con otros ecosistemas similares en otros lugares serán necesarios para comprender mejor los efectos de la deposición de N y P del cambio global, y poder tomar medidas de conservación.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Armas, C., 2015. *Consecuencias de la deposición atmosférica de nitrógeno y fósforo en las comunidades vegetales y microbiota del suelo en sistemas de alta montaña. Memoria científico-técnica del proyecto de investigación financiado por Organismo Autónomo de Parques Nacionales (ref OAPN 1578/2015).*
- Bardgett, R. D., Manning, P., Morriën, E., & Vries, F. T., 2013. *Hierarchical responses of plant–soil interactions to climate change: consequences for the global carbon cycle. Journal of Ecology, 101(2), 334-343.*
- Bell, C. W., Fricks, B. E., Rocca, J. D., Steinweg, J. M., McMahon, S. K., & Wallenstein, M. D., 2013. *High-throughput fluorometric measurement of potential soil extracellular enzyme activities. Journal of visualized experiments: JoVE, 81(1), 1-16.*
- Bongers, T., 1990. *The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. Oecologia (1990) 83:14-19.*
- Bongers, T., van der Meulen, H., & Korthals, G., 1997. *Inverse relationship between the nematode maturity index and plant parasite index under enriched nutrient conditions. Applied Soil Ecology 6 195-199.*
- Bongers, T., & Bongers, M., 1998. *Functional diversity of nematodes. Applied Soil Ecology 10 239-251.*
- Da Silveira, J., 2018. *Consecuencias de la deposición atmosférica de nitrógeno y fósforo sobre el acoplamiento de los ciclos de nutrientes en ecosistemas alpinos (Trabajo de fin de máster). Universidad de Córdoba.*
- Deng, Q., Hui, D., Dennis, S., & Reddy, K., 2017. *Responses of terrestrial ecosystem phosphorus cycling to nitrogen addition: a meta-analysis. Global Ecology & Biogeography 26, 713–728.*

- Donhauser, J. & Frey, B., 2018. *Alpine soil microbial ecology in a changing world. FEMS Microbiology Ecology*, 94, fty099.
- Dorta, P., Gelado, M. D., Cardona, P., Collado, C., Criado, C., Hernandez, J. J., & Lopez, P., 2002. *Algunas consideraciones sobre la importancia del polvo de origen sahariano en el clima del archipiélago canario y su aporte a las aguas superficiales oceánicas: el episodio de abril de 2002. Publicaciones de la Asociación Española de Climatología*, 3(1), 13-24.
- Ferris, H., Bongers, T., & de Goede, R.G.M., 2001. *A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept. Applied Soil Ecology* 18 13–29.
- Gallardo, A., Covelo, F., Morillas, L., & Delgado, M., 2009. *Ciclos de nutrientes y procesos edáficos en los ecosistemas terrestres: especificidades del caso mediterráneo y sus implicaciones para las relaciones suelo-planta. Ecosistemas*. 18(2), 4-19. Disponible en: <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=600>.
- García-Gomez, H., Gonzalez-Fernandez, I., Vivianco, M.G., Calvete-Sogo, H., Vermejo-Vermejo, V., Valiño, F., Rábago, I., & Alonso, R., 2017. *Depósito atmosférico de nitrógeno en España y evaluación del riesgo de efectos en los hábitats terrestres de la Red de Parques Nacionales. Ecosistemas*. 26(1), 55-65, DOI: 0.7818/ECOS.2017.26-1.08.
- H. Wickham. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York*, 2016.
- Háněl, L., 2017. *Soil nematodes in alpine meadows of the Tatra National Park (Slovak Republic). Helminthologia* 54(1) 48–67. DOI: 10.1515/helm-2017-0005.
- Hagedorn, F., Gavazov, K., & Alexander, J.M., 2019. *Above- and belowground linkages shape responses of mountain vegetation to climate change. Science* 365, 1119–1123.

Jari Oksanen, F. Guillaume Blanchet, Michael Friendly, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Dan McGlinn, Peter R Minchin, R. B. O'Hara, Gavin Simpson, Peter Solymos, M. Henry H. Stevens, Eduard Szoecs & Wagner, H., 2019. *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-6. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

Fox, F., & Weisberg, S., 2019. *An R Companion to Applied Regression, Third Edition*. Thousand Oaks CA: Sage. URL: <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>

Kergunteuil, A., Campos-Herrera, R., Sánchez-Moreno, S., Vittoz, P., & Rasmann, S., 2016. *The Abundance, Diversity, and Metabolic Footprint of Soil Nematodes Is Highest in High Elevation Alpine Grasslands*. *Front. Ecol. Evol.* 4:84. doi: 10.3389/fevo.2016.00084.

Körner, C., 2003. *Alpine plant life: functional plant ecology of high mountain ecosystems*. 2nd edition. ISBN 3-540-00347-9.

Mahowald, N., 2011. *Aerosol Indirect Effect on Biogeochemical Cycles and Climate*. *Science*. 334, 794, DOI:10.1126/science.1207374.

Leff, J. W., Jones, S. E., Prober, S. M., Barberán, A., Borer, E. T., Firn, J. L., & McCulley, R. L., 2015. *Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(35), 10967-10972.

Lokupitiya, E., Stanton, N.L., Seville, R.S. & Snider, J.R., 2000. *Effects of increased nitrogen deposition on soil nematodes in alpine tundra soils*. *Pedobiologia* 44, 591–608.

Ochoa-Hueso, R., & Stevens, C. J., 2015. *European semiarid Mediterranean ecosystems are sensitive to nitrogen deposition: impacts on plant communities and root phosphatase activity*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(2), 5.

- R Core Team (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rincón, L., & Gutierrez, F., 2012. Nitrogen and phosphorus cycles dynamics in soils. *Revista Colombiana de biotecnología*. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77624081026>.
- Sánchez-Moreno, S., & Ferris, H., 2008. *Nematode Ecology and Soil Health, in Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture, 3rd edn, ed. by Sikora RA, Coyne D, Hallmann J and Timpe P. CABI, Wallingford, UK.*
- Sánchez-Moreno, S., & Talavera, M., 2019. Los nematodos edáficos y la relación planta-suelo en escenarios de cambio climático. *Fitopatología*, 4, 33-41.
- Sánchez-Moreno, S., & Talavera, M., 2013. Los nematodos como indicadores ambientales en agroecosistemas. *Ecosistemas*. 22(1), 50-55, DOI: 10.7818/ECOS.2013.22-1.09.
- Sala O. et al., 2000. *Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100*, *Science* 287, 1770-1774, DOI: 10.1126/science.287.5459.1770.
- Shaw, E.A., Boot, C.M., Moore, J.C., Wall, & D.H., Baron, J.S., 2019. Long-term nitrogen addition shifts the soil nematode community to bacterivore-dominated and reduces its ecological maturity in a subalpine forest. *Soil Biol Biochem*; 130:177–84.
- Van den Hoogen, J. et al., 2019. Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Science* 572, 194-198. Disponible en <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1418-6>.
- Vestergard, M., Bjornlund, L., & Christensen, S., 2004. Aphid effects on rhizosphere microorganisms and microfauna depend more on barley growth phase than on soil fertilization. *Oecologia* 141, 84e93.

- Xiong, D., et al., 2019. *Nonlinear responses of soil nematode community composition to increasing aridity. Global Ecol Biogeography* 2020; 29:117–126, DOI: 10.1111/geb.13013.
- Yang, B., Zhang, T., Huang, J., Ram Bhusal, D., & Pang, Y., 2019. *Response of Soil Nematode Community to Phosphorous Amendment in a Subalpine Spruce Plantation. Clean – Soil, Air, Water* 2019, 1800202.
- Yeates, G.W., Bongers, T., de Goede, R.G.M., Frekman, D.W., & Georgieva, S.S., 1993. *Feeding Habits in Soil Nematode Families and Genera--An Outline for Soil Ecologists. Journal of Nematology* 25(3):315-331.
- Zhao, J., Wang, F., Li, J., Zou, B., Wang, X., Li, Z., & Fu, S., 2014. *Effects of experimental nitrogen and/or phosphorus additions on soil nematode communities in a secondary tropical forest. Soil biology & biochemistry.* 75, 1-10. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.03.019>.
- Zong, N., Shi, P., & Chai, C., 2018. *Effects of warming and nitrogen addition on nutrient resorption efficiency in an alpine meadow on the northern Tibetan Plateau. Soil science and plant nutrition.* Volume 64, number 4, pages 482-490. DOI:10.1080/00380768.2018.1467727.

9. ANEXOS

9.1. Anexo I.

9.1.1. Nutrientes del suelo

La cantidad de nutrientes en los suelos fueron determinados en el laboratorio de ionómica del instituto CEBAS-CSIC (Murcia, Spain). El contenido en C y N total se determinó por combustión con un C/N analyzer (LECO Truspec, St. Joseph, MI, USA), mientras que el P total fue determinado después de una digestión ácida con un espectrometro de emisión ICP (inductively coupled plasma) (ICAP 6500 DUO Thermo; Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). El pH fue medido en una solución de agua en una proporción 1:2.5 (peso:volumen; suelo:agua) que fue agitada durante 3 minutos para después realizar la lectura con un pH-meter (Crison, Spain) tras 15 minutos de reposo de la solución.

9.1.2. Análisis de la actividad enzimática

A partir de las muestras recogidas de suelo, se realizaron mediciones fluorimétricas de alto rendimiento de actividades potenciales de enzimas extracelulares del suelo, según el protocolo de Bell *et al.*, 2013. Se analizaron un total de ocho actividades enzimáticas, cuatro relacionadas con el ciclo del C (β -1,4-glucosidasa [BG], β -D-celobiohidrolasa [CB], β -xylosidasa [XYL] y α -1,4-glucosidasa [AG]), dos con el del N (β -1,4-N-acetilglucosaminidasa [NAG] y L-leucinaminopeptidasa [LAP]), una con el del P (fosfatasa [PHOS]) y una con el de azufre (S) (arilsulfatasa [AS]).

Las muestras fueron incubadas con un tampón de pH (acetato de sodio 50 mM) e inoculadas con ocho tipos de sustratos ricos en C, N, P o S (**BG** = 4- Metilumbeliferil β -D-glucopiranosido; **CB** = 4- Metilumbeliferil β -D-celobiosida; **NAG** = 4- Metilumbeliferil N-acetil- β -D-glucosaminida; **PHOS** = 4- Metilumbeliferil fosfato; **XYL** = 4- Metilumbeliferil β -D-xilopiranosido; **AG** = 4- Metilumbeliferil α -D-glucopiranosido; **LAP** = L-Leucin-7-amido-4-metilcumarin hidrocloreuro; **AS**= 4- Metilumbeliferil sulfato potásico) y posteriormente unidos a un indicador fluorescente

sintético, siendo uno MUB (4-metil-umbeliferona) y el otro MUC (amino-4-metilcumarina).

El fundamento general de este experimento consiste en que, durante una reacción catalizada por enzimas, se rompe el enlace entre el colorante fluorescente (MUB o MUC) y el sustrato añadido. El colorante liberado es usado para una medida indirecta de la actividad enzimática y es cuantificado mediante un lector de microplacas que detecta la intensidad de fluorescencia del colorante. A continuación, la actividad es cuantificada a partir de las concentraciones conocidas añadidas del colorante a las muestras de suelo y la curva patrón de dilución de intensidades de fluorescencia para el colorante específico del sustrato empleado. A partir de estos datos obtenidos, se puede determinar la actividad enzimática en unidades de $\mu\text{mol actividad/g suelo seco} \cdot \text{hora}$.

9.1.3. Estima de la abundancia de hongos y bacterias mediante PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa (en inglés, qPCR) es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN extraído previamente de las muestras de suelo.

El ADN fue extraído de 250 mg de suelo usando el kit DNeasy Powersoil® (Qiagen, Inc., Venlo, Netherlands) y siguiendo los protocolos del fabricante. La concentración de ADN fue estimada mediante un Qubit Fluorometric Quantification (Thermo Scientific, USA). Las muestras fueron almacenadas en un congelador a -80°C hasta que fueron procesadas.

Las qPCR nos permitieron estimar la abundancia de genes marcadores microbianos para bacterias y hongos. Los pares de primers usados para las qPCR fueron 515f (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 806r (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') para los procariotas, e ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS5.8S (5'-CGC TGC GTT CTT CAT CG-3') para hongos, respectivamente. Las amplificaciones se realizaron utilizando el método basado en SYBR® Green (Sigma-Aldrich, USA) en una máquina CFX96 TM Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories, USA). Las curvas estándar (patrón) se prepararon para cada placa de muestras utilizando un

patrón específico de moléculas de ADN de bacterias u hongos y haciendo una serie de muestras diluidas secuencialmente x 10.

La mezcla de reactivos contenía 10 µl de 2X PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems, USA), 1 µl de cada primer (20 µM), 10-100ng de template DNA y agua libre de nucleasas (Ambion Thermofisher) hasta conseguir 20 µl de volumen final. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C durante 10 min, y después, para bacterias: 35 ciclos de 10 s a 95°C, 30 s a 57°C y 30 s a 72°C; mientras que para hongos: 40 ciclos de 15 s a 95°C, 30 s a 53°C y 1 min a 72°C, seguido por una curva de derretido (melt curve) de 60°C a 95°C a incrementos de 0.5 °C. Se incluyeron tres replicas por muestra de ADN, curva estándar y control negativo. La eficiencia de las PCR varió entre el 75% y 95%, todas con $r^2 > 0.9$. La especificidad de los productos amplificados fue verificada mediante la inclusión de los resultados de los “melting curves” en un análisis de electroforesis en gel de agarosa.