

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

**EFEECTO DEL MANEJO DE RESIDUOS DE *Lolium multiflorum* DEJADOS EN CAMPO SOBRE LA
FAUNA MICROBIANA Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SUELO**

presentado por

LEIRE MÚGICA AZPILICUETA *(e)k*

aurkeztua

**INGENIERO AGRONOMO
NEKAZARITZA INGENIARITZA**

Septiembre, 2011 / 2011, Iraila

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

Departamento de Producción Agraria

Trabajo Fin de Carrera:

**EFFECTO DEL MANEJO DE RESIDUOS DE *Lolium multiflorum*
DEJADOS EN CAMPO SOBRE LA FAUNA MICROBIANA Y LA
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SUELO**

Autora

Leire Múgica Azpilicueta

Directoras

**Rosa M^a Canals Tresserras
Leticia San Emeterio Garciandia**

Titulación

Ingeniería Agronómica

Convocatoria

Septiembre 2011

Rosa M ^a Canals	Leticia San Emeterio	Leire Múgica
Fecha:	Fecha:	Fecha:

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer, en primer lugar a Rosa y a Leticia, directoras de este trabajo, por su dedicación y ayuda durante la realización del mismo, y a la ETSIA por darme la oportunidad de llevarlo a cabo.

También a todos los demás profesores, becarios y personal de la universidad por su dedicación durante los años que he estado estudiando en la UPNA.

Agradecer a los compañeros de clase, por la ayuda y los buenos momentos que hemos pasado juntos.

A mis amigas, por animarme en los malos momentos, y a toda mi familia, en especial a mis padres y a mi hermano, por el apoyo y confianza que me han mostrado a lo largo de estos últimos años.

INDICE

	Pág.
* RESUMEN.....	1
1.- INTRODUCCIÓN.....	4
1.1.- La agricultura de conservación.....	5
1.1.1.- Concepto.....	5
1.1.2.- Rotación de cultivos.....	7
1.1.3.- Siembra directa.....	8
1.1.4.- Cubiertas verdes.....	9
1.1.5.- Policultivos.....	9
1.1.6.- Mínimo laboreo.....	10
1.2.- Las cubiertas verdes.....	12
1.2.1.- Descripción y evolución de la técnica.....	12
1.2.2.- Ventajas de la práctica.....	15
1.2.2.1.- Control de la erosión hídrica y eólica.....	15
1.2.2.2.- Absorción del excedente de nitrógeno del suelo.....	16
1.2.2.3.- Recirculación de nutrientes.....	17
1.2.2.4.- Efecto herbicida.....	17
1.2.2.5.- Mejora de las propiedades del suelo.....	18
1.2.2.6.- Control de plagas, enfermedades y otros patógenos de los cultivos.....	19
1.2.2.7.- Mejora de la rentabilidad de la explotación.....	19

1.2.3.- Limitaciones de la práctica.....	20
1.2.3.1.- Fecha de siembra y duración de la estación de crecimiento.....	20
1.2.3.2.- Reducción del contenido de agua del suelo.....	20
1.2.3.3.- Efectos no deseados en los cultivos sucesivos.....	21
1.2.3.4.- Coste económico.....	22
1.2.4.- Especies vegetales empleadas como cubiertas verdes.....	22
1.2.5.- Descripción de la cubierta verde ideal.....	23
1.3.- Interés de <i>Lolium multiflorum</i> como cubierta verde.....	25
1.3.1.- Descripción de la especie y de su cultivo como forraje.....	25
1.3.2.- Interés de <i>Lolium multiflorum</i> como cubierta verde.....	27
1.3.3.- Posibles limitaciones de <i>Lolium multiflorum</i> como cubierta verde: la alelopatía.....	28
2.- OBJETIVOS.....	31
3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
3.1.- Descripción de la parcela de ensayo.....	34
3.2.- Diseño experimental.....	36
3.3.- Establecimiento del ensayo y muestreos de campo.....	38
3.4.- Analíticas de laboratorio.....	40

3.4.1.- Actividades enzimáticas estudiadas.....	40
3.4.1.1.- Amidasa.....	41
3.4.1.2.- Ureasa.....	43
3.4.1.3.- Glucosidasa.....	46
3.4.1.4.- Fosfatasa alcalina.....	48
3.4.2.- Carbono y nitrógeno en la biomasa microbiana y nitrificación potencial.....	51
3.4.2.1.- Carbono y nitrógeno en la biomasa microbiana.....	51
3.4.2.2.- Nitrificación potencial	56
3.4.3.- Otros parámetros edáficos medidos.....	57
3.4.3.1.- Determinación de la humedad.....	57
3.4.3.2.- Determinación del amonio y nitrato.....	58
3.5.- Análisis estadísticos de los datos.....	59
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
4.1.- Humedad del suelo.....	62
4.2.- Actividad enzimática del suelo.....	65
4.3.- Actividad enzimática en los residuos de <i>I. multiflorum</i>	72
4.4.- Biomasa microbiana.....	76
4.4.1.- Nitrógeno y carbono microbianos.....	76

4.4.2.- Relación carbono/nitrógeno en la biomasa microbiana.....	80
4.5.- Nitrificación potencial.....	82
4.6.- Contenido de nitrato y amonio en el suelo.....	85
4.6.1.- Contenido de nitrato en el suelo.....	85
4.6.2.- Contenido de amonio en el suelo.....	87
5.- CONCLUSIONES.....	89
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	92
ANEXO I: RESULTADOS DEL ENSAYO	99

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama ombrotérmico de Arazuri.....	34
Figura 2. Diseño de la parcela.....	37
Figura 3. Precipitación acumulada (mm).....	62
Figura 4. Temperatura media (°C).....	63
Figura 5. Contenido de humedad en el suelo (%).....	63
Figura 6. Actividad enzimática del suelo: amidasa.....	65
Figura 7. Actividad enzimática del suelo: ureasa.....	66
Figura 8. Actividad enzimática del suelo: β-glucosidasa.....	68
Figura 9. Actividad enzimática del suelo: fosfatasa alcalina.....	69
Figura 10. Actividad enzimática en los residuos de L. multiflorum: amidasa...	72
Figura 11. Actividad enzimática en los residuos de L. multiflorum: ureasa.....	73
Figura 12. Actividad enzimática en los residuos de L. multiflorum: β-glucosidasa	73
Figura 13. Actividad enzimática en los residuos de L. multiflorum: fosfatasa alcalina.....	74
Figura 14. Nitrógeno presente en la biomasa microbiana.....	77
Figura 15. Carbono presente en la biomasa microbiana.....	78
Figura 16. Relación carbono/nitrógeno en la biomasa microbiana.....	81
Figura 17. Nitrificación potencial del suelo.....	82
Figura 18. Contenido de nitrato en el suelo.....	85
Figura 19. Contenido de amonio en el suelo.....	87

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Humedad del suelo y de los residuos de <i>L. multiflorum</i>	100
Tabla 2: Actividad enzimática en el suelo: amidasa.....	101
Tabla 3: Actividad enzimática en el suelo: ureasa.....	102
Tabla 4: Actividad enzimática en el suelo: glucosidasa.....	103
Tabla 5: Actividad enzimática en el suelo: fosfatasa alcalina.....	104
Tabla 6: Actividad enzimática en los residuos de <i>L. multiflorum</i> : amidasa.....	105
Tabla 7: Actividad enzimática en los residuos de <i>L. multiflorum</i> : ureasa.....	105
Tabla 8: Actividad enzimática en los residuos de <i>L. multiflorum</i> : glucosidasa..	105
Tabla 9: Actividad enzimática en los residuos de <i>L. multiflorum</i> : fosfatasa alcalina.....	106
Tabla 10: Nitrógeno y carbono en la biomasa microbiana.....	107
Tabla 11: Relación entre carbono y nitrógeno microbianos.....	108
Tabla 12: Nitrificación potencial.....	109
Tabla 13: Contenido de nitrato y amonio del suelo.....	110

* RESUMEN

EFFECTO DEL MANEJO DE RESIDUOS DE *Lolium multiflorum* DEJADOS EN CAMPO SOBRE LA FAUNA MICROBIANA Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SUELO

El raigrás italiano (*Lolium multiflorum*) es un cultivo que está muy extendido en todo el mundo debido a su alta productividad, alto valor forrajero y su buena calidad como alimento para el ganado. Se trata de la gramínea pratense más sembrada en la Península Ibérica. Algunos estudios indican que esta especie puede ocasionar alelopatías en cultivos posteriores o afectar a los microorganismos del suelo, influyendo así en la disponibilidad de nutrientes. Por lo tanto, el manejo que se realice del cultivo y de los residuos de cosecha puede influir en los rendimientos de cultivos posteriores.

El objetivo de este trabajo es comprobar si existen diferencias en la actividad microbiana y enzimática del suelo en función de la manera de aplicación de los residuos vegetales de *Lolium multiflorum* en campo y del tiempo que éstos están en el suelo, para poder así determinar cuál es el mejor manejo que se puede realizar de los residuos de esta especie.

Para ello se establecieron 30 microparcels en una parcela de Arazuri en junio del 2010 que incluían cinco tratamientos y 6 repeticiones de cada uno: control (suelo desnudo), cultivo de *Lolium multiflorum*, residuos secos de raigrás enterrados, residuos frescos de raigrás enterrados y residuos frescos de raigrás en superficie.

Se realizaron tres muestreos de suelo: el primero a la semana de establecer el ensayo, el segundo en septiembre de 2010 (a los tres meses) y el último en enero de 2011 (a los siete meses). En cada muestreo, se extrajo una muestra de suelo de cada microparcels para la determinación en laboratorio de distintas actividades enzimáticas microbianas. Las enzimas analizadas fueron: ureasa y amidasa (relacionadas con el ciclo del nitrógeno), fosfatasa alcalina (relacionada con el ciclo del fósforo) y β -glucosidasa (relacionada con el ciclo del carbono).

Además, se tomaron submuestras para la determinación de la humedad edáfica, el carbono y el nitrógeno en la biomasa microbiana, las tasas de nitrificación potencial, y el contenido de nitrato y amonio en el suelo.

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados en laboratorio concluyeron que la actividad enzimática del suelo no se vio afectada significativamente por los diferentes tratamientos aplicados al suelo. Sin embargo, la actividad de las enzimas implicadas en el ciclo del nitrógeno (amidasa y ureasa) varió según el tiempo de estancia de los residuos de raigrás en el suelo. En cuanto a la biomasa microbiana presentó un incremento a corto plazo con el aporte de materia orgánica al suelo. Por lo tanto, en este trabajo no se ha observado un efecto inhibitorio del raigrás italiano sobre las enzimas y la fauna microbiana del suelo para los niveles de residuos aplicados.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- LA AGRICULTURA DE CONSERVACIÓN

1.1.1.- Concepto

La FAO (Food and Agriculture Organization) define la agricultura de conservación como aquella que tiene por objeto conservar, mejorar y hacer un uso más eficiente de los recursos naturales mediante la gestión integrada de los recursos disponibles del suelo, agua y los recursos biológicos combinados con insumos externos (Hobbs, 2007).

Sin embargo, existen otras definiciones, como la que propone la Asociación Española de Agricultura de Conservación Suelos Vivos, que define esta técnica como un sistema de producción agrícola sostenible, que comprende un conjunto de prácticas agronómicas adaptadas a las exigencias del cultivo y a las condiciones locales de cada región, cuyas técnicas de cultivo y de manejo del suelo lo protegen de su erosión y degradación, mejoran su calidad y biodiversidad, contribuyen a la preservación de los recursos naturales, agua y aire, sin menoscabo de los niveles de producción de las explotaciones (Guía Buenas Prácticas Agrícola-Ganaderas y Eficiencia Energética).

La agricultura de conservación tiene sus orígenes en Estados Unidos. En la década de 1930, tuvieron lugar varios años sucesivos de sequía que originaron graves problemas de erosión eólica, provocando grandes pérdidas económicas en el sector agrícola. Esto se debió a la labranza excesiva del suelo (Hobbs, 2007). Para combatir esta erosión se desarrollaron nuevos equipos de laboreo que permitían descompactar el suelo y controlar la flora adventicia, pero sin invertir el terreno, dejando en superficie abundantes restos vegetales de los cultivos precedentes. Este método se extendió rápidamente por todas las zonas secas de los EE.UU. (Gil *et al.*, 2009).

En la actualidad, la agricultura de conservación está ganando aceptación en muchas partes del mundo como una alternativa tanto a la agricultura convencional como a la agricultura ecológica (Dumanski *et al.*, 2006), ya que actualmente es la

práctica agronómica más adaptada a mejorar los suelos (Fichas técnicas AGRACON) y por el incremento del interés en una agricultura sostenible (García-Orenes *et al.*, 2010).

Se basa en los principios de la reconstrucción del suelo, la optimización de los insumos de producción de cultivos, incluido el trabajo, y la optimización de los beneficios (Dumanski *et al.*, 2006). Contribuye a la conservación del medio ambiente, así como a mejorar y mantener la producción agrícola (Hobbs, 2007).

Los objetivos de la agricultura de conservación son los siguientes (Guía Buenas Prácticas Agrícola-Ganaderas y Eficiencia Energética; Hobbs, 2007):

- Suelo:
 - Reducir la erosión.
 - Incrementar los niveles de materia orgánica.
 - Mejorar la estructura y las propiedades físico - químicas.
 - Aumentar la biodiversidad de la fauna del suelo.
 - Incrementar la fertilidad natural del suelo.
- Aire:
 - Disminuir las emisiones de Gases de Efecto Invernadero (GEI).
- Agua:
 - Disminuir la escorrentía
 - Disminuir la contaminación de aguas superficiales, como de los ríos por sedimentos, fertilizantes y pesticidas.
 - Mejorar la capacidad de retención de agua.
 - Reducir los lixiviados de nutrientes.
 - Aminorar el riesgo de inundaciones.
- Recursos y energía:
 - Fomentar el ahorro energético de insumos y de los tiempos de trabajo.
 - Ahorrar costes mejorando el resultado económico.

Las prácticas agronómicas englobadas en los sistemas de agricultura de conservación se fundamentan en los principios de mínima alteración del suelo,

cobertura permanente del terreno con materiales orgánicos (restos de cosechas o cultivos de cobertura), realización de rotaciones de especies en explotaciones de cultivos anuales o una asociación de plantas en cultivos perennes, y aplicación de un sistema agrícola adecuado de gestión de nutrientes y más sostenible para el futuro (Hobbs, 2007; Bergua, 2010; Márquez y González, 2011).

Algunas de estas prácticas agronómicas son la rotación de cultivos, la siembra directa, las cubiertas verdes, los policultivos y el mínimo laboreo. A continuación se describen con mayor detalle.

1.1.2.- Rotación de cultivos

La rotación de cultivos es uno de los métodos más antiguos para conservar la productividad del suelo, y una herramienta fundamental para resolver los problemas de lucha contra las malas hierbas, enfermedades, nematodos y otros patógenos de los cultivos (Bergua, 2010).

Es una práctica agrícola en la que se alternan diferentes cultivos en una misma parcela en una secuencia de tiempo determinada, que habitualmente sigue un esquema prediseñado teniendo en cuenta la funcionalidad de los cultivos elegidos.

Labrador y Guiberteau (1991) expusieron que la rotación presenta múltiples ventajas frente al monocultivo:

- Mejor aprovechamiento de la tierra, el espacio y el agua.
- Disminución de los problemas fitosanitarios.
- Menor afluencia de malas hierbas debido a que el terreno queda rápidamente cubierto.
- En ciertas asociaciones las plantas ejercen una acción de mutuo beneficio, aunque también suelen darse problemas de fitotoxicidad.
- Las producciones son siempre mayores.

Comparados con sistemas en los que se da rotación de cultivos, los suelos bajo sistemas de monocultivo, en general, contienen concentraciones significativamente menores y menor calidad de la materia orgánica del suelo, menos estabilidad estructural del suelo, y actividad y biomasa microbiana reducidas (Moore *et al.*, 1999).

1.1.3.- Siembra directa

La siembra directa es el máximo exponente de la agricultura de conservación en cultivos extensivos (Márquez y González, 2011), ya que se trata del sistema ideal desde el punto de vista del medio ambiente y, en la mayoría de los casos, agronómico (Bergua, 2010).

Es una técnica de cultivo que implica el no laboreo de la tierra, en la cual se siembra el cultivo directamente en el suelo no cultivado desde la cosecha del cultivo anterior (Environmental Indicators for Agriculture). Esta operación se consigue gracias a sembradoras especiales, que pueden ser de dos tipos (Márquez y González, 2011):

- de rejas: apropiadas para zonas con piedras y sin mucha arcilla.
- de discos: son más caras, pero más polivalentes.

Un adecuado manejo de los restos vegetales de la cosecha anterior es fundamental para el éxito de la implantación de la siembra directa. La paja y las graznas que quedan en el campo deben cubrir homogéneamente la superficie del suelo. Para ello es recomendable realizar una distribución uniforme de la paja, siendo la manera más económica y eficaz hacerlo en la recolección mediante equipos específicos instalados en la cosechadora, como una picadora de paja (Gil *et al.*, 2009).

El control de malas hierbas se consigue con herbicidas de mínimo impacto medioambiental (Bergua, 2010), y la aplicación de fertilizantes se realiza directamente en el rastreo del cultivo anterior (Dumanski *et al.*, 2006).

Precisamente, la presencia de los residuos del cultivo anterior en el campo permite controlar la erosión del suelo durante el periodo de tiempo en el que la parcela no permanece cultivada.

1.1.4.- Cubiertas verdes

Una cubierta verde es una cobertura temporal vegetal que se cultiva para proporcionar una protección al suelo (Environmental Indicators for Agriculture). Actualmente, se están realizando cubiertas polífitas mezclando leguminosas y gramíneas, utilizando especialmente especies espontáneas de cada zona, ya que son las más adaptadas (Bergua, 2010).

Esta técnica se describirá más detalladamente en el apartado 1.2 del presente trabajo.

1.1.5.- Policultivos

El policultivo es una práctica agrícola que consiste en cultivar dos o más cultivos en el mismo espacio al mismo tiempo (Lithourgidis *et al.*, 2011), generalmente en filas alternas.

Es una estrategia habitual en los sistemas agrícolas tradicionales de todo el mundo, especialmente en países en desarrollo, que se justifica, entre otras razones, por su mayor eficiencia en el uso de los recursos naturales (suelo, agua y energía) (González y Guzmán, 2006).

La ventaja más importante que presenta esta práctica es la producción de un mayor rendimiento en la parcela por el uso más eficiente de los recursos debido al uso de mezclas de cultivos con diferente capacidad de enraizamiento, crecimiento y requerimientos nutricionales (Lithourgidis *et al.*, 2011).

El policultivo mejora la fertilidad del suelo a través de la fijación biológica de nitrógeno con el uso de leguminosas, e incrementa la conservación del suelo por una mayor cobertura de la superficie de éste que con un monocultivo (Lithourgidis *et al.*, 2011).

Además de las mejoras agronómicas, esta práctica proporciona una dieta rica y diversa durante todo el año, otorga estabilidad en las producciones, minimiza los riesgos (ya que si algún cultivo sufre daños, los demás pueden compensar la pérdida) y permite aumentar la rentabilidad de la explotación con bajos niveles de tecnología (González y Guzmán, 2006).

1.1.6.- Mínimo laboreo

El mínimo laboreo es una práctica agronómica de menor grado de conservación que la siembra directa, pero fundamental para aquellos agricultores que quieren hacer agricultura de conservación y no tienen recursos ni conocimientos para implantar la siembra directa en sus explotaciones. Ofrece la posibilidad de realizar agricultura de una forma más respetuosa con el medio ambiente que la convencional, pero sin reducir la rentabilidad de las explotaciones (Gil *et al.*, 2009).

En la agricultura de mínimo laboreo la labranza del terreno se realiza únicamente en las capas superficiales del suelo, hasta los primeros 10 - 15 cm. Normalmente es vertical con chisel o cultivador, pero también puede ser con arado de cohecho, que realiza volteo, o simplemente con gradas de discos (Pérez y Lafarga, 2007).

Se realizan una o dos labores a la salida del verano, en función del cultivo a implantar. Siempre de manera somera y sin invertir el perfil del suelo, de manera que tras la siembra el 30% de su superficie se encuentre cubierta por restos vegetales para proteger al suelo de la erosión (Gil *et al.*, 2009; Márquez y González, 2011).

Para el control de las hierbas adventicias, que puedan aparecer antes de la siembra, se utilizan productos herbicidas autorizados o cultivadores que permitan un porcentaje de cobertura de suelo acorde con los niveles mínimos exigibles (Gil *et al.*, 2009).

1.2.- LAS CUBIERTAS VERDES

1.2.1.- Descripción y evolución de la técnica

Desde los comienzos de la agricultura de conservación estuvo muy claro el uso de la cubierta vegetal entre cultivos como la mejor forma de proteger el suelo (Bergua, 2010).

El interés de la investigación del cultivo de las cubiertas vegetales y los abonos verdes apareció hace décadas, pero el uso de dichos cultivos disminuyó durante el último siglo. Las cubiertas vegetales y los abonos verdes perdieron valor debido al uso de pesticidas y fertilizantes químicos, pero ahora están recuperando importancia para afrontar una agricultura más respetuosa con el medio ambiente, que trata de solventar problemas de degradación de suelo y de pérdida de nutrientes por lixiviación (Thorup-Kristensen *et al.*, 2003).

Los objetivos principales de un cultivo de cobertura son (Sullivan, 2003; Thorup-Kristensen *et al.*, 2003):

- Proteger el suelo, de forma que se evite su degradación debido a la erosión por el viento y el agua.
- Reducir la lixiviación de nutrientes del perfil del suelo, especialmente de nitratos.
- Mejorar las propiedades del suelo mediante el incremento del contenido de materia orgánica en éste.

En la actualidad, los agricultores que realizan una agricultura convencional no son proclives a utilizar cubiertas y abonos verdes por su valor como única fuente de nitrógeno, debido al bajo precio de los fertilizantes nitrogenados (Thorup-Kristensen *et al.*, 2003). Sin embargo, cada vez son más los agricultores que apuestan por una agricultura más sostenible, que implica la utilización de técnicas más conservadoras, como es el uso de cubiertas vegetales.

Las cubiertas verdes pueden utilizarse en cultivos leñosos, en cuyo caso el cultivo de cobertura se implanta en la superficie de suelo entre las hileras de los árboles (Sullivan, 2003), o en rotaciones de cultivos, en las que durante una determinada época del año el suelo permanece desnudo reemplazando ese periodo de barbecho por un cultivo. En este último caso, son cultivadas durante periodos del año en los que las condiciones no son óptimas para el crecimiento del cultivo de interés comercial (Thorup-Kristensen *et al.*, 2003).

Existen diferentes tipos de cubiertas según la época del año en la que se implanten en la parcela (Sullivan, 2003):

- De invierno: el cultivo se siembra a finales de verano tras la cosecha del cultivo principal para proporcionar cobertura al suelo durante el invierno.
- De verano: el cultivo ocupa la tierra por una parte de la temporada de verano, y al final de su desarrollo suele aportarse como abono verde al suelo para mejorar las condiciones de los suelos pobres.

Atendiendo a su forma de implantación las cubiertas vegetales se pueden clasificar como (Gil *et al.*, 2009; Márquez y González, 2011):

- Espontánea: formadas por hierbas procedentes del banco de semillas del suelo. Se suele realizar en suelos que hayan sido labrados durante años, de forma que exista un banco de semillas con gran variedad de especies. Son recomendables principalmente en los casos en los que las características del terreno dificulten las operaciones sobre el suelo.
- Espontánea seleccionada hacia gramíneas: se deja crecer la vegetación y después se seleccionan las gramíneas (cebadilla, bromo, raigrás, etc.) mediante la utilización de un control químico con fitosanitarios.
- Sembradas: normalmente se siembran cultivos de gramíneas, aunque se pueden mezclar con leguminosas. Estas siembras son recomendables para suelos muy erosionados o manejados previamente bajo no laboreo con suelo desnudo, dado que no habrá semilla para la implantación de una

cubierta de forma espontánea. La mezcla de gramíneas y leguminosas proporciona al suelo una serie de beneficios:

- Los cultivos de gramíneas mejoran la estructura del suelo mediante el desarrollo de su sistema radicular y absorben una gran cantidad del exceso de nitrógeno que puede existir en el suelo, evitando así su lixiviación a capas más profundas.
 - Los cultivos de leguminosas contribuyen al enriquecimiento del suelo en nutrientes mediante fijación fisiológica de nitrógeno y fósforo.
- Cubiertas inertes: son aquellas constituidas a base de restos de cosecha, mucho más usuales. Su mayor ventaja es que no consumen agua incrementando aún más la humedad del suelo y aportan gran cantidad de nutrientes al suelo.

El manejo de cubiertas en agricultura de conservación requiere la realización de una serie de operaciones que dependerán de la naturaleza de las mismas. De forma general, las labores a realizar son similares, excepto en las cubiertas de vegetación espontánea en las que no es necesario la realización de la siembra (Gil *et al.*, 2009).

Para la supresión de los cultivos de cobertura los herbicidas son la herramienta más utilizada en los sistemas de agricultura de conservación, aunque hay otros métodos no químicos que incluyen la siega y la labranza mecánica que también son utilizados (Sullivan, 2003).

También es importante una adecuada sincronización de la incorporación de la cubierta vegetal al suelo, para evitar la interferencia con la plantación del cultivo principal, ya que se observan reducciones de rendimiento a menudo cuando la cubierta verde interfiere con la fecha de plantación del cultivo principal (Thorup-Kristenses *et al.*, 2003; Tonitto, 2005).

El cultivo utilizado como cubierta verde debe estar adaptado al suelo, clima y situación de cultivo de la parcela para asegurarse que produce los efectos

deseados. Kramberger *et al.* (2008) exponen en su ensayo que las cubiertas verdes de cultivos extensivos (forrajeros) deben cumplir cuatro requerimientos:

- Bajo coste de producción.
- Proporcionar forraje de calidad y que pueda ser conservado fácilmente.
- Consumo de nitrógeno durante los periodos críticos para la lixiviación.
- No producir efectos negativos en el cultivo sucesivo.

Las zonas de climas templados continentales son áreas donde el periodo de verano es utilizado para la producción de cultivos, mientras que pueden ser demasiado frías para el crecimiento de la mayoría de cultivos durante el invierno. En estas condiciones, el suelo es a menudo dejado sin plantas durante este periodo, por lo que en la actualidad se están implantando cubiertas verdes (Thorup-Kristensen *et al.*, 2003).

En estos climas, en las rotaciones de cultivos extensivos, las cubiertas verdes más utilizadas son aquellas en las que se siembra una gramínea, a veces mezclada con una leguminosa, para evitar el periodo de barbecho durante la estación de temperaturas más bajas, en la que el suelo permanece desnudo y expuesto a la erosión y lixiviación de nutrientes.

1.2.2.- Ventajas de la práctica

La implantación de una cubierta verde en una parcela presenta varias ventajas agronómicas y ambientales frente a dejar el suelo desnudo. Estas son el control de la erosión hídrica y eólica, la absorción del excedente de nitrógeno del suelo, la recirculación de nutrientes, el efecto herbicida, la mejora de las propiedades del suelo, el control de plagas, enfermedades y otros patógenos de los cultivos, y la mejora de la rentabilidad de la explotación.

1.2.2.1.- Control de la erosión hídrica y eólica

El establecimiento de una cubierta verde en el campo reduce la erosión del suelo, tanto hídrica como eólica, por el hecho de que éste permanece cubierto de

vegetación (Anaya, 1999; Thorup-Kristensen *et al.*, 2003). Un cultivo de cobertura reduce la escorrentía, por lo que disminuye la pérdida de suelo y se favorece la infiltración del agua (aumento de la humedad del suelo), evita el impacto directo de las gotas de lluvia sobre el suelo reduciendo su alteración, e impide el arrastre de partículas del suelo por del viento. Estos efectos se observan sobretodo en los casos en los que se implanta una cubierta verde de invierno (Lithourgidis *et al.*, 2011), ya que es la estación en la que más precipitaciones se producen, y por lo tanto, existe un mayor riesgo de erosión y de lavado de nutrientes.

1.2.2.2.- Absorción del excedente de nitrógeno del suelo

Sustituyendo los periodos de barbecho por cubiertas verdes se consigue absorber el excedente de nitrógeno del suelo en post cosecha, y así reducir la lixiviación de este nutriente de forma que disminuye el contenido de nitrato en el agua infiltrada desde el suelo (Tonitto, 2005; Thorup-Kristensen *et al.*, 2003). De esta forma se reduce el impacto ambiental, ya que se evita la contaminación de las aguas superficiales y subterráneas con nitratos (Thorup-Kristensen *et al.*, 2003).

En términos mecánicos, una cubierta verde reduce la pérdida de nitrógeno por lixiviación a través de tres mecanismos (Thorup-Kristensen *et al.*, 2003):

- Como las cubiertas verdes absorben nitrógeno reducen la concentración de nitrato en el agua del suelo. Así, el agua lixiviada a través del suelo llevará menos nitrógeno con ella.
- El nitrógeno es activamente transportado hacia arriba en las raíces de la cubierta verde, y de este modo se consigue corregir la lixiviación que ya se había producido hacia capas más profundas.
- El uso del agua por la cubierta verde reducirá la cantidad de agua percolada a través del suelo, y de este modo la cantidad de nitrógeno lixiviado es menor.

Bajo condiciones de alto contenido de nitrógeno en suelo, una cubierta verde normalmente absorbe más N, y por eso tiene un fuerte efecto contra la

pérdida de este nutriente por lixiviación (Schröder *et al.*, 1996), aunque no va a agotar el suelo completamente en ningún caso (Thorup-Kristensen *et al.*, 2003).

1.2.2.3.- Recirculación de nutrientes

Las cubiertas de leguminosas tienen la gran ventaja de aportar nitrógeno por fijación biológica (Thorup-Kristensen *et al.*, 2003), por lo que las gramíneas se siembran casi siempre asociadas con leguminosas, pues permiten obtener una masa de vegetación más importante y además presentan sistemas de raíces complementarios a los de las leguminosas, lo que tiene un efecto favorable sobre la estructura del suelo (Ovalle *et al.*, 2007).

Además del nitrógeno de las leguminosas, las cubiertas vegetales ayudan a reciclar otros nutrientes presentes en el suelo. El nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), azufre (S), y otros nutrientes se acumulan en los cultivos de cobertura durante su periodo de crecimiento. Cuando estas plantas son incorporadas al suelo como abono verde, o se dejan en campo en sistemas de no laboreo, estos nutrientes esenciales son liberados al medio lentamente durante la descomposición de la materia orgánica, quedando disponibles para el cultivo sucesivo (Sullivan, 2003). Esto puede ser especialmente útil en la agricultura de bajos insumos, como la agricultura orgánica (Thorup-Kristensen *et al.*, 2003).

1.2.2.4.- Efecto herbicida

Ovalle *et al.* (2007) determinaron que las cubiertas vegetales ejercen un efecto herbicida sobre las poblaciones de las especies espontáneas o malas hierbas que crecen en los campos de cultivo.

Los cultivos de cobertura ocupan un espacio y captan parte de la luz que incide sobre la parcela, con lo que la reducción del terreno disponible y el sombreado del suelo reducen la posibilidad de que las malas hierbas se establezcan y se desarrollen. Además, el potencial alelopático de algunas especies puede ayudar al control de las malezas. Por ello, la utilización de cubiertas verdes

se ha convertido en un importante método de control de malas hierbas en la agricultura sostenible (Sullivan, 2003).

1.2.2.5.- Mejora de las propiedades del suelo

Debido a que los residuos de cultivo son las principales fuentes de materia orgánica, el manejo del cultivo y la fertilización pueden ejercer una influencia significativa en la calidad del suelo (Moore *et al.*, 1999).

El cultivo de una cubierta verde aumenta el contenido de materia orgánica del suelo, lo que mejora una serie de propiedades físicas del suelo, incluyendo la estructura y la retención de agua. Las cubiertas vegetales de invierno incrementan la estabilidad de los agregados, protegiendo contra la rotura de los agregados en invierno y obteniendo así una mejor friabilidad y estructura después de la labranza en primavera (Thorup-Kristensen *et al.*, 2003).

La incorporación de las cubiertas vegetales como abono verde permite mantener y mejorar la fertilidad del suelo (Huang *et al.*, 2010), ya que aumenta la actividad microbiana y actúa como reservorio de nutrientes, lo que promueve el incremento de los rendimientos y calidad del cultivo sucesivo (Huang *et al.*, 2010; Mikanova *et al.*, 2009).

El mantenimiento del suelo cubierto con vegetación reduce las oscilaciones de la temperatura del suelo, mantiene la humedad durante las épocas calurosas y secas, e induce la actividad microbiana y el desarrollo del cultivo (García-Orenes *et al.*, 2010). La humedad del suelo y la temperatura afectan fuertemente a las condiciones de los microorganismos del suelo, y así también a la descomposición del material vegetal (Thorup-Kristensen *et al.*, 2003), por lo que el mantenimiento de éstas en unos niveles adecuados puede ayudar a obtener mejores resultados en el rendimiento del cultivo principal.

1.2.2.6.- Control de plagas, enfermedades y otros patógenos de los cultivos

Además de mejorar de las características del suelo, los cultivos de cobertura pueden complementar muchos de los programas de control de plagas, enfermedades y otros patógenos de los cultivos (Sullivan, 2003) debido a la variación de la especies vegetales que se cultivan en la parcela.

Algunos agricultores e investigadores han observado y documentado un aumento del número de insectos beneficiosos asociados a los cultivos de cobertura. Los cultivos de cobertura ofrecen polen, néctar y un hábitat a los insectos beneficiosos, por lo que dejar los residuos de los cultivos de cobertura en la superficie es la mejor opción para albergar los insectos beneficiosos (Sullivan, 2003).

1.2.2.7.- Mejora de la rentabilidad de la explotación

Las cubiertas verdes normalmente son cultivadas durante periodos del año en los que las condiciones no son óptimas para el crecimiento del cultivo principal (Thorup-Kristensen *et al.*, 2003), por lo que si se establece un cultivo de cobertura de interés comercial puede incrementarse la rentabilidad de la explotación.

El uso de cubiertas verdes también presenta otras ventajas económicas indirectas, como son el ahorro en fertilizantes, debido a la incorporación de nutrientes con la materia orgánica del cultivo de cobertura; en herbicidas, por el efecto alelopático de algunas especies; y en pesticidas, por la supresión del hábitat de algunas plagas. Otro hecho que produce un beneficio económico indirecto es el incremento del rendimiento del cultivo sucesivo, debido a la mejora del estado y fertilidad del suelo (Sullivan, 2003).

1.2.3.- Limitaciones de la práctica

La utilización de cubiertas verdes en agricultura presenta varias limitaciones, que pueden afectar al cultivo sucesivo, como son la fecha de siembra y la duración de la estación de crecimiento, la reducción del contenido de agua del suelo, efectos no deseados en los cultivos sucesivos y el coste económico que supone para la explotación.

1.2.3.1.- Fecha de siembra y duración de la estación de crecimiento

La duración de la estación de crecimiento de la cubierta verde es tan importante como la elección de la especie. El aplazamiento de la siembra de la cubierta verde puede reducir la profundidad de las raíces y su consumo de nitrógeno especialmente de las capas más profundas, ya que si se siembra tarde ya se habrá producido parte de la lixiviación de nitratos que se quiere evitar (Thorup-Kristensen *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos por Elers y Hartmann (1987), que establecieron cubiertas verdes en cinco fechas diferentes durante el otoño, muestran que la captación de nitrógeno se redujo aproximadamente 1kg N/ha y día para cubiertas verdes monocotiledóneas y 2kg N/ha y día para cubiertas verdes de crucíferas al retrasar la fecha de siembra.

1.2.3.2.- Reducción del contenido de agua del suelo

Mientras que una cubierta verde evita la pérdida de nutrientes del campo, el crecimiento de ésta reduce el contenido de agua del suelo (Thorup-Kristensen *et al.*, 2003), por lo que el consumo de agua por los cultivos de cobertura se ha convertido en una preocupación en lugares donde las precipitaciones son escasas (Sullivan, 2003). Esta reducción de la humedad en el suelo puede afectar negativamente al desarrollo del cultivo sucesivo dentro de una rotación (Kramberger *et al.*, 2009).

1.2.3.3.- Efectos no deseados en los cultivos sucesivos

Varios estudios muestran que las cubiertas verdes pueden contener compuestos fitotóxicos, que pueden reducir la germinación de otras especies, tanto cultivos como malas hierbas (Thorup-Kristensen *et al.*, 2003). La alelopatía generada por algunas especies de cubiertas vegetales puede afectar negativamente al desarrollo del cultivo siguiente (Kramberger *et al.*, 2009).

Tonitto (2005) expone que es importante una adecuada sincronización de eliminación o incorporación de la cubierta vegetal con la siembra o plantación del cultivo principal, ya que se observan reducciones en el rendimiento del cultivo principal cuando la cubierta verde interfiere con su fecha de plantación.

Además, una correcta gestión de los residuos del cultivo de cobertura es necesaria para evitar que éste actúe como mala hierba del cultivo que se desarrollará posteriormente en la parcela, por lo que se evitar que en la parcela queden semillas del cultivo utilizado como cubierta verde.

Algunos estudios, como el de Kramberger *et al.* (2009), determinaron que las cubiertas verdes no leguminosas, que normalmente tienen bajo contenido de N y una alta relación C/N, muestran pocos efectos o efectos no beneficiosos en el cultivo siguiente, y en algunos casos incluso efectos negativos.

Otros autores señalan que las leguminosas son menos eficientes que las cubiertas no leguminosas en el agotamiento del nitrógeno del suelo. Por ello, una forma de utilizar la capacidad de las leguminosas de fijar nitrógeno y la eficiencia de las no leguminosas en la absorción del nitrógeno del suelo es cultivarlas mezcladas (Thorup-Kristensen *et al.*, 2003).

Los cultivos de cobertura pueden reducir los niveles nutricionales del suelo limitando el crecimiento del cultivo sucesivo, ya que para durante su desarrollo absorben nutrientes del suelo. Este problema se puede evitar incorporando los residuos del cultivo al suelo como abono verde, de forma que los nutrientes son liberados al suelo por la descomposición de la materia orgánica.

1.2.3.4.- Coste económico

Una de las desventajas que presenta el cultivo de una cubierta verde es el coste económico que supone para la explotación, ya que se deben de realizar una serie de labores agrícolas que no se llevan a cabo si se deja la parcela en barbecho. La semilla supone el mayor coste asociado a esta práctica agronómica (Sullivan, 2003). Además, si el cultivo de cobertura utilizado es anual, se debe realizar la siembra todos los años por lo que el coste es mayor que en una cubierta vegetal perenne.

1.2.4.- Especies vegetales empleadas como cubiertas verdes

Las plantas generalmente recomendadas como cubierta vegetal pertenecen a las familias Fabaceae (leguminosas), Brassicaceae (crucíferas) y Poaceae (gramíneas) (Ovalle *et al.*, 2007).

Las cubiertas de leguminosas tienen la gran ventaja de aportar al suelo nitrógeno por fijación biológica. Por esta razón, las gramíneas se siembran casi siempre asociadas con leguminosas (Ovalle *et al.*, 2007).

Las especies anuales utilizadas como cubiertas verdes son (Ovalle *et al.*, 2007; Thorup-Kristensen *et al.*, 2003; Tonitto, 2005):

- Avena (*Avena sativa*)
- Raigrás italiano (*Lolium multiflorum* Lam.)
- Centeno (*Secale cereale* L.)
- Algunos tréboles (*Trifolium* spp.), como el trébol encarnado (*Trifolium incarnatum*) o el violeta (*Trifolium pratense*)
- Veza (*Vicia sativa*).

En las cubiertas perennes se utilizan las siguientes especies (Ovalle *et al.*, 2007; Tonitto, 2005):

- Festuca de los prados (*Festuca pratensis*)

- Raigrás inglés (*Lolium perenne*)
- Trébol blanco (*Trifolium repens*)
- Trébol violeta (*Trifolium pratense*)

Las especies de cubiertas vegetales dominantes en sistemas de climas templados son tolerantes al frío y no leguminosas, como el centeno o el raigrás. Sin embargo, algunas especies de leguminosas como el trébol violeta, el trébol encarnado, y la veza, han sido manejados exitosamente como cubiertas verdes de invierno en climas fríos y templados (Tonitto, 2005).

1.2.5.- Descripción de la cubierta verde ideal

Para la implantación de la cubierta verde ideal en una parcela se deben tener en cuenta que las decisiones de manejo de los cultivos de cobertura deben estar basadas en un equilibrio entre la rentabilidad agrícola y la sostenibilidad ambiental (Kramberger *et al.*, 2008), ya que una cubierta vegetal que produce efectos negativos en el cultivo principal de la explotación reduciría la rentabilidad de ésta y no sería deseable aplicarla.

Cómo cultivar las cubiertas verdes para obtener los beneficios ambientales y agronómicos óptimos dependerá de factores como el clima, el tipo de suelo, el cultivo principal, el sistema de cultivo utilizado y los problemas ambientales locales (Thorup-Kristensen *et al.*, 2003)

Una cubierta verde ideal debe cumplir las siguientes condiciones:

1. Se debe elegir una especie y variedad que estén adaptadas a las condiciones edafológicas y climatológicas locales, de forma que su manejo sea lo más sencillo posible y se tengan que realizar el menor número de labores posibles, para que el coste de su cultivo sea el menor.
2. El cultivo de cobertura debe encajar adecuadamente dentro de la rotación de cultivos que se realiza en la parcela, por lo que se debe elegir una especie cuyo

ciclo tenga una duración tal que no interfiera con el ciclo del resto de cultivos que se desarrollan en el campo.

3. Para la elección de la cubierta verde también debe tenerse en cuenta la fitotoxicidad que presentan algunas plantas, de forma que no se generen alelopatías que puedan afectar al desarrollo del cultivo principal, con la consecuente pérdida de rendimiento.
4. La cubierta vegetal debe cubrir la mayor superficie de terreno posible para proteger el suelo de la lluvia y el viento, y evitar así la erosión y la pérdida de suelo.
5. Debe ser un cultivo eficiente en la captación de nutrientes del suelo, sobretodo de nitrógeno para evitar su lixiviación y así la contaminación de las aguas con nitratos. Además, la retención de nutrientes es importante, porque en el momento en el que el cultivo es incorporado al suelo éste se descompone y libera lentamente los nutrientes al suelo, de forma que quedan disponibles para el cultivo sucesivo y se reduce la necesidad de aplicar fertilizantes.
6. En climas en los que las precipitaciones son escasas, las necesidades de agua de la cubierta verde no deben ser excesivamente altas, ya que si extrae una cantidad elevada de agua puede afectar negativamente al cultivo siguiente.
7. Si la especie elegida como cubierta vegetal es una leguminosa hay que tener en cuenta las necesidades de nitrógeno del cultivo siguiente, ya que las leguminosas fijan nitrógeno atmosférico a través de la simbiosis con las bacterias del género *Rhizobium* y lo incorporan al suelo, por lo que si se alcanzan concentraciones elevadas de este nutriente puede generarse una situación de toxicidad para algunas especies de cultivos.
8. Otra característica que puede resultar interesante en un cultivo de cobertura es su posterior aprovechamiento. Si tras realizar su función como cubierta vegetal de la parcela ese cultivo se puede aprovechar, no sólo como abono verde, sino como alimento para el ganado, la rentabilidad de la explotación puede incrementarse con la venta de la cosecha.

1.3.- INTERÉS DE *Lolium multiflorum* COMO CUBIERTA VERDE

1.3.1.- Descripción de la especie y de su cultivo como forraje

Las gramíneas del género *Lolium* son utilizadas en gran parte de las regiones templadas del mundo como forraje (Andueza *et al.*, 1999). El raigrás italiano (*Lolium multiflorum* Lam.) es una gramínea forrajera muy apreciada por su gran productividad, su rápido establecimiento, su agresividad frente a otras especies adventicias y su alta calidad nutritiva (Piñeiro *et al.*, 2001). Gracias a estas características su cultivo está muy extendido en todo el mundo, y es la gramínea pratense más sembrada en España.

Se trata de una especie de porte erecto, de 40-120 mm, con tallos lisos o ásperos hacia su extremo superior. Las hojas son glabras, de color verde brillante, planas, con lígula membranosa de 1-2 mm y aurículas. La inflorescencia es una espiga, cuyas espiguillas contienen de 11 a 22 flores. Las espiguillas presentan una sola gluma y son aristadas. El grano es una carióspside vestida.

Se cultiva principalmente en zonas de clima templado, ya que el raigrás italiano resiste temperaturas frías, pero es muy sensible al calor y a la sequía. Detiene completamente su crecimiento en veranos calurosos y secos. Tampoco tolera el encharcamiento, pero se desarrolla bien sobre suelos que retienen la humedad.

Las variedades de *Lolium multiflorum* se clasifican en dos grupos: alternativas tipo Westerwold, que son anuales; y no alternativas, que son más duraderas, pudiendo alcanzar los dos años de vida productiva, por lo que son bianuales (Piñeiro *et al.*, 2001).

Las variedades alternativas tipo Westerwold se cultivan como praderas monófitas de corta duración (desde septiembre hasta mayo). Las variedades no alternativas se utilizan para establecer praderas bífitas o polífitas de mayor duración. Una leguminosa que frecuentemente se asocia al raigrás italiano no

alternativo es el trébol violeta (Piñeiro *et al.*, 2001), que soporta bien la agresividad inicial del raigrás.

También, según su dotación cromosómica se distinguen variedades diploides y tetraploides. Las variedades tetraploides son más productivas, presentan mayor agresividad inicial, mayor contenido en agua y más resistencia a enfermedades.

El raigrás italiano puede sembrarse durante todo el otoño, pero lo recomendable es sembrarlo antes de que finalice el mes de septiembre, para conseguir un buen establecimiento y crecimiento inicial (Piñeiro *et al.*, 2001). A diferencia de las demás gramíneas pratenses, si se siembra pronto en otoño permite un primer aprovechamiento antes de que acabe el año. En áreas de invierno benigno, a mediados de marzo puede realizarse la siguiente siega.

Como cultivo principal, es una especie muy productiva si se abona suficientemente con nitrógeno. Desde su siembra en otoño hasta final del año siguiente pueden alcanzarse producciones superiores a las 15 t ms/ha. En el segundo año la producción decae, pero puede estar por encima de las 12 t ms/ha.

La mayoría de variedades tienden a espigar en la primera quincena de mayo. Los rebrotes también pueden formar espigas a diferencia de lo que ocurre con otras gramíneas pratenses. Se puede dejar resemillar para alargar su duración en la pradera, pero esto supone una pérdida de calidad del forraje en el corte en que se permite el semillado.

Se aprovecha mediante siega, aportándose en verde o conservándose ensilado o henificado, aunque también puede pastarse. El forraje presenta una elevada riqueza en azúcares solubles (es la gramínea pratense sembrada con mayor contenido en hidratos de carbono solubles), y es de buena calidad y apetecibilidad para el ganado. Su alto contenido en azúcares hace que presente una elevada aptitud para el ensilado por lo que suele preferirse conservarlo ensilado que henificado.

Para alimentación en fresco y para henificación se recomiendan las variedades tetraploides. Para ensilar, se recomiendan las variedades diploides, con menor contenido acuoso, que permiten la práctica del ensilado sin necesidad de aditivos.

1.3.2.- Interés de *Lolium multiflorum* como cubierta verde

Los raigrases han sido a menudo utilizados como cubiertas verdes debido a su capacidad de crecimiento en épocas de temperaturas bajas (Kramberger *et al.*, 2008), cuando no es posible el cultivo de otras especies de interés comercial debido a la climatología. *Lolium multiflorum* es una gramínea forrajera que se adapta a un amplio rango climático, dentro de los climas templados, por lo que puede introducirse en rotaciones de cultivos en diferentes lugares.

El raigrás italiano es cultivado como cubierta vegetal de invierno, en el caso de variedades anuales (variedades tipo Westerwold), o como cubierta vegetal perenne, debido a su capacidad de autoresiembrado, en el caso de las variedades no alternativas.

Es habitualmente utilizado como cultivo de invierno en rotaciones con el fin de intensificar la producción forrajera (López Cedrón *et al.*, 2006), o para proporcionar una cubierta verde (Kramberger *et al.*, 2009), que además produce un forraje de calidad (Piñeiro *et al.*, 2001).

El raigrás italiano es efectivo en la prevención de la lixiviación del nitrógeno mineral durante el otoño y el invierno (Kramberger *et al.*, 2009; Lithourgidis *et al.*, 2011), ya que es un cultivo que presenta una alta demanda de nitrógeno. Debido a esto, desempeña un papel importante desde el punto de vista medioambiental, ya que evita que el N se filtre por lavado a zonas inaccesibles para las raíces, para acabar en los cauces de aguas superficiales o subterráneas (Piñeiro *et al.*, 2001).

Otra de las características de esta especie que la hace interesante como cubierta verde es que se implanta rápidamente en campo (Piñeiro *et al.*, 2001), por

lo que ejerce un efecto herbicida sobre las malas hierbas que puedan aparecer en la parcela, ya que debido a su rápido crecimiento inicial no deja crecer a otras especies. Por ejemplo, Kaneko *et al.* (2011) concluyeron en su ensayo que utilizando el raigrás italiano como cubierta verde en una rotación con soja forrajera no es necesario aplicar herbicidas, ya que el efecto de supresión de malas hierbas del raigrás es suficiente para una producción adecuada de soja. Además, esta facilidad de establecimiento hace que el suelo permanezca desnudo menos tiempo, por lo que se reducen las posibilidades de erosión.

Presenta ventajas sobre otros cultivos utilizados como cubiertas vegetales en áreas de otoños e inviernos templados en términos de costos de producción (Kramberger *et al.*, 2008; Rozman *et al.*, 2006) y de beneficios, debido a la producción de forraje de calidad que presenta características adecuadas para el consumo por el ganado. Por lo tanto, esta cubierta verde presenta una mayor rentabilidad que otras que no pueden ser aprovechadas con un fin comercial.

Moraes *et al.* (2009) determinó que las especies *Raphanus sativus* y *Lolium multiflorum* presentan una mayor cobertura del suelo que otras cubiertas verdes, por lo que el suelo queda más protegido. Además, el raigrás italiano permite una mayor reducción de las malas hierbas y un mayor crecimiento de las plantas de cereales que constituirían el cultivo siguiente (Lithourgidis *et al.*, 2011).

Kuo y Jellum (2000) observaron que el centeno de invierno y el raigrás benefician al nitrógeno orgánico del suelo y mejoran gradualmente, a largo plazo, la producción de biomasa del maíz comparado con el control (suelo en barbecho) (Thorup-Kristensen *et al.*, 2003).

1.3.3.- Posibles limitaciones de *Lolium multiflorum* como cubierta verde: la alelopatía

Algunos estudios han encontrado evidencias de la existencia de un efecto negativo del raigrás italiano en el rendimiento del cultivo sucesivo de remolacha (Kramberger *et al.*, 2008) y de maíz (Kramberger *et al.*, 2009), e incluso una

inhibición del ahijado del arroz tras el aporte de residuos de *L. multiflorum* (Li *et al.*, 2008). Sin embargo, otros autores exponen que no encuentran efectos negativos de esta especie sobre cultivos posteriores (López Cedrón *et al.*, 2006).

Una de las explicaciones posibles a estos efectos inhibitorios es la presencia de aleloquímicos en los residuos de esta especie (Li *et al.*, 2008; Kramberger *et al.*, 2009). En sus tallos y raíces se han aislado y caracterizado compuestos fenólicos (Ponce *et al.*, 2009). Entre la gran variedad de compuestos secundarios encontrados en plantas, los fenólicos y terpenoides representan los principales agentes alelopáticos que se conocen actualmente (Anaya, 1999). A nivel planta-suelo, los fenoles han sido frecuentemente asociados a las interacciones alelopáticas entre vegetales. Además pueden participar en la defensa de las plantas contra microorganismos patógenos e interferir en las interacciones entre plantas y microorganismos edáficos (Castells, 2008).

Por lo tanto, los compuestos fenólicos, a menudo antimicrobianos, presentes en *L. multiflorum* son los responsables de su potencial alelopático (Ponce *et al.*, 2009).

La alelopatía es definida como el efecto directo o indirecto, perjudicial o beneficioso, de una planta sobre el crecimiento y desarrollo de otra a través de la producción de compuestos químicos (metabolitos secundarios) que son liberados al medio ambiente (Rice, 1984).

Se ha reconocido evidencias de alelopatía en condiciones naturales sólo en algunas comunidades y en circunstancias particulares. Varios factores interactúan con los agentes alelopáticos en el suelo haciendo la evaluación del proceso en la naturaleza muy compleja (Anaya, 1999).

Diversos autores han encontrado diferentes compuestos obtenidos de la descomposición del raigrás italiano que actúan como inhibidores de la germinación y el desarrollo de otros cultivos o del propio raigrás (Breland, 1996; Stirzaker y Bunn, 1996). Sin embargo, las concentraciones demandadas para la aparición de inhibición son tan altas que únicamente han sido obtenidas en

laboratorio. Además, se requieren ciertas condiciones para que la inhibición sea aparente (Bueno *et al.*, 2006).

Es difícil aplicar los resultados obtenidos en laboratorio directamente a la producción en campo, porque la concentración de sustancias inhibitorias en los extractos son probablemente mayores que lo que se observa en condiciones naturales (Chung y Miller, 1995).

En otras especies del mismo género que el raigrás italiano se han encontrado evidencias de alelopatía, como se indica en el estudio realizado por San Emeterio *et al.* (2003), que demuestra que *L. rigidum* manifiesta una actividad alelopática y que influye en la emergencia y en el crecimiento de las plántulas del raigrás italiano, dactilo y alfalfa.

Por lo tanto, debido al potencial alelopático de esta especie, el manejo de sus residuos podría influir sobre los cultivos posteriores en una rotación (Oreja *et al.*, 2010).

2.- OBJETIVOS

El rendimiento del cultivo principal, implantado tras una cubierta vegetal, se ve influenciado por la gestión agronómica de ésta, tanto por la duración de su ciclo como por el manejo de los residuos que quedan en el campo. Por ello, es importante sincronizar la fecha de eliminación de la cubierta verde con la fecha de siembra o plantación del cultivo principal, así como realizar un adecuado manejo de los residuos del cultivo de cobertura de forma que no afecten negativamente al desarrollo del cultivo principal.

Como se ha expuesto en el apartado anterior, el raigrás italiano (*Lolium multiflorum*) es una gramínea que presenta un gran interés como cubierta vegetal dentro de una rotación de cultivos en climas templados. Por ello, los objetivos del presente trabajo son:

En primer lugar determinar si los residuos de *L. multiflorum* dejados en el campo afectan a la actividad microbiana del suelo, y de qué modo lo hacen, ya que dicha actividad está relacionada con la disponibilidad de los principales nutrientes (nitrógeno y fósforo) para los cultivos.

En segundo lugar, determinar cuál puede ser la mejor gestión que se puede realizar de los residuos de esta especie para que la actividad microbiana edáfica relacionada con el ciclo del nitrógeno, del carbono y del fósforo no se vea afectada negativamente, o incluso se vea beneficiada. Para ello, se evaluará si los residuos de *L. multiflorum* aplicados al suelo de diferentes maneras afectan de forma distinta a las actividades enzimáticas relacionadas con los ciclos de los principales nutrientes del suelo y su disponibilidad.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- DESCRIPCIÓN DE LA PARCELA DE ENSAYO

La parcela objeto de estudio pertenece a la localidad de Arazuri, Navarra (42°48'N-1°43'W). Se encuentra en la zona media de Navarra, y presenta un clima de transición entre mediterráneo y atlántico. La temperatura media anual es de 12.4 °C. Los meses más calurosos son julio y agosto, y las temperaturas más bajas se registran en los meses de diciembre y enero. El total de las precipitaciones es de 762.3 l/m². Las lluvias están bien repartidas a lo largo de todo el año, siendo más escasas durante la estación estival. El mes con más precipitaciones es noviembre, mientras que los más secos son julio y agosto (Figura 1).

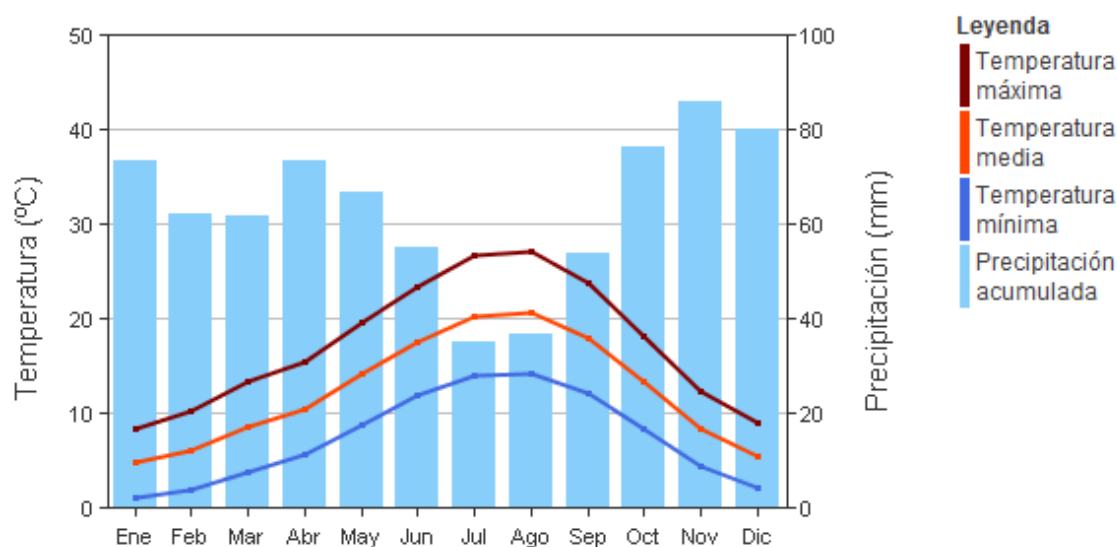


Figura 1. Diagrama ombrotérmico de Arazuri. Fuente: Meteorología y Climatología de Navarra.

Según el informe analítico realizado por el Laboratorio Naserza en el año 2008, los resultados obtenidos en el análisis granulométrico determinan que la composición del suelo es la siguiente: 4.73 % arena gruesa (2-0.2 mm), 8.47 % arena media (0.2-0.1 mm), 14.78 % arena fina (0.1-0.05 mm), 19.60 % limos gruesos (0.05-0.002 mm), 32.44 % limos finos (0.02-0.002 mm) y 19.97 % arcillas (<0.002 mm). Por lo tanto, la textura del suelo de la parcela es arcillo – limosa.

El pH (H₂O) del suelo es ligeramente básico, ya que tiene un valor de 7.61. La conductividad eléctrica es de 0.63 dS/m, por lo que se puede afirmar que se trata de un suelo no salino, con una adecuada conductividad eléctrica, que no tiene problemas por presencia de sales solubles. El contenido en materia orgánica es de 2.42 %. Relacionando este valor con otros parámetros como el contenido en arcillas y el pH del suelo, se puede determinar que el contenido de materia orgánica es correcto, aunque no es un valor muy elevado.

El contenido en fósforo es de 136.53 mg P₂O₅/Kg y el de potasio de 341.57 mg K₂O /Kg, lo cual son valores elevados. Se trata de una parcela que antes del establecimiento del ensayo estaba dedicada a la producción agrícola, por lo que durante su explotación se realizaron diferentes aportaciones de fertilizantes, como lo reflejan los altos contenidos de estos nutrientes. El suelo tiene un contenido de nitrógeno total del 0.18 %, lo cual es un valor bajo. La concentración de nitrato (5.96 µg N-NO₃⁻/g) es notablemente superior a la de amonio (0.64 µg N-NH₄⁺/g), que presenta un valor bajo.

3.2.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la realización del ensayo se establecieron treinta subparcelas de dimensiones 50 x 50 cm a las que se aplicaron cinco tratamientos diferentes con seis repeticiones de cada tratamiento. Los tratamientos que se llevaron a cabo fueron los siguientes:

- Control: suelo desnudo (CON)
- Suelo con residuos secos y enterrados de *L. multiflorum* (LSE)
- Suelo con residuos frescos enterrados de *L. multiflorum* (LVE)
- Suelo con residuos frescos en superficie de *L. multiflorum* (LVS)
- Cultivo de *L. multiflorum* (CUL)

La parcela utilizada en el ensayo estaba dividida en dos zonas, una con suelo sin cultivar y otra en la que había 24 subparcelas con cultivo de *L. multiflorum*. Esta última estaba siendo utilizada en un ensayo paralelo que se estaba llevando a cabo en la parcela de Arazuri, y se utilizó en nuestro ensayo para el tratamiento de cultivo de *L. multiflorum*. En la zona sin cultivar se determinaron 24 subparcelas en las que se aplicaron los tratamientos control, suelo con residuos secos y enterrados de *L. multiflorum*, suelo con residuos frescos enterrados de *L. multiflorum* y suelo con residuos frescos en superficie de *L. multiflorum*.

Para el diseño de la parcela se distribuyeron los tratamientos completamente al azar en las subparcelas, y el resultado fue el que se muestra en la figura 2.

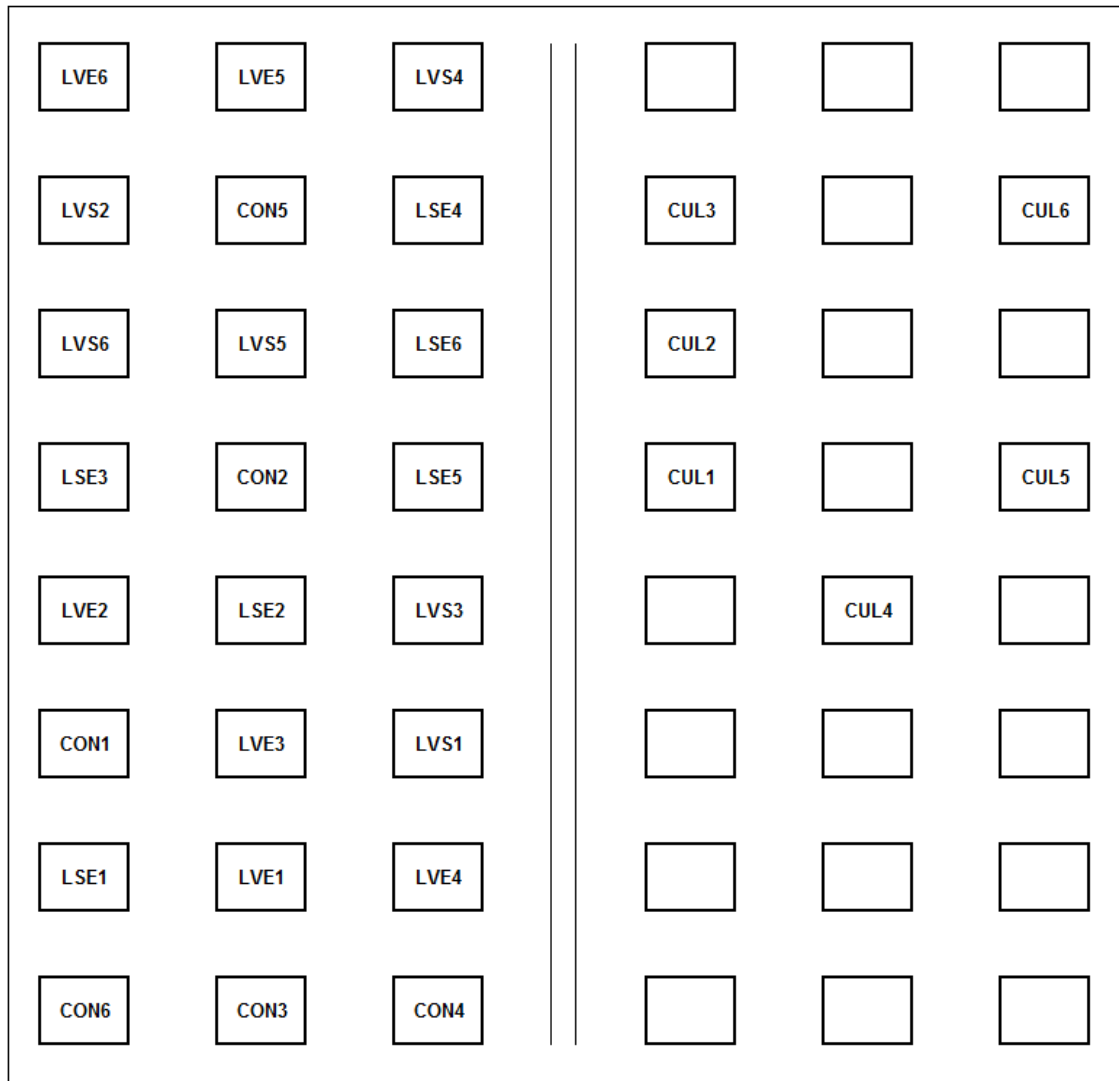


Figura 2. Diseño de la parcela. Fuente: Elaboración propia.

3.3.- ESTABLECIMIENTO DEL ENSAYO Y MUESTREOS DE CAMPO

El ensayo se estableció el día 7 de junio de 2010, simulando una fecha probable de siega del cultivo de *Lolium multiflorum*. Para ello, en primer lugar se determinó la posición de cada una de las subparcelas y se procedió a aplicar en cada una la forma de *L. multiflorum* que le correspondía.

En cada una de las subparcelas en las que había que aplicar residuos del cultivo la cantidad aplicada en peso seco fue de 90 g (180 g/m²), sobre el suelo desnudo.

Para obtener los residuos secos de *L. multiflorum*, una semana antes de establecer el ensayo se segaron parte de las subparcelas y se dejaron secar las plantas durante toda la semana. Se estimó que el contenido de humedad de estos residuos era inferior al 40%, por lo que la cantidad de residuos aplicada fue de 150 gramos (300 g/m²). Los residuos secos se enterraron con una azada a una profundidad de unos 10 cm intentando homogeneizar la mezcla de suelo y residuos.

Los residuos frescos se cortaron el mismo día de la aplicación y se estimó su contenido de humedad en un 80%. Por lo tanto, la cantidad de residuos aplicada fue de 450 gramos en (900 g/m²), tanto para los residuos dejados en superficie como enterrados. Al igual que en el caso anterior los residuos enterrados se mezclaron con la tierra para obtener un suelo con características homogéneas.

En las subparcelas a las que correspondía el tratamiento “control” se eliminaron los restos de vegetación de la superficie sin realizar ninguna labor en el suelo. Para las subparcelas de cultivo se eligieron parcelas en las que ya se había sembrado anteriormente *L. multiflorum*.

Para la realización del trabajo se han llevado a cabo un total de tres muestreos de suelo, dejando transcurrir un tiempo desde el establecimiento del ensayo de:

- Una semana: junio de 2010
- Tres meses: septiembre de 2010
- Siete meses: enero de 2011

En los tres muestreos el procedimiento llevado a cabo fue el mismo. De cada subparcela se extrajo una muestra de suelo, para lo cual se utilizó un tubo cilíndrico de PVC cuyas dimensiones eran 10 cm de longitud y 9 cm de diámetro. Por lo tanto, el volumen de suelo muestreado era de 636 cm³. El tubo era introducido en el suelo mediante el golpeo con un martillo sobre un taco de madera que se colocaba sobre él. Para sacar la muestra de suelo era necesario utilizar dos ganchos que facilitaban la extracción del tubo del suelo.

En las subparcelas en las que el tratamiento aplicado era residuos frescos de *L. multiflorum* en superficie, también se recogió una muestra de este residuo vegetal, unos 20 gramos aproximadamente, además de la muestra de suelo.

Las muestras, tanto de suelo como de residuos vegetales, se depositaban cada una en bolsas de plástico etiquetadas, que se cerraban e introducían en una cámara frigorífica portátil, para evitar alterar sus características antes de trasladarlas al laboratorio para realizar los análisis pertinentes.

3.4.- ANALÍTICAS DE LABORATORIO

Los análisis llevados a cabo en el laboratorio tenían como objetivo la determinación de la actividad enzimática del suelo, la biomasa microbiana, el contenido de nitratos y amonio en el suelo, y la nitrificación potencial.

En primer lugar, cada muestra de suelo se mezcló y homogeneizó para poder obtener submuestras representativas. Para la realización de los análisis se tamizó una parte de cada muestra de suelo con un tamiz de 2 mm. Tanto el suelo sin tamizar como tamizado se guardó en bolsas de plástico debidamente etiquetadas y cerradas en el frigorífico (4 °C) para su correcta conservación.

Los residuos de cultivo se cortaron con la tijera y se molieron hasta conseguir que la mayor parte de la muestra pasase por el tamiz de 2 mm. Estas muestras se guardaron en el frigorífico (4 °C) en bolsas de plástico etiquetadas y cerradas.

Para llevar a cabo los análisis de laboratorio se siguieron los siguientes protocolos:

3.4.1.- Actividades enzimáticas estudiadas

La amidasa, ureasa, β - glucosidasa y fosfatasa alcalina son enzimas que llevan a cabo hidrólisis específicas y que fueron seleccionadas en este experimento porque catalizan reacciones implicadas en transformaciones biogeoquímicas del ciclo del nitrógeno, el carbono y el fósforo, y porque son, probablemente, un elemento esencial en la evaluación de la actividad microbiana del suelo.

Para la determinación de las actividades enzimáticas sobre suelos tamizados (2mm) y residuos vegetales molturados y tamizados, se siguieron los protocolos de Taylor et al (2002), para glucosidasa y fosfatasa alcalina, Kandeler y Gerber (1988), para ureasa y Acosta-Martinez y Tabatabai (2000), para amidasa.

3.4.1.1.- Amidasa

La amidasa es una proteína que está implicada en la mineralización de nitrógeno y cataliza la liberación de NH_4^+ a partir de amidas lineales, actuando sobre enlaces C-N no peptídicos. Es de amplia distribución en suelos, plantas, levaduras y hongos (Acosta-Martínez y Tabatabai, 2000). La actividad de esta enzima se estima mediante el cálculo de la concentración de β -naftilamina en las muestras.

Procedimiento:

1. Preparación de la muestra

Muestra mezclada, tamizada y almacenada a 4 °C.

2. Procedimiento para el ensayo tamponado de la actividad amidasa

2.1. Pesar por triplicado (2 ensayos y 1 blanco) alrededor de 1 g de suelo y 0.15 g de residuos de cultivo en cada tubo y añadir 1.5 ml de tampón THAM 100 mM, pH: 8.5. Agitar en agitatuos para mezclar bien su contenido, y colocarlos en el bloque termostático sin cerrarlos para atemperar antes del inicio de la reacción (37°C, 5 min).

2.2. Colocar en el bloque, también para atemperar un tubo con la solución de L-leucina β -naftilamina 8 mM (37°C, 5 min).

Inicio de la reacción:

2.3. Añadir, con intervalos regulares de 30 s, 0.5 ml de solución de L-leucina β -naftilamina 8 mM (sustrato) a cada tubo, salvo a los blancos. Tras añadir el sustrato a un tubo y antes de añadirlo al siguiente, cerrarlo, agitarlo en agitatuos y colocarlo otra vez en el bloque.

2.4. No es necesario agitar los tubos cada 15 min, aunque en ningún caso perjudicaría la agitación a los resultados.

Parada de la reacción:

- 2.5. Transcurridos alrededor de 45 min añadir, en el mismo orden y con el mismo intervalo entre tubos con que se añadió el sustrato, 3 ml de etanol (95%). Tras añadir la solución a un tubo y antes de añadirla al siguiente agitarlo en el agitatuos.
- 2.6. Añadir a los blancos 3 ml de etanol 95% y 0.5 ml de solución de L-leucina β -naftilamina 8 mM (sustrato) y agitarlos.
- 2.7. Centrifugar inmediatamente los tubos (2000 rpm, 5 min).
- 2.8. Tomar una alícuota de 1ml de la muestra centrifugada y añadir 1 ml de etanol (95%), 2 ml de etanol acidificado y 2 ml de solución de dimetilaminocinnamaldehído (0.6 mg/ml). Agitar la muestra en agitatuos después de añadir cada uno de los reactivos.
- 2.9. Medir la absorbancia de los ensayos y las soluciones de calibración a 540 nm, haciendo cero con el tubo cero de la recta de calibrado.
3. Preparación de la recta de calibrado:
- 3.1. Preparar una recta de calibrado pipeteando en 7 tubos las siguientes cantidades de solución de β -naftilamina 125 μ g/ml y agua desionizada:

Tubo	β -naftilamina (μ g/ml)	β -naftilamina (ml)	Agua desionizada (ml)
1	0	0.0	10.0
2	5	0.4	9.6
3	10	0.8	9.2
4	15	1.2	8.8
5	20	1.6	8.4
6	25	2.0	8.0
7	30	2.4	7.6

- 3.2. Añadir a una alícuota de 1 ml de cada una de las soluciones concentradas de β -naftilamina, 1 ml de etanol 95%, 2 ml de etanol acidificado y 2 ml de solución de dimetilaminocinnamaldehído. Mezclar la solución en el agitatuos después de añadir cada uno de los reactivos.

Cálculos:

A partir de la recta de calibrado, se obtiene el factor F que relaciona la absorbancia (A_{540}) con la concentración de β -naftilamina.

$$\frac{ACT.AMIDASA}{(mg\beta - naf / (kg.h))} = \frac{[A_{540} - A_B] * F (mg / l) * 0.005(l) * 1000(g / kg)}{P_m (g) * T * [PS / 100]}$$

A_{540} : Absorbancia a 540 nm de los ensayos

A_B : Absorbancia a 540 nm del blanco correspondiente

F: Factor de la recta de calibrado de β -naftilamina

0.005: Volumen total de sobrenadante en litros

P_m : Peso de la muestra de suelo en g

T: Tiempo de ensayo en horas

PS: Peso seco del suelo (%)

3.4.1.2.- Ureasa

La ureasa es una enzima que pertenece al mismo grupo que la amidasa, y cataliza la hidrólisis de la urea a dióxido de carbono y amoníaco actuando sobre enlaces C-N peptídicos. La estimación de la actividad ureasa se realiza mediante la cuantificación del amonio liberado en los ensayos realizados en laboratorio (García *et al.*, 2003).

Procedimiento:

1. Preparación de la muestra

Muestra mezclada, tamizada y almacenada a 4°C.

2. Procedimiento para el ensayo tamponado de la actividad Ureasa

2.1. Pesar por triplicado (2 ensayos y 1 blanco) alrededor de 1 g de suelo en cada tubo y añadir 1.75 ml de tampón borato 100 mM, pH: 10,0. Agitar en agitatubos para mezclar bien su contenido, y colocarlos en el bloque termostático sin cerrarlos para atemperar antes del inicio de la reacción (37 °C; 5 min).

2.2. Colocar en el bloque, también para atemperar, un tubo con la solución de urea 820 mM (37 °C; 5 min).

Inicio de la reacción

2.3. Añadir, con intervalos regulares, 0.25 ml de solución de urea 820 mM (sustrato) a cada tubo, salvo a los blancos. Tras añadir el sustrato a un tubo y antes de añadirlo al siguiente, cerrarlo, agitarlo en agitatuos y colocarlo otra vez en el bloque.

2.4. A los 15, a los 30 y a los 45 min, agitar los tubos y colocarlos de nuevo en su posición.

Parada de la reacción

2.5. Transcurridos alrededor de 60 min añadir, en el mismo orden y con el mismo intervalo entre tubos con que se añadió el sustrato, 6 ml de solución de KCl 2 M a todos los ensayos. Tras añadir la solución a un tubo y antes de añadirla al siguiente, cerrarlo y agitarlo en agitatuos

2.6. Añadir a los blancos también 6 ml de solución de KCl 2 M. Añadir luego 0.25 ml de solución de urea 820 mM (sustrato), cerrarlos y agitarlos de igual forma.

2.7. Centrifugar los tubos (3500 rpm; 5 min).

3. Preparación de la recta de calibrado para determinación de NH_4^+

3.1. Preparar (siempre) una recta de calibrado pipeteando en los tubos las siguientes cantidades de solución de amonio 5 mg/l, agua y solución diluyente para ensayos tamponados (ver Tabla). Preparar siempre al menos 2 blancos.

Tubo	NH_4^+ (mg/l)	NH_4^+ 5 mg/l (ml)	Agua (ml)	Sol. Diluyente (ml)
1 (Blanco)	0	0	3.75	0.25
2	0.25	0.2	3.55	0.25
3	0.50	0.4	3.35	0.25
4	1.00	0.8	2.95	0.25
5	2.00	1.6	2.15	0.25
6	4.00	3.2	0.55	0.25

4. Lectura a 670 nm:

- 4.1. Inmediatamente después de centrifugar, pipetear con puntas finas 0.25 ml de cada sobrenadante en tubos de 10 ml, añadir 3.75 ml de agua y agitar.
- 4.2. Añadir, tanto a los sobrenadantes diluidos, como a los tubos de la recta de calibrado, 2 ml de reactivo A. Agitar bien en agitatubos y añadir 0.8 ml de reactivo de dicloroisocianurato. Inmediatamente tras la adición de este reactivo a cada tubo y antes de hacerlo en el siguiente, agitar bien durante unos segundos.
- 4.3. Esperar 30 min a T^a ambiente y volver a agitar todos los tubos.
- 4.4. Medir la absorbancia de los ensayos y las soluciones de calibración a 670 nm, haciendo cero con el tubo cero de la recta de calibrado.

Cálculos:

A partir de la recta de calibrado se obtiene el factor (F) que relaciona la absorbancia (A₆₇₀) con la concentración de amonio.

La actividad ureasa en mg de N-NH₄⁺ / (Kg de suelo seco * h) se calcula de la siguiente forma:

$$ACT.UREASA = \frac{[A_{670} - A_B] * F(mgNH_4^+ / l) * 16 * f_2 * 0.008(l) * 0.778(mgN / mgNH_4^+)}{P_m(g) * [T / 2](2h) * 10^{-3}(kg / g) * [PS / 100]}$$

A₆₇₀: Absorbancia a 670 nm de los ensayos

A_B: Absorbancia a 670 nm del blanco correspondiente

F: Factor de la recta de calibrado de amonio en mg de NH₄⁺/l

0,008: Volumen total de sobrenadante en litros

0,778: Relación peso atómico de N / peso molecular de amonio (mg de N/mg de NH₄⁺)

16: Factor de la primera dilución del sobrenadante realizada por defecto para la determinación de amonio

f₂: Factor de la segunda dilución realizada cuando la absorbancia a 670 nm se sale de la recta de calibrado

P_m: Peso de la muestra de suelo en g

T: Tiempo de ensayo en horas (T= t (min)/60)

PS: Peso seco del suelo (%)

3.4.1.3.- Glucosidasa

La β -glucosidasa es una importante glicosidasa presente en los suelos, que cataliza la hidrólisis del β -D-glucósido que se encuentra en los carbohidratos. Esta enzima está involucrada en el paso final de la degradación de la celulosa que proporciona azúcares simples a los microorganismos del suelo (Schmidt y Laskowski, 1961), y que está implicada en el ciclo del carbono. La determinación de la actividad de esta proteína se realiza mediante la estimación de la cantidad de fenol liberada en la reacción.

Procedimiento:

A partir de una muestra mezclada, tamizada y almacenada a 4°C.

1. Procedimiento para el ensayo tamponado de la actividad b-glucosidasa
 - 1.1. Pesar por triplicado (2 ensayos y 1 blanco) alrededor de 1 g de suelo en cada tubo y añadir 1.6 ml de MUB 20 mM, pH: 6.0. Agitar en agitatuos para mezclar bien su contenido, y colocarlos en el bloque termostático sin cerrarlos para atemperar antes del inicio de la reacción (37 °C; 5 min).
 - 1.2. Colocar en el bloque, también para atemperar, un tubo con la solución de sustrato, solución 4-nitrofenil-b-D-glucopiranosido 50 mM (37 °C; 5 min).

Inicio de la reacción

- 1.3. Añadir, con intervalos regulares, 0.4 ml de sustrato a cada tubo, salvo a los blancos. Tras añadir el sustrato a un tubo y antes de añadirlo al siguiente, cerrarlo, agitarlo en agitatuos y colocarlo otra vez en el bloque.
- 1.4. A los 15 y a los 30 min, agitar los tubos (agitatuos, agitación moderada) y colocarlos de nuevo en su posición.

Parada de la reacción

- 1.5. Transcurridos alrededor de 45 min añadir, en el mismo orden y con el mismo intervalo entre tubos con que se añadió el sustrato, 0,4 ml de solución de cloruro cálcico y 1,6 ml de THAM 0.1 M, pH: 12.0 a todos los

ensayos. Tras añadir las soluciones a un tubo y antes de añadir las al siguiente, cerrarlo y agitarlo en agitatorios.

1.6. Añadir a los blancos también 0,4 ml de solución de cloruro cálcico y 1,6 ml de de THAM 0.1 M, pH: 12.0. Añadir luego 0.4 ml de solución de PNG 50 mM (sustrato), cerrarlos y agitarlos de igual forma.

1.7. Centrifugar los tubos (3500 rpm; 5 min).

2. Preparación de la recta de calibrado:

No es necesario hacer la recta de calibrado siempre que se hacen ensayos porque es muy estable, pero al principio conviene hacerla en cada ocasión para comprobarlo.

2.1. Preparar una recta de calibrado pipeteando en los tubos las siguientes cantidades de solución de 4-nitrofenol de 80 mg/l y de tampón MUB 20 mM pH:6.0. Utilizar siempre al menos 2 blancos, aunque no se prepare recta de calibrado.

Tubo	NP (mg/l)	NP 80 mg/l (ml)	Tampón MUB 20 mM pH:6 (ml)
1 (Blanco)	0	0.0	5.0
2	8	0.5	4.5
3	16	1.0	4.0
4	24	1.5	3.5
5	32	2.0	3.0
6	40	2.5	2.5

2.2. Añadir a todos los tubos de la recta de calibrado 1 ml de solución de cloruro cálcico y de THAM 0.1 M, pH: 12.0, agitar y centrifugar según se describe para los ensayos.

3. Lectura a 410 nm:

3.1. Inmediatamente después de centrifugar, según el color de los sobrenadantes, diluirlos 5, 10, 20 ó más veces si fuera necesario. Para ello, pipetear con puntas finas (de 2.5 ml) en tubos normales de vidrio, respectivamente, 1, 0.5, 0.25 ml o menos volumen de cada

sobrenadante,(utilizar siempre la misma dilución con el blanco que con los ensayos), llevando luego a 5 ml con THAM0.1 M, pH: 10.0.

3.2. Medir lo antes posible (haciendo cero con un blanco de la recta de calibrado) la absorbancia a 410 nm de los ensayos y de los tubos de la recta de calibrado en un espectrofotómetro, utilizando siempre una cubeta de vidrio.

Cálculos:

A partir de la recta de calibrado se obtiene el factor (F) que relaciona la absorbancia (A_{410}) con la concentración de 4-nitrofenol.

La actividad b-Glucosidasa, en mg de 4-nitrofenol / (kg de suelo seco * h), se calcula de la siguiente forma:

$$ACT.\beta - GLUCOSIDASA = \frac{[A_{410} - A_B] * F(mg/l) * 0.002(l) * 1000(g/kg)}{P_m(g) * T(h) * [PS/100]}$$

A_{410} : Absorbancia a 410 nm de los ensayos

A_B : Absorbancia a 410 nm del blanco correspondiente

F: Factor de la recta de calibrado de 4-nitrofenol (PN) en mg de PN/litro

0,002: Volumen del ensayo en litros

F: Factor de la dilución realizada tras el final de los ensayos

P_m : Peso de la muestra de suelo en g

T: Tiempo de ensayo en horas ($T = t(\text{min})/60$)

PS: Peso seco del suelo (%)

3.4.1.4.- Fosfatasa alcalina

La mineralización del fósforo orgánico es llevada a cabo por las fosfatasa o fosfohidrolasas, que catalizan la hidrólisis de ésteres y de anhídridos de ácido fosfórico (Fernández *et al.*, 2008; Nahas, 2002). Para la determinación de la actividad de esta enzima se estima el contenido de fenol, que ha sido liberado en la reacción de hidrólisis llevada a cabo en los análisis de laboratorio.

Procedimiento:

1. Preparación de la muestra

A partir de una muestra mezclada, tamizada y almacenada a 4°C.

2. Procedimiento para el ensayo tamponado de la actividad Fosfatasa alcalina

2.1. Pesar por triplicado (2 ensayos y 1 blanco) alrededor de 1 g de suelo en cada tubo y añadir 1.6 ml de MUB 20 mM, pH:11. Agitar en agitatuos para mezclar bien su contenido, y colocarlos en el bloque termostático sin cerrarlos para atemperar antes del inicio de la reacción (37 °C; 5 min).

2.2. Colocar en el bloque, también para atemperar, un tubo con la solución de sustrato, solución de 4-nitrofenil fosfato hexahidratado 50 mM (37 °C; 5 min).

Inicio de la reacción

2.3. Añadir, con intervalos regulares, 0.4 ml de sustrato a cada tubo, salvo a los blancos. Tras añadir el sustrato a un tubo y antes de añadirlo al siguiente, cerrarlo, agitarlo en agitatuos y colocarlo otra vez en el bloque.

2.4. A los 15 y a los 30 min, agitar los tubos y colocarlos de nuevo en su posición.

Parada de la reacción

2.5. Transcurridos alrededor de 45 min añadir, en el mismo orden y con el mismo intervalo entre tubos con que se añadió el sustrato, 0,4 ml de solución de cloruro cálcico y 1,6 ml de sosa 0,5 M a todos los ensayos. Tras añadir las soluciones a un tubo y antes de añadir las al siguiente, cerrarlo y agitarlo en agitatuos.

2.6. Añadir a los blancos también 0,4 ml de solución de cloruro cálcico y 1,6 ml de de sosa 0,5 M. Añadir luego 0.4 ml de solución de PNP 50 mM (sustrato), cerrarlos y agitarlos de igual forma.

2.7. Centrifugar los tubos (3500 rpm; 5 min).

3. Preparación de la recta de calibrado de 4-nitrofenol (NP):

No es necesario hacer la recta de calibrado siempre que se hacen ensayos porque es muy estable, pero al principio conviene hacerla en cada ocasión para comprobarlo.

3.1. Preparar una recta de calibrado pipeteando en los tubos las siguientes cantidades de solución de NP de 80 mg/l y tampón MUB 20 mM pH: 11 (ver tabla). Utilizar siempre al menos 2 blancos, aunque no se prepare recta de calibrado.

Tubo	NP (mg/l)	NP 80 mg/l (ml)	Tampón MUB 20 mM pH:11 (ml)
1 (Blanco)	0	0.0	5.0
2	8	0.5	4.5
3	16	1.0	4.0
4	24	1.5	3.5
5	32	2.0	3.0
6	40	2.5	2.5

3.2. Añadir a todos los tubos de la recta de calibrado 1 ml de solución de cloruro cálcico y 4 ml de sosa 0,5 M, agitar y centrifugar según se describe para los ensayos.

4. Lectura a 410 nm:

4.1. Inmediatamente después de centrifugar, según el color de los sobrenadantes, diluirlos 5, 10, 20 ó más veces si fuera necesario (factor de dilución: f). Para ello, pipetear con puntas finas (de 2.5 ml) en tubos normales de vidrio, respectivamente, 1, 0.5, 0.25 ml o menos volumen de cada sobrenadante, (utilizar siempre la misma dilución con el blanco que con los ensayos), llevando luego a 5 ml con agua.

4.2. Medir lo antes posible (haciendo cero con un blanco de la recta de calibrado) la absorbancia a 410 nm de los ensayos y de los tubos de la recta de calibrado en un espectrofotómetro. Si las absorbancias de los ensayos fueran superiores a la del punto de la recta de mayor concentración, realizar una dilución superior y repetir la medida.

Cálculos:

A partir de la recta de calibrado (se muestra un ejemplo para el ensayo tamponado) se obtiene el factor (F) que relaciona la absorbancia (A₄₁₀) con la concentración de 4-nitrofenol (C).

La actividad fosfatasa alcalina, en mg de 4-nitrofenol / (kg de suelo seco * h), se calcula de la siguiente forma:

$$ACT.FOSFATASA = \frac{[A_{410} - A_B] * F(mg/l) * 0.002(l) * 1000(g/kg)}{P_m(g) * T(h) * [PS / 100]}$$

A₄₁₀: Absorbancia a 410 nm de los ensayos

A_B: Absorbancia a 410 nm del blanco correspondiente

F: Factor de la recta de calibrado de 4-nitrofenol en mg de NP/litro
0,002: Volumen del ensayo en litros

F: Factor de la dilución realizada tras el final de los ensayos

P_m: Peso de la muestra de suelo en g

T: Tiempo de ensayo en horas (T= t (min)/60)

PS: Peso seco del suelo (%)

3.4.2.- Carbono y nitrógeno en la biomasa microbiana y nitrificación potencial

La biomasa microbiana del suelo está implicada en la descomposición de los materiales orgánicos y, por lo tanto, en los ciclos de los nutrientes del suelo. Es también frecuentemente utilizada como indicador de cambios en las propiedades químicas y físicas del suelo resultantes del manejo del suelo y de estreses ambientales en los ecosistemas agrícolas (Moore *et al.*, 1999).

3.4.2.1.- Carbono y nitrógeno en la biomasa microbiana

El cálculo del carbono y el nitrógeno presentes en la biomasa microbiana se realizó utilizando el método de fumigación - extracción con cloroformo.

La fumigación con cloroformo implica la muerte de las poblaciones microbianas del suelo. Las células de los microorganismos lisan (destrucción

celular) liberando la materia orgánica microbiana (nitrógeno y carbono orgánicos) que forman parte de ellas. Esta fumigación no afecta a la materia orgánica no viviente del suelo.

Previamente a la determinación del carbono y nitrógeno microbianos se realizó una extracción, tanto de las muestras de suelo fumigado como no fumigado. Los valores medidos en suelos fumigados representan el contenido de carbono y nitrógeno presentes en el suelo y en las poblaciones de microorganismos del suelo, mientras que los valores en suelos no fumigados únicamente representan el contenido de carbono y nitrógeno en el suelo. El contenido de carbono y nitrógeno microbianos es el resultado de la diferencia entre el valor medido en suelos fumigados y no fumigados.

Procedimiento:

1. Para cada suelo pesar 20g en el vaso de precipitar y 20 g en el tarro de 250 mL. Etiquetar el vaso de precipitar con lápiz, los marcadores o rotuladores se borrarán con el cloroformo.

Suelos no fumigados:

2. Pipetear 80 mL de K_2SO_4 0.05 M en los tarros de 250 mL con el suelo y en los blancos, cubrir con parafilm y agitar durante 1 h.
3. Filtrar la extracción inicial a través de papel de filtro Whatman nº 1 (prelavado con agua destilada) en tarros de 150 mL. Etiquetar y congelar hasta realizar la digestión del nitrógeno y el análisis de carbono.

Suelos fumigados:

4. Fumigación con cloroformo: colocar una toalla mojada en el fondo del desecador, y colocar los vasos de precipitar con el suelo arriba. Añadir un vaso de precipitar de 50 ML con 30 mL de cloroformo y las *Bowling chips* (bolitas de papel de aluminio).
5. Conectar el desecador a la bomba de vacío y hacer vacío hasta que el cloroformo llegue a ebullición. Asegurarse de que la bomba evacúa a una

campana de extracción. Una vez que el cloroformo llega a ebullición, desconectar de la bomba y ventilar. Repetir este paso dos veces hasta un total de 3 evacuaciones. En la última evacuación no ventilar. Guardar en oscuridad durante 3 días.

6. Después de 3 días, liberar el vacío y quitar el cloroformo del desecador.
7. Transferir los suelos fumigados a los tarros de 250 mL y extraer los suelos como en los pasos 2 y 3.

PROTOCOLO DE LA OXIDACIÓN CON PERSULFATO PARA MEDIR EL NITRÓGENO TOTAL

La determinación del nitrógeno total en el suelo implica la medida de la cantidad nitrógeno orgánico e inorgánico. Para ello, es necesario convertir todo el nitrógeno presente en el suelo en nitrato. Esto se consigue mediante la realización de una digestión con persulfato, que oxida todo el nitrógeno presente en el suelo. La medida del nitrógeno total del suelo se realiza mediante un autoanalizador, que determina el valor del nitrato total por colorimetría, mediante la medida de la absorbancia de los extractos tras una reacción de color.

Procedimiento:

1. Descongelar los extractos de K_2SO_4 0.05 M.
2. Invertir los extractos varias veces para mezclarlos. Añadir 25 mL de muestra al tubo de 50 mL.
3. Cada 10 muestras se tienen que incluir un estándar y un blanco:
 - a) Blanco = 25 mL (26.45 g) de K_2SO_4 0.05 M.
 - b) Estándar = 25 mL (26.45 g) de 10 mg N/L de alanina en K_2SO_4 0.05 M.
4. Para cada muestra, blanco o estándar, añadir 25 mL de reactivo alcalino de persulfato potásico.
5. Inmediatamente después de añadir el reactivo de persulfato, enroscar la tapa del tubo para prevenir pérdidas gaseosas de amonio.
6. Pesar y anotar el peso de cada tubo tapado.

7. Colocar los tubos etiquetados, tapados y pesados en la autoclave durante 40 minutos (103.5 kPa de presión).
8. Después de autoclavarlos, dejar el tiempo suficiente para que los extractos digeridos se enfríen y se seque el exterior de los tubos, entonces volver a pesar los tubos para calcular la pérdida de masa por vapor.
9. Medir el contenido de nitrato (NO_3^-) de los extractos en un autoanalizador.
10. Correcciones:

- (i) Corrección de pérdida de masa. Durante la autoclave, un pequeño volumen de agua se pierde como vapor. Con el tiempo suficiente para la completa degradación del persulfato (40 min), la pérdida de masa puede llegar al 0.04 o 4%. Los pesos pre- y post- autoclave se tienen que anotar para calcular y corregir la pérdida de masa.

Fracción de peso perdido = $(\text{peso pre-autoclave} - \text{peso post-autoclave}) / (\text{peso pre-autoclave} - \text{peso medio tubos})$

Esta fracción se multiplica por el valor del autoanalizador (contenido de nitrato) para corregirlo.

Valor corregido con pérdida de masa = $\text{valor autoanalizador} - (\text{valor autoanalizador} \times \text{fracción de peso perdido})$

- (ii) Corrección del blanco. Si el autoanalizador se calibra con agua, hay que corregir este valor con el blanco. Si se calibra usando una matriz de persulfato no sería necesario.

Valor corregido con blanco = $\text{valor corregido con pérdida de masa} - \text{valor medio de los blancos}$

- (iii) Corrección de la dilución. Como la muestra se ha diluido con un volumen igual de reactivo (1:1 reactivo:muestra), la concentración de la mezcla se multiplica por 2.

Valor con dilución corregida = $\text{valor con blanco corregido} \times 2$

11. Cálculo de la concentración actual de N (valor con la recuperación corregida)

Concentración actual de N (ppm N) = $\text{valor con dilución corregida} / \text{proporción de recuperación}$

PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE CARBONO ORGÁNICO TOTAL (TOC)

Procedimiento:

1. Descongelar los extractos de K₂SO₄ 0.05 M.
2. Añadir 2 ml de cada extracción a tubos con 3.5 ml de reactivo de crómico para CORG bajo, manteniendo los tubos en un ángulo de 45° durante el pipeteo. Cerrarlos bien y agitarlos con cuidado.
3. Se incluyen los tubos correspondientes a una recta de calibrado de carbono orgánico en los que se pipetea, respectivamente, los siguientes volúmenes de solución estándar de ftalato ácido de potásico 0.5 M (solución de extracción). Los tubos de la recta de calibrado corresponden, respectivamente, a las siguientes concentraciones de carbono orgánico: 0, 20, 40, 60, y 80 mg/l.
4. Los tubos se mantienen 1 hora a 150° en el bloque digestor.
5. Sacar los tubos del digestor, esperar unos 5 minutos e introducir los tubos en un cubo con agua corriente, manteniéndolos hasta que se atemperen y luego agitar.
6. Medir la absorbancia a 420 nm de los tubos de la recta de calibrado y después de las muestras.

Cálculos:

A partir de la recta de calibrado de ftalato se obtiene el factor F que relaciona la absorbancia con la concentración de carbono orgánico.

El carbono orgánico, CO, expresado en mg de C orgánico/kg de suelo, de un filtrado tanto de suelo fumigado con cloroformo, como de suelo no fumigado, se calcula de la siguiente forma:

$$CO = \frac{C(mg/l) * 0.04(l)}{Pm(g) * [PS/100] * 10^{-3}(kg/g)}$$

El carbono de biomasa microbiana, CBM, expresado en mg de C/kg de suelo, se calcula, a partir del carbono orgánico extraído del suelo fumigado y sin fumigar, de la siguiente forma:

$$CBM = \frac{[CO_F - CO_{NOF}]}{K_c} = \frac{[CO_F - CO_{NOF}]}{0.45}$$

CO: Carbono orgánico extraído (mg C/kg suelo)

P_m: Peso suelo utilizado en el ensayo (g)

PS: Peso seco del suelo (%)

0.04: Volumen total de filtrado (l)

CBM: Carbono de biomasa microbiana (mg C/kg suelo)

CO_F: Carbono orgánico extraído de suelo fumigado (mg C/kg suelo)

CO_{NOF}: Carbono orgánico extraído de suelo no fumigado (mg C/kg suelo)

K_C: Constante cuyo valor equivale a la fracción del carbono de biomasa microbiana extraída siguiendo el procedimiento descrito, es decir, constante que convierte carbono labile-cloroformo en biomasa microbiana. El valor utilizado es de 0.45.

3.4.2.2.- Nitrificación potencial

La nitrificación potencial es la capacidad máxima de la población de microorganismos nitrificantes de un suelo para transformar el nitrógeno en forma de amonio (N-NO₄⁺) a nitrógeno en forma de nitrato (N-NO₃⁻) (Fortuna *et al.*, 2003).

Relaciona la cantidad total de nitratos en el suelo final e inicial, tras someter al suelo a unas condiciones ambientales idóneas para la nitrificación. La tasa de nitrificación en los suelos es fuertemente dependiente de la temperatura, el contenido de agua, la oxigenación, el pH y el potencial osmótico del suelo (Cabrera, 2007), que influyen la disponibilidad de amonio y en los microorganismos nitrificantes. Este parámetro es una estimación del tamaño de la población de microorganismos nitrificantes del suelo. Su valor depende tanto del número de microorganismos nitrificantes como de la concentración de amonio disponible en el suelo, por lo que ambos son factores limitantes de la nitrificación potencial.

Procedimiento:

1. Medir 100 mL de solución NP (dilución de 7 mL de solución de KH₂PO₄ 0.2 M, 18 mL de solución de K₂HPO₄ 0.2 M y 50 mL de solución de (NH₄)SO₄ 50 mM en 5 L) en matraces de 250 mL.
2. Pesar 10 g de suelo fresco en cada erlenmeyer.

3. Colocar en agitador a 60 revoluciones/min.
4. A las 2, 8, 14 y 24 h, transferir 10 mL de suspensión de cada matraz a tubos de centrífuga.
5. Añadir unas gotas de solución floculante.
6. Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
7. Verter el sobrenadante en los tubos, tapar y congelar, para la posterior determinación del contenido de NO_3^- en un autoanalizador.

3.4.3.- Otros parámetros edáficos medidos

3.4.3.1.- Determinación de la humedad

La determinación de la humedad se realizó para las muestras de suelo sin tamizar y para las muestras de residuos vegetales de *L. multiflorum*. El valor de la humedad es utilizado para corregir los cálculos realizados en la determinación de las actividades enzimáticas, el carbono y nitrógeno en la biomasa microbiana, la nitrificación potencial y el contenido de nitrato y amonio en el suelo.

Se pesaron 20 g de suelo húmedo de cada muestra mezclado y homogeneizado, y 2 g de residuos húmedos de cultivo en diferentes recipientes etiquetados. Se metieron en una estufa de aire forzado a 70 °C durante 24 horas para secar las muestras. Se pesaron nuevamente todas las muestras para determinar el peso seco de éstas. De esta forma, la diferencia entre el peso húmedo y el seco proporciona el contenido de humedad del suelo y los residuos.

A continuación, se tamizaron bajo el grifo las muestras de suelo a través de un tamiz de 2 mm para separar las piedras que contenían y así poder determinar con más exactitud la humedad del suelo. Las piedras se colocaron en recipientes, se pesaron y se secaron en la estufa de aire forzado a 70 °C durante 24 horas. Tras sacarlas de la estufa se anotó el peso seco de las rocas y se desecharon. El valor del peso de las rocas es utilizado para corregir el valor de humedad del suelo.

3.4.3.2.- Determinación de nitrato y amonio

El nitrógeno orgánico es transformado por los microorganismos del suelo en amonio a través del proceso de mineralización. El amonio se transforma en nitrato mediante el proceso de nitrificación que también es llevado a cabo por poblaciones microbianas del suelo. La medida del contenido de nitratos y amonio en el suelo proporciona información sobre la disponibilidad de nitrógeno para el cultivo en el momento del muestreo.

Procedimiento:

1. Pesar y anotar la cantidad exacta de suelo y KCl 2M en cada tubo de centrífuga.
2. Centrifugar los tubos 10 minutos a 3000 rpm
3. Verter el sobrenadante en tubos, tapar y congelar.
4. Posteriormente se descongelan las muestras y se mide la cantidad de amonio y nitrato presente en ellas utilizando un autoanalizador.

3.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS

Los resultados han sido analizados mediante modelos lineales generales univariantes utilizando el software SPSS 19.0.

Las variables analizadas han sido: la actividad enzimática en el suelo y en los residuos de *L. multiflorum* (amidasa, ureasa, glucosidasa y fosfatasa alcalina), el contenido en nitratos y amonio del suelo, la nitrificación potencial, la biomasa microbiana (nitrógeno y carbono microbianos), la relación C/N microbianos, y el contenido de humedad del suelo.

Se ha realizado el análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores de todas las variables utilizando un nivel de significación de 0.05. Los dos factores que han sido utilizados son la fecha de muestreo y el tratamiento aplicado al suelo. El modelo que se ha seguido es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde Y_{ijk} es la variable estudiada; μ es la media global de la variable; α_i es el efecto del nivel i del factor fecha; β_j es el efecto del nivel j del factor tratamiento; $(\alpha\beta)_{ij}$ es la interacción entre los dos factores y representa el hecho de que el efecto de un determinado nivel de un factor sea diferente para cada nivel del otro factor; y ε_{ijk} las desviaciones aleatorias alrededor de las medias.

Se partía de las siguientes hipótesis:

$$H_{0\alpha}: \mu_{1\alpha} = \mu_{2\alpha} = \dots = \mu_{k\alpha} ; H_{1\alpha}: \mu_{1\alpha} \neq \mu_{2\alpha} \neq \dots \neq \mu_{k\alpha}$$

$$H_{0\beta}: \mu_{1\beta} = \mu_{2\beta} = \dots = \mu_{k\beta} ; H_{1\beta}: \mu_{1\beta} \neq \mu_{2\beta} \neq \dots \neq \mu_{k\beta}$$

$$H_{0\alpha\beta}: \mu_{\alpha\beta} - \mu_{\alpha'\beta} = \mu_{\alpha i} - \mu_{\alpha' i} ; H_{1\beta}: \mu_{\alpha\beta} - \mu_{\alpha'\beta} \neq \mu_{\alpha i} - \mu_{\alpha' i}$$

donde μ_1, \dots, μ_k representan las medias de la variable, α el factor fecha y β el factor tratamiento. Si se acepta la hipótesis nula significa que no existen diferencias en la variable en función de la fecha de muestreo o entre tratamientos, pero si se rechaza implica que existen diferencias significativas entre los datos.

Previamente a la realización del análisis se ha comprobado que los datos cumplían las condiciones de independencia entre datos, normalidad (pruebas no paramétrica: Test de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (Test de Levene). En los casos en los que los datos no siguieron una distribución normal, las variables se transformaron logarítmicamente antes de realizar los ANOVAs correspondientes.

Tras la realización del ANOVA de dos factores, para ver la diferencia entre los tratamientos aplicados al suelo en los casos en los que se existen diferencias entre los dos factores se realizaron análisis post hoc de los datos para cada fecha de muestreo. Las variables en las que se observó interacción entre factores se realizaron ANOVAs unifactoriales para cada uno de los factores (fecha y tratamientos).

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- HUMEDAD DEL SUELO

El ensayo se estableció en la parcela el 7 de junio de 2010 sobre el suelo seco. El primer muestreo tuvo lugar el 14 de junio con contenido de humedad en el suelo bajo, en torno al 11%, a pesar de que durante los días anteriores se habían producido precipitaciones.

Los meses de verano son los más secos en esta región. Julio presentó una acumulación de lluvias normal, mientras que agosto y septiembre presentaron un valor de precipitaciones más bajo de lo habitual (Figura 3). Sin embargo, durante este periodo las temperaturas registraron valores normales (Figura 4). En el segundo muestreo (20 de septiembre de 2010) el suelo presentaba una humedad en torno al 8% debido a la escasez de lluvias durante el verano.

Entre el segundo y tercer muestreo la cantidad de precipitaciones acumuladas fue inferior a lo habitual, al igual que ocurre con la temperatura, que fue en torno a 1 °C más baja de lo normal (Figura 3 y 4). En los días anteriores al muestreo realizado el 24 de enero de 2011 no se registraron lluvias, pero el contenido de humedad del suelo era notablemente superior (16.6%) al registrado en los meses de junio y septiembre.

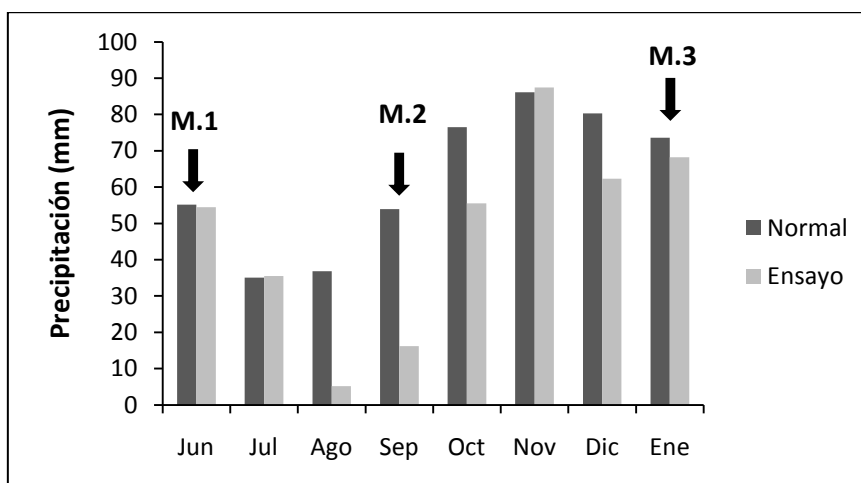


Figura 3. Precipitación acumulada (mm). Normal, precipitación media normal acumulada; Ensayo, precipitación acumulada durante el periodo de ensayo. Fechas de muestreo: M.1, primer muestreo; M.2, segundo muestreo; M.3, tercer muestreo.

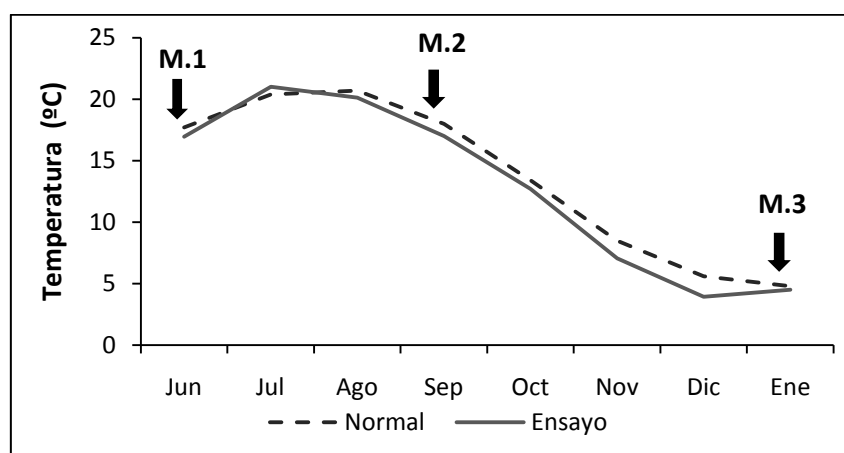


Figura 4. Temperatura media (°C). Normal, temperatura media normal; Ensayo, temperatura media durante el periodo de ensayo. Fechas de muestreo: M.1, primer muestreo; M.2, segundo muestreo; M.3, tercer muestreo.

El contenido de humedad del suelo presenta diferencias significativas en función de la fecha de muestreo ($p < 0.001$), pero no se observa ningún efecto significativo de los diferentes tratamientos aplicados en las subparcelas ($p = 0.254$) (Figura 5). Aunque no se han encontrado diferencias entre tratamientos, la humedad del suelo tiende a evolucionar de manera diferente dependiendo del tratamiento aplicado (efecto de la interacción entre fecha y tratamiento, $p = 0.037$).

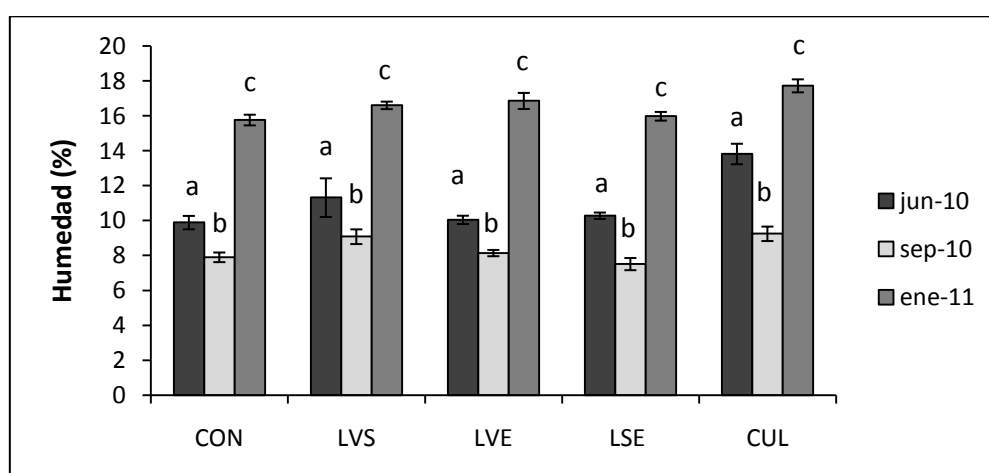


Figura 5. Contenido de humedad en el suelo (%). Tratamientos: CON, control; LVS, residuos verdes en superficie; LVE, residuos verdes enterrados; LSE, residuos secos enterrados; CUL, cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre fechas. Barras de error indican error estándar.

A pesar de no existir diferencias significativas entre tratamientos, las subparcelas con cultivo tienden a presentar el mayor contenido de humedad respecto al control, aunque el cultivo consume agua del suelo durante los meses que está en campo (otoño-primavera). Otro tratamiento que presenta una tendencia a aumentar la humedad en el suelo es el que presenta residuos de raigrás en superficie, ya que los residuos del cultivo evitan la evaporación del agua del suelo. Sin embargo, no se puede afirmar que la presencia de cultivo o de residuos de cultivo en el suelo incremente el contenido de agua de éste por no presentar una diferencia significativa con respecto al suelo desnudo (control).

Las diferencias en el contenido de humedad se observan entre las tres fechas de muestreo, ya que tras el verano, en septiembre, se registraron unos valores menores a los medidos en junio, y en enero la humedad en el suelo es notablemente superior a las otras dos fechas de muestreo debido a las lluvias y a que durante el otoño e invierno la evaporación del agua del suelo es menor que durante la estación estival.

El suelo de la parcela de Arazuri tiene una textura arcillo-limosa que presenta un valor de capacidad de campo de 25.8 % ⁽¹⁾ y un punto de marchitez del 17.7% ⁽²⁾. En todas las fechas de muestreo, y para todos los tratamientos, el contenido de humedad del suelo era inferior a la capacidad de campo, y únicamente el suelo con cultivo en el mes de enero presentó una humedad superior al punto de marchitez. Por lo tanto, en la mayoría de los casos el agua del suelo no está disponible para las plantas, ya que la humedad presenta un valor inferior al punto de marchitez. En el caso del cultivo hay que tener en cuenta que éste consume agua, por lo que disminuye el contenido de humedad en el suelo.

(1) Cálculo capacidad de campo: Fórmula de Bodman y Mahmud:

$$CC (\%) = 0.023 * (\% \text{ arena}) + 0.25 * (\% \text{ limo}) + 0.61 * (\% \text{ arcilla})$$

(2) Cálculo punto de marchitez: Fórmula de Máximov:

$$PMP (\%) = 0.001 * (\% \text{ arena}) + 0.12 * (\% \text{ limo}) + 0.57 * (\% \text{ arcilla})$$

4.2.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SUELO

Las enzimas microbianas extracelulares son un factor fundamental en los ciclos biogeoquímicos, y por tanto en la consecuente liberación de nutrientes disponibles para las plantas (Joanisse *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2010), ya que participan en los ciclos de los nutrientes del suelo. Las actividades enzimáticas son consideradas como un buen indicador de la calidad del suelo, porque controlan la liberación de nutrientes para los cultivos y el crecimiento de los microorganismos (Mikanova *et al.*, 2009).

Los resultados aportados por este ensayo muestran que la actividad de las enzimas microbianas extracelulares del suelo estudiadas es diferente, ya que unas presentan mayor sensibilidad a la aplicación de diferentes tratamientos, mientras que otras varían su actividad con el paso de los meses tras la implantación del ensayo en campo.

En el estudio realizado se han encontrado diferencias significativas en la actividad de la enzima amidasa entre las tres fechas de muestreo ($p < 0.001$), pero no existen efectos significativos de los tratamientos aplicados ($p = 0.179$), ni de la interacción entre fecha y tratamiento ($p = 0.881$) (Figura 6).

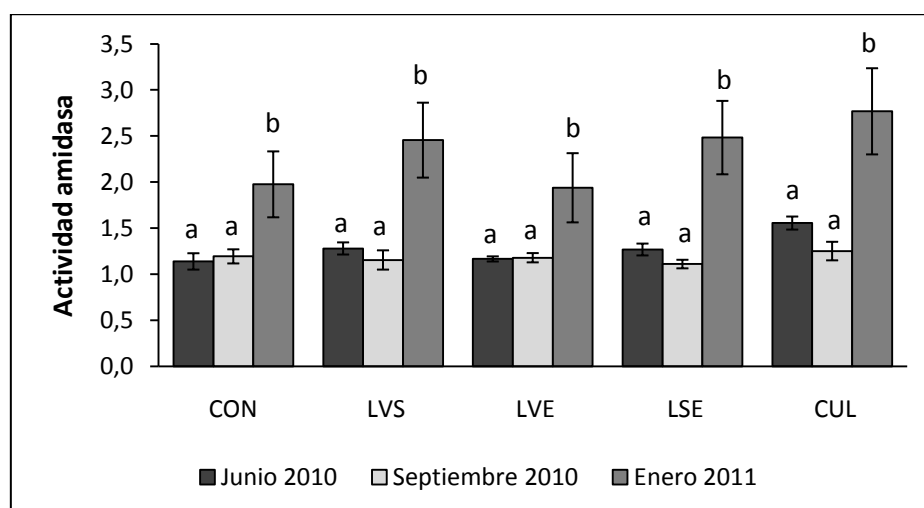


Figura 6. Actividad enzimática del suelo: amidasa (mmoles β -naftilamina/(kg*h)).
Tratamientos: CON, control; LVS, residuos verdes en superficie; LVE, residuos verdes

enterrados; LSE residuos secos enterrados; CUL, cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre fechas. Barras de error indican error estándar.

En todos los tratamientos aplicados la actividad media de la amidasa presenta un valor similar en los meses de junio y septiembre, y aumenta significativamente en el mes de enero. Este hecho puede estar relacionado con la diferencia de humedad del suelo, ya que en el mes de enero el contenido de agua en el suelo es significativamente superior a las otras dos fechas. A pesar de no haber diferencias entre los tratamientos, se observa que en los tres muestreos realizados, en la subparcela con cultivo de *L. multiflorum* la amidasa tiende a presentar su mayor actividad.

Al igual que ocurre con la amidasa, no se produce interacción entre fecha y tratamiento ($p=0.137$) y se observan diferencias temporales significativas ($p=0.011$) en los resultados obtenidos para la actividad de la enzima ureasa (Figura 7).

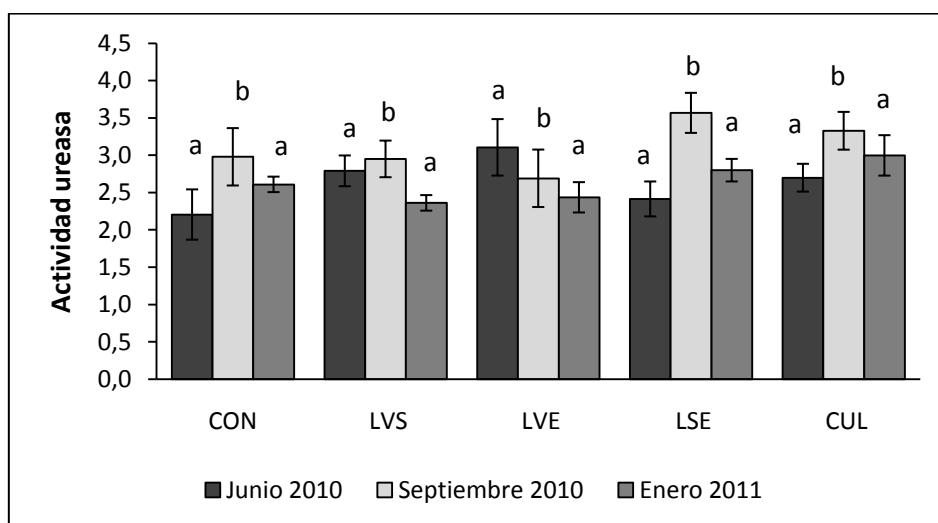


Figura 7. Actividad enzimática del suelo: ureasa (mmoles N/kg*h). Tratamientos: CON, control; LVS, residuos verdes en superficie; LVE, residuos verdes enterrados; LSE residuos secos enterrados; CUL, cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre fechas. Barras de error indican error estándar.

En septiembre la actividad de esta enzima es significativamente superior a los meses de junio y enero, que presentan valores similares. A diferencia de lo que ocurre con la amidasa, que presenta su mayor actividad cuando el suelo está más húmedo, la mayor tasa de actividad de la ureasa coincide con el muestreo en el que el suelo presentaba un contenido de humedad menor.

La ureasa es la enzima que mayor actividad presenta de todas las analizadas en el experimento llevado a cabo, ya que en los tres muestreos, y para todos los tratamientos presenta los valores más elevados. En junio y septiembre la tasa de actividad de la amidasa es la mitad de la que presenta la ureasa.

En cuanto a los diferentes tratamientos aplicados, la actividad de la ureasa no presenta diferencias significativas ($p=0.381$) para ninguna fecha muestreada (Figura 7). Este hecho difiere de los resultados obtenidos por otros autores, que afirman que las actividades de la ureasa son mayores en sistemas de no laboreo que en el sistema convencional (Hamido y Kpombekou, 2009) o que la adición de hierba fresca aumenta la actividad de esta enzima (Fang *et al.*, 2010).

Los análisis realizados no muestran diferencias significativas en la tasa de actividad de la enzima glucosidasa en función del tratamiento aplicado a las subparcelas ($p=0.580$) y los resultados obtenidos en las tres fechas de muestreo son similares ($p=0.559$) (Figura 8). Tampoco se produce interacción entre los factores fecha y tratamiento ($p=0.210$).

La glucosidasa es la enzima que presenta la actividad más reducida de todas las estudiadas en este ensayo. Por lo tanto, en el experimento realizado se han obtenido los mismos resultados que Sanaullah *et al.* (2011) en suelos con cultivos forrajeros (*Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* y *Medicago sativa*), que determinaron que la actividad de las enzimas involucradas en el ciclo del nitrógeno, entre las que están la amidasa y la ureasa, fue mayor que las actividades de las enzimas implicadas en el ciclo del carbono, como la glucosidasa.

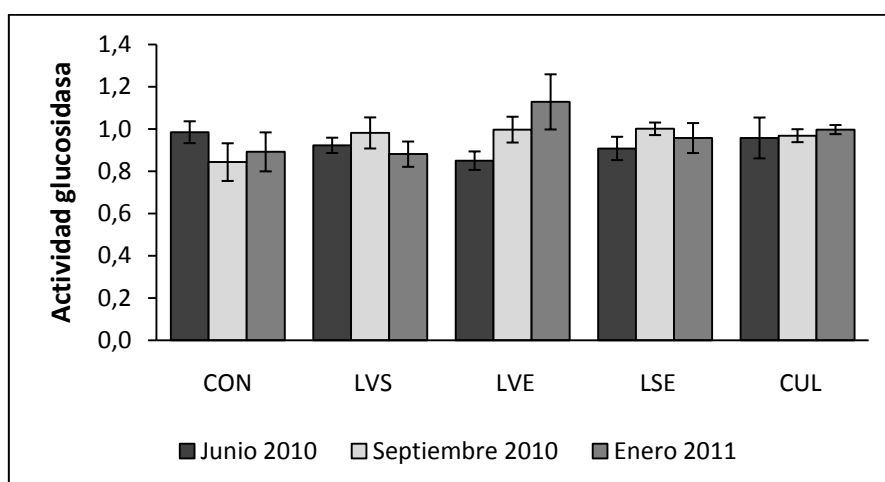


Figura 8. Actividad enzimática del suelo: β -glucosidasa (mmoles PN/(kg*h)). Tratamientos: CON, control; LVS, residuos verdes en superficie; LVE, residuos verdes enterrados; LSE residuos secos enterrados; CUL, cultivo. Barras de error indican error estándar.

La actividad de la fosfatasa alcalina en el suelo no se ve afectada por el paso tiempo, ya que no se observan diferencias significativas entre los tres muestreos realizados ($p=0.401$). Tampoco se observa efecto de la interacción entre la fecha de muestreo y los tratamientos aplicados ($p=0.259$).

Los resultados obtenidos para las subparcelas con cultivo de *L. multiflorum* presentan diferencias significativas con el resto de tratamientos aplicados en el ensayo, entre los cuales se han observado semejanzas ($p<0.001$) (Figura 9). El suelo cultivado con *L. multiflorum* presenta la mayor tasa de actividad de la enzima fosfatasa alcalina, y además los datos se encuentran menos dispersos, por lo que existe una menor varianza en los resultados de este tratamiento.

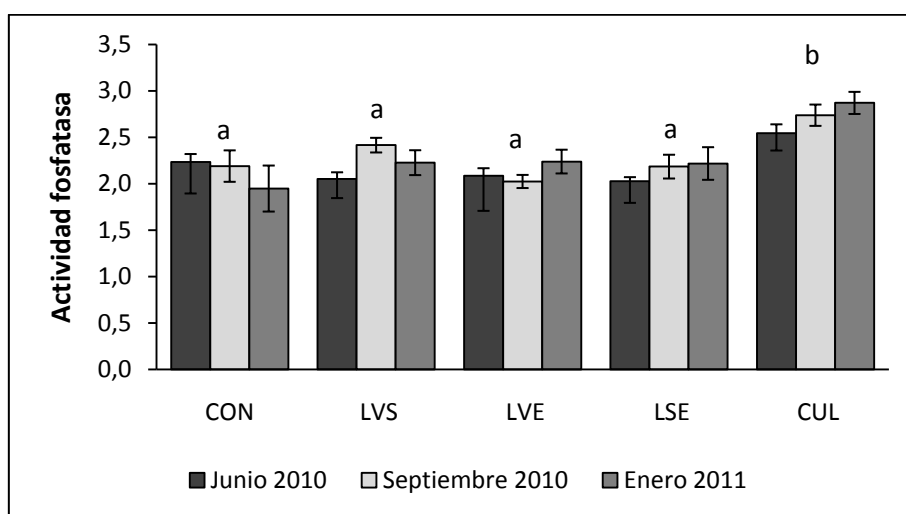


Figura 9. Actividad enzimática del suelo: fosfatasa alcalina (mmoles PNP/(kg*h)). CON, control; LVS, residuos verdes en superficie; LVE, residuos verdes enterrados; LSE residuos secos enterrados; CUL, cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Barras de error indican error estándar.

García-Orenes *et al.* (2010) determinaron que de las enzimas estudiadas en su experimento sólo la actividad de la fosfatasa, que tiene un papel esencial en la mineralización del fósforo orgánico, es mayor en el suelo con vegetación natural que en la parcela tratada con paja de avena. Este resultado se ha podido comprobar en nuestro estudio, ya que se ha observado que se da mayor actividad en las subparcelas con vegetación (cultivo de *L. multiflorum*) que en las que se ha aplicado los residuos de raigrás.

Fang *et al.* (2010) concluyeron que la adición de hierba fresca al suelo incrementa la actividad de la fosfatasa ácida con respecto al control (suelo desnudo). Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro ensayo no muestran esta diferencia, ya que la actividad que presenta la enzima fosfatasa alcalina en el control y en los tratamientos con residuos de raigrás italiano es similar.

En general, la actividad enzimática presenta un valor mayor en las subparcelas con cultivo de raigrás italiano. Resultado que coincide con otros estudios como el de Sanaullah *et al.* (2011), que observaron que en suelos con

vegetación, en la mayoría de casos, se dan incrementos en la actividad de las enzimas extracelulares comparados con el control sin vegetación.

Según Mikanova *et al.* (2009), en sistemas de no laboreo, en los que los residuos del cultivo se quedan en la superficie, la descomposición es más lenta, la materia orgánica se queda en las capas más superficiales, la actividad biológica es estimulada y consecuentemente la actividad enzimática incrementa. Por lo tanto, concluye que la utilización intensiva de materia orgánica de calidad es esencial en el manejo del suelo y necesario para mejorar la fertilidad del suelo. Sin embargo, en nuestro ensayo no se han observado una diferencia significativa entre el tratamiento de residuos de raigrás italiano en superficie y el control, por lo que no se ha podido comprobar un aumento de la actividad enzimática por la adición de materia orgánica al suelo.

Algunos autores (Fang *et al.*, 2010; Mikanova *et al.*, 2009) mostraron en su experimento que la adición al suelo de residuos de cultivo post-cosecha estimula la actividad enzimática, y que aumentando la cantidad de residuos incorporados al suelo la actividad enzimática se ve incrementada (Fang *et al.*, 2010). Estos resultados no se han obtenido en el presente ensayo, ya que no se observa un efecto significativo de la adición de residuos de *L. multiflorum* al suelo con respecto al control.

En cuanto a las fluctuaciones de la actividad enzimática del suelo entre muestreos, únicamente en las enzimas relacionadas con el ciclo del nitrógeno (amidasa y ureasa) se dieron diferencias significativas, lo que podría estar relacionado con la humedad del suelo, entre otros factores. Pero si comparamos los resultados obtenidos para las cuatro enzimas estudiadas, excepto la amidasa que incrementa su actividad en enero, el resto presenta un mayor valor en el mes de septiembre.

Fang *et al.* (2010) estudiaron la actividad enzimática en diferentes tratamientos en un ensayo establecido en la provincia de Guizhou (China), que presenta un clima templado ligeramente más caluroso que el de Arazuri. Entre los

tratamientos aplicados incluían residuos frescos de cultivo en superficie, y observaron que la actividad enzimática más baja se da en diciembre. Este resultado no lo hemos observado en nuestro ensayo, ya que en muy pocos casos se ha dado esta situación.

En cuanto al posible efecto alelopático del raigrás italiano, en este estudio no se ha podido comprobar en campo, ya que los suelos con residuos de este cultivo no presentan una actividad enzimática significativamente menor, contrariamente a lo expuesto por Joannis *et al.* (2007) que determinaron que la aplicación de residuos con altas concentraciones de fenoles inhiben la actividad enzimática del suelo.

4.3.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LOS RESIDUOS DE *L. multiflorum*

Los resultados obtenidos para la actividad enzimática en los residuos de raigrás italiano han sido analizados independientemente de los datos del suelo, por lo que se exponen a continuación.

La actividad de la enzima amidasa en los residuos de *L. multiflorum* presenta un incremento con el paso de los meses (Figura 10). Se observan diferencias significativas ($p < 0.001$) en los resultados obtenidos, ya que la actividad de esta enzima es notablemente superior en los meses de septiembre y enero. En enero se da la mayor actividad, coincidiendo con el momento en el que los residuos presentan mayor contenido de humedad. Esto ocurre también con los resultados de la amidasa en suelo.

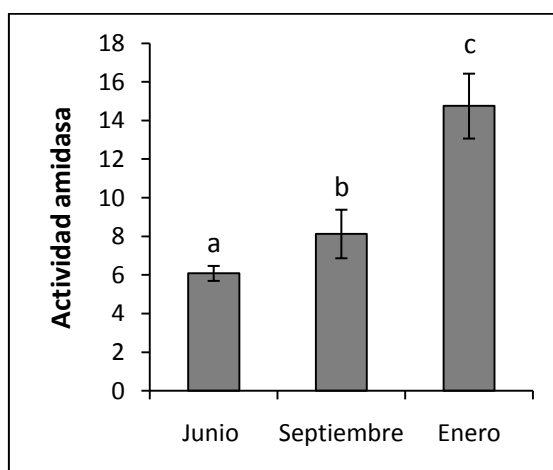


Figura 10. Actividad enzimática en los residuos de *L. multiflorum*: amidasa (mmoles Bnaftilamina/(kg*h)). Fechas de muestreo: junio 2010; septiembre 2010; enero 2011. Letras diferentes indican diferencias significativas entre fechas. Barras de error indican error estándar.

La tasa de actividad de la enzima ureasa no presenta diferencias significativas entre las diferentes fechas de muestreo ($p = 0.405$) (Figura 11), hecho que difiere de los resultados obtenidos para esta enzima en los análisis de suelo realizados. Sin embargo, se observa una tendencia a aumentar su actividad con el paso de los meses.

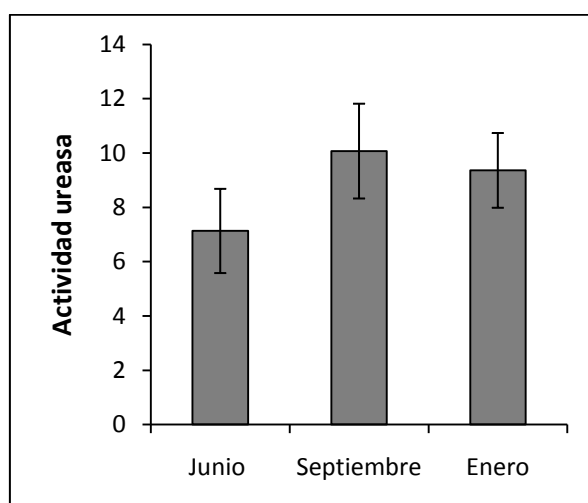


Figura 11. Actividad enzimática en los residuos de *L. multiflorum*: ureasa (mmoles N/(kg*h)). Fechas de muestreo: junio 2010; septiembre 2010; enero 2011. Barras de error indican error estándar.

En cuanto a la glucosidasa, aunque existe una tendencia a incrementar su valor en el mes junio, no existen diferencias significativas ($p=0.383$) entre los resultados obtenidos en los tres muestreos, al igual que ocurre con los resultados obtenidos para los análisis de suelos (Figura 12).

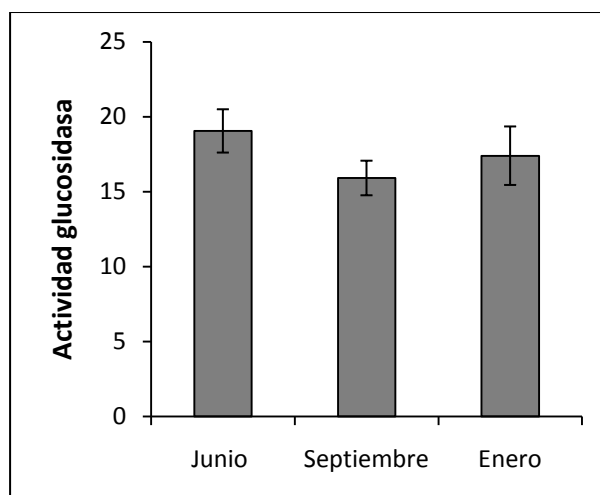


Figura 12. Actividad enzimática en los residuos de *L. multiflorum*: β -glucosidasa (mmoles PN/(kg*h)). Fechas de muestreo: junio 2010; septiembre 2010; enero 2011. Barras de error indican error estándar.

La actividad de esta enzima en los residuos de *L. multiflorum* es notablemente superior a la actividad de las demás enzimas estudiadas. Por lo tanto, al contrario de lo que ocurre en el suelo, la actividad de la glucosidasa (enzima involucrada en el ciclo del carbono) es mayor que la actividad de las enzimas implicadas en el ciclo del nitrógeno (amidasa y ureasa).

La analítica edáfica realizada en la parcela de Arazuri determina que la relación C/N del suelo es 7.85, lo cual es un valor bajo. Según la bibliografía consultada, el raigrás italiano presenta una relación C/N superior a 25, lo cual es un valor alto para un cultivo de cobertura (Báez *et al.*, 1998; Estavillo *et al.*, 2005). Por tanto, la diferencia de la relación C/N entre el suelo y el cultivo puede estar relacionada con el significativo aumento de la actividad de la enzima β -glucosidasa en los residuos de raigrás italiano con respecto al suelo.

Por último, la fosfatasa alcalina presenta una actividad baja en el primer y segundo muestreo, pero se ve incrementada notablemente en el mes de enero. Los análisis realizados muestran que existen diferencias temporales significativas en la actividad de esta enzima en los residuos del cultivo ($p < 0.001$), a diferencia de lo que ocurre en el suelo, debido precisamente al hecho comentado (Figura 13).

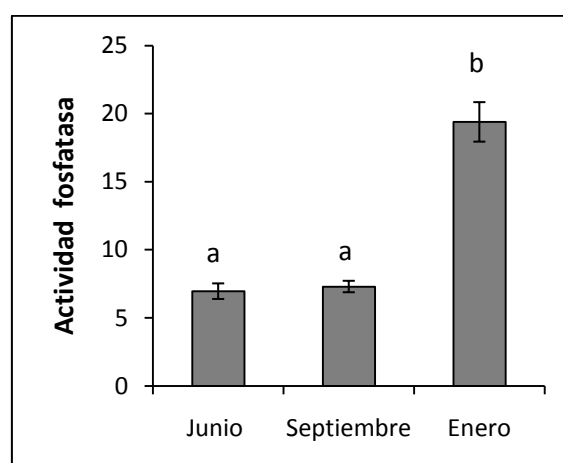


Figura 13. Actividad enzimática en los residuos de *L. multiflorum*: fosfatasa alcalina (mmoles PNP/(kg*h)). Fechas de muestreo: junio 2010; septiembre 2010; enero 2011. Letras diferentes indican diferencias significativas entre fechas. Barras de error indican error estándar.

En general, la actividad enzimática en los residuos de *L. multiflorum* presenta una tendencia a incrementar su valor con el paso de los meses, a pesar de que este aumento no sea significativo en alguna de las enzimas estudiadas.

En cuanto a las diferencias con la actividad enzimática en el suelo, la diferencia más notable es que la tasa de actividad de todas las enzimas analizadas en este ensayo es significativamente superior en los residuos de cultivo que en el suelo. Además, como ya se ha indicado anteriormente, la glucosidasa presenta una actividad superior al resto de enzimas en los residuos de *L. multiflorum*, en contraposición a lo que ocurre en los resultados obtenidos en los análisis de suelo. Sin embargo, al igual que ocurre en el suelo, la enzima glucosidasa no presenta variaciones temporales significativas en los residuos de cultivo y la amidasa incrementa su actividad con el paso de los meses.

4.4.- BIOMASA MICROBIANA

La gestión agrícola influye en los microorganismos del suelo, por lo que los cambios en el contenido de carbono y nitrógeno microbianos, que se producen como respuesta a los diferentes sistemas de cultivo, parecen estar relacionados con la cantidad y diversidad de residuos de cultivos, su distribución espacial, la proporción de compuestos orgánicos devueltos al suelo de la descomposición de la materia orgánica, la densidad radicular, el microclima y la estructura del suelo (Moore *et al.*, 1999; García-Orenes *et al.*, 2010).

Tras la incorporación de un abono verde, fresco y en una cantidad relativamente abundante al suelo, se produce un rápido aumento de los microorganismos del suelo (Sullivan, 2003), por lo que resulta interesante la aplicación de cubiertas vegetales y el abonado con materia orgánica para obtener una mejora en el estado del suelo donde se va a desarrollar el cultivo.

Mikanová *et al.* (2009) concluyeron en su experimento que una alta actividad de los microorganismos del suelo es un indicador de calidad y fertilidad del suelo, por lo que se trata de un factor muy importante a tener en cuenta a la hora de elegir el sistema de cultivo que se va a aplicar.

4.4.1.- Nitrógeno y carbono microbianos

En el presente trabajo se ha observado que el nitrógeno de la biomasa microbiana presenta diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ($p < 0.001$) y entre las tres fechas de muestreo ($p = 0.009$), pero no se dan efectos significativos de la interacción entre fecha y tratamiento ($p = 0.137$) (Figura 14).

Los valores de nitrógeno microbiano muestran fluctuaciones temporales más pronunciadas que los de carbono microbiano, porque los microorganismos difieren más en su contenido en nitrógeno que en su contenido en carbono, dependiendo de su estado de desarrollo (Moore *et al.*, 2000). En el ensayo realizado también se ha observado que el nitrógeno microbiano presenta más

variabilidad que el carbono, tanto entre tratamientos como entre los diferentes muestreos. En la siguiente gráfica se observan las fluctuaciones en la cantidad de nitrógeno microbiano.

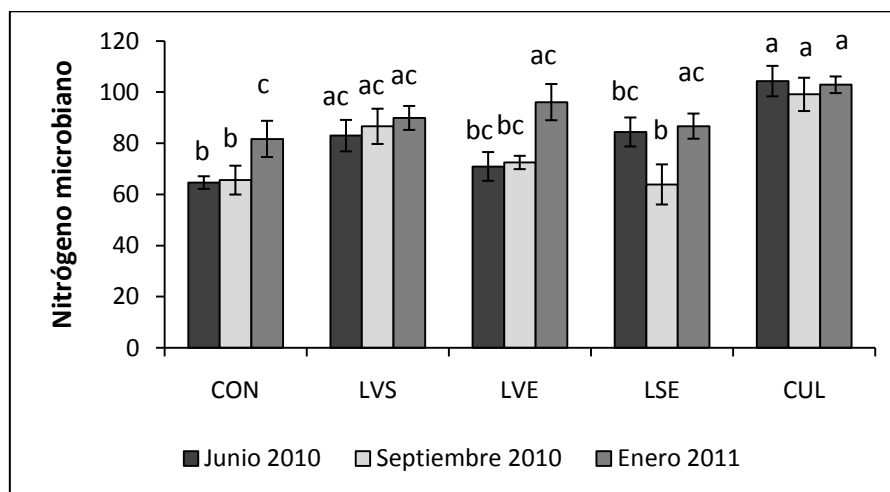


Figura 14. Nitrógeno presente en la biomasa microbiana (mg N/kg suelo). Tratamientos: CON, control; LVS, residuos verdes en superficie; LVE, residuos verdes enterrados; LSE residuos secos enterrados; CUL, cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre fechas y tratamientos. Barras de error indican error estándar.

En cuanto a las diferencias en el valor del nitrógeno microbiano entre tratamientos (Figura 14), el cultivo es el que presenta un mayor valor en las tres fechas de muestreo, mientras que el control presenta el valor más bajo en junio y enero. En septiembre es el tratamiento de residuos secos enterrados el que presenta menor contenido en nitrógeno microbiano. Los suelos con residuos de *L. multiflorum* enterrados no presentan diferencias significativas con respecto al control en ninguno de los tres muestreos. Sin embargo, en los suelos con residuos en superficie aumenta significativamente el nitrógeno microbiano en los meses de junio y septiembre.

En general, el contenido de nitrógeno presente en la biomasa microbiana tiende a aumentar con el paso de los meses. El valor de nitrógeno microbiano más elevado se da en el mes de enero, coincidiendo con la mayor tasa de actividad de la amidasas y con el mayor contenido de humedad en el suelo, excepto para el suelo

cultivado que presenta el mayor valor en junio. Además, se observa que, excepto para el control y el tratamiento de residuos secos enterrados, el contenido de nitrógeno microbiano tiende a ser similar en las diferentes fechas de muestreo.

En cuanto al contenido de carbono en la biomasa microbiana, se producen diferencias temporales significativas ($p < 0.001$) y el efecto de la interacción entre fecha y tratamiento es importante ($p = 0.003$) (Figura 15). A pesar de que las diferencias entre tratamientos no son significativas ($p = 0.065$), los resultados obtenidos para los suelos con residuos y cultivo de raigrás italiano tienden a mostrar un efecto distinto que el control.

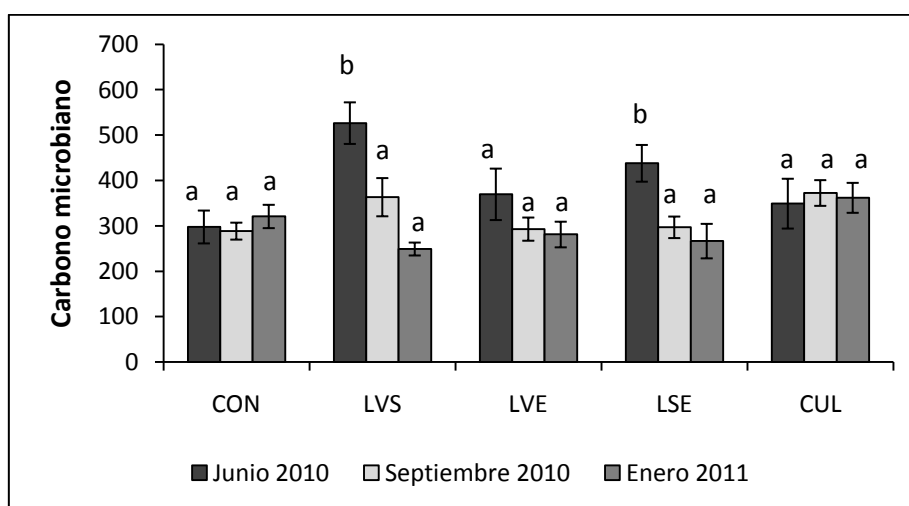


Figura 15. Carbono presente en la biomasa microbiana (mg C/kg suelo). Tratamientos: CON, control; LVS, residuos verdes en superficie; LVE, residuos verdes enterrados; LSE residuos secos enterrados; CUL, cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre fechas y tratamientos. Barras de error indican error estándar.

A medida que pasan los meses, tras el establecimiento del ensayo, se produce una evolución diferente del carbono microbiano en los diferentes tratamientos. El control no presenta diferencias significativas entre las tres fechas de muestreo, al igual que ocurre en suelos cultivados y con residuos de raigrás frescos enterrados. Sin embargo, el contenido de carbono microbiano tiende a disminuir progresivamente con el paso de los meses en los suelos con residuos de raigrás fresco en superficie y residuos secos enterrados, observándose claras

diferencias entre el valor de junio y los resultados obtenidos en septiembre y enero (Figura 15). Estos resultados coinciden con lo expuesto por García-Orenes *et al.* (2010) en su ensayo, ya que afirman que algunos sistemas de manejo agrícola muestran claros efectos a corto plazo en el carbono de la biomasa microbiana, sobre todo debido a cambios en las entradas de materia orgánica al suelo.

En cuanto a los resultados del carbono microbiano en función de los tratamientos (Figura 14), al igual que ocurre para el nitrógeno microbiano y a pesar de no presentar diferencias significativas, los valores más bajos se dan en el control, lo que puede deberse a que el contenido en materia orgánica del suelo en este tratamiento es inferior al resto, por la ausencia de cultivo o residuos de éste. Los valores más altos se dan en el cultivo y en el tratamiento de residuos frescos en superficie, por lo que el enterrado de los residuos del cultivo no implica un mayor contenido de carbono en la biomasa microbiana. Este hecho permite reducir el número de operaciones agronómicas, lo que resulta beneficioso para la rentabilidad de la explotación.

García-Orenes *et al.* (2010) comprobaron que la adición de paja de avena al suelo, produce un importante incremento en las diferentes fracciones de carbono orgánico y en la actividad microbiana, lo que se traduce en una mejora de la calidad del suelo. En nuestro estudio se ha observado que el enterrado de los residuos secos de raigrás italiano tiende a incrementar el contenido de carbono en junio y septiembre, pero los valores obtenidos para los suelos con residuos de cultivo en superficie son más altos que para este tratamiento.

A pesar de que no existen diferencias significativas entre tratamientos se ha observado que el carbono de la biomasa microbiana tiende a ser mayor en suelos con vegetación que en el control (suelo sin vegetación). Sin embargo, las diferencias encontradas no son tan notables como los resultados obtenidos por Fae *et al.* (2009) que determinaron que, comparado con el control, las cubiertas verdes (*L. multiflorum*, mezcla de *Secale cereale* y *Avena sativa*) tuvieron un valor de carbono en la biomasa microbiana tres veces mayor.

Diversos estudios indican un descenso en la biomasa microbiana (Diallo *et al.*, 2006) tras la aplicación de residuos vegetales con altas concentraciones de fenoles o taninos. Sin embargo, en nuestro estudio no se han encontrado indicios de inhibición, ya que los resultados obtenidos para los suelos con residuos de raigrás presentan una tendencia a incrementar el contenido de carbono y nitrógeno de la biomasa microbiana respecto al control.

4.4.2.- Relación carbono/nitrógeno en la biomasa microbiana

La relación carbono/nitrógeno (C/N) microbianos es a menudo utilizada para describir la estructura y el estado de la población de microorganismos (Moore *et al.*, 2000). Este autor afirma en su estudio que esta relación no se ve afectada por el sistema de cultivo estudiado, lo que se ha podido comprobar en el ensayo realizado.

La relación carbono/nitrógeno del suelo tiende a variar entre los tratamientos aplicados en las subparcelas ($p=0.097$), mientras que sí se observan diferencias significativas con el paso de los meses ($p<0.001$) (Figura 16). Además, se produce un efecto significativo de la interacción entre fecha y tratamiento ($p=0.007$).

La relación C/N de la biomasa microbiana desciende en cada muestreo realizado, paralelamente al contenido en carbono microbiano, pero en este caso el valor que difiere del resto se da en el mes de enero, que es el que presenta un valor medio más bajo, lo que se debe a que en este mes se registraron los valores más altos de nitrógeno y los más bajos de carbono.

La relación C/N de la biomasa microbiana en los tratamientos con residuos de cultivo disminuye significativamente con el tiempo, mientras que en el control y en los suelos con cultivo la relación C/N permanece más estable en el tiempo. Además, los resultados obtenidos para los suelos con cultivo de *L. multiflorum* tienden a disminuir esta relación con respecto al control.

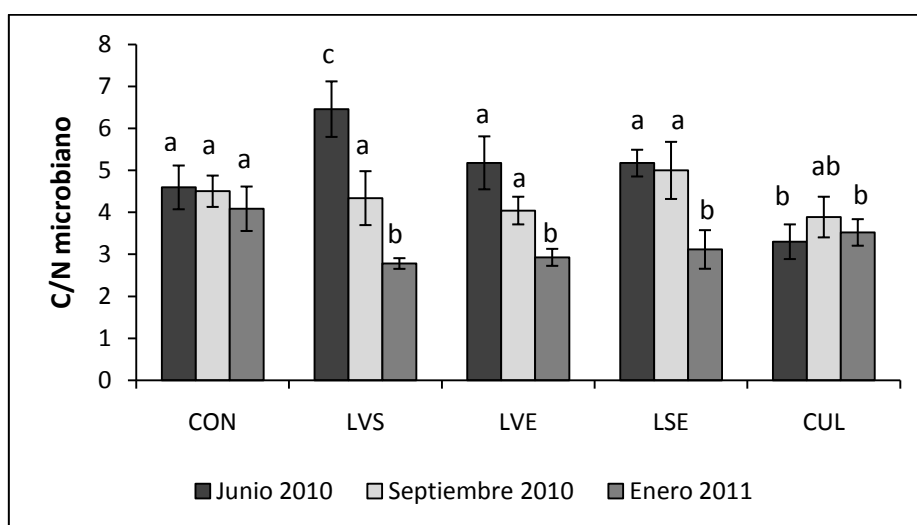


Figura 16. Relación carbono/nitrógeno en la biomasa microbiana. Fechas de muestreo: junio, septiembre y enero. Tratamientos: CON, control; LVS, residuos verdes en superficie; LVE, residuos verdes enterrados; LSE residuos secos enterrados; CUL, cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre fechas y tratamientos. Barras de error indican error estándar.

Joergensen (1995) determinó que la relación C/N de la biomasa microbiana varía desde 5.2 en suelos agrícolas a 20.8 en suelos forestales (Moore *et al.*, 2000). Por lo tanto, los valores obtenidos en este ensayo son muy bajos, ya que excepto en junio que la relación C/N tiene un valor cercano a 5, en los otros muestreos el valor es significativamente más bajo.

La relación C/N microbianos describe la estructura de la comunidad microbiana del suelo. Valores altos de la relación C/N de la biomasa microbiana indican una mayor proporción de hongos, mientras que valores bajos sugieren que las bacterias predominan en la población microbiana (Moore *et al.*, 2000). Por lo tanto, en nuestro caso, la proporción de bacterias en el suelo es mayor que la de hongos, ya que el valor de la relación C/N microbianos es bajo (C/N < 5).

4.5.- NITRIFICACIÓN POTENCIAL

La nitrificación del suelo es de gran importancia agrícola, porque de este proceso microbiano depende parte de la productividad del suelo, y de importancia ambiental, ya que el nitrato es fácilmente eliminado de los suelos por desnitrificación y lixiviación (Krave *et al.*, 2002).

La nitrificación potencial es un indicador de la disponibilidad potencial de nitrógeno en el suelo (Steenwerth y Belina, 2008), que depende del tamaño de la población de microorganismos nitrificantes presente en el suelo y de la disponibilidad de amonio en el suelo. Ambos factores se ven influenciados por las condiciones ambientales del suelo, que por lo general varían en función del tipo de suelo y que interactúan entre sí de forma compleja (Krave *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo para esta variable presentan diferencias significativas entre las tres fechas de muestreo ($p < 0.001$), sin embargo, se observa una tendencia a evolucionar de manera diferente entre tratamientos (interacción fecha*tratamiento $p < 0.001$) (Figura 17).

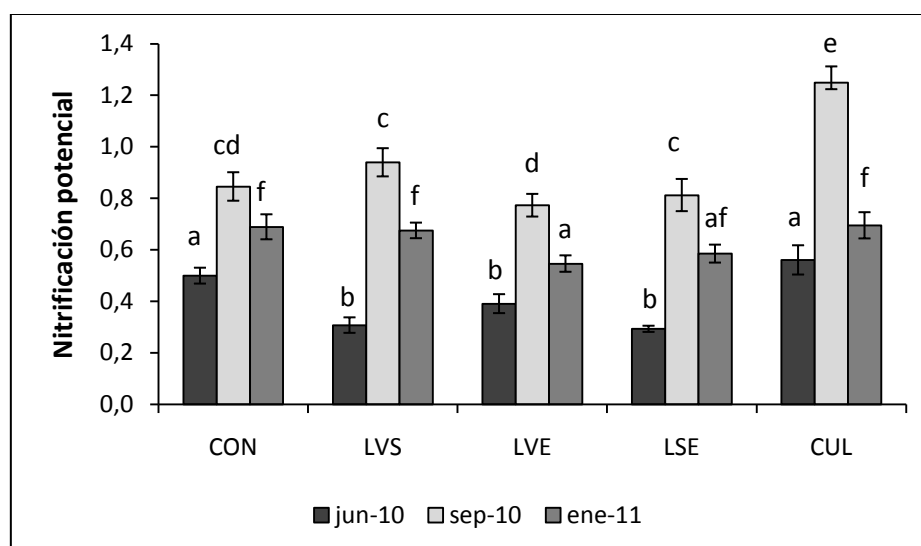


Figura 17. Nitrificación potencial del suelo ($\mu\text{g N-NO}_3 / (\text{g suelo seco} \cdot \text{h})$). Tratamientos: CON, control; LVS, residuos verdes en superficie; LVE, residuos verdes enterrados; LSE residuos secos enterrados; CUL, cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre fechas y tratamientos. Barras de error indican error estándar.

Los valores de nitrificación potencial obtenidos en el mes de junio son los más bajos, mientras que en septiembre, coincidiendo con la tasa de humedad más baja en el suelo, se produce la mayor tasa de nitrificación en todos los tratamientos estudiados. Steenwerth y Belina (2008) también obtuvieron este resultado en su ensayo, en el que estudiaron el efecto de las cubiertas verdes de gramíneas en la dinámica del nitrógeno del suelo en un agroecosistema de viñedos en un clima mediterráneo. Este aumento de la tasa de nitrificación puede estar relacionado las condiciones ambientales del suelo, ya que tras los meses estivales, la temperatura del suelo es mayor y el contenido de agua del suelo se ha reducido, lo que puede favorecer a la actividad de los microorganismos nitrificantes. Además, el incremento del valor de este parámetro en septiembre parecer ser mayor en el cultivo que en el resto de tratamientos, incluido el control.

En los tres muestreos la mayor tasa de nitrificación potencial se da en las subparcelas con cultivo de *L. multiflorum*, a pesar de que únicamente en septiembre la diferencia con respecto al control es significativa. Además, las fluctuaciones entre fechas son más pronunciadas en los suelos con cultivo que en los suelos con residuos de raigrás.

En cuanto a los valores de nitrificación potencial obtenidos para los suelos cultivados, en nuestro estudio son más altos que los obtenidos por Steenwerth y Belina (2008), pero hay que tener en cuenta que a pesar de que en ambos estudios los cultivos de cobertura utilizados son gramíneas, las especies y las condiciones agronómicas son diferentes.

Los valores más bajos de nitrificación potencial se dan en las subparcelas con residuos de *L. multiflorum* enterrados. En el mes de junio, los suelos con residuos de cultivo presentan un descenso significativo de esta variable con respecto al control (Figura 17). Sin embargo, en septiembre, que es el mes en el que mayor tasa de nitrificación potencial se produjo, estos tratamientos no presentan diferencias importantes con respecto al control. Según los resultados obtenidos, el aumento de la nitrificación a los tres meses del establecimiento del

ensayo es mayor en suelos no labrados con residuos de cultivo en superficie, que en las subparcelas en las que se ha incorporado los residuos al suelo.

Por último, en el mes de enero, la nitrificación potencial disminuye significativamente en todos los tratamientos. Además, en todos ellos los valores obtenidos son similares, excepto para los resultados de las subparcelas con residuos enterrados en verde, que además presentan las tasas más bajas.

4.6.- CONTENIDO DE NITRATO Y AMONIO EN EL SUELO

4.6.1.- Contenido de nitrato en el suelo

El contenido de nitrato en el suelo es muy variable, según muestran los resultados obtenidos en el ensayo realizado. La concentración de nitrato en el suelo presenta variaciones significativas entre muestreos ($p < 0.001$), y los diferentes tratamientos aplicados tienden a evolucionar de manera distinta, ya que se produce un efecto significativo de la interacción entre fecha y tratamiento ($p < 0.001$) (Figura 18).

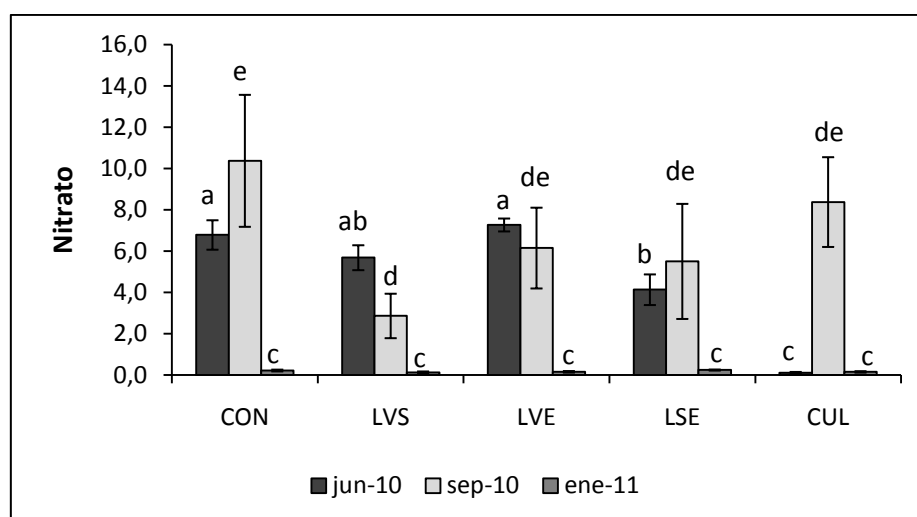


Figura 18. Contenido de nitrato en el suelo ($\mu\text{g N-NO}_3/\text{g}$ suelo seco). Tratamientos: CON, control; LVS, residuos verdes en superficie; LVE, residuos verdes enterrados; LSE residuos secos enterrados; CUL, cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre fechas y tratamientos. Barras de error indican error estándar.

En el primer muestreo, las subparcelas con residuos de *L. multiflorum* frescos presentan una concentración de nitrato similar al control, mientras que los suelos con residuos secos y con cultivo presentan un descenso significativo del contenido de nitrato con respecto al control. En cuanto a las subparcelas con cultivo la baja concentración de nitrato puede deberse a que el cultivo la ha consumido durante su estancia en el campo.

En el mes de septiembre se produce un aumento significativo del contenido de nitrato en el control y en los suelos con cultivo y con residuos secos enterrados, mientras que en los suelos con residuos frescos el contenido de nitrato se reduce con respecto a junio. El incremento que se produce en las subparcelas con cultivo puede deberse a que durante el verano el raigrás italiano se seca, por lo que no absorbe nutrientes del suelo.

En nuestro ensayo, la cantidad de nitrógeno en el suelo en septiembre tiende a ser superior en el control que en las subparcelas con cultivo de raigrás italiano. Contrariamente a estos resultados, otros estudios muestran que el contenido de nitrógeno mineral en el suelo antes del invierno es mayor en los suelos con un cultivo de cobertura (raigrás italiano y colza) que en el control (suelo desnudo) (Kramberger *et al.*, 2009).

Los valores obtenidos en enero son notablemente más bajos que los medidos en junio y septiembre. Teniendo en cuenta que la mayor tasa de nitrificación potencial se produce en el mes de septiembre, este descenso del contenido de nitrato es posible que se haya producido debido a la lixiviación de nitratos durante el otoño e invierno, ya que es la época de más precipitaciones en la zona donde se encuentra la parcela utilizada en el ensayo (ver figura 18). El hecho de que no existan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos aplicados (suelo cultivado y con residuos de cultivo) y el control (suelo desnudo), indica que la lixiviación se produce tanto en suelos con cubiertas verdes como en suelos desnudos.

En cuanto a los suelos cultivados no se puede afirmar que el descenso producido en enero se deba a la pérdida de nitrato por lixiviación, ya que puede que éste haya sido absorbido por el cultivo. Por ello, hubiese sido conveniente haber realizado un análisis de los lixiviados de los distintos tratamientos para poder sacar una conclusión al respecto.

En su experimento (Kramberger *et al.*, 2009) vieron que las cubiertas verdes reducen el nitrógeno mineral en el suelo en otoño y primavera. En nuestro

ensayo no se ha podido comprobar este efecto, ya que a pesar de que en junio (tras la primavera) y en enero (tras el otoño) se dan los valores más bajos del contenido de nitrato en el suelo en los tratamientos con residuos de cultivo, este resultado no presenta diferencias significativas respecto al control.

Fang *et al.* (2010) observaron que la concentración total de nitrógeno en el suelo aumenta significativamente al aportar un abono verde (hierba fresca de gramínea), sin embargo, en este experimento no se ha producido este efecto, ya que no se observan diferencias importantes entre los tratamientos con residuos enterrados y el control, e incluso se observa una tendencia a disminuir la concentración de nitrato en estos suelos con respecto al control.

4.6.2.- Contenido de amonio en el suelo

En cuanto al contenido de amonio, se observa que es más estable que el de nitrato, ya que los análisis realizados concluyen que no existen diferencias significativas entre tratamientos ($p=0.674$) ni entre fechas ($p=0.716$), y tampoco se observa un efecto significativo de la interacción fecha y tratamiento ($p=0.266$).

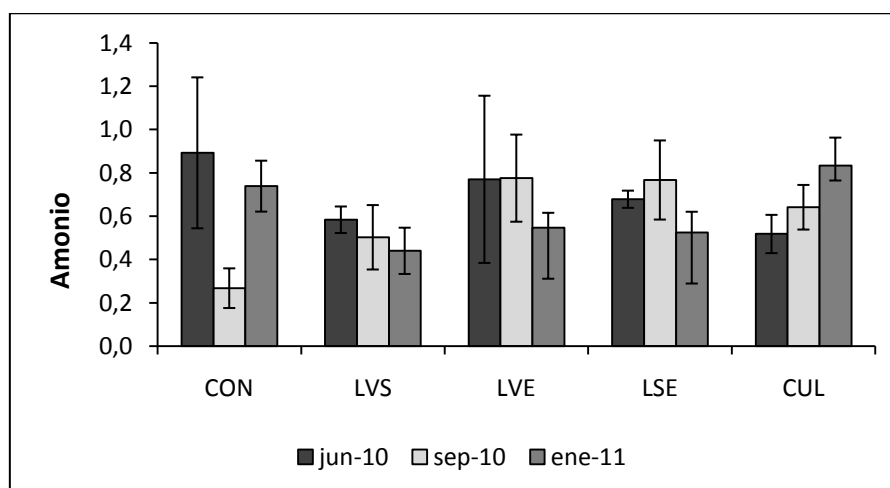


Figura 19. Contenido de amonio en el suelo ($\mu\text{g N-NH}_4/\text{g}$ suelo seco). Tratamientos: CON, control; LVS, residuos verdes en superficie; LVE, residuos verdes enterrados; LSE residuos secos enterrados; CUL, cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre fechas y tratamientos. Barras de error indican error estándar.

Algunos autores (Steenwerth y Belina, 2008) afirman que el contenido de amonio se ve incrementado en los meses estivales, y que además en los suelos con cultivos de cobertura la concentración de esta sustancia es significativamente mayor que en suelos sin cultivo de cobertura en primavera y en invierno. Sin embargo, ninguno de estos efectos se han podido observar en nuestro ensayo, ya que no se dan diferencias temporales significativas ni variaciones importantes entre tratamientos (Figura 19).

El contenido de NH_4^+ en la parcela es bajo, ya que durante el ensayo no se ha fertilizado el suelo, aunque se trata de una parcela agrícola que anteriormente fue fertilizada. Además de que el contenido de amonio en el suelo es bajo, se oxida rápidamente a nitrato. Por ello, para determinar la cantidad potencial de amonio disponible en el suelo sería interesante realizar un estudio para saber cuánto amonio puede formarse por mineralización del nitrógeno orgánico. Además, conociendo los valores de mineralización de nitrógeno orgánico a amonio se puede hacer una estimación de la población microbiana mineralizadora.

5.- CONCLUSIONES

Con los ensayos realizados y los resultados obtenidos en este trabajo se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1.- A nivel general, los sistemas de manejo agrícola estudiados no muestran efectos significativos en las actividades de las enzimas microbianas extracelulares, aunque éstas son ligeramente superiores en los suelos con residuos de *L. multiflorum* respecto al control (suelo desnudo).

2.- Las enzimas implicadas en el ciclo del nitrógeno (amidasa y ureasa) presentan distinta actividad temporal. La amidasa, enzima que cataliza la hidrólisis de las amidas (glutamina o la asparragina), presenta mayor actividad en el muestreo en el que el contenido de humedad del suelo es más alto, mientras que la ureasa, que cataliza la hidrólisis de la urea, presenta la actividad más alta en el muestreo en el que la humedad en el suelo es menor.

3.- La actividad de la β -glucosidasa, enzima implicada en el ciclo del carbono, no presenta variaciones temporales ni diferencias entre los tratamientos aplicados y el control. Es la enzima con menor tasa de actividad.

4.- La actividad de la fosfatasa alcalina, enzima involucrada en el ciclo del fósforo, presenta un aumento significativo en los suelos cultivados con *L. multiflorum* respecto al control.

5.- La actividad enzimática en los residuos de *L. multiflorum* se incrementa significativamente a los 6 meses del establecimiento del ensayo.

6.- La aplicación de residuos frescos de *L. multiflorum* en superficie incrementa el nitrógeno de la biomasa microbiana a corto plazo. El contenido en nitrógeno microbiano de los suelos con cultivo de *L. multiflorum* es superior al control durante todo el periodo de ensayo. El carbono de la biomasa microbiana aumenta a corto plazo al aplicar al suelo residuos del cultivo, tanto frescos como secos.

7.- La actividad de la población microbiana nitrificante del suelo se incrementa significativamente a los tres meses, ya que es cuando se produce la mayor tasa de nitrificación potencial.

8.- En este ensayo no se ha podido comprobar la existencia de procesos inhibitorios en la actividad microbiana debido a la presencia de residuos de *L. multiflorum*, ya que no se ha observado una disminución significativa de la actividad enzimática microbiana en los suelos con residuos de *L. multiflorum* respecto al control.

9.- La incorporación de los residuos de *L. multiflorum* al suelo puede mejorar la calidad de éste, pero en general no existen diferencias significativas entre los diferentes sistemas de aplicación de estos residuos (frescos o secos, en superficie o enterrados), a corto y medio plazo.

10.- La presencia del cultivo de *L. multiflorum* en el suelo presenta los efectos positivos más significativos de todos los tratamientos estudiados (incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina, de la nitrificación potencial y del contenido de nitrógeno en la biomasa microbiana), y no muestra procesos inhibitorios en las actividades enzimáticas microbianas. Por lo tanto, sería interesante estudiar si mantener el suelo siempre con cultivo es la gestión agronómica más adecuada que se puede realizar del suelo.

6.- BIBLIOGRAFÍA

- AMINI, R.; AN, M.; PRATLEY, J.; AZIMI, S. (2009). Allelopathic assessment of annual ryegrass (*Lolium rigidum*): Bioassays. *Allelopathy Journal*, 24, 67-76.
- AN, M.; PRATLEY, J. E.; HAIG, T. (2001). Phytotoxicity of vulpia residues: III. Biological activity of identified allelochemicals from *Vulpia myuros*. *Journal of Chemical Ecology*, 27(2), 383-394.
- ANAYA, A.L. (1999). Allelopathy as a Tool in the Management of Biotic Resources in Agroecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18 (6), 697-739.
- ANDUEZA, D.; MUÑOZ, F.; DELGADO, I. (1999). Valor nutritivo de diferentes variedades de *Lolium* sp. *Actas de la XXXIX Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos*.
- BÁEZ, D.; PINTO, M.; ESTAVILLO, J.M.; RODRÍGUEZ, M. (1998). Utilización de cultivos cobertera para minimizar la lixiviación de nitratos en rotaciones de maíz. *Jornadas sobre la contaminación de las aguas subterráneas: un porbelma pendiente*.
- BESNARD, A.; HANOCQ, D. (2010). Effect of the Winter grazing of swards on nitrate leaching. *Fourrages*, 203, 221-224.
- BERGUA, J. (2010). Pasado, presente y futuro de la Agricultura de conservación. I seminario técnico sobre agricultura de conservación (AGRACON), pag. 2-7.
- BUENO, J.; AMIAMA, C.; HERNANZ, J.L. (2007). No-tillage drilling of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.): Crop residue effects, yields and economic benefits. *Soil & Tillage Research*, 95, 61-68.
- CABRERA, M.L. (2007). Mineralización y nitrificación: procesos claves en el ciclo del nitrógeno. *IPNI - Informaciones Agronómicas*, 34.
- CANALS, R.M.; HERMAN, D.J.; FIRESTONE, M.K. (2003). How disturbance by fossorial mammals alters N cycling in a California annual grassland. *Ecology*, 84 (4), 875-881.
- CASTELLS, E.; PEÑUELAS, J.; VALENTINE, D.W. (2003). Are phenolic compounds released from the Mediterranean shrub *Cistus albidus* responsible for changes in N cycling in siliceous and calcareous soils? *New Phytologist*, 162, 187-195.
- CHUNG, I.; MILLER, D.A. (1995). Allelopathic Influence of Nine Forage Grass Extracts on Germination and Seedling Growth of Alfalfa. *Agron. J.* 87, 767-772.

CHUNG, I.; MILLER, D.A. (1995). Effect of Alfalfa Plant and Soil Extracts on Germination and Growth of Alfalfa. *Agron. J.* 87, 762-767.

CONSTANTIN, J.; BEAUDOIN, N.; LAURENT, F.; COAN, J.P.; DUyme, F.; MARY, B. (2011). Cumulative effects of catch crops on nitrogen uptake, leaching and net mineralization. *Plant and soil*, 341, 137-154.

DIALLO, M.D.; DUPONNOIS, R.; GUISSÉ, A.; SALL, S.; CHOTTE, J.L.; THIOULOUSE, J. (2006). Biological effects of native and exotic plant residues on plant growth, microbial biomass and N availability under controlled conditions. *European Journal of Soil Biology*, 42, 238-246.

DIOSMA, G.; GOLIK, S.I.; CHIDICHIMO, H.O.; BALATTI, P.A. (2003). Nitrification potential, dehydrogenase activity and microbial biomass in argiudol soil cultivated with wheat under two tillering methods. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1 (1), 111-119.

DUMANSKI, J.; PEIRETTI, R.; BENITES, J.R.; MCGARRY, D.; PIERI, C. (). The paradigm of conservation agriculture. *Proceedings of World Association of Soil and Water Conservation*, 1-7, 58-64.

DURAND, J.L.; GONZALEZ-DUGO; GASTAL, F. (2010). How much do water deficits alter the nitrogen nutrition status of forage crops? *Nutrient cycling in agroecosystems*, 88 (2), 231-243.

ENVIRONMENTAL INDICATORS FOR AGRICULTURE – Vol. 3: Methods and Results, OECD, 2001, glossary, pág. 389-391

ESTAVILLO, J.M.; MERINO, P.; MACADAM, S.M.B.; MENÉNDEZ, S.; PINTO, M.; GONZÁLEZ-MURUA, C. (2005). Emisiones gaseosas de nitrógeno en el Norte de España.

FAE, G.; SULC, R.M.; BARKER, D.J.; DICK, R.P.; EASTRIDGE, M.L.; LORENZ, N. (2009). Integrating winter annual forages into a no-till corn silage system. *Agronomy Journal* 101 (5), 1286-1296.

FANG, S.; LIU, J.; LIU, D.; XIE, B. (2010). Enzymatic activity and nutrient availability in the rhizosphere of poplar plantations treated with fresh grass mulch. *Soil Science and Plant Nutrition*, 56, 483-491.

FORTUNA, A.; HARWOOD, R.R.; ROBERTSON, G.P.; FISK, J.W.; PAUL, E.A.(2003). Seasonal changes in nitrification potential associated with application of N

fertilizer and compost in maize systems of southwest Michigan. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 97, 285-293.

GARCÍA, C.; GIL, F.; HERNÁNDEZ, T.; TRASAR, C. (2003). Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos. Medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Ediciones Mundi-Prensa

GARCIA-ORENES, F.; GUERRERO, C.; ROLDAN, A., MATAIX, J.; CERDA, A.; CAMPOY, M.; ZORNOZA, R.; BARCENAS, G.; CARAVACA, F. (2010). Soil microbial biomass and activity under different agricultural management systems in a semiarid Mediterranean agroecosystem. *Soil & Tillage Research*, 109, 110-115.

GIL, J.A.; VEROZ, O.; HERNANZ, J.L.; GONZÁLEZ, J. (2009). Ahorro y Eficiencia Energética con Agricultura de Conservación. Fondo editorial del IDEA. Serie "Ahorro y Eficiencia Energética en la Agricultura"

GOMINERO, T.; PIMENTEL, D.; PAOLETTI, M.G. (2011). Is There a Need for a More Sustainable Agriculture? *Critical Reviews in Plant Sciences*, 30, 6-23.

GOMINERO, T.; PIMENTEL, D.; PAOLETTI, M.G. (2011). Environmental Impact of Different Agricultural Management Practices: Conventional vs. Organic Agriculture. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 30, 95-124.

GONZÁLEZ, R.; GUZMÁN, G. (2006). Los policultivos en la agricultura tradicional de la Vega de Granada. VII Congreso SEAE Zaragoza, nº 21.

GUÍA BUENAS PRÁCTICAS AGRÍCOLA-GANADERAS Y EFICIENCIA ENERGÉTICA. Eneal. Edita GDR Portmader. Pág. 6-8.

HAMIDO, S.A.; KPOMBLEKOU-A, K. (2009). Cover crop and tillage effects on soil enzyme activities following tomato. *Soil & Tillage Research*, 105, 269-274.

HERBARIO (FLORA PRATENSE Y FORRAJERA CULTIVADA). Universidad Pública de Navarra <http://www.unavarra.es/servicio/herbario/index.htm>

HOBBS, P.R. (2007). Conservation Agriculture: What Is It and Why Is It Important for Future Sustainable Food Production? *Journal of Agricultural Science*.

HORWATH, W.R.; PAUL, E.A. (1994). Microbial Biomass. *Methods of Soil Analysis. Part 2 – Microbiological and Biochemical Properties. SSSA Book Series = 5.* Published by Soil Science Society of America, Inc. 753-773

HUANG, C.; DENG, L.; GAO, X.; ZHANG, S.; LUO, T.; REN, Q. (2010). Effects of fungal residues return on soil enzymatic activities and fertility dynamics in a paddy soil under a rice-wheat rotation Chengdu Plain. *Soil & Tillage Research*, 108, 16-23.

JOANISSE, G.D.; BRADLEY, R.L.; PRESTON, C.M.; MUNSON, A.D. (2007). Soil enzyme inhibition by condensed litter tannins may drive ecosystem structure and processes: the case of *Kalmia angustifolia*. *New Phytologist*, 175, 535-546.

JULCA, A.; MENESES, L.; BLAS, R.; BELLO, S. (2006). La materia orgánica, importancia y experiencias de su uso en la agricultura. *Idesia*, vol. 24, 49-61

KANEKO, M.; UOZUMI, S.; TOUNO, E.; DEGUCHI, S. (2011). No-till, no-herbicide forage soybean (*Glycine max* L. Merrill) cropping system with an Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) living mulch. *Grassland Science*, 57, 28-34.

KÖGEL-KNABNER, I. (2002). The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry*, 34, 139-162.

KRAMBERGER, B.; GSELMAN, A.; JANZEKOVIC, M., KALIGARIC, M.; BRACKO, B. (2009). Effects of cover crops on soil mineral nitrogen and on the yield and nitrogen content of maize. *European Journal of Agronomy*, 31, 103-109.

KRAMBERGER, B.; LUKAC, B.; GRUSKOVNJAK, D.; GSELMAN, A. (2008). Effects of Italian Ryegrass and Date of Plow-In on Soil Mineral Nitrogen and Sugarbeet Yield and Quality. *Agronomy Journal*, volume 100, issue 5, 1332-1338.

KRAVE, A.S.; VAN STRAALLEN, N.M.; VAN VERSEVELD, H.W. (2002). Potential nitrification and factors influencing nitrification in pine forest and agricultural soils in Central Java, Indonesia. *Pedobiología*, 46, 573-594.

LI, G.X.; ZENG, R.S.; LI, H.J.; YANG, Z.Y.; XIN, G.R.; YUAN, J.G.; LUO, Y. (2008). Allelopathic effects of decaying Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) residues on rice. *Allelopathy Journal*, 22 (1), 15-23.

LITHOURGIDIS, A.S.; DORDAS, C.A.; DAMALAS, C.A.; VLACHOSTERGIOS, D.N. (2011). Annual intercrops: an alternative pathway for sustainable agriculture. *Australian Journal of Crop Science*, 5, 396-410.

LÓPEZ CEDRÓN, F. X.; RUIZ-NOGUEIRA, R.; CONFALONE, A., PIÑEIRO, J.; SAU, F. (2006). Productividad de la rotación anual raigrás-maíz en Galicia: Evaluación durante cinco años en regadío y secano y bajo dos sistemas de siembra. *Pastos*, 36(2), 193-216.

LOVETT, J.V.; JESSOP, R.S. (1982). Effects of Residues of Crop Plants on Germination and Early Growth of Wheat. *Aust. J. Agric. Res.*, 33, 909-916.

MÁRQUEZ, F.; GONZÁLEZ, E.J. (2011). Agricultura de conservación: un nuevo concepto para una sociedad medioambientalmente sostenible. *Asociación Española Agricultura de Conservación / Suelos Vivos*.

MATTHEWS, J.M. (1996). Cultural management of annual ryegrass. *Plant Protection Quarterly* Vol. 11.

METEOROLOGÍA Y CLIMATOLOGÍA DE NAVARRA: <http://meteo.navarra.es/>

MIKANOVA, O.; JAVUREK, M.; SIMON, T.; FRIEDLOVA, M.; VACH, M. (2009). The effect of tillage systems on some microbial characteristics. *Soil & Tillage Research*, 105, 72-76.

MOORE, J.M.; KLOSE, S.; TABATABAI, M.A. (2000). Soil microbial biomass carbon and nitrogen as affected by cropping systems. *Biol Fertil Soils*, 31, 200-210.

OVALLE, C.; GONZÁLEZ, M.I.; DEL POZO, A.; HIRZEL, J. HERNAIZ, V. (2007). Cubiertas vegetales en producción orgánica de frambuesa: efectos sobre el contenido de nutrientes del suelo y en el crecimiento y producción de las plantas. *Agricultura Técnica (Chile)*, 67 (3), 271-280.

PAZA, A.; CEGLAREK, F.; GASIOROWSKA, B.; BURACZYNSKA, D.; KROLIKOWSKA, M.A. (2011). Soil content of mineral nitrogen after intercropping determined in autumn and spring. *Fresenius Environmental Bulletin*, 20 (3), 549-552.

PÉREZ, J.J.; LAFARGA, A. (2007). Sistemas de laboreo agrícola: elegir el apropiado. *Navarra Agraria*, 9-10.

PIÑEIRO, J.; DÍAZ, N.; PÉREZ, M. (2001). Raigrás italiano. *Agricultura*, 827, 437-443.

PONCE, M. A.; BOMPADRE, M. J.; SCERVINO, J. M., OCAMPO, J. A.; CHANETON, E. J. (2009). Flavonoids, benzoic acids and cinnamic acids isolated from shoots and roots of Italian rye grass (*Lolium multiflorum* Lam.) with and without endophyte association and arbuscular mycorrhizal fungus. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(4), 245-253.

ROBERTSON, G.P.; VITOUSEK, P.M. (2009). Nitrogen in agriculture: Balancing the Cost of an Essential Resource. *Annual Review of environment and resources*, 34, 97-125.

SANAULLAH, M.; BLAGODATSKAYA, E.; CHABBI, A. (2011). Drought effects on microbial biomass and enzyme activities in the rhizosphere of grasses depend on plant community composition. *Applied Soil Ecology*, 48, 38-44.

SAN EMETERIO, L.; ARROYO, A.; CANALS, R.M. (2003). Allelopathic potential of *Lolium rigidum* Gaud. on the early growth of three associated pasture species. *Grass and Forage Science*, 59, 107-112.

SOUTO, C.; CHIAPUSIO, G.; PELLISSIER, F. (2000). Relationships between phenolics and soil microorganisms in spruce forest: significance for natural regeneration. *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 26, No. 9, 2025-2034.

STEENWERTH, K.; BELINA, K.M. (2008). Cover crops and cultivation: Impacts on soil N dynamics and microbiological function in a Mediterranean vineyard agroecosystem. *Applied Soil Ecology*, 40, 370-380.

SULLIVAN, P. (2003). Overview of Cover Crops and Green Manures. *Fundamentals of Sustainable Agriculture*. ATTRA.

TAYLOR, J. P.; WILSON, B.; MILLS, M. S., BURNS, R. G. (2002). Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biology & Biochemistry*, 34, 387-401.

THORUP-KRISTENSEN, K.; MAGID, J.; JENSEN, L.S. (2003). Catch crops and Green Manures as Biological Tools in Nitrogen Management in Temperate Zones. *Advances in Agronomy*, Vol. 79, 227-297.

TONITTO, C.; DAVID, M.B.; DRINKWATER, L.E. (2006). Replacing bare fallows with cover crops in fertilizer-intensive cropping systems: A meta-analysis of crop yield and N dynamics. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 112, 58-72.

VAN DEN BOSSCHE, A.; DE BOLLE, S.; DE NEVE, S.; HORMAN, G. (2009). Effect of tillage intensity on N mineralization of different crop residues in a temperate climate. *Soil & Tillage Research*, 10, 316-324.

VLIEGHER, A. DE; LATRE, J.; CARLIER, L. (2009). *Lolium multiflorum* as a catch crop in maize. Alternative functions of grassland. Proceedings of the 15th European Grassland Federation Symposium, Czech Republic.

ANEXO I: RESULTADOS DEL ENSAYO

Tabla 1: Humedad del suelo y de los residuos de *L. multiflorum*.

	HUMEDAD (%)		
	Junio	Septiembre	Enero
CON1	8,444	7,735	14,951
CON2	10,421	7,032	15,156
CON3	11,155	7,854	15,392
CON4	9,453	8,723	15,771
CON5	10,271	7,400	16,436
CON6	9,580	8,665	16,845
LVS1	15,082	9,655	16,755
LVS2	13,810	9,747	16,159
LVS3	7,601	8,066	16,375
LVS4	10,709	10,529	15,954
LVS5	10,736	8,223	17,024
LVS6	9,960	8,266	17,316
LVE1	10,444	8,861	17,700
LVE2	10,171	8,208	17,236
LVE3	9,559	8,055	17,196
LVE4	10,900	8,020	15,400
LVE5	9,335	8,229	15,503
LVE6	9,856	7,491	18,067
LSE1	10,268	8,026	16,667
LSE2	9,685	7,182	15,084
LSE3	10,146	8,698	16,675
LSE4	10,362	7,758	15,851
LSE5	11,067	7,206	15,748
LSE6	10,146	6,208	15,820
CUL1	13,144	9,905	16,276
CUL2	15,661	10,750	17,593
CUL3	11,927	8,613	18,517
CUL4	12,713	7,829	18,069
CUL5	14,883	9,312	18,698
CUL6	14,560	9,069	17,144
HOJ1	9,500	5,769	17,647
HOJ2	17,413	6,000	24,444
HOJ3	16,915	10,000	---
HOJ4	12,500	7,692	18,182
HOJ5	16,915	11,538	15,625
HOJ6	20,101	15,686	10,345

Tabla 2: Actividad enzimática en el suelo: amidasa.

	AMIDASA		
	mmoles β - naftilamina/kg*h		
	Junio	Septiembre	Enero
CON1	1,107	1,345	1,279
CON2	0,942	1,165	2,662
CON3	1,242	1,243	3,279
CON4	0,990	0,867	1,397
CON5	1,022	1,142	1,072
CON6	1,527	1,395	2,159
LVS1	1,365	1,385	1,287
LVS2	1,502	1,362	1,997
LVS3	1,117	0,689	3,358
LVS4	1,085	1,159	1,434
LVS5	1,238	1,250	3,423
LVS6	1,366	1,079	3,227
LVE1	1,188	1,208	2,139
LVE2	1,067	1,274	1,357
LVE3	1,237	1,047	1,248
LVE4	1,233	1,016	3,695
LVE5	1,159	1,329	1,432
LVE6	1,108	1,195	1,754
LSE1	1,454	1,242	1,928
LSE2	1,215	0,974	3,383
LSE3	1,467	1,200	1,795
LSE4	1,172	1,065	3,500
LSE5	1,214	1,182	3,122
LSE6	1,082	0,994	1,166
CUL1	1,295	1,264	3,705
CUL2	1,735	1,179	3,615
CUL3	1,474	1,303	1,851
CUL4	1,527	1,089	1,718
CUL5	1,534	0,976	4,085
CUL6	1,761	1,691	1,632
HOJ1	4,943	13,988	12,752
HOJ2	7,768	7,501	10,974
HOJ3	6,421	6,796	11,432
HOJ4	5,785	8,804	18,411
HOJ5	5,857	5,899	21,161
HOJ6	5,759	5,787	13,781

Tabla 3: Actividad enzimática en el suelo: ureasa.

	UREASA mmolesN_NH4/kg*h		
	Junio	Septiembre	Enero
CON1	1,826	2,906	2,551
CON2	1,369	1,926	2,494
CON3	2,572	2,031	2,911
CON4	3,567	4,210	2,891
CON5	1,475	2,871	2,560
CON6	2,417	3,923	2,244
LVS1	2,044	2,534	2,203
LVS2	2,864	3,747	2,372
LVS3	3,094	2,295	2,048
LVS4	2,361	3,634	2,376
LVS5	2,939	2,827	2,352
LVS6	3,435	2,661	2,812
LVE1	2,849	3,345	2,103
LVE2	3,871	2,751	2,618
LVE3	4,446	3,038	1,978
LVE4	3,109	2,292	2,937
LVE5	1,934	3,681	3,048
LVE6	2,419	1,032	1,926
LSE1	2,418	4,702	2,338
LSE2	1,671	3,617	2,368
LSE3	2,550	3,529	3,247
LSE4	2,414	3,535	2,907
LSE5	3,381	3,353	2,873
LSE6	2,047	2,663	3,060
CUL1	2,914	3,133	3,547
CUL2	3,112	4,284	2,347
CUL3	2,106	2,652	2,360
CUL4	2,973	3,190	3,263
CUL5	2,123	2,854	2,565
CUL6	2,958	3,845	3,898
HOJ1	2,551	10,218	5,862
HOJ2	11,296	11,278	5,939
HOJ3	7,921	5,156	11,347
HOJ4	11,691	14,164	9,110
HOJ5	4,922	4,863	9,172
HOJ6	4,400	14,746	14,734

Tabla 4: Actividad enzimática en el suelo: glucosidasa.

	GLUCOSIDASA		
	mmoles PN/kg*h		
	Junio	Septiembre	Enero
CON1	0,923	0,847	0,939
CON2	0,893	0,594	0,648
CON3	0,943	0,888	0,852
CON4	1,015	1,025	0,884
CON5	0,907	0,587	0,728
CON6	1,228	1,118	1,298
LVS1	0,920	1,216	0,781
LVS2	1,085	1,010	1,030
LVS3	0,902	0,739	0,847
LVS4	0,883	1,073	0,910
LVS5	0,819	0,796	0,669
LVS6	0,925	1,051	1,048
LVE1	1,043	1,010	1,580
LVE2	0,795	0,991	1,160
LVE3	0,741	1,186	0,852
LVE4	0,862	0,967	0,927
LVE5	0,875	0,739	0,818
LVE6	0,784	1,089	1,432
LSE1	1,017	1,049	1,239
LSE2	0,900	0,967	0,812
LSE3	1,086	0,963	1,066
LSE4	0,838	1,115	0,967
LSE5	0,905	1,001	0,779
LSE6	0,702	0,909	0,879
CUL1	0,874	0,934	0,996
CUL2	1,109	1,064	0,927
CUL3	0,975	0,944	1,046
CUL4	0,769	1,046	0,948
CUL5	0,685	0,864	1,003
CUL6	1,332	0,957	1,062
HOJ1	15,220	13,623	22,966
HOJ2	21,792	13,417	12,761
HOJ3	23,208	19,721	10,733
HOJ4	14,377	13,690	21,239
HOJ5	19,878	18,902	18,964
HOJ6	19,803	16,094	17,698

Tabla 5: Actividad enzimática en el suelo: fosfatasa alcalina.

	FOSFATASA ALCALINA		
	mmoles PN/kg*h		
	Junio	Septiembre	Enero
CON1	1,930	2,183	2,174
CON2	2,153	1,537	1,938
CON3	2,211	2,091	2,071
CON4	2,555	2,412	0,924
CON5	2,158	2,117	1,792
CON6	2,383	2,798	2,786
LVS1	2,030	2,574	2,120
LVS2	2,223	2,653	2,702
LVS3	2,064	2,386	1,719
LVS4	1,732	2,225	2,428
LVS5	2,059	2,164	2,212
LVS6	2,199	2,488	2,177
LVE1	2,209	2,303	2,463
LVE2	2,032	2,059	2,393
LVE3	1,904	2,062	1,989
LVE4	2,344	1,956	1,888
LVE5	1,828	1,773	2,026
LVE6	2,198	1,990	2,670
LSE1	2,116	2,442	2,687
LSE2	2,048	1,903	2,132
LSE3	2,063	2,492	2,583
LSE4	1,957	2,164	1,821
LSE5	2,129	2,379	1,625
LSE6	1,851	1,722	2,456
CUL1	2,149	3,297	2,627
CUL2	2,814	2,614	2,574
CUL3	2,535	2,649	2,720
CUL4	2,561	2,633	2,884
CUL5	2,461	2,710	3,085
CUL6	2,741	2,522	3,327
HOJ1	5,246	7,494	12,958
HOJ2	9,247	6,333	20,707
HOJ3	7,742	7,952	17,491
HOJ4	5,997	6,754	22,117
HOJ5	6,670	6,302	21,544
HOJ6	6,800	8,921	21,487

Tabla 6: Actividad enzimática en los residuos de *L. multiflorum*: amidasa.

	AMIDASA		
	mmoles naftilamina/kg*h		
	Junio	Septiembre	Enero
HOJ1	4,943	13,988	12,752
HOJ2	7,768	7,501	10,974
HOJ3	6,421	6,796	11,432
HOJ4	5,785	8,804	18,411
HOJ5	5,857	5,899	21,161
HOJ6	5,759	5,787	13,781

Tabla 7: Actividad enzimática en los residuos de *L. multiflorum*: ureasa.

	UREASA		
	mmolesN_NH4/kg*h		
	Junio	Septiembre	Enero
HOJ1	2,551	10,218	5,862
HOJ2	11,296	11,278	5,939
HOJ3	7,921	5,156	11,347
HOJ4	11,691	14,164	9,110
HOJ5	4,922	4,863	9,172
HOJ6	4,400	14,746	14,734

Tabla 8: Actividad enzimática en los residuos de *L. multiflorum*: glucosidasa.

	GLUCOSIDASA		
	mmolesPN/kg*h		
	Junio	Septiembre	Enero
HOJ1	15,220	13,623	22,966
HOJ2	21,792	13,417	12,761
HOJ3	23,208	19,721	10,733
HOJ4	14,377	13,690	21,239
HOJ5	19,878	18,902	18,964
HOJ6	19,803	16,094	17,698

Tabla 9: Actividad enzimática en los residuos de *L. multiflorum*: fosfatasa alcalina.

	FOSFATASA ALCALINA		
	mmolesPN/kg*h		
	Junio	Septiembre	Enero
HOJ1	5,246	7,494	12,958
HOJ2	9,247	6,333	20,707
HOJ3	7,742	7,952	17,491
HOJ4	5,997	6,754	22,117
HOJ5	6,670	6,302	21,544
HOJ6	6,800	8,921	21,487

Tabla 10: Nitrógeno y carbono en la biomasa microbiana.

	N mg N/kg suelo			CBM mg C/kg suelo		
	Junio	Septiembre	Enero	Junio	Septiembre	Enero
CON1	64,860	63,063	80,789	330,232	300,447	241,226
CON2	63,484	51,107	64,810	381,302	305,681	392,834
CON3	65,341	63,963	80,703	235,812	263,233	262,837
CON4	60,900	70,656	83,649	154,252	345,284	295,713
CON5	57,658	54,770	66,960	305,174	212,058	360,254
CON6	75,514	89,959	113,260	380,074	305,346	372,798
LVS1	99,064	97,364	88,169	654,169	436,505	248,744
LVS2	103,258	108,252	110,623	549,141	301,686	294,944
LVS3	64,103	68,482	77,804	576,799	389,513	201,424
LVS4	77,701	98,828	93,823	569,392	328,293	246,604
LVS5	78,331	70,780	82,742	482,850	217,477	280,744
LVS6	75,439	75,961	86,231	326,881	507,291	223,247
LVE1	77,177	83,270	114,036	507,472	293,261	270,068
LVE2	68,845	71,986	99,725	161,623	397,233	291,482
LVE3	53,030	73,859	76,993	264,879	308,655	263,851
LVE4	93,899	64,496	89,160	514,171	238,565	283,553
LVE5	69,318	68,004	78,997	356,776	219,335	181,246
LVE6	63,281	73,312	117,579	413,476	301,436	396,996
LSE1	102,784	85,733	107,499	478,380	388,758	328,360
LSE2	77,587	42,542	76,825	452,721	321,277	293,414
LSE3	100,025	71,827	91,442	549,123	229,974	285,667
LSE4	82,277	73,015	88,119	506,210	316,154	88,582
LSE5	68,914	72,630	74,409	283,252	281,954	256,264
LSE6	74,820	37,639	81,856	358,505	244,298	347,759
CUL1	95,154	108,494	90,288	270,348	362,830	269,857
CUL2	119,182	124,179	102,570	338,847	302,473	289,544
CUL3	94,773	83,705	101,978	421,635	311,800	414,623
CUL4	92,315	81,473	106,630	176,267	489,958	347,928
CUL5	98,106	99,810	100,996	320,134	409,755	488,266
CUL6	126,300	96,987	114,745	567,956	359,193	361,883

Tabla 11: Relación entre carbono y nitrógeno microbianos.

	C/N		
	Junio	Septiembre	Enero
CON1	5,091	4,764	2,986
CON2	6,006	5,981	6,061
CON3	3,609	4,115	3,257
CON4	2,533	4,887	3,535
CON5	5,293	3,872	5,380
CON6	5,033	3,394	3,292
LVS1	6,604	4,483	2,821
LVS2	5,318	2,787	2,666
LVS3	8,998	5,688	2,589
LVS4	7,328	3,322	2,628
LVS5	6,164	3,073	3,393
LVS6	4,333	6,678	2,589
LVE1	6,575	3,522	2,368
LVE2	2,348	5,518	2,923
LVE3	4,995	4,179	3,427
LVE4	5,476	3,699	3,180
LVE5	5,147	3,225	2,294
LVE6	6,534	4,112	3,376
LSE1	4,654	4,534	3,055
LSE2	5,835	7,552	3,819
LSE3	5,490	3,202	3,124
LSE4	6,152	4,330	1,005
LSE5	4,110	3,882	3,444
LSE6	4,792	6,491	4,248
CUL1	2,841	3,344	2,989
CUL2	2,843	2,436	2,823
CUL3	4,449	3,725	4,066
CUL4	1,909	6,014	3,263
CUL5	3,263	4,105	4,834
CUL6	4,497	3,704	3,154

Tabla 12: Nitrificación potencial.

	Nitrificación potencial µg N-NO3/ g ss		
	Junio	Septiembre	Enero
CON1	0,476	0,924	0,486
CON2	0,571	0,770	0,790
CON3	0,562	0,911	0,665
CON4	0,533	0,661	0,813
CON5	0,487	1,035	0,729
CON6	0,367	0,773	0,650
LVS1	0,278	0,856	0,682
LVS2	0,202	0,956	0,650
LVS3	0,399	1,158	0,792
LVS4	0,282	1,021	0,567
LVS5	0,298	0,840	0,654
LVS6	0,385	0,804	0,704
LVE1	0,336	0,865	0,466
LVE2	0,512	0,740	0,574
LVE3	0,478	0,604	0,629
LVE4	0,384	0,894	0,630
LVE5	0,271	0,819	0,527
LVE6	0,363	0,714	0,451
LSE1	0,292	0,705	0,513
LSE2	0,300	0,878	0,628
LSE3	0,247	1,073	0,515
LSE4	0,331	0,838	0,537
LSE5	0,274	0,711	0,582
LSE6	0,313	0,667	0,734
CUL1	0,636	1,223	0,870
CUL2	0,761	1,330	0,663
CUL3	0,541	1,236	0,688
CUL4	0,587	1,320	0,755
CUL5	0,349	1,210	0,490
CUL6	0,489	1,173	0,703

Tabla 13: Contenido de nitrato y amonio del suelo.

	N-NH4 µg N-NH4/g ss			N-NO3 µg N-NO3/ g ss		
	Junio	Septiembre	Enero	Junio	Septiembre	Enero
CON1	0,928	0,000	0,982	4,915	4,016	0,188
CON2	0,519	0,468	0,483	9,466	23,621	0,354
CON3	0,028	0,147	1,058	7,710	15,356	0,100
CON4	0,734	0,115	0,944	4,876	9,608	0,214
CON5	0,624	0,292	0,395	6,698	3,618	0,120
CON6	2,522	0,586	0,571	7,012	5,994	0,331
LVS1	0,477	0,786	0,000	3,945	1,760	0,054
LVS2	0,650	7,822	0,578	4,548	7,457	0,280
LVS3	0,758	0,016	0,789	7,760	4,612	0,048
LVS4	0,459	0,665	0,422	6,109	1,364	0,077
LVS5	0,420	0,218	0,368	6,867	0,937	0,048
LVS6	0,739	0,828	0,484	4,842	1,025	0,254
LVE1	0,000	0,472	0,541	6,471	1,810	0,091
LVE2	0,573	1,215	0,622	6,223	2,468	0,060
LVE3	2,654	0,294	0,477	7,231	4,524	0,097
LVE4	0,466	1,506	0,372	7,845	3,805	0,177
LVE5	0,535	0,795	0,426	8,079	10,984	0,201
LVE6	0,394	0,373	0,842	7,732	13,280	0,305
LSE1	0,763	0,283	0,516	2,519	3,544	0,354
LSE2	0,603	0,248	0,347	3,654	3,060	0,206
LSE3	0,651	1,128	0,354	2,270	2,251	0,240
LSE4	0,563	0,976	0,820	3,676	1,615	0,190
LSE5	0,821	0,647	0,807	6,724	3,168	0,255
LSE6	0,668	1,322	0,303	5,932	19,357	0,196
CUL1	0,276	0,777	0,812	0,248	4,656	0,090
CUL2	0,326	1,025	0,728	0,006	6,913	0,085
CUL3	0,414	0,345	0,865	0,000	18,591	0,110
CUL4	0,842	0,743	0,561	0,206	8,099	0,226
CUL5	0,634	0,507	1,433	0,153	3,766	0,283
CUL6	0,614	0,451	0,603	0,000	8,209	0,109