



Universidad
Complutense
Madrid



EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD ECOLÓGICA DEL SUELO EN OLIVARES CON PRÁCTICAS AGRÍCOLAS CONTRASTADAS

Máster Universitario en Restauración de Ecosistemas

Presentado por:

D. JUAN FRANCISCO LÓPEZ RUBIO

Director:

Dr. D. JOSÉ MARÍA REY BENAYAS

Tutor académico:

Dr. D. JOSÉ MARÍA REY BENAYAS

En Valdepeñas, a 20 de Junio de 2022

INDICE

0. RESUMEN	3
1. INTRODUCCION	4
1.1. Justificación/Antecedentes.....	4
1.2. Necesidad de restauración del suelo agrícola.....	5
1.3. Evaluación de la integridad ecológica del suelo.....	7
2. OBJETIVOS E HIPOTESIS	12
3. MATERIAL Y METODOS	13
3.1.- Estudios de caso.....	13
3.2.- Toma de muestras de suelo.....	14
3.3.- Análisis de las muestras de suelo.....	15
3.4.- Análisis de los datos.....	23
4. RESULTADOS	24
4.1.- Efectos del manejo agrícola en los indicadores del suelo.....	24
4.2.- Interpretación de los cromatogramas.....	26
4.3.- Relación entre los indicadores del suelo y la información de los cromatogramas.....	27
5. DISCUSION	29
5.1.- Interpretación de los cromatogramas.....	29
5.2.- Manejo agrícola e integridad ecológica del suelo.....	31
6. CONCLUSIONES	33
7. BIBLIOGRAFIA	34
8. ANEXOS	39
- Anexo 1.- Preparación de las muestras de suelo y cromatogramas.....	40
- Anexo 2.- Elementos de la caracterización de un cromatograma.....	46
- Anexo 3.- Cromatogramas de las muestras de suelo.....	56
- Anexo 4.- Indicadores químicos y biológicos de las muestras de suelo.....	77

0. RESUMEN

El manejo adecuado del suelo agrícola es fundamental para favorecer su integridad ecológica y promover la sostenibilidad de los agroecosistemas. El objetivo principal de este estudio es la evaluación de la integridad ecológica del suelo en olivares con manejo agrícola contrastado. A su vez, se pretende validar la cromatografía circular de Pfeiffer como herramienta útil, barata y fácil de entender para la evaluación y el seguimiento de la integridad ecológica de los suelos agrícolas. Para ello, se han analizado indicadores químicos y biológicos de calidad para 10 pares de muestras de suelo, con manejo ecológico y con manejo convencional, y se realizaron cromatogramas de todas ellas. Se correlacionaron estadísticamente los valores cuantitativos de los indicadores de calidad con las características cualitativas mostradas en los cromatogramas. La concentración de carbono y la actividad microbiana mostraron las correlaciones más fuertes. La integridad ecológica del suelo en los olivares con prácticas agroecológicas es mayor que la de los olivares convencionales adyacentes. La fuerte diferenciación radial, la intensa coloración, la mayor integración entre zonas, el desarrollo de la zona central y las amplitudes de las zonas externa e intermedia fueron las características principales de la integridad ecológica de los suelos mostrados en los cromatogramas. Estos resultados proporcionan evidencia de que los patrones mostrados en los cromatogramas proporcionan una información integrada y fiable del estado del suelo en los casos en los que se necesita una comparación de su fertilidad. Son necesarios más estudios con el fin de establecer mejores correlaciones entre los indicadores cuantitativos y cualitativos de calidad y para una mejor comprensión y uso de la técnica cromatográfica como herramienta para la evaluación de la integridad del suelo.

Palabras clave: cromatografía, cubiertas vegetales, calidad del suelo, carbono

ABSTRACT

Appropriate management of agricultural soils is fundamental to improve their ecological integrity and promote the sustainability of agroecosystems. The main objective of this study is to assess the ecological integrity of the soil in olive groves with contrasting agricultural management. At the same time, the aim is to validate Pfeiffer circular chromatography as a useful, cheap and easy tool to understand for the assessment and

monitoring of the ecological integrity of agricultural soils. For this purpose, chemical and biological quality indicators have been analysed for 10 pairs of soil samples, ecologically managed and conventionally managed, and chromatograms were performed for all of them. The quantitative values of the quality indicators were statistically correlated with the qualitative characteristics shown in the chromatograms. Carbon concentration and microbiological activity showed the strongest correlations. The ecological integrity of the soil in olive orchards with agroecological practices is higher than in adjacent conventional olive orchards. Strong radial differentiation, intense colouration, higher integration between zones, development of the central zone and the amplitudes of the outer and intermediate zones were the main characteristics of the ecological integrity of the soils shown in the chromatograms. These results provide evidence that the patterns shown in the chromatograms provide integrated and reliable information on soil status in cases where a comparison of soil fertility is needed. Further studies are needed in order to establish better correlations between quantitative and qualitative indicators of quality and for a better understanding and use of the chromatographic technique as a tool for the assessment of soil integrity.

1. INTRODUCCION

1.1.- Justificación

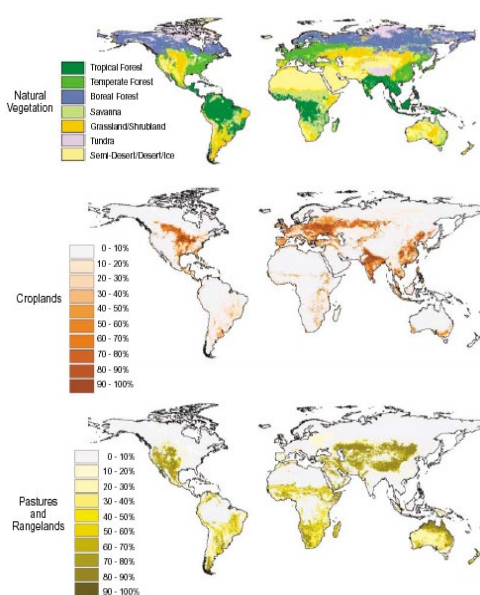


Figura 1. Reducción de la cubierta vegetal natural. (Foley et al. 2005)

Actualmente, el humano como especie hemos afectado a alrededor de un 83% de la superficie global terrestre (Sanderson et al. 2002); esta transformación, que ha tenido lugar desde hace más de 8000 años, es debida principalmente a la agricultura y a los asentamientos de las poblaciones (Ellis. 2015). Las tierras de cultivo, los pastos, las plantaciones forestales y las zonas urbanas de todo el mundo se han expandido en las últimas décadas, acompañadas de grandes aumentos en el consumo de energía, agua y fertilizantes, dando lugar a considerables pérdidas de biodiversidad (Foley et al. 2005).

La pérdida de biodiversidad y los cambios de uso de los suelos son los componentes principales del cambio global, junto con el cambio climático. Muchos cambios en los bosques, las tierras de cultivo, las vías fluviales y el aire en todo el mundo están impulsados por la necesidad de proporcionar alimentos, fibra, agua y refugio a más de seis mil millones de personas (Foley et al. 2005; **Figura 1**).

La expansión de la agricultura desde el Neolítico y la intensificación de esta durante las últimas décadas son las principales causas de la huella ecológica humana en el planeta y, además, actualmente se producen alimentos y fibras en exceso (Andrade, 2016). Es preciso un cambio de paradigma en la práctica de la agricultura actual, adecuando los sistemas de producción utilizando las lecciones aprendidas de las prácticas tradicionales, combinándolas y apoyándolas con los nuevos avances científicos y técnicos (Rey Benayas & Bullock, 2012).

La década 2021-2030 se ha declarado por la ONU como la Década de la Restauración Ecológica (<https://www.decadeonrestoration.org/>), ofreciendo un amplio abanico de posibilidades para la acción climática y la seguridad alimentaria. Para ello se deben seguir una serie de estrategias con el fin de alcanzar el objetivo propuesto: restaurar 2.000 millones de hectáreas de áreas degradadas. Las principales estrategias propuestas son: (1) incorporar acciones holísticas, incluyendo el trabajo a escala efectiva; (2) incluir el conocimiento ecológico tradicional; (3) colaborar con movimientos y organizaciones aliadas; (4) avanzar y aplicar la ciencia y la tecnología del microbioma del suelo; (5) proporcionar oportunidades de formación y desarrollo de capacidades para las comunidades y los profesionales; y (6) estudiar y mostrar las relaciones entre la salud del ecosistema y la salud humana (Aronson et al. 2020).

1.2 - Necesidad de restauración del suelo agrícola

Un nuevo enfoque en la forma de hacer agricultura está ganando fuerza, tanto en el mundo rural como en los círculos académicos, con una visión más allá de la agricultura orgánica, con un enfoque regenerativo. Como apoyo a la mencionada Década de la Restauración Ecológica, las estrategias de la Comisión Europea “De la granja a la mesa” (<https://www.consilium.europa.eu/es/policias/from-farm-to-fork/>) y “Para la biodiversidad 2030” (https://ec.europa.eu/environment/strategy/biodiversity-strategy-2030_es) refuerzan las oportunidades para un sistema alimentario justo,

saludable y ecológico, para el cual un horizonte de investigación e innovación es necesario. Para el alcance de los objetivos propuestos, es preciso la introducción de sistemas de cultivo más respetuosos con el medio ambiente, mediante: 1) cubiertas vegetales, 2) plantación en curvas de nivel, 3) manejo de restos de podas y 4) fertilización orgánica, entre otras muchas (Rodríguez-Entrena et al. 2013).

En la actualidad, el papel primordial que desempeñan la materia orgánica y el humus en el mantenimiento de la productividad del suelo y las pérdidas que conlleva su eliminación son ampliamente reconocidas (Ribó, M., 2003). Cualquier práctica que aumente el aporte fotosintético de carbono o ralentice la liberación de carbono almacenado aumentará la cantidad de éste en el suelo, secuestrando así carbono atmosférico (Sun et al., 2010). La mayoría de los suelos de producción agrícola convencional son suelos con una fertilidad agotada, afectados por la intensidad de su producción, la mecanización profunda y el uso de fertilizantes y agroquímicos, afectando a los procesos de humificación, además de la rápida mineralización de la materia orgánica (Saavedra et al. 2018).

El proyecto Olivares Vivos

Existen programas de investigación llevados a cabo por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, la Universidad de Jaén y el proyecto “Olivares Vivos” de SEO-Birdlife que, desde el 2016, con el apoyo financiero del programa Life de la UE, seleccionan explotaciones de olivos de la región andaluza con el fin de adoptar un modelo de



Figura 2. Mar de olivos en la provincia de Jaén

agricultura regenerativa. El objetivo principal de este proyecto es cuantificar los beneficios a largo plazo de un manejo adecuado de los agroecosistemas olivareros en Andalucía y así demostrar la compatibilidad de un enfoque sostenible y a la vez productivo, teniendo en cuenta entre otros factores, la importancia del secuestro de carbono como un ingreso económico

(<https://www.revistaquercus.es/noticia/8003/especiales-quercus/especial-life-olivares-vivos-armonizar-agricultura-y-biodiversidad.html>).

Debido a las características climáticas y edafológicas de esta región, la rusticidad del olivo (*Olea Europaea*) es una particularidad de esta especie. Este cultivo (**Figura 2**) ocupa un 43% de la superficie de la región andaluza. Su manejo está basado principalmente en una intensificación de la producción, con un uso abusivo de herbicidas, roturación del suelo y aplicación de fertilizantes de síntesis. Este tipo de manejos provoca grandes desequilibrios en la provisión de servicios ecosistémicos a escalas regionales (**Figura 3**).

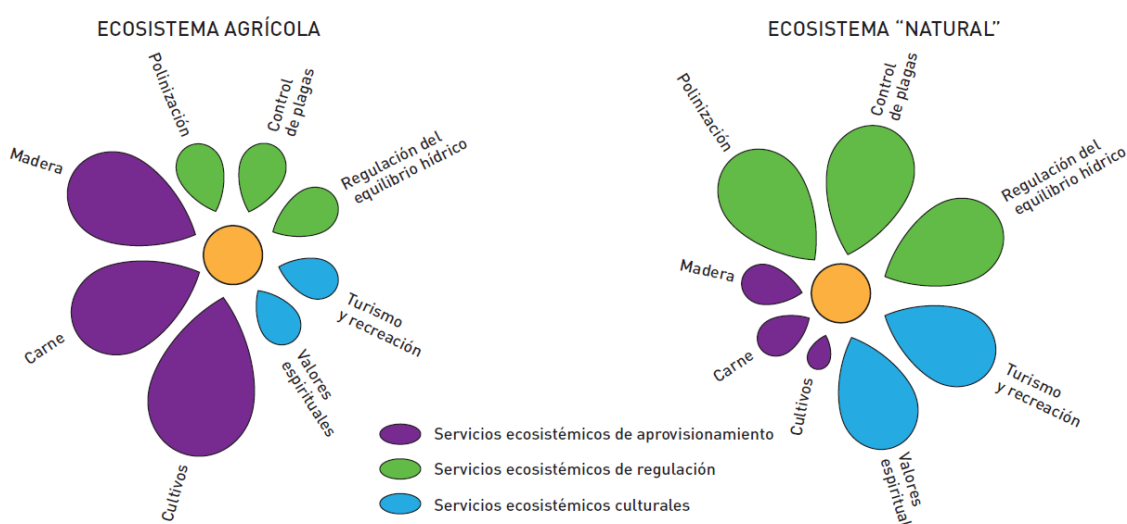


Figura 3. La agricultura normalmente produce un incremento de los servicios ecosistémicos de aprovisionamiento a expensas de los servicios de regulación y culturales (Gordon et al. 2010).

Este proyecto está demostrando que este tipo de olivicultura funciona y es rentable, generando una recuperación de especies y un aumento muy significativo de la abundancia de flora y fauna, sin disminuir la productividad y ahorrando en fertilizantes y fitosanitarios, lo cual proporciona un valor añadido a sus producciones.

1.3.- Evaluación de la integridad ecológica del suelo

El suelo es un cuerpo natural dinámico y vivo, vital para el funcionamiento de los ecosistemas terrestres. Sus funciones más importantes son el flujo y la retención del agua, el transporte y la retención de solutos, la estabilidad física y el soporte, la retención y el ciclo de los nutrientes, la amortiguación y el filtrado de materiales

potencialmente tóxicos y el mantenimiento de la biodiversidad y los hábitats (*Lehman et al. 2015*).

Indicadores de la calidad del suelo

La formación del suelo es un proceso complejo que involucra cambios: 1) físicos, que implican la reducción del tamaño de las partículas sin ninguna alteración en su composición; 2) químicos, originados por la separación de las partículas minerales de las rocas, su alteración o destrucción y la resíntesis a compuestos sólidos estables (*Budhu, 2007*); y 3) biológicos (*Porta et al., 2003*), como son: la degradación y el aporte de materia orgánica, la producción de CO₂ en la respiración, la intervención en la movilidad de los ciclos biogeoquímicos de los elementos y los efectos mecánicos de los animales y las plantas, así como el fraccionamiento de las rocas, entre otros (*Porta et al., 2003*).

Es importante que los indicadores básicos de la calidad del suelo estén relacionados con las funciones de los ecosistemas (*Doran et al. 1997*). Estos indicadores se miden para seguir los efectos del manejo sobre el funcionamiento del suelo en un periodo dado (*Astier et al., 2002*). Así, el carbono orgánico del suelo es uno de los más importantes indicadores de su calidad y está directamente relacionado con el mantenimiento de su estructura, infiltración, suministro y almacenamiento del agua (*Laban et al., 2018*); a su vez incide en la presencia de diferentes grupos de microorganismos, mineralización de la materia orgánica y la disponibilidad de nutrientes para los cultivos (*Kononova, M., 1982*).

Indicadores físicos. La calidad física del suelo se asocia con la estructura, la densidad aparente, la estabilidad de los agregados, la infiltración, la profundidad del suelo superficial, la capacidad de almacenamiento del agua y la conductividad hidráulica saturada (*Navarro et al., 2008*).

Indicadores químicos. Entre ellos se encuentran la disponibilidad de nutrientes, el carbono orgánico total, el carbono orgánico lábil, el pH, la conductividad eléctrica, la capacidad de absorción de fosfatos, la capacidad de intercambio de cationes, los cambios en la materia orgánica, el nitrógeno total y el nitrógeno mineralizable.

Indicadores biológicos. Los indicadores biológicos integran una gran cantidad de factores que afectan la calidad del suelo e incluyen funciones como la tasa de

respiración, las tasas de descomposición de los residuos vegetales, y el nitrógeno y el carbono de la biomasa microbiana.

Evaluación de la calidad del suelo mediante la cromatografía circular de Pfeiffer

La capacidad de evaluar la calidad del suelo e identificar sus propiedades clave es complicada debido a las numerosas cuestiones que definen la calidad y a la multiplicidad de factores físicos, químicos y biológicos que controlan los procesos edáficos (*Doran et al. 1994*). El método de análisis cromatográfico, en el cual se centra el presente TFM, al tratarse de una técnica no cuantitativa, supone un reto en su interpretación; para entenderlo mejor, conviene combinarlo con datos cuantitativos de los diferentes indicadores de calidad obtenidos mediante otros métodos. Por ello, en este TFM se han analizado algunos valores de calidad para las diferentes propiedades químicas y microbiológicas de las muestras de suelo (**Tabla 1**).

Tabla 1. Indicadores químicos y biológicos de la calidad del suelo (*García et al. 2012*).

Indicador	Medida	Relación con las funciones y condiciones del suelo
QUIMICO	pH	Actividad química y biológica, límites para el crecimiento de las plantas y actividad microbiana.
	Conductividad	Actividad microbiológica y de las plantas, límites para el crecimiento de las plantas y la actividad microbiológica.
	Carbono	Fertilidad del suelo, estabilidad y grado de erosión. Potencial productivo.
	N, P y K	Disponibilidad de nutrientes para las plantas y pérdida potencial de N. Productividad y calidad ambiental.
BIOLOGICO		
	Glucosidasa	Descomposición de la materia orgánica. Liberación energía lábil para microorganismos.
	Respiración edáfica	Actividad microbiana.

Los análisis convencionales de fertilidad del suelo determinan elementos químicos, pH, densidad aparente y porcentaje de materia orgánica de los suelos; sin embargo, estos

análisis no consideran las interacciones entre los componentes químicos, físicos y biológicos. Existen otras técnicas más rápidas, de bajo coste, accesibles y fáciles de entender, que no necesitan de avanzados conocimientos científicos o específicos para su interpretación, como es el caso de la cromatografía circular de Pfeiffer (*Kokornaczyk et al., 2016*) (**Figura 4**). La cromatografía circular de Pfeiffer consiste en un método físico de separación de los diferentes componentes que caracterizan las sustancias complejas, proporcionando al mismo tiempo un análisis completo de la calidad del suelo debido a la interacción de las sustancias presentes en la muestra, las cuales determinan la formación de diferentes patrones que son utilizados para evaluar la calidad del suelo (*Kokornaczyk et al., 2016*).



Figura 4. Muestras de suelo y cromatogramas

Esta herramienta no substituye los análisis químicos convencionales, pero puede ayudar al diagnóstico de la calidad del suelo mediante métodos de comparación, correlacionando la información de los cromatogramas y los resultados de los análisis químicos (*Perumal et al., 2016*). La cromatografía puede utilizarse como un indicador integrador de distintos componentes de la calidad del suelo, permitiendo monitorizar constantemente la respuesta o impacto producido por las diferentes prácticas de manejo de los sistemas agrícolas. Esta técnica es fácil de reproducir, los resultados presentados son más descriptivos que cuantitativos y el resultado proporciona información útil y fácil de entender sobre la integración entre las características físicas, químicas y biológicas.

Existen multitud de artículos científicos en los cuales se expone de forma detallada la interpretación de los cromatogramas respecto a la calidad del suelo, todos ellos con un enfoque cualitativo. La cromatografía circular ha sido evaluada en condiciones experimentales como un indicador que determina los componentes minerales, orgánicos y proteínicos para analizar el sistema edáfico (*Pfeiffer, 1984; Kokornaczyk et al., 2016; Maseda, 2016*). Pocos estudios han explorado la relación cuantitativa entre las

características del cromatograma y los indicadores de la calidad del suelo. Sin embargo, en la última década se está incrementado el interés por la validación de esta herramienta, y así poder encontrar metodologías consistentes en la forma de utilizarla como indicador del estado del suelo.

Aunque el procedimiento para obtener un cromatograma está bien descrito, es escaso un procedimiento sólido y estandarizado para la interpretación (*Khemani et al., 2008*), siendo limitada una evaluación rigurosa de la eficacia de la cromatografía del suelo para evaluar su calidad. *Pfeiffer (1984)* presentó una detallada descripción de los cromatogramas producidos a partir de una variedad de suelos, pero no evaluó la consistencia del procedimiento para diagnosticar la salud del suelo. Este autor distinguió tres zonas principales en un cromatograma y sugirió que la anchura de las zonas externas y medias deberían reflejar las características de materia orgánica en las muestras. *Restrepo y Pinheiro (2011)* desarrollaron de una forma más fácil de caracterizar y evaluar los cromatogramas. Posteriormente, con un enfoque de "razonamiento basado en casos", *Khemani et al. (2008)* escanearon cromatogramas y realizaron análisis de imágenes, registrando las correspondientes propiedades del suelo en un intento de evaluar si se podía extraer información cuantitativa de estas imágenes, pero no informaron de sus resultados.

En un estudio más reciente, *Kokornaczyk et al. (2017)* examinaron 16 muestras de suelo utilizando cromatografía en papel y análisis químicos estándar. Aunque se basaron en un conjunto de datos limitado, estos autores informaron de una fuerte correlación entre los patrones de la cromatografía y el contenido de materia orgánica, nitrógeno total, fósforo asimilable y niveles de bromo. En general, concluyeron que un fuerte desarrollo de las características radiales como canales y picos era indicativo de suelos de mejor calidad, mientras que los rasgos concéntricos como el número de anillos eran indicativos de suelos de peor calidad (*Kokornaczyk et al., 2017*). Este estudio llevó a estos autores a concluir que las diferencias en los patrones de los cromatogramas producidos utilizando cromatografía circular de Pfeiffer pueden ser un indicador fiable de la salud del suelo.

Otro estudio reciente realizado por *Saavedra et al. (2018)* comparó los cromatogramas producidos a partir de suelos con distintas prácticas de uso. Estos autores encontraron

que los colores de los cromatogramas son sensibles a los cambios en los nutrientes (nitrógeno) y la salud general del suelo. Los cambios en las características estructurales de los cromatogramas también representaban cambios en las relaciones entre la microbiología, la materia orgánica y los minerales.

Perumal et al. (2016), desarrollaron un software para la interpretación rápida del cromograma, basado en una amplia base de datos que correlaciona las imágenes con los valores de nutrientes del suelo en India. Otros trabajos como el de *Haßbold-Piezunka (2003)*, *Kokornaczyk et al. (2016)* y *Maseda (2016)* han comparado los patrones de los cromatogramas con los resultados de otros análisis para el compostaje, diferentes tipos de suelos y la detección de metales pesados en suelos contaminados. *Ford et al. (2020)* estudiaron 343 muestras de suelo procedentes de distintos usos de la tierra en Australia, con el fin de investigar la relación entre el carbono orgánico total, la actividad y la diversidad microbiana, la salinidad y los niveles de pH y 12 características del cromatograma. Como conclusión, observaron que el carbono orgánico total y la actividad microbiana mostraron las correlaciones más fuertes con las características del cromatograma; también observaron que las características del cromatograma dependieron del contexto y los gradientes de las variables del suelo. En consecuencia, para obtener mejores resultados más fiables del suelo evaluado, la cromatografía debe ser complementada con otros análisis de suelo.

2. OBJETIVOS E HIPOTESIS

El **objetivo principal** de este Trabajo Fin de Máster es evaluar la integridad ecológica del suelo en olivares con manejo agrícola contrastado, es decir, manejo agroecológico y manejo convencional. Los **objetivos específicos** son (1) analizar la calidad del suelo de los olivares mediante la cromatografía circular de Pfeiffer y (2) validar la cromatografía circular de Pfeiffer como herramienta útil, barata y fácil de entender para la evaluación y el seguimiento de la integridad ecológica de los suelos agrícolas. Las **hipótesis de partida** son que (1) los suelos de los olivares con prácticas agroecológicas tendrán una mayor integridad ecológica que los suelos de los olivares con manejo convencional y (2)

la cromatografía circular es una herramienta útil para evaluar la integridad ecológica de los suelos agrícolas.

Este TFM pretende pues desarrollar metodologías para la evaluación de los patrones de los cromatogramas que permitan sintetizar, analizar e integrar las relaciones existentes entre las características del método cromatográfico y otros indicadores cuantitativos químicos y biológicos del suelo. Para ello utilizará muestras de la cromatografía entre manejos agrosistémicos contrastados en clima mediterráneo continental.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1.- Estudios de caso

Este TFM se ha realizado en olivares localizados en los municipios de Valdepeñas y S. Carlos del Valle (Ciudad Real) y Jaén, con similitudes climáticas y edafológicas (**Figura 6**). El tipo suelo de ambas localidades es calcisol háplico, caracterizado por una importante acumulación de carbonatos cálcicos secundarios. Este tipo de suelos generalmente se desarrollan en regiones con estaciones secas definidas y son comunes sobre material parental calcáreo (*Soil Atlas of Europe, 2005*).

El clima de la zona según la clasificación de Köppen-Geiger (*Chazarra et al., 2018*) es del tipo Csa, es decir, un clima mediterráneo de inviernos fríos (llegando a -4°C) y veranos secos y calurosos (con temperaturas de más de 40°C), siendo en otoño y primavera cuando suceden las precipitaciones frecuentes.

Parcelas objeto de estudio

Se estudiaron 10 olivares en producción con manejo agroecológico y otros tantos convencionales en las zonas mediterráneas con clima mediterráneo continental, suelos calcisoles y una altitud < 1000 msnm. Para la elección de los olivares agroecológicos estos tenían que haber aplicado prácticas agrícolas de no roturación del suelo con presencia de cubiertas vegetales espontáneas o sembradas, sin adición de herbicidas, pesticidas o fertilizantes solubles (**Figura 5**) durante un periodo mínimo de tres años.



Figura 5. Olivar objeto de estudio "Campo de vida". FIRE. Valdepeñas

Tras una exhaustiva búsqueda de olivares en las regiones mencionadas, se optó por el análisis de los diez pares de olivares de la **Figura 6**.

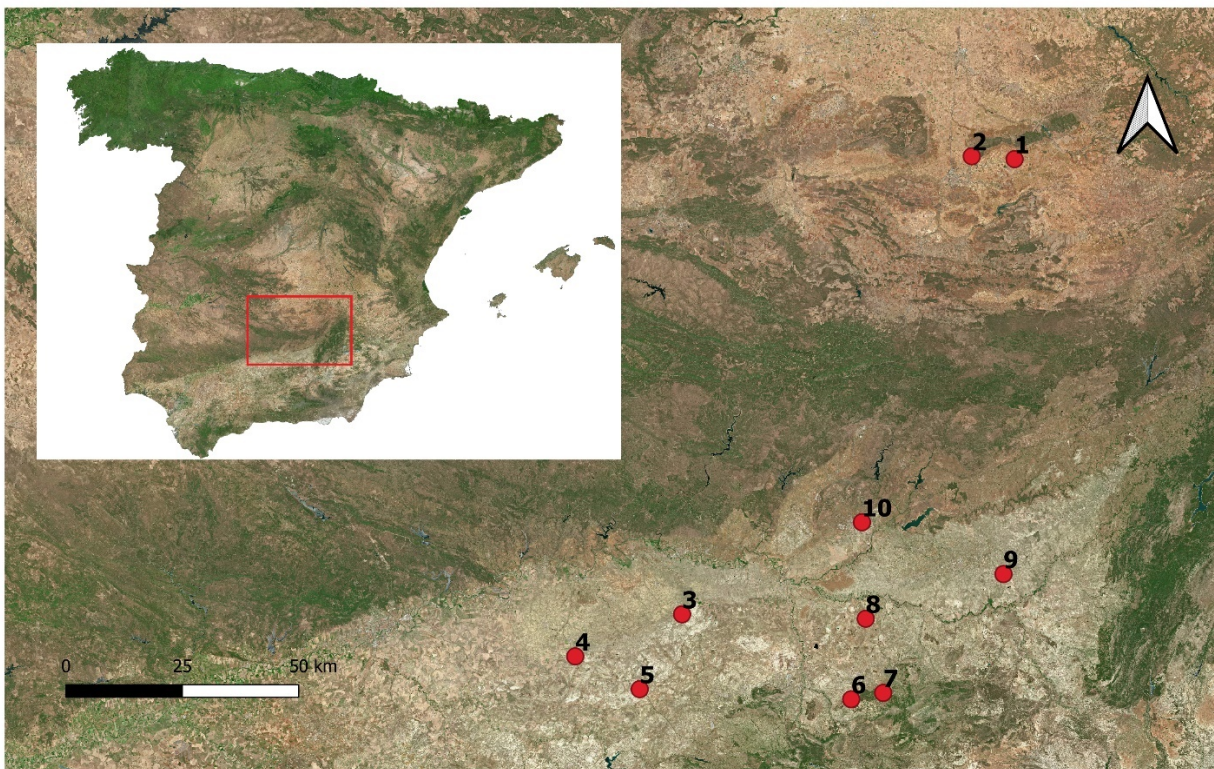


Figura 6. Localización de los diez pares de olivares para la toma de muestras. Los olivares agroecológicos 1 y 2 forman parte del proyecto Campos de Vida de la Fundación Internacional de Restauración de Ecosistemas. Los olivares agroecológicos 3-10 pertenecen al proyecto Olivares Vivos de SEO-Birdlife.

A su vez, acompañando cada una de las muestras de suelo de los olivares agroecológicos mencionados, se analizaron muestras de suelo de olivares adyacentes con un manejo convencional, caracterizado por ser suelos desnudos y roturados con aplicación de

herbicidas, pesticidas y fertilizantes solubles. El objetivo fue la obtención de datos pareados de las fincas con las mismas condiciones edafológicas y microclimáticas para su posterior comparación.

3.2.- Toma de muestras de suelo.

Un total de 20 muestras de suelo, una por olivar, fueron recogidas para el análisis de su calidad. Cada muestra fue de 1kg y se tomó en un único punto (**Figura 7**), a una profundidad de 10 – 15 cm, es decir, donde se encuentra la mayor parte de la rizosfera de la cubierta vegetal. Las muestras de suelo se guardaron en bolsas herméticas de diferentes tamaños para su posterior análisis (**Figura 8**).



Figura 7. Recogida de muestras de suelo en olivar.



Figura 8. Preparación muestras de suelo para su posterior análisis.

3.3.- Análisis de las muestras de suelo.

Análisis químicos

Se midieron el pH, la conductividad eléctrica, el carbono total, el nitrógeno total, el fósforo total y la concentración de potasio (**Tabla 2**) en el laboratorio Nutrilab (<https://nutrilab-urjc.es/>) de la Universidad Rey Juan Carlos.

Tabla 2. Parámetros, metodología y unidades de los análisis químicos del suelo.

Parámetro	Método de análisis	Unidades
Potasio	Fotometría de Llama	mg K/Kg de suelo
Carbono	Digestión- Espectrofotometría UV	%C
Nitrógeno Total	Digestión- Espectrofotometría UV	mg N/Kg de suelo
Fósforo Total	Digestión- Espectrofotometría UV	mg P/Kg de suelo
pH	Potenciometría	unidades de pH
Conductividad	Conductímetro	μS/cm

Análisis microbiológicos

Se midió la producción de glucosidasa por el método de espectrofotometría UV ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) y la respiración microbiana mediante la cuantificación de producción de CO_2 utilizando glucosa como fuente de carbono. La metodología que se ha utilizado para la tasa de CO_2 , es un sistema de respiración basado en microplacas que permite analizar muestras de suelo bajo una serie de réplicas de diferentes fuentes de carbono en un espacio reducido y compacto (**Figuras 9 y 10**). Estos análisis los realizó el autor del TFM en el Laboratorio de Biodiversidad y Funcionamiento ecosistémico (BioFunLab; <https://www.upo.es>) de la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.

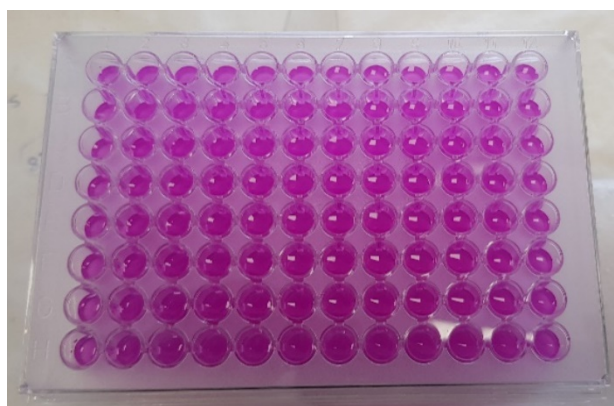


Figura 9. Microplaca con agar previa a los análisis

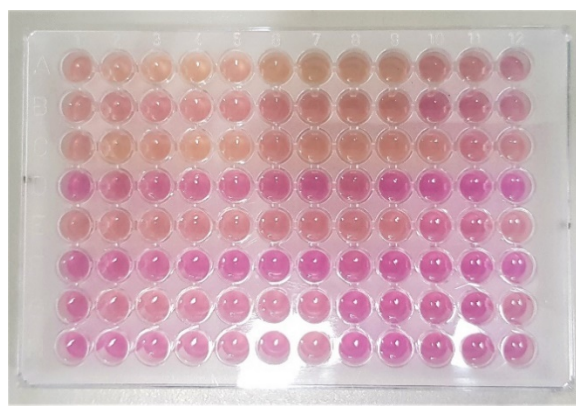


Figura 10. Microplaca con agar posterior a los análisis

Cromatografía circular de Pfeiffer

La cromatografía circular de Pfeiffer consiste en un método físico de separación de los diferentes componentes que caracterizan las sustancias complejas que proporciona al mismo tiempo un análisis integrado de la calidad del suelo. Esto es debido a la interacción de las sustancias presentes en la muestra, las cuales determinan la formación de diferentes patrones que son utilizados para evaluar la salud del suelo (Kokornaczyk *et al.*, 2016). La cromatografía es una técnica que proporciona resultados cualitativos más que valores numéricos de los compuestos presentes en el suelo. En el **Anexo 1** se muestra de forma detallada la preparación de las muestras de suelo y la obtención de los cromatogramas.

Caracterización de los cromatogramas

Los elementos de los cromatogramas que resultan concluyentes para evaluar la calidad del suelo y de sencilla interpretación son los siguientes: 1) zonas, 2) coloración, 3) integración de zonas, 4) formas y 5) patrones (**Figura 11**). El **Anexo 2** proporciona más detalles sobre estos elementos.

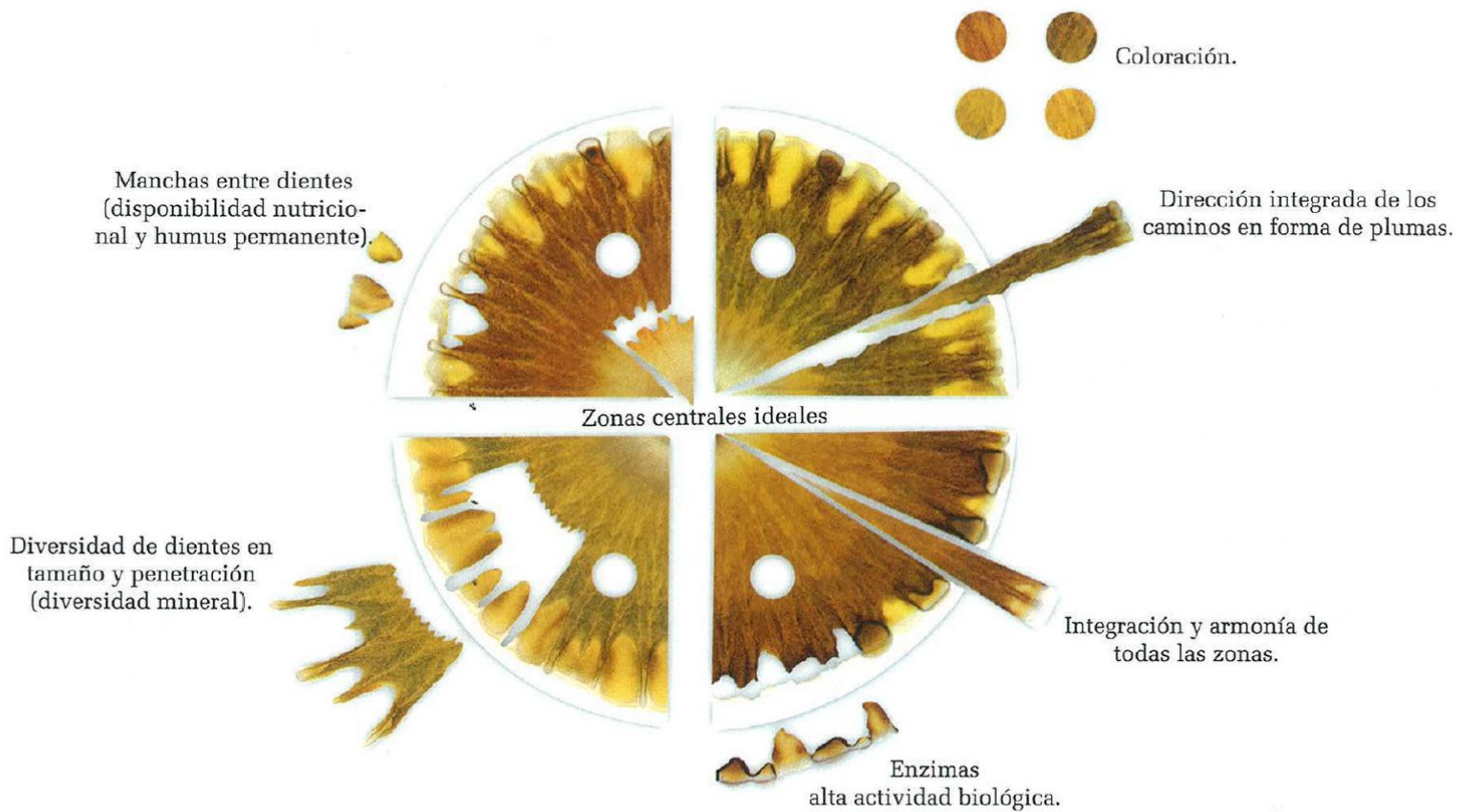


Figura 11. Detalles de las diferentes características en un cromatograma ideal.

Evaluación visual de los caracteres diferenciales de los cromatogramas

Para su caracterización, nos fijaremos en un cromatograma ideal (**Figura 12**) correspondiente a un suelo con buena calidad, es decir, de un ecosistema maduro (como un bosque), el cual tiene excelentes condiciones de humedad y estructura, un aporte constante de materia orgánica y una gran diversidad de organismos.



Figura 12. Cromatograma ideal, perteneciente a un suelo íntegro y con excelentes indicadores de calidad.

La evaluación visual de los cromatogramas consistió en puntuar (1) el grado de desarrollo de las características de los patrones diferenciales (canales, picos, intensidad de color, integridad entre zonas y características de la zona central) y (2) las medidas de las diferentes zonas del cromatograma (zona central, anillo interno, anillo intermedio, anillo exterior, radio total y la suma de los anillos intermedio y exterior) (**Tabla 3**). A partir de estas observaciones, en los cromatogramas se identificaron y valoraron:

- i) La puntuación del grado de desarrollo de la zona central.
- ii) La puntuación del grado de integración entre anillos concéntricos (valoración de límites entre zonas).
- iii) La puntuación de los patrones radiales (definidos por los canales y picos).
- iv) La intensidad general del color del cromatograma (definido por la textura y evaluación visual).
- v) Las medidas de las diferentes zonas del cromatograma.

Tabla 3. Características de los patrones diferenciales de los cromatogramas.

Características del cromatograma	Medida del parámetro	Que representa	Abreviación
<u>Circulo Central</u>	Presencia y desarrollo (0= ausente – 5=completamente desarrollada)	La presencia de esta zona da una indicación de la fertilidad general del suelo. Estado de su estructura y porosidad.	ZCe
<u>Medición de zonas</u>	Radio total (mm)	La suma de los componentes del suelo: minerales, carbono y humus.	RT
	Radio círculo interno (mm)	Los patrones en la zona central informan sobre la presencia de minerales, los cuales paran antes en el papel de filtro.	RIn
	Amplitud anillo intermedio (mm)	Esta zona indica la presencia de proteínas, carbono orgánico y materia orgánica.	RIm
	Amplitud anillo exterior	Las "nubes" en los extremos de espigas indican la disponibilidad de nutrientes y humus para la planta.	REX
<u>Integración Zonas</u>	Suma del radio del anillo intermedio y exterior	La suma de la parte orgánica y mineral del suelo.	RIm + REX
	0=no integración – 5=completamente integrado	Integración de las diferentes zonas indican una buena salud del suelo y la integración de los diferentes componentes en el mismo.	Int
<u>Canales</u>	Número y desarrollo (0= ausente – 5=desarrollados)	Los canales sugieren presencia de microbiología e integración. Un buen suelo presentará los canales semejantes a plumas.	Can
<u>Picos</u>	Número y desarrollo (0 = ausentes, 5 = completamente desarrollados y desiguales)	Los cabos anchos, largos y desiguales indican buenas condiciones del suelo, así como diversidad biológica.	Pic
<u>Color</u>	Intensidad color (0=Borroso- 5=Intenso)	Colores cálidos y alta intensidad de color indican un suelo sano. Los colores más fríos sugieren suelos con menos carbono presente.	Col

i) Zona central.

Se valoró la zona central del cromatograma con una puntuación del 0 al 5 dependiendo de su grado de desarrollo; asignando la puntuación 0 en los casos que la zona central esté ausente y 5 cuando esta se encuentra totalmente desarrollada y presentando una deseable coloración crema (**Figura 13, Tabla 4**).



Figura 13. Grados de desarrollo de la zona central

Tabla 4. Valoración de la zona central dependiendo de su desarrollo

0	1	2	3	4	5
Ausente	Levemente presente	Levemente desarrollada	Desarrollo medio	Buen desarrollo	Completamente desarrollada

ii) Grado de integración entre anillos concéntricos

Cuando el suelo es de alta calidad, las zonas del cromatograma se mezclan con fluidez entre sí. Para la caracterización del grado de integración entre anillos concéntricos, se otorgó una puntuación del 0 (menor integración) al 5 (máxima integración; (**Figura 14 y Tabla 5**).



Figura 14. Grados de integración entre zonas del cromatograma

Tabla 5. Valoración de los cromatogramas dependiendo de la integración de sus zonas

0	1	2	3	4	5
No integrado con anillos presentes	Levemente integrado con anillos presentes	Integrado con anillos presentes	Integrado con anillos levemente presentes	Integrado sin anillos presentes	Completamente integrado

iii) Puntuación de los patrones radiales

Para los canales y los picos se otorgó 0 puntos cuando estos caracteres estaban ausentes y 5 puntos cuando su desarrollo era completo, siendo la máxima puntuación en el caso de los picos cuando había presencia de nubes en las terminaciones (presencia de moléculas disponibles para las plantas). Como límite entre la ZIm y la ZEx se consideraron las bases de las espigas. Los canales se puntuaron mediante su estructura (0 = ausente, 5 = completamente desarrollado; **Figura 15, Tabla 6**).

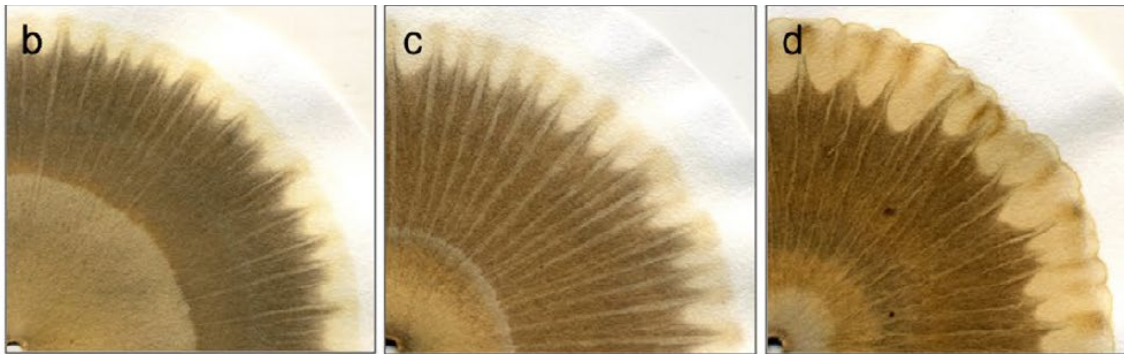


Figura 15. Grados de desarrollo de los canales

Tabla 6. Valoraciones dependiendo del grado de desarrollo de los canales

0	1	2	3	4	5
Ausente	Canales levemente visibles	Canales visibles estrechos y rectilíneos	Canales anchos y rectilíneos	Canales con formación levemente en pluma	Plumas completamente desarrolladas

Para la caracterización de los picos se observó su desarrollo (0 = ausente, 5 = completamente desarrollado y desiguales), correspondiendo las terminaciones en pico a puntuaciones medias (**Figura 16, Tabla 7**).

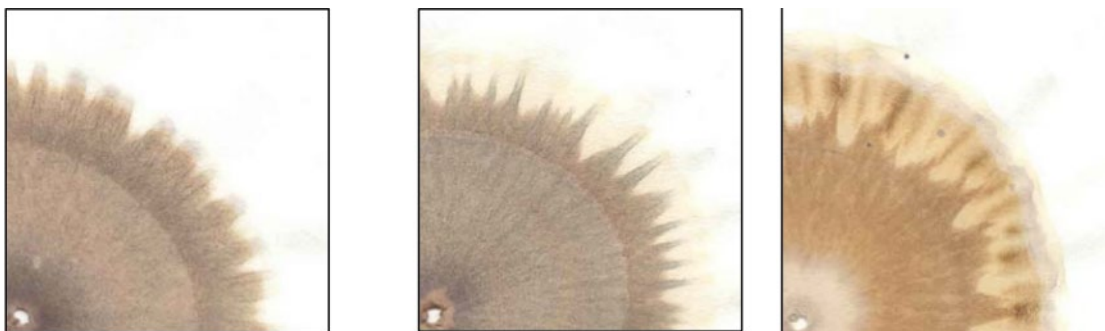


Figura 16. Grado de caracterización de los picos.

Tabla 7. Valoraciones dependiendo del grado de caracterización de los picos.

0	1	2	3	4	5
Ausentes	Levemente presentes	Presentes	Presentes y puntiagudos	Puntiagudos y desiguales	Desarrollados y desiguales

iv) Color del cromatograma

Para puntuar la intensidad del color se otorgó 0 puntos cuando el color se percibe como indeseable o borroso y 5 puntos cuando se percibe como intenso o deseable. Se acreditarán puntos intermedios en los casos de desarrollo intermedio del carácter (Figura 17, Tabla 8).



Figura 17. Grados de intensidad de color

Tabla 8. Valoraciones de los diferentes grados de intensidad de color

0	1	2	3	4	5
Borroso con tonos indeseables	Borroso con tonos deseables	Imagen con leves tonos deseables	Imagen con claros tonos deseables	Imagen con tonos deseados más intensos	Imagen totalmente desarrollada con tonos deseados

v) Medidas de las diferentes zonas del cromatograma.

La amplitud de las distintas zonas debe estar en proporción en un suelo equilibrado. Si una zona es pequeña o estrecha y la otra es ancha o grande, entonces el cromatograma está desequilibrado, al igual que el suelo.

Las medidas se realizaron siguiendo la metodología propuesta por *Kokornaczyk et al.* (2017). En cada cromatograma se tomaron cinco medidas aleatorias de cada parámetro y se calcularon los valores medios: radio total (RT, mm), radio del anillo interno (Rin, mm) donde se excluye el círculo central si este estuviera presente, amplitud del anillo intermedio (RIm, mm) y amplitud del anillo exterior (REx, mm). Otra medida incluye la suma del radio del anillo intermedio y exterior (RIm + REx, **Figura 18**). Para la medida de las zonas se utilizó una regla.

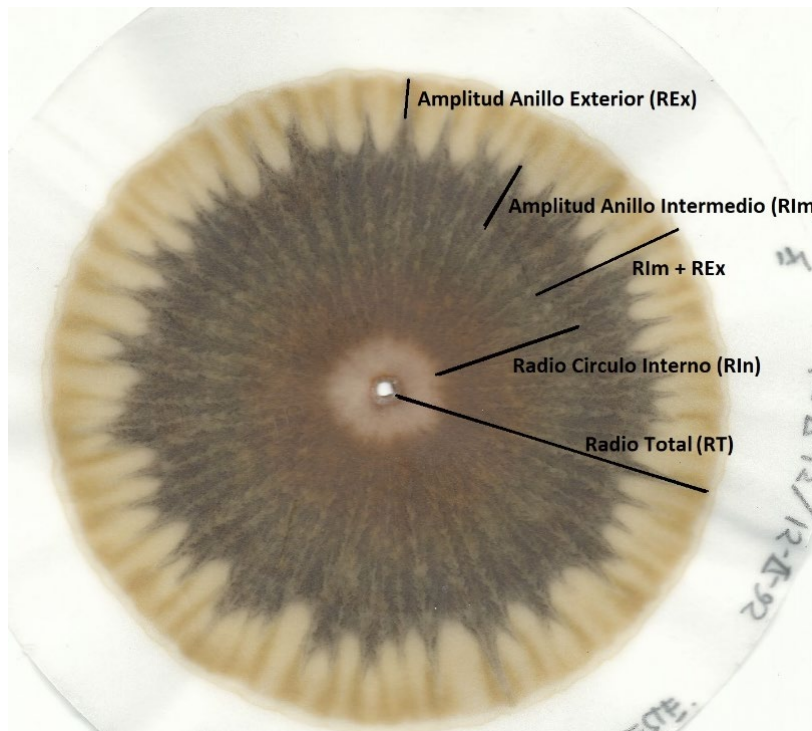


Figura 18. Mediciones realizadas en un cromatograma para su valoración.

3.4.- Análisis de los datos

El conjunto de datos se analizó estadísticamente con el fin de resumir y sistematizar los resultados de las muestras individuales, además de testar las diferencias estadísticas entre los indicadores químicos y biológicos en los olivares agroecológicos y sus convencionales pareados. Se utilizó el software estadístico RStudio, los paquetes instalados fueron “tidyverse”, “rstatix” y “ggpubr”.

Para los indicadores químicos y biológicos de calidad se realizó una prueba T de student pareada, para obtener el valor de p entre ambos manejos en los olivares. Para estudiar los efectos de la cubierta del suelo en los patrones de los cromatogramas, se realizó un análisis estadístico mediante el test de Wilcoxon Mann-Whitney (WMW); previamente se ejecutó un test de normalidad de Shapiro Wilk para los valores de interpretación en los cromatogramas. Se realizaron unas correlaciones de tipo Spearman para comprobar la relación entre las características de las variables cuantitativas y cualitativas referentes a los distintos indicadores de calidad del suelo.

4. RESULTADOS

4.1.- Efectos del manejo agrícola en los indicadores del suelo.

Indicadores químicos

Las muestras de suelo presentaron diferentes niveles de nutrientes, pH y conductividad (**Tabla A2. Anexo 4**). La **Tabla 9** muestra los valores de los diferentes indicadores químicos en los dos tipos de manejo agrícola: olivares agroecológicos frente al conjunto de datos provenientes de sus olivares adyacentes con suelos desnudos.

Tabla 9. Valores de los indicadores químicos en olivares con agroecológicos frente a los adyacentes con manejo convencional. La diferencia estadística corresponde a una prueba de T de Student pareada.

	Valor Medio \pm ds		Intervalo		Diferencia estadística
	Olivares cubierta	Olivares adyacentes	Olivares cubierta	Olivares adyacentes	
Potasio	56,17 \pm 79,62	26,23 \pm 26,71	3,8 – 275,28	5,59 – 87,71	0,274
Carbono %	0,75 \pm 0,78	0,39 \pm 0,38	0,06 – 2,06	0,02 – 1,21	0,182
Nitrógeno Total	1116,69 \pm 554,77	619,39 \pm 224,28	559,28 – 2095,32	249,84 – 957,91	0,017
Fosforo Total	370,07 \pm 91,85	307,82 \pm 120,66	252,41 – 529,26	139 – 498,7	0,210
pH	8,25 \pm 0,24	8,20 \pm 0,65	7,68 – 8,47	6,41 – 8,56	0,808
Conductividad	428,5 \pm 157,29	386,6 \pm 307,53	238 – 701	234 – 1251	0,705

Los valores medios de los indicadores químicos de las muestras de olivares agroecológicos son más altos, en general, que sus respectivos pareados adyacentes (**Tabla 9**), pero sólo el N total mostró diferencias estadísticamente significativas.

En los resultados del contenido de carbono de las muestras de suelo, se observa que difieren en gran medida desde valores muy bajos a valores muy altos (**Tabla A3, Anexo**

4). Todas las muestras procedentes de olivares agroecológicos presentaron valores más altos en los contenidos de potasio, nitrógeno total y fósforo total que sus respectivos pareados adyacentes (**Tabla A2, Anexo 4**); la conductividad se clasificó en todas las muestras de suelo en la categoría “no salina” (**Tabla A5, Anexo 4**), siendo mayores los valores de las muestras de los olivares agroecológicos que sus pareados adyacentes (**Tabla A2, Anexo 4**).

No se encontraron diferencias significativas al comparar los valores de pH referentes a los sistemas agrícolas agroecológicos frente a sus pareados adyacentes convencionales (**Tabla A2, Anexo 4**). Todas las muestras de suelo pertenecen a la categoría “Moderadamente alcalino” (**Tabla A4, Anexo 4**).

Indicadores biológicos

Se midieron las tasas de CO₂ y el contenido de glucosidasa para las muestras de suelo (**Tabla A6, Anexo 4**). En la **Tabla 10** se muestran los valores de los diferentes indicadores biológicos en los dos tipos de manejo agrícola: olivares agroecológicos frente al conjunto de datos provenientes de sus olivares adyacentes bajo manejo convencional.

Tabla 10. Valores biológicos de los datos pareados de los olivares agroecológicos frente a los convencionales. La diferencia estadística corresponde a una prueba de T de Student pareada.

	Valor Medio ± ds		Intervalo		Diferencia estadística
	Cubierta	Adyacente	Cubierta	Adyacente	
Respiración microbiana	0,350±0,137	0,267±0,06	0,224 - 0,673	0,173 – 0,361	0.096
Glucosidasa	1,21±0,62	0,68±0,36	0,44 – 2,44	0,18 – 1,17	0.033

Los valores más altos y valores medios (de glucosidasa y tasas de respiración **Tabla 10**) se corresponden con las muestras de los olivares agroecológicos cuando estos son comparados con sus pareados convencionales (**Tabla A6, Anexo 4**).

4.2.- Interpretación de los cromatogramas.

Para obtener un mejor conjunto de datos de los indicadores que muestran la calidad del suelo en los cromatogramas, se clasificaron estos en una escala de notas basado en los dos enfoques de valoración descritos anteriormente (**Tabla A1, Anexo 3**).

En la **Tabla 11** se muestran para cada valor los intervalos, los valores medios y valor de p . Se rechaza la hipótesis nula para el conjunto de valores visuales referentes a la zona central, integración, canales y picos; al contrario que con los datos referentes al radio total (mm) y radio intermedio (mm), los cuales muestran una distribución normal.

Tabla 11. Valores de los patrones en los cromatogramas mediante el test de normalidad de Shapiro Wilk

	Valor Medio \pm ds	Intervalo	Diferencia estadística
VALORACIONES VISUALES			
Zona central	0,95 \pm 1,23	0 – 4	0.00012
Integración	1,45 \pm 1,76	0 – 5	0.00073
Canales	1,95 \pm 1,76	0 – 5	0.02186
Picos	2,35 \pm 1,87	0 – 5	0.02004
Coloración	2,5 \pm 1,67	0 – 5	0.06599
MEDICIONES			
Zona central	1,75 \pm 2,22	0 – 7	0.00043
Radio Interior	33,25 \pm 7,79	13 – 40	0.00161
Radio Intermedio	17,2 \pm 4,51	12 – 28	0.06103
Radio Exterior	1,1 \pm 1,89	0 – 6	8.297e-06
Radio exterior + Radio intermedio	17,85 \pm 6,08	12 – 34	0.00546
Radio Total	53 \pm 1,77	50 – 57	0.4166

Efectos de la cubierta del suelo en los patrones de los cromatogramas

Todos los valores basados en mediciones de los cromatogramas de los suelos de olivares agroecológicos produjeron un valor medio significativamente más alto en todos los parámetros medidos, al compararlos con las muestras de suelos provenientes de sus adyacentes convencionales; salvo para el radio interior (zona mineral), siendo este generalmente mayores en los cromatogramas referentes a olivares con manejo convencional (**Tabla 12**).

Tabla 12. Valores cromatográficos de los datos pareados de los olivares agroecológicos frente a los convencionales. El contraste estadístico corresponde a un test de Wilcoxon Mann-Whitney.

	Valor Medio \pm ds		Intervalo		Diferencia estadística
	Cubierta	Adyacente	Cubierta	Adyacente	
Valoraciones basadas en puntuaciones visuales					
Zona central	1,6 \pm 1,43	0,3 \pm 0,48	0 – 4	0 - 1	0.013
Integración	2,1 \pm 1,85	0,8 \pm 1,47	0 – 5	0 - 4	0,055
Canales	2,6 \pm 1,77	1,3 \pm 1,56	0 – 5	0 - 4	0,104
Picos	3,1 \pm 1,91	1,6 \pm 1,57	0 – 5	0 - 4	0,091
Coloración	3,1 \pm 1,85	1,9 \pm 1,28	0 – 5	0 - 4	0,098
Valoraciones basadas en mediciones					
Zona central	3 \pm 2,49	0,5 \pm 0,85	0-7	0 -2	0.008
Radio Interior	30,3 \pm 9,08	36,2 \pm 5,13	13 – 40	26- 40	0.116
Radio Intermedio	19 \pm 4,78	15,4 \pm 3,59	13 – 28	12 – 24	0.080
Radio Exterior	1,8 \pm 2,34	0,4 \pm 0,96	0 – 6	0 – 3	0.079
Radio exterior + Radio intermedio	20,2 \pm 6,89	15,5 \pm 4,27	13 – 34	12 - 25	0.073
Radio Total	54 \pm 1,63	52 \pm 1,33	52 – 57	50 - 54	0.012

Todos los valores medios de los parámetros visuales basados en una atribución de puntos fueron mayores en los cromatogramas provenientes de olivares agroecológicos cuando estos fueron comparados con sus adyacentes convencionales; estos atributos son: la integración de zonas, coloración, la zona central, los canales y los picos (**Tabla 12**).

4.3.- Relación entre las características químicas y biológicas del suelo y la interpretación de los cromatogramas.

La **Tabla 13** muestra la relación entre las características de las variables cuantitativas y cualitativas referentes a los distintos indicadores de calidad del suelo.

En general, todas las correlaciones entre las valoraciones cromatográficas y los indicadores de calidad químicos y biológicos fueron positivas (**Tabla 13**), salvo en el caso del pH. El pH muestra solo correlación positiva con la medición del radio interior, este a su vez muestra correlaciones negativas con todos los demás indicadores de calidad químicos y biológicos. Las correlaciones entre las tasas de producción de CO₂ y la medición del radio total y el radio interior también fueron negativas.

Tabla 13. Correlaciones (valores r de Spearman) entre las valoraciones cromatográficas y los análisis químicos y microbiológicos.

	Potasio	Carbono	Nitrógeno Total	Fósforo Total		pH	Conductividad	Glucosidasa	CO ₂
	Valoraciones Visuales								
Zona central	0,5 *	0,59 **	0,76 ****	0,14		-0,33	0,38	0,41	0,28
Integración	0,39	0,64 **	0,74 ***	0,026		-0,43	0,29	0,46 *	0,35
Canales	0,4	0,62 **	0,79 ****	0,11		-0,43	0,29	0,47 *	0,37
Picos	0,35	0,58 **	0,74 ***	0,1		-0,42	0,29	0,38	0,31
Coloración	0,34	0,61 **	0,83 ****	0,29		-0,59 *	0,52 *	0,45 *	0,39
	Medición Zonas								
Zona central	0,45 *	0,57 **	0,73 ***	0,17		-0,37	0,42	0,41	0,32
Radio Interior	-0,37	-0,52 *	-0,06 **	-0,07		0,38	-0,26	-0,48	-0,41
Radio Intermedio	0,28	0,51 *	0,71 ***	0,17		-0,31	0,34	0,4	0,32
Radio Exterior	0,22	0,59 **	0,66 **	0,027		-0,33	0,28	0,34	0,38
Radio exterior + Radio intermedio	0,22	0,5 *	0,67 **	0,1		-0,27	0,25	0,32	0,23
Radio Total	0,2	0,23	0,39	0,27		-0,14	0,22	0,0077	-0,19

ns = $p > 0.05$; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$

Hay correlaciones fuertes y significativas en los contenidos de carbono y nitrógeno con todas las valoraciones visuales de los cromatogramas. El contenido de potasio, el pH, la glucosidasa y la respiración microbiana mostraron correlaciones más débiles para las valoraciones visuales de los cromas que el carbono y nitrógeno, seguidas de la conductividad. El contenido en fósforo muestra las correlaciones más débiles con las valoraciones visuales en los cromatogramas, salvo para la coloración.

En el caso de los análisis de laboratorio y las mediciones de las distintas zonas en el cromatograma, el carbono y nitrógeno muestran las correlaciones más fuertes, salvo para el radio total en ambos, y el radio interior para el caso del nitrógeno. Para el potasio, pH, conductividad y tasa de CO₂ estas correlaciones fueron débiles. El fósforo muestra las correlaciones más débiles con las mediciones de las distintas zonas del cromatograma.

5. DISCUSION

Este estudio tiene como objetivo principal evaluar la integridad ecológica del suelo en olivares con manejo agrícola contrastado y como objetivos específicos analizar la calidad del suelo mediante la cromatografía circular de Pfeiffer y validar esta técnica como herramienta para la evaluación y el seguimiento de la integridad ecológica de los suelos agrícolas. Planteamos las hipótesis de que los suelos de los olivares con prácticas agroecológicas tendrán una mayor integridad ecológica que los suelos de olivares con manejo convencional, así como que la cromatografía circular es una herramienta útil para evaluar la integridad ecológica de los suelos.

5.1.- Interpretación de los cromatogramas.

Se encontraron correlaciones positivas entre todos los indicadores cuantitativos y cualitativos de calidad e integración del suelo medidos, salvo para el pH y radio interior (**Tabla 13**).

El contenido de carbono y nitrógeno mostraron las correlaciones más fuertes con las valoraciones visuales de los cromatogramas (zona central, integración, picos, canales y coloración) (**Tabla 13**); para los indicadores biológicos (glucosidasa y CO₂), los cuales, según *Ford et al.*, (2020) son algunos de los indicadores que muestran unas de las correlaciones más fuertes con los cromatogramas, estas correlaciones, aunque positivas, fueron más débiles (**Tabla 13**). Este hecho apoya parcialmente la hipótesis de *Kokornaczyk et al.*, 2017, el cual mostró que los rasgos de los cromatogramas están fuertemente correlacionados con el contenido de materia orgánica y que una mayor actividad microbiana conduce a cromatogramas de colores más intensos (*Pfeiffer, 1984*). En los ecosistemas mediterráneos el carbono orgánico del suelo está fuertemente correlacionado de forma positiva con la actividad microbiana (*Guenon et al.*, 2013; *Hamman et al.*, 2007; *Muñoz-Rojas et al.*, 2016), por lo que esperábamos que ambos indicadores de calidad estuvieran asociados de igual manera en nuestro estudio. En el caso del fósforo, estas correlaciones aun siendo positivas fueron las más débiles (**Tabla 13**), al contrario de lo reportado por *Kokornaczyk et al.* (2017), esto puede ser al número limitado de muestras en nuestro estudio. El pH muestra correlaciones negativas con las

valoraciones visuales de los cromatogramas (**Tabla 13**), al contrario que lo reportado por *Ford et al.* (2021); esto puede ser debido a que el rango de pH de las muestras de su estudio fué más amplio. La conductividad y niveles de potasio mostraron correlaciones positivas de rango medio con los valores visuales de integridad mostrados en los cromatogramas (**Tabla 13**).

Para las distintas mediciones de las zonas en los cromatogramas las correlaciones fueron positivas con los indicadores químicos y biológicos de calidad (**Tabla 13**). Solo el radio interior muestra correlaciones negativas con los niveles de carbono, glucosidasa y respiración microbiana (**Tabla 13**), esto puede ser debido al avanzado estado de mineralización de la materia orgánica, (*Pfeiffer, 1984*). Para el nitrógeno y fósforo estas correlaciones, aunque negativas fueron más débiles (**Tabla 13**).

Los cromatogramas de los suelos con mayor contenido orgánico y actividad microbiana muestran una amplitud de la zona externa e intermedia (y por lo tanto la suma de ambos) significativamente mayor que los suelos con menor contenido de estos (**Tabla A1, Anexo 3**) (**Tabla A2, Anexo 4**); las correlaciones entre ambos indicadores de integridad y calidad se mostraron positivas (**Tabla 13**), *Kokornaczyk et al.* (2017) mostró en su estudio una relación positiva entre estos parámetros de calidad.

Las posibles razones por las que nuestras hipótesis no se han confirmado en su totalidad, puede ser debido al número limitado de muestras analizadas en el presente estudio; además, estas hipótesis se establecieron basándose en un pequeño número de estudios publicados. Estas investigaciones anteriores sobre la relación entre parámetros del estado del suelo y las características del cromatograma se basan en un número muy bajo de muestras (*Kokornaczyk et al., 2017*) o en evaluaciones cualitativas sin fundamento (*Follador, 2015; Saavedra et al., 2018*); además dichos estudios provienen de diferentes partes del mundo, pudiendo tener diferencias en la biología y características del suelo y por lo tanto en las características mostradas en el cromatograma.

En el presente TFM no se procede a ningún análisis de las propiedades físicas de las muestras, es por ello una futura investigación teniendo en cuenta estas propiedades es requerida para una mayor comprensión de la técnica cromatográfica.

5.2.- Manejo agrícola e integridad ecológica del suelo.

La variabilidad obtenida en los valores de las características de los cromatogramas entre ambos manejos del suelo (**Tabla A1, Anexo 3**), es de suficiente magnitud como para sugerir que una respuesta en estas características puede estar relacionado con el cambio del estado del suelo y la integridad ecológica del mismo; siendo esta variabilidad similar a los comunicados por *Kokornaczyk et al.* (2017). Las muestras de suelo provenientes de los olivares agroecológicos se corresponden con una mayor valoración de las puntuaciones visuales mostradas en los cromatogramas, y contrariamente una disminución de las valoraciones en los cromatogramas se corresponden a olivares con manejo convencional (**Tabla A1, Anexo 3**).

Para el caso de las mediciones en los cromatogramas, el radio total, radio intermedio, radio exterior y la suma de los radios intermedio y exterior es mayor en los olivares agroecológicos que sus pareados adyacentes (**Tabla A1, Anexo 3**); la longitud del radio interior de forma generalizada es mayor en los suelos con manejo convencional (**Tabla A1, Anexo 3**), lo cual es debido a la mineralización de la materia orgánica (*Restrepo y Pinheiro, 2011*). El valor medio del radio intermedio de los olivares agroecológicos se muestra más amplio que sus pareados adyacentes, al igual que el radio exterior y por lo tanto la suma de ambos (**Tabla A1, Anexo 3**).

Ford et al. (2021), menciona la importancia de la similitud en la amplitud de los radios interior y exterior que muestra un cromatograma, mostrando una relación directa con los indicadores de calidad de un suelo. En nuestro caso, la diferencia entre los valores medios de ambos radios en los olivares agroecológicos es menor que la resultante entre estos dos radios en olivares sin cubierta. Este hecho indica que los suelos de los olivares agroecológicos son más íntegros que los suelos de los olivares manejados convencionalmente.

Los diferentes manejos del suelo influyen en la concentración de materia orgánica y por consiguiente en el porcentaje de carbono presente en el suelo. Los suelos manejados agroecológicamente tienden a presentar un mayor contenido de materia orgánica (**Tabla A2, Anexo 4**) ya que el sistema radicular de las gramíneas en las cubiertas vegetales tiene un alto contenido de lignina, la cual favorece esta acumulación (*Primavesi, 1982*).

Las muestras de suelo procedentes de los olivares con prácticas agroecológicas, muestran mayor contenido en nitrógeno total (**Tabla A2, Anexo 4**); esto es debido a que los cultivos de cobertura desempeñan una gran cantidad de funciones, actuando como fuente de nitrógeno disponible para las plantas y de nutrientes de liberación lenta (*Doran y Smith. 1991*). Contrariamente, un disturbio de las propiedades físicas del suelo reduce el carbono y nitrógeno orgánico del suelo, generalmente reduciendo el contenido de estos ligados a la materia orgánica. El bajo contenido de materia orgánica se debe a que el suelo se mantiene al descubierto, sin reposición de fuentes de carbono y expuesto a altas temperaturas, favoreciendo la mineralización de la materia orgánica (*Moreira y Siqueira 2006*) y su oxidación. Es por ello, los cultivos de cobertura deben utilizarse como herramienta de gestión para secuestrar el nitrógeno en la reserva de materia orgánica del suelo (*Meisenger y Schomberg. 2010*).

Soltangheisi et al. (2018) destacan el papel de las cubiertas vegetales en la acumulación de fósforo en el suelo y su disponibilidad para los cultivos; a su vez *Hallama et al. (2019)* estudian el papel de la microbiología en el ciclo del fósforo en agroecosistemas bajo cubiertas vegetales dando una gran importancia a la asimilación de este debido a la actividad microbiana. En el presente estudio todas las muestras provenientes de olivares agroecológicos muestran mayores niveles de fósforo (**Tabla A2, Anexo 4**), salvo en la muestra de suelo de la finca 8p, esto puede ser debido al uso de fertilizantes fosforados en el programa de fertilización.

Para los valores de salinidad, en las muestras de suelo provenientes de las cubiertas vegetales se observa valores mayores que sus pareados convencionales (**Tabla A2, Anexo 4**). Esto es debido al mayor contenido de minerales en estas muestras, así como el mayor contenido en materia orgánica, la cual aumentaría la capacidad de intercambio catiónico del suelo (*Tunstall. 2005*).

Al seleccionar agrosistemas olivareros con las mismas características edáficas (calciol háplico), los valores de pH fueron similares en ambos manejos (**Tabla A2, Anexo 4**), este hecho apoya de una forma más robusta la mayor diferenciación cromatográfica dependiendo del manejo del suelo.

Los sistemas agrícolas bajo con un manejo convencional del suelo presentan valores más bajos de respiración microbiana (**Tabla A6, Anexo 4**), esta práctica acelera el proceso de descomposición de la materia orgánica, aumentando la actividad microbiana poco

después de la perturbación. Si no hay suficientes residuos para mantener la población microbiana, ésta se descompone y, en consecuencia, se produce una disminución de su actividad (*Cherubin et al., 2015*). Los sistemas agrícolas que proporcionan un mantenimiento de la cubierta del suelo tienden a tener un mayor ciclo de residuos, aumentando la biomasa microbiana y, en consecuencia, una actividad biológica estable (*Kuzyakov, 2010*). Esto no se cumple en las muestras pareadas 5 y 5p, pudiendo estar relacionado este valor con el reciente establecimiento del sistema de no labranza que aún no ha provocado un aumento de las tasas de respiración. Otro factor que puede haber influido en este resultado es la reducida presencia de plantas en el momento del muestreo, proporcionando una menor presencia de raíces, perjudicando la entrada de sustratos de carbono, los cuales son importantes para el mantenimiento de la actividad microbiana (*Bopaiyah y Shetti 1991*).

Las enzimas en el suelo son esenciales para la transformación de energía y el ciclaje de nutrientes, y son producidas por plantas, animales y microorganismos (*Baležentienė y Klimas 2009*). En las muestras de suelo, los valores de glucosidasa son mayores en los olivares agroecológicos (**Tabla A6, Anexo 4**), cumpliendo así un papel vital en procesos tales como la mineralización, inmovilización de nutrientes y fijación biológica (*Carpa 2009*). Para las muestras pareadas de las fincas 8 no fue así, esto puede ser debido a que una parte de las enzimas de suelo son extracelulares, y liberadas durante el metabolismo y muerte celular, otras son intracelulares y que forman parte de la biomasa microbiana o bien están adsorbidas en la materia orgánica y en el sistema coloidal, lo cual sugiere que el suelo puede actuar como un reservorio temporal. Lo anterior implica que en un momento dado la actividad enzimática podría no estar ligada necesariamente con la actividad microbiana (*Paul y Clark 2007*).

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este estudio son las siguientes:

1. La integridad ecológica del suelo en los olivares con prácticas agroecológicas fue mayor que en los olivares con manejo convencional, de acuerdo con la hipótesis de partida. Esto fue puesto de manifiesto tanto por los indicadores químicos y

biológicos de la calidad del suelo analizados como por las características mostradas en los cromatogramas.

2. Los patrones de los cromatogramas pueden considerarse una fuente de información integrada y fiable de la calidad e integridad ecológica del suelo. En particular, la fuerte diferenciación radial, la intensa coloración, la mayor integración entre zonas, el desarrollo de la zona central y la amplitud de las zonas externa e intermedia son evidencias visibles de buena calidad del suelo, mientras que la diferenciación concéntrica de los patrones, la mayor longitud del radio interior y los colores borrosos indican un suelo poco fértil.
3. La cromatografía es un análisis económico y fácil de realizar que puede sustituir parcialmente los análisis químicos del suelo, principalmente en los casos en los que se necesita una comparación de la fertilidad esperada, de acuerdo con la hipótesis segunda. Los cromatogramas se interpretan de forma más holística y visual por su forma, color y patrón, sin mediciones cuantitativas de los indicadores de calidad.
4. El presente TFM revela la necesidad de un estudio más amplio y detallado para establecer mejores correlaciones entre los indicadores cuantitativos de la calidad del suelo y las características cualitativas de integridad ecológica manifestadas por los cromatogramas, así como para una mejor comprensión y uso de la técnica cromatográfica circular de Pfiffer.

7. BIBLIOGRAFIA

- Andrade, Fernando H., La tecnología y la producción agrícola. El pasado y los actuales desafíos. *Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*. Anales Tomo LXV. 105-143. Argentina.
- Aronson, J., Goodwin, N., Orlando, L., Eisenberg, C., Cross, A. 2020., A world of possibilities: six restoration strategies to support the United Nation's Decade on Ecosystem Restoration. *Restoration Ecology* 28 (4):730-736.
- Astier-Calderón, M., Maass-Moreno, M., Etchevers-Barra, J. 2002., Derivación de indicadores de calidad de suelos en el contexto de la agricultura sustentable. *Agrociencia* 36 (5):605 – 620.
- Balezentiene, L., Klimas, E. 2009. Effect of organic and mineral fertilizers and land management on soil enzyme activities. *Agronomy Research* 7(Special issue I): 191–197.

- Bopaiah, B., Shetty, H. S. 1991. Soil microflora and biological activities in the rhizosphere and root regions of coconut based multi storey cropping and coconut monocropping systems. *Soil Biology Biochemistry*, 23(1): 297-302.
- Bradford, J. M., & Peterson, G. A. 2000. Conservation tillage. *Handbook of soil science*. pp 247-266. CRC Press. Boca Raton. Florida.
- Budhu, M., 2007. *Soil mechanics and foundations*. pp 634. 2da. ed. John Wiley & Sons Inc. New Jersey, USA.
- Brinton, W., 2010. Assessing Compost and Humus Condition by Circular Chromatography. *Journal of the woods end research lab* 1:1.
- Brookes, D. C., 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils*, 19 (4): 269-279.
- Campbell, C.D., Chapman, S. J., Cameron, C. M., Davidson, M. S., Potts, J.M. 2003. A Rapid Microtiter Plate Method To Measure Carbon Dioxide Evolved from Carbon Substrate Amendments so as To Determine the Physiological Profiles of Soil Microbial Communities by Using Whole Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (6): 3593–3599.
- Carpa R. 2009., Enzymological research on soils from different environments. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology* 16(1):44-48.
- Chazarra, A., Flórez, García, E., Peraza, B., Tohá Rebull, T., Lorenzo Mariño, B., Criado, E., Moreno García, J. V. et al. 2018. *Mapas climáticos de España (1981-2010) y ETo (1996-2016)*. Agencia Estatal de Meteorología. España.
- Cherubin, M., Eitelwein, M., Fabbris, C., Weirich, S., Ferreira da Silva, R., Rodrigues da Silva, V., Basso, C. J., 2015. Qualidade física, química e biológica de um Latossolo com diferentes manejos e fertilizantes. *Revista Brasileira Ciência do Solo*, 39(2), 615-625.
- Corwin, D.L., Lesch, S. M., 2005. Apparent soil electrical conductivity measurements in agriculture. *Computers and Electronics in Agriculture*, 46 (1–3), 11-43.
- Dexter, A.R., 2004. Soil physical quality. Part I. Theory, effect of soil texture, density and organic matter, and effect on root growth. *Geoderma*. 120 (3-4), 201:214.
- Doran, J. W., Scott Smith, M., 1991. Role of cover crops in nitrogen cycling. *Cover crops for clean water*. Citeseer.
- Doran, J. W., Parkin. T. B., 1994. Defining and Assessing Soil Quality. *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*, 35 (1).
- Doran, J.W., Parkin, T. B., 1996. Quantitative indicators of soil quality: A minimum data set. In *Methods for Assessing Soil Quality*. *Soil Science Society of America*, pp. 25–37. Madison, WI, USA.
- Doran J.W., Parkin, T. B., 1997. Quantitative Indicators of Soil Quality: A Minimum Data Set. *Methods for Assessing Soil Quality*, 49 (2).
- Douglas, K., Stott, D., 1994. A Framework for Evaluating Physical and Chemical Indicators of Soil Quality. *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*, 35 (4).
- Ellis. E., 2015. Ecology in an anthropogenic biosphere. *Ecological society of America*, 85 (3), 287-331.
- European Commission 2005. Soil Atlas of Europe. *Joint Research Center*.

- European Commission., 2020. Farm to fork strategy. For a fair, healthy and environmentally friendly food system. European Green Deal.
- Foley, J., Defries, R., Asmer, G., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S. et al. 2005. Global Consequences of Land Use. *Science* 309 (5734), 570-574.
- Follador, B., 2015. Portraying soils and compost: color, form, and pattern. *Context* 34, 7-8.
- Food and Agriculture Organization 2008. *Visual Soil Assessment, Field Guide Olives Orchard*.
- Ford, B., Cook, B., Tunbridge, D., Tilbrook, P., 2019. Using paper chromatography for assessing soil health in southwestern Australia. Centre of Excellence in Natural Resource Management. University of Western Australia.
- Ford, B., Stewart, B., Tunbridge, D., Tilbrook, P., 2021. Paper chromatography: An inconsistent tool for assessing soil health. *Geoderma* 383: 114783.
- Freitas, L., Amorim de Oliveira, I., Santos Silva, L., Vieira Frare, J. C., Filla, V.A., Pimenta, R. 2017. Indicadores da qualidade química e física do solo sob diferentes sistemas de manejo. *Revista Unimar Ciências*, 26 (1), 1-12.
- García, Y., Ramirez, W., Sanchez, S. 2012. Indicadores de la calidad de los suelos: una nueva manera de evaluar este recurso. *Pastos y forrajes* 35 (2) :125-138.
- Griffin, E. 2013. Soil organic carbon. In: Report card on sustainable natural resource use in agriculture. *Department of Agriculture and Food, Western Australia*.
- Hallama, M., Pekrun, C., Lambers, H., Kandeler, E. 2019. Hidden miners – the roles of cover crops and soil microorganisms in phosphorus cycling through agroecosystems. *Plant and Soil* 434: 7–45.
- Haßold-Piezunka, N., 2003. Suitability of the chroma soil tests to determine compost quality and degree of decomposition. *Dissertation for a doctor degree presented at the Department of Mathematic and Natural Sciences*. Oldenburg: Carl-von-Ossietzky-University (in German).
- Hazleton, P.A. & Murphy, B.W., 2016. Interpreting soil test results: What do all the numbers mean? Third edn. *CSIRO publishing*, Clayton South.
- Henríquez, C., Uribe, L., Valenciano, A., Nogales, R. 2014. Actividad enzimática del suelo - Deshidrogenasa, -glucosidasa, Fosfatasa y Ureasa- bajo diferentes cultivos. *Agronomía Costarricense* 38(1): 43-54.
- Júnior, D., Caroline de Assis Valadão, F., Silva, G. J. 2017. Organic matter and physical attributes of an oxisol under different management. *Revista Ciência Agronômica*, 26(3), 237-250.
- Laban, P., Metternitch, G., Davies, J. 2018. *Biodiversidad de suelos y carbono orgánico en suelos: cómo mantener vivas las tierras áridas*. UICN, Gland, Suiza.
- Laffely, A., Susan Erich, M. Mallory, E. B. 2020. Evaluation of the CO2 flush as a soil health indicator. *Applied Soil Ecology* 154, 103594.
- Lehman, R., Cambardella, C., Stott, D., Acosta-Martinez, V., Manter, D., Buyer, J. et al. 2015 Understanding and Enhancing Soil Biological Health: The Solution for Reversing Soil Degradation. *Sustainability*, 7 (1), 988-1027.
- Maseda, T. 2016. *Desarrollo y Caracterización del Método de Dinamólisis Capilar para el Análisis de Suelos Contaminados: estudio de los suelos de Linares*. Tesis (Doctoral). E.T.S.I de Minas y Energía (UPM).

- Meisinger, J., Schomberg, H. 2010. *Using cover crops and cropping systems for nitrogen management. Advances in nitrogen management.* Chapter 9. Academia.edu
- Muñoz-Rojas, M., Erickson, T., Dixon, K., Merritt, D. 2016. Soil quality indicators to assess functionality of restored soils in degraded semiarid ecosystems. *Restoration Ecology* 24 (52): 543-552.
- Moreira, F. M. S., et al. 2006. *Microbiologia e Bioquímica do Solo. (2nd ed.)*. p. 729. Universidade Federal de Lavras. Lavras.
- Navarro, A., Figueroa, B., Martinez, M., González, F., Osuna, E. S. 2008. Indicadores físicos del suelo bajo labranza de conservación y su relación con el rendimiento de tres cultivos. *Agricultura Técnica en México.* 34 (2):151.
- Paul, E., 2007., *Soil Microbiology and Biochemistry.* p 275. Academic Press.
- Paustian, K., Vernon, C., Sauerberck, D., Sampson, N. 1998. CO₂ Mitigation by Agriculture: An Overview. *Climatic Change* 40: 135–162.
- Perumal, K., Ananthi, S., Arunkumar, J. 2016. Innovate and simplest Alternative Analytical Technology (AAT) for testing soil nutrients. *Soil Science Research*, I (1) 22-31.
- Pfeiffer., 1984. *Chromatography applied to quality testing.* Bio-Dynamic Farming and Gardening Association, USA.
- Porta Casanellas, J., López-Acevedo Reguerín, M., Roquero de Laburu, C. 2003. *Edafología: para la agricultura y el medio ambiente.* 3ra. ed. p 929. Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Primavesi, A., 1982. *Manejo ecológico do solo: agricultura em regiões tropicais.* p. 549. Nobel. São Paulo.
- Restrepo, J., Pinheiro, S. 2011. *Cromatografía. Imágenes de vida y destrucción del suelo.* Coas Ediciones.
- Revistaquercus.es. *Especial life olivares vivos armonizar agricultura y biodiversidad.* Especiales quercus.
- Ribó, M., 2003. *Balance de macronutrientes y materia orgánica en el suelo de agrosistemas hortícolas con manejo integrado y ecológico.* Universitat de València, Valencia.
- Rodríguez-Entrena et al., 2013. Adoption of conservation agriculture in olive groves: Evidences from southern Spain. *Land Use Policy* 34: 294-300.
- Saavedra, T., Figueroa, F., Caballero, V. 2018. Chromatography of Pfeiffer in the analysis of soils of productive systems. *Revista Mexicana de ciencias agrícolas* 9:3.
- Sanderson, E., Jaiteh, M., Levy, M., Redford, K., Wannebo, A., Woolmer, G. 2002. The Human Footprint and the Last of the Wild: The human footprint is a global map of human influence on the land surface, which suggests that human beings are stewards of nature, whether we like it or not. *BioScience*, 52 (10): 891–904.
- Singer, M.J., Ewing, S., 2000. *Soil quality. In: Handbook of soil science.* p 271. Ed. M.E. Sumner. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- Slattery, W. J., Conyers, M. K., Aitken, R. L. 1999. *Soil pH, aluminium, manganese and lime requirement. In 'Soil analysis: An interpretation manual.* pp. 103–128. CSIRO Publishing: Melbourne.
- Smith, P., Martino, D., Cai, Z., Gwary, D., Janzen, H., Kumar, P et al 2008. Greenhouse gas mitigation in agriculture. *The Royal Society* 363 (1492): 789–813.

- Soltangheisi, A., Rodrigues, M., Arruda Coelho, M.J., Marcos Gasperini, A., Ricardo Sartor, L., Sergio Pavinato, P. 2018. Changes in soil phosphorus lability promoted by phosphate sources and cover crops. *Soil and Tillage Research* 179: 20-28.
- Stott, D. E., Andrews, S. S., Liebeg, M. A., Wienhold, L. J., Karlem, D. L. 2010. Evaluation of β -glucosidase activity as a soil quality indicator for the soil management assessment framework. *Soil Science Society of America Journal*, 74(1): 107-119.
- Sun, W., Huang, W., Zhang, W., Yu, W. 2010. Carbon sequestration and its potential in agricultural soils of China. *Global Biogeochemical Cycles* 24 (3).
- Tunstall, B., 2005. *Dryland salinity implications of interactions between clay, organic matter, salt and water in soils*. eric.com.au.
- Kononova, M. M., 1966. *Soil Organic Matter: Its Nature, Its Role in Soil Formation and in Soil Fertility*. 2nd Edition. Pergamon Press, London.
- Kononova, M. M., Bordas de Muntan, E. 1982. *Materia orgánica del suelo: su naturaleza, propiedades y métodos de investigación*, p. 365. Oikos-Tau Barcelona. España.
- Kokornaczyk, M. O., Primavera, F., Luneia, R., Baumgartner, S., Betti, L. 2016. Analysis of soils by means of Pfeiffer's circular chromatography test and comparison to chemical analysis results. *Biological Agriculture & Horticulture* 33 (3): 143-147.
- Kuzyakov, Y., 2010. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology Biochemistry*, 42(9), 1363-1371.
- Wolters, V. 2000., Invertebrate control of soil organic matter stability. *Biology and Fertility of Soils*. 31 (1):1-19.

ANEXOS

ANEXO 1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE SUELO Y CROMATOGRAMAS

Preparación y secado de las muestras de suelo.

Una vez transportadas las muestras, se ponen a secar indirectamente al sol o a media sombra, extrayendo piedras, palos y otros objetos no deseados (**Figura A1**).

Cuando estén totalmente secas las muestras se toman submuestras de 100 gramos y se pasan por un colador o tamiz de plástico, con la finalidad de lograr una



Figura A1. Secado de las muestras de suelo

mejor uniformidad en las partículas de suelo antes de su pulverización.

Con el suelo seco a temperatura ambiente y debidamente tamizado (partículas inferiores a 2mm), se muele suavemente la muestra con la ayuda de un mortero de cerámica hasta obtener un polvo homogéneo.

Extracción de las muestras de suelo con solución de extracción (1%NaOH)

Posteriormente se pesan 5 g y se mezclan con 50 ml de solución de NaOH al 1% previamente preparada (1 gramo NaOH en 100 ml de agua destilada). En nuestro caso, al ser 20 muestras de suelo se prepararon 1000 ml de solución.

La solución resultante se agita convenientemente seis veces en ambas direcciones (izquierda y derecha) durante distintos tiempos: 1) inmediatamente después de haber mezclado el suelo con la solución de hidróxido de sodio, 2) a los quince minutos y 3) a la hora. A continuación, la solución se debe dejar en reposo absoluto durante 6 horas antes de proceder a la realización del cromatograma (**Figura A2**).

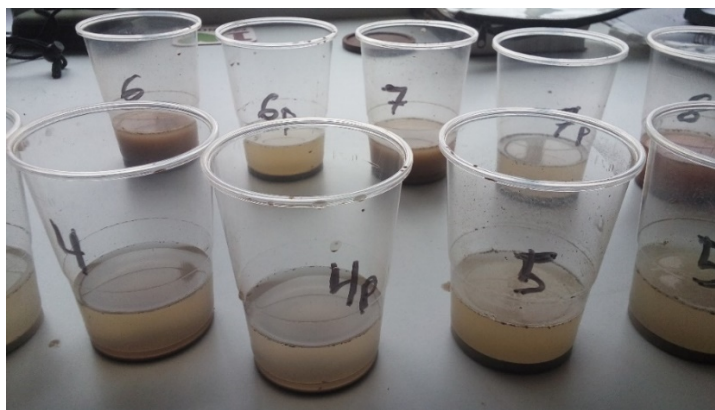


Figura A2. Solución de suelo en Hidróxido de sodio 1% en reposo 6 horas

Los solutos, agregados coloidales y partículas en suspensión del suelo, tanto inorgánicos como orgánicos, tienen oportunidad de reaccionar con el hidróxido de sodio presente. Los iones de OH^- y de Na^+ son muy reactivos y alteran químicamente estos componentes del suelo, produciendo nuevas moléculas, rompiendo estructuras macromoleculares, alterando la solubilidad y formando nuevos complejos coloidales o en suspensión. La materia orgánica por su composición es más propensa a reaccionar con el hidróxido de sodio.

Preparación de los papeles de filtro

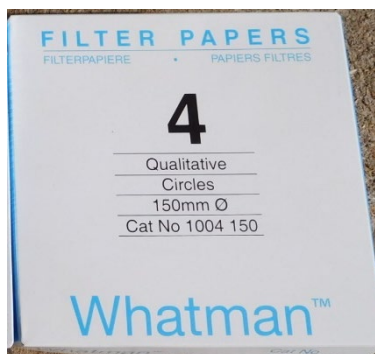


Figura A3. Papeles de filtro

Se trata de una cromatografía horizontal en papel circular, teniendo el centro de este como punto de entrada de la solución.

Se utiliza un papel de filtro de trama definida, se recomienda papel de la marca “Whatman”, número 4 para analizar suelos (**Figura A3**) y 150mm de diámetro.

Los papeles de filtro se preparan haciendo un pequeño agujero con un perforador de 2 mm en el centro del papel y colocando marcas de lápiz a 4 cm y 6 cm del centro (**Figura A4**).



Figura A4. Perforación del papel de filtro

Por otro lado, se hacen cuadrados de 2 x 2 cm de longitud con papel de filtro y se enrollan de forma cilíndrica para poder ser insertadas en el agujero perforado en el centro del papel de filtro circular. El objetivo de este pabilo será servir de medio para la ascensión de las soluciones de Nitrato de Plata 0,5% e Hidróxido de Sodio 1% para la impregnación del papel de filtro circular (**Figura A5**).

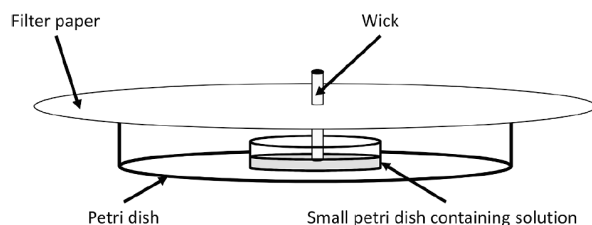


Figura A5. Esquema de la impregnación de un cromatograma con una solución de AgNO_3 o de NaOH

Impregnación de los papeles de filtro con solución de revelado (AgNO_3 0,5%)

Se llena una placa pequeña de Petri de aproximadamente 3 mm de profundidad con una solución de nitrato de plata al 0,5% (0,5 g de AgNO_3 en 100 ml de agua destilada) y se coloca en el interior de una placa de Petri más grande (**Figura A5**).

El papel de filtro con el pabilo insertado en el centro se coloca sobre la caja de Petri pequeña, asegurándose de que el pabilo este en la solución de nitrato de plata. La solución se deja empapar a través del papel de filtro hasta que alcanza 1-2 mm anterior de la marca de 4 cm (**Figura A6**). Inmediatamente después de que se haya impregnado esta parte con la solución, se retira el papel de la placa de Petri y se desecha el pabilo.



Figura A6. Pasos para la impregnación de la solución de AgNO_3 en el papel de filtro

El objetivo es dejar la superficie central del papel (4 cm de radio, en un papel de filtro con radio de 7.5 cm) impregnada con AgNO_3 , a fin de que cuando discurra sobre esa

zona la solución de suelo, los solutos puedan reaccionar con el nitrato de plata. Los solutos son partículas de arcillas, de limos y materia orgánica que previamente han tenido ocasión de reaccionar con el hidróxido de sodio.

Posteriormente, para el secado de los filtros se debe cubrir papel absorbente por ambas caras (sin presionar) e introducir el conjunto en una caja que esté absolutamente a oscuras por un tiempo mínimo de 4-6 horas dependiendo de las condiciones ambientales de temperatura y humedad. El objetivo de esto es evitar la luz que haría precipitar la plata metálica y conseguir que el papel de filtro esté seco completamente antes de correr la solución de suelo en el papel de filtro.

Difusión del extracto de suelo

La intención de dejar en reposo absoluto la solución del suelo durante seis horas es evitar las partículas mayores en la zona superficial de la solución; del sobrenadante se extraen 10 – 15 ml con la ayuda de una jeringa con aguja. De ese modo extraeremos únicamente, aparte de agua, iones y partículas en suspensión de materia orgánica, arcilla y limos de pequeño tamaño.

Se depositan en una caja petri de pequeño diámetro, y esta se coloca en el centro de otra de mayor diámetro vacía. El objeto de la caja petri mayor es que soporte el papel de filtro sin que se doble al correr el cromatograma.

Sacamos el papel de filtro secado e impregnado en nitrato de plata y colocamos un pabilo en el hueco que previamente se hizo en el centro al preparar el papel. Colocamos el papel con el pabilo sobre la caja petri que contiene la solución de suelo, de forma que el pabilo se introduzca en el líquido.

Inmediatamente observamos que empieza a humedecerse el papel en contacto con el pabilo y el líquido va desplazándose desde el centro hacia la periferia formando un círculo cada vez mayor.

En la solución de suelo, aparte del agua (solvente) que es el componente mayoritario, encontramos iones y moléculas disueltos (solutos) y agregados moleculares o partículas que se encuentran en suspensión en su seno. Las partículas se desplazan con el agua a distinta velocidad en el papel de filtro, en función de las fuerzas de adhesión que las



Figura A7. Desplazamiento de partículas en el papel de filtro dependiendo de la naturaleza de los componentes en la solución

solución acuosa de nitrato de plata al 0.5% con que impregnamos el papel. Los iones NO_3^- y Ag^+ reaccionan con las sustancias presentes en la solución de suelo, formándose nuevas sustancias y complejos (orgánicos e inorgánicos), cuya velocidad en ser transportados varía en función de las fuerzas de adhesión.

Revelado

Cuando interrumpimos el flujo de solución del suelo extendida a través del papel de filtro 1-2 mm anterior a la marca de 6 cm comienza el periodo de secado. El agua evaporada no se sustituye con aporte de nueva agua, y los solutos y partículas en suspensión dejan de desplazarse. Los iones desaparecen y cristalizan conjuntos moleculares sólidos, las partículas en suspensión se depositan e inmovilizan en el tejido de papel, en aquellos lugares en que se encontraban en el seno del agua.

Al analizar el papel de filtro una vez seco se puede observar distintas zonas concéntricas correspondientes a distintos solutos y partículas que antes estaban asociadas, las moléculas se han separado y ordenado por tamaño a lo largo de la longitud del radio en el filtro circular; estas partículas detuvieron su desplazamiento en el agua a través del tejido del papel, al interrumpir el aporte de agua desde el pabito.

Debido a las cualidades de las sales y compuestos de plata, se descomponen por efecto de la luz, haciendo que la plata se separe de algunos de los compuestos a los que estaba unida, y cambia el color. Los colores de los cromatogramas secos y fijados, varían en función de la naturaleza de los agregados moleculares que estuvieran presentes en la solución. La materia orgánica particulada, muerta recientemente y no descompuesta, y sometida convenientemente a la acción del NaOH tiene una elevada tendencia a la

paredes y otras partículas ejercen sobre ellas llenando los huecos existentes entre los cordones de celulosa (capilaridad). (Figura A7). Influye su tamaño, masa (su densidad), y su superficie.

En el seno del agua hay disociación de las moléculas de nitrato de plata, procedentes de la evaporación de la

floculación y presenta una coloración deseable en los cromatogramas. La textura o estructura final del cromatograma, puede ser completamente lisa, cuando no hay aglutinación de partículas en la suspensión que discurre entre el papel, o bien grumosa, fruto de la floculación o formación de agregados.

ANEXO 2.- ELEMENTOS CONSTITUYENTES EN LA CARACTERIZACION DE UN CROMATOGRAMA

A continuación, se enuncian ciertos elementos que resultan concluyentes en la salud del suelo y de sencilla aplicación para su interpretación. Se consideran los siguientes: 1) zonas, 2) coloración, 3) integración de zonas, 4) formas y 5) patrones.

1) ZONAS DEL CROMATOGRAMA

Observando el cromatograma de un suelo ideal (**Figura A8**) distinguimos distintas zonas en él:

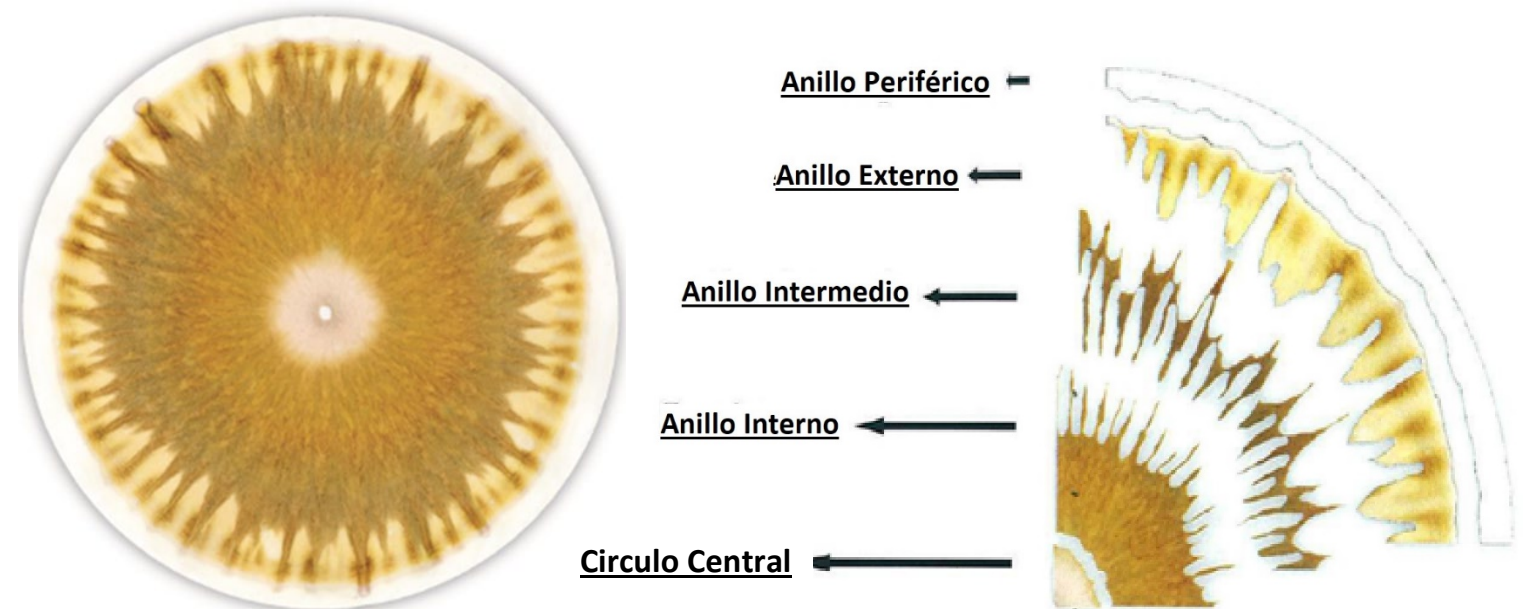


Figura A8. Zonas de un cromatograma ideal

CIRCULO CENTRAL, ESTRUCTURA (ZCe)

Formada por el intenso lavado al que ha estado sometida esta zona en el papel de filtro, ya que toda la solución que se va a extender por el papel pasa por ahí. En esta zona, el nitrato de plata se ha combinado prácticamente en su totalidad.

Esta zona da una indicación de la fertilidad general del suelo, así como la capacidad de retención de agua y aire debido a su estructura.

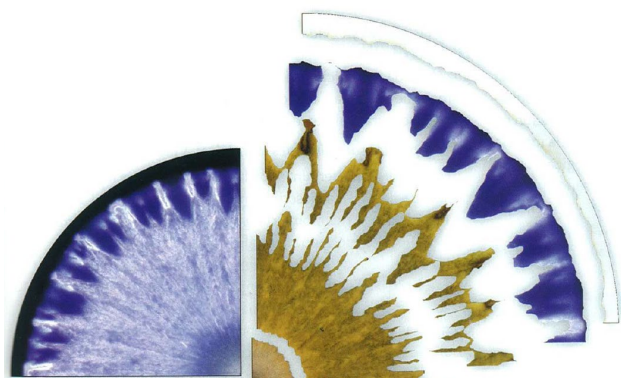


Figura A9. Radiografía de un cromatograma mostrando

Cuando retiramos el pabito se corta el suministro solución. Al no haber acumulación previa, únicamente queda atrapada en el papel de filtro la cantidad de solutos y partículas en suspensión que hay en la pequeña fracción de solución aportada en último lugar.

ANILLO INTERNO, MINERAL (ZIn)

La zona interna informa sobre la presencia de minerales. Los complejos arcillosos, alófanos, y arcillo-húmicos se desplazan más lentamente que los complejos de sólo materia orgánica particulada, y éstos a su vez más lentos que el humus.

Como hay abundantes y variados complejos orgánicos, en esta zona quedan los unidos a arcillas y alófanos, dando una textura grumosa.

El agua de la solución forma una red de canalillos que asemejan la estructura de una pluma, con bárbulas que confluyen en un raquis.

En las radiografías de los cromatogramas estas plumas son transparentes a los Rayos x, de lo que se deduce la ausencia de plata en las mismas. La plata proveniente del nitrato de plata, habría quedado fijada en las moléculas orgánicas y complejos arcillo- húmicos.

(Figura A9).

ANILLO INTERMEDIO, ORGÁNICO (ZIm)

Aquí se depositan complejos orgánicos sin vinculación con materia mineral, y por tanto menos densos y más fácilmente transportables, quedando depositados más externamente y formando este anillo, dejando también una textura grumosa.

Los canalillos anteriormente dichos se continúan en esta zona.

ANILLO EXTERNO, HÚMICO (ZEx)

Finalmente quedan los agregados más livianos que son los componentes del humus en sentido estricto. Estas "nubes" en los extremos indican presencia de nutrientes y humus disponibles.

Esta zona exterior tiene una importancia primordial en la evaluación de los cromatogramas. Como muestran las aplicaciones convencionales de la cromatografía del humus, generalmente se distinguen tres fracciones principales de los materiales húmicos: los compuestos menos móviles y más condensados, que recorren sólo una corta distancia en el papel antes de detenerse; los compuestos intermedios; y, por último, los compuestos altamente móviles y fúlvicos, que son los que más migran cuando se cromatografían (Kononova 1966; Brinton 2010).

El raquis de algunas plumas llega hasta el final de la zona y el humus permanente forma manchas o lunares. La actividad enzimática bacteriana se muestra en esta zona.

ANILLO PERIFÉRICO, SECA (ZPe)

Es la zona del papel a la que no ha llegado la solución.

Se utiliza para realizar anotaciones que identifiquen el cromatograma y para manipularlo evitando interferencias en la imagen que se forma.

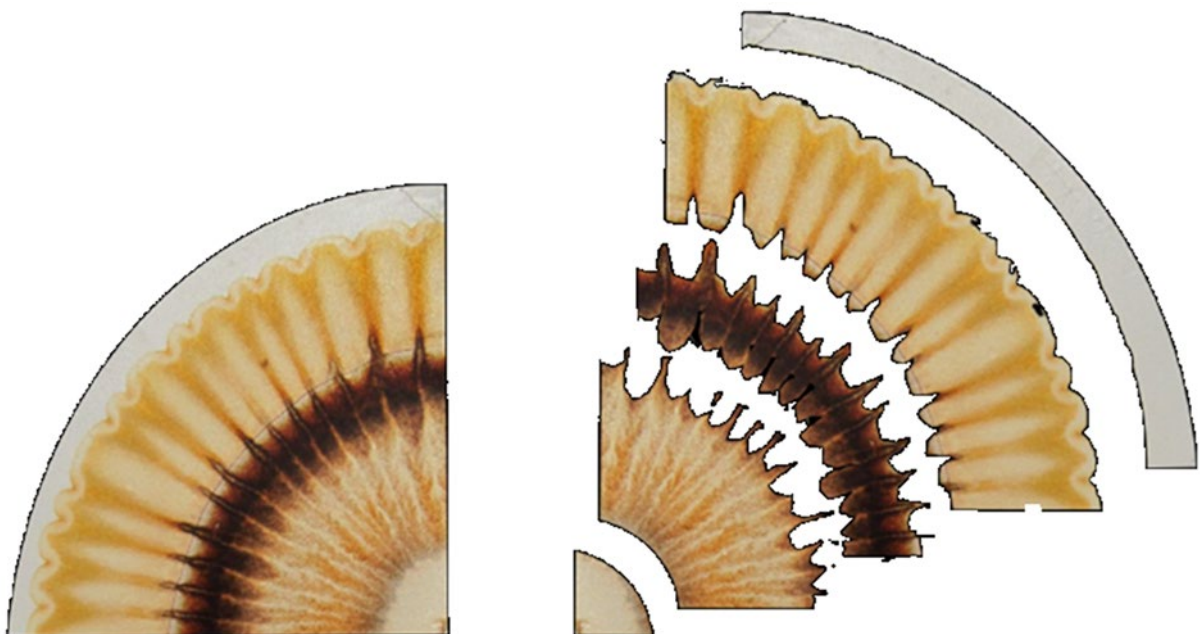


Figura A10. Diferentes zonas no integradas en un cromatograma

2) COLORACIÓN DE LOS CROMATOGRAMAS

Las diferentes coloraciones del cromatograma, son fruto de las reacciones que se producen entre los componentes del suelo con el hidróxido de sodio y el nitrato de plata; también de la reacción entre el nitrato de plata con el hidróxido de sodio.

La reacción del nitrato de plata con la materia orgánica desemboca en productos con plata; La luz produce una reducción de estos compuestos, precipitándose la plata y dando coloraciones en la gama de los ocres.

La reacción del nitrato de plata con el hidróxido de sodio, produce óxido de plata de color negro. Cuando hay poca materia orgánica en el suelo, la solución que corre por el papel contiene hidróxido de sodio en más o menos cantidad dependiendo de la abundancia de materia orgánica, ya que, en la preparación de la solución con el suelo, el hidróxido de sodio ha tenido oportunidad de combinarse con ella.

Principales coloraciones indicadoras de una buena calidad del suelo:

Los colores que reflejan el buen estado evolutivo y saludable tanto de los suelos como de los abonos son: amarillo, dorado, anaranjado, rojizo o café claro y tonalidades verdosas (**Figura A11**). Cuando en un cromograma encontramos la combinación de cafés claros y muy oscuros, estamos ante un proceso intermedio de desarrollo, en el cual la materia orgánica está cruda, acumulada o en etapa de maduración e integración.

Principales coloraciones que indican condiciones no deseables del suelo:

Negro, ceniza, pardo muy oscuro, lilas o violeta, gris y tonalidades azuladas. (**Figura A11**) Estas coloraciones reflejan un mal estado evolutivo y no saludable de los suelos, suelos desnudos, sin estructura y aplicación de fertilizantes de síntesis y/o herbicidas.



Figura A11. Colores deseables (izquierda) y no deseables (derecha) en un cromatograma

3) INTEGRACIÓN DE ZONAS

Se aprecia en los límites interzonales. La integración es una cualidad que varía entre dos extremos: límites netos y límites difusos, estando correlacionados respectivamente con el aislamiento o la conexión de las partículas.

En un estado ideal de suelo, es dónde hay más conexión e integración entre los distintos componentes (materia orgánica, minerales y microbiología). Esto se muestra en el cromatograma con una mayor difusión en los límites, especialmente entre zonas.

Un suelo de buena calidad mostrará gran integración entre las zonas, mientras que un suelo en malas condiciones presentará zonas no integradas (presencia de anillos) y sus límites serán netos (**Figura A12, Figura A13**).



Figura A12. Cromatograma mostrando integración entre sus zonas (izquierda) y no integración (derecha)

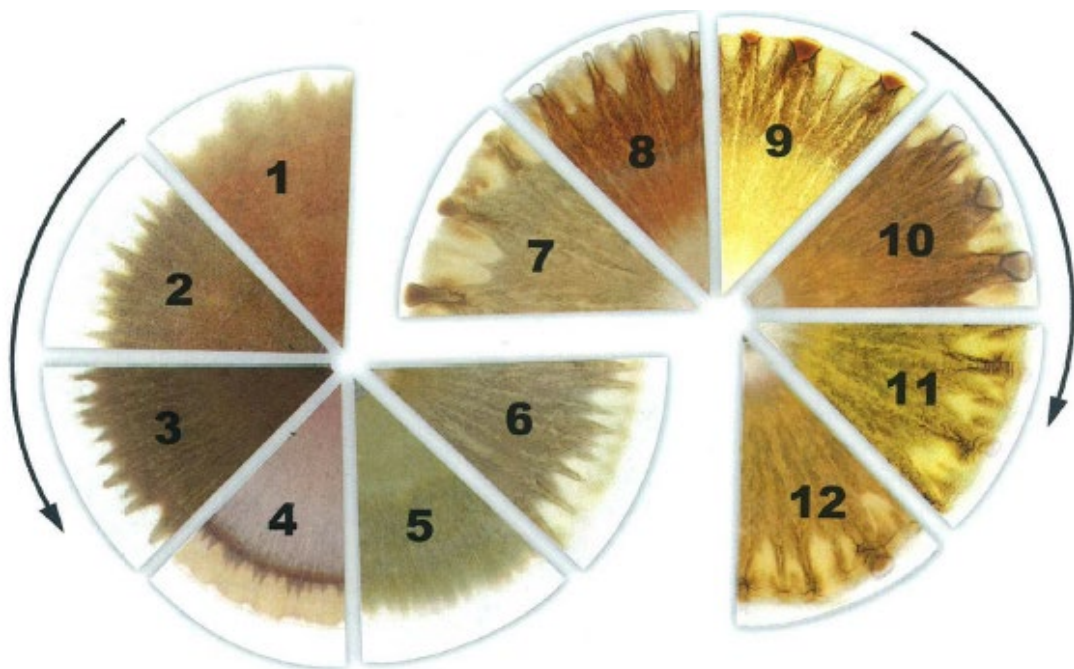


Figura A13. Evolución en la integración de las zonas de un cromatograma

4) FORMAS

Entendemos por formas a las figuras tomadas individualmente. Distinguimos ciertas figuras que llamaremos canales o plumas, picos, cabos, y manchas.

Canales/Plumas.

Figuras semejantes a plumas de ave. Son originadas por el desplazamiento de la solución en el papel de filtro, liberada de agregados moleculares que van quedando atrapados en las inmediaciones de la corriente.

Llamamos raquis, por semejanza con la pluma, a la estructura lineal radial central en la que confluyen las diminutas corrientes o bárbulas laterales.

Su ausencia en el cromatograma indica carencia de agregados en la solución.

Un buen suelo con diversidad microbiológica presentará plumas con bárbulas interconectadas, de límites difusos, y con raquis anchos, irregulares en su trayectoria y profundamente hundidos en la zona externa. (**Figura A14**).

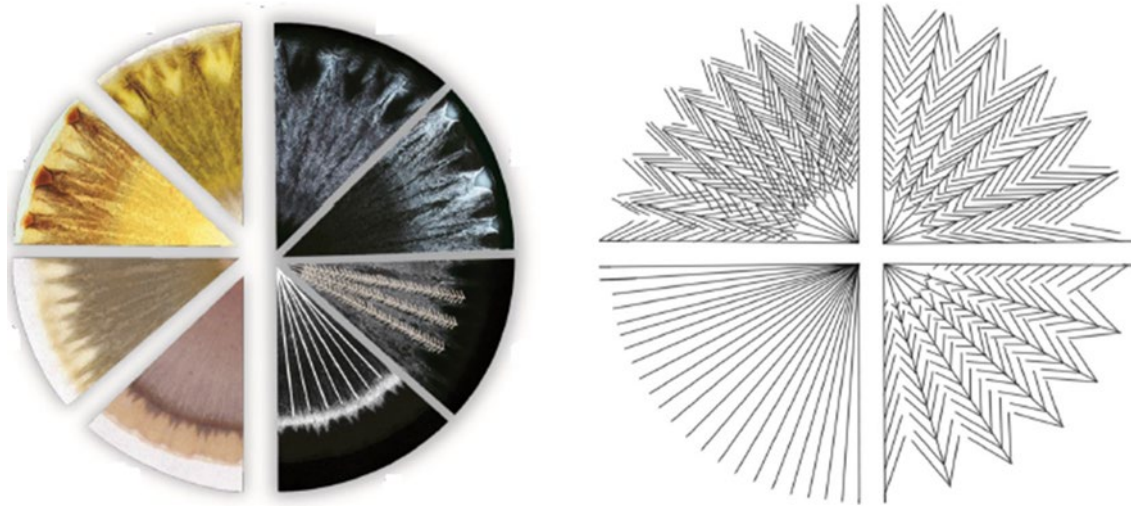


Figura A14. Diferentes patrones de las plumas y canales

Los raquis estrechos y rectilíneos y las bárbulas -cuando existen- son cortas y no interconectadas con las de las plumas adyacentes, son síntoma de un suelo en condiciones no deseables, bien por carencias en materia orgánica o por condiciones deficientes en la misma.

Picos, compuestos por cabos y ensenadas

Se muestran únicamente en el área externa del cromatograma, y los llamamos así por la semejanza con estos accidentes geográficos. Los cabos pertenecen a la zona intermedia. Las ensenadas conforman la zona externa y es donde se encuentran diversos componentes del humus (**Figura A15**).

Los cabos son los extremos que pueden interrumpirse en la zona periférica.

Corresponden con el final de la corriente de solución, y participan de las cualidades enunciadas anteriormente.

Los cabos anchos, largos, desiguales tanto en anchura como en longitud, indican buenas condiciones del suelo. Por el contrario, las formas aciculares, cortas, uniformes, nos indican condiciones deficientes.

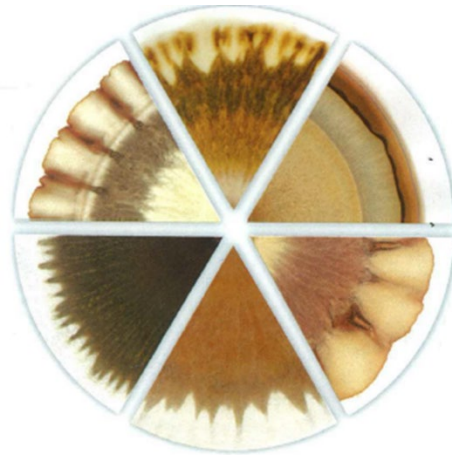


Figura A15. Diferentes patrones de los picos mostrados en un cromatograma

Manchas

Nos referimos a estas figuras en el sentido habitual del término. Cuando aparecen lo hacen en la zona húmica. Se encuentran independientemente de los cabos o formando parte de ellos.

Presentan coloración en el rango deseable, ocre, café oscuro, rojizo (**Figura A16**). Las manchas color café oscuro se presentan siempre en suelos fértiles y corresponden con el humus permanente y la disponibilidad de nutrientes para la planta. Su ausencia nos indica condiciones no deseables para el suelo.



Figura A16. Cromatogramas mostrando presencia de manchas en la zona húmica (derecha) y ausencia de manchas (izquierda).

5) PATRONES

Se entiende por patrón a la cualidad de un conjunto unitario de formas que hace referencia a las similitudes de los elementos o formas.

Algunos patrones de interés para la interpretación de los cromatogramas serían los relativos a la uniformidad, los límites y la textura.

Los patrones de uniformidad y límites, se definen en relación con su posición entre dos modos extremos. La textura hace referencia a la estructura fina de la porción de cromatograma que consideremos.

Uniformidad (repetitivo vs. variado)

Se refiere a la igualdad de formas. Cuando las formas son todas iguales se alcanza la máxima uniformidad, entonces hablamos de un patrón repetitivo o uniforme. Esta característica, corresponde con condiciones no deseables del suelo y que tendría muy poca diversidad, sobre todo biológica.

Cuando todas las formas son distintas, nos hallaríamos con el máximo de variedad.

Hablaríamos de un patrón variado, correspondiente con condiciones deseables en el suelo, de gran riqueza y diversidad de elementos que lo integran.

Límites (netos vs. difusos)

Nos referimos a los límites de las formas, no a los límites de las zonas, si bien comparten con estos últimos la interpretación.

Límites netos son indicadores de separación y no integración en conjuntos mayores.

Constituyen condiciones no deseables para los suelos si queremos tener condiciones climáticas de los mismos.

Los límites difusos indican lo contrario, siendo deseable esta condición para los suelos.

Textura (lisa vs. grumosa)

Cualidad que atañe a la conformación general de la sección del cromatograma que consideremos. Corresponde a la estructura fina o la estructura última que podemos visualizar. Los extremos que consideramos son su igualdad (textura lisa) o desigualdad (textura grumosa).

Las texturas lisas nos indican condiciones abióticas predominantes en el suelo, transportándose en la solución moléculas inorgánicas pequeñas y no floculantes. Las texturas grumosas son síntoma de agregados orgánicos y floculación abundante, siendo esta textura como deseable.

ANEXO 3. VALORACIONES DE LOS CROMATOGRAMAS DE LAS MUESTRAS DE SUELO.

Los cromatogramas se clasificaron en una escala de notas (**Tabla A1**). Dos enfoques de valoración fueron utilizados: 1) valoración basada en atribución de puntos en una escala de valores visuales (de 0 a 5) para las características de integración, color, picos, canales y zona central; y 2) valoración basada en las mediciones (mm) de las diferentes zonas del cromatograma, en las cuales se incluyen radio total, radio interior, radio intermedio y radio exterior, así como la suma del radio intermedio y el exterior.

Tabla A1. Valoraciones de los indicadores de calidad para cada patrón de los cromatogramas

Muestra de suelo	ZCe (mm)	RT (mm)	Rin (mm)	Rim (mm)	Rex (mm)	Rim + Rex (mm)	ZCe	Int	Can	Pic	Col
1. Benayas	1	56	37	17	1	18	1	1	2	2	4
1p. Benayas	0	54	38	16	0	16	0	0	1	3	3
2. Benayas	4	57	28	23	2	25	2	3	4	5	2
2p. Benayas	2	54	37	15	0	15	1	1	2	2	1
3. Fuerte del Rey	0	52	38	14	0	14	0	0	0	0	0
3p. Fuerte del Rey	0	52	40	12	0	12	0	0	0	0	1
4. Benzalá	0	53	40	13	0	13	0	0	0	0	0
4p. Benzalá	0	53	40	13	0	13	0	0	0	0	0
5. Tierras Cucas	3	55	32	20	0	20	1	1	2	3	3
5p. Tierras Cucas	0	52	40	12	0	12	0	0	1	1	3
6. Pegalajar I	7	54	13	28	6	34	4	5	5	5	5
6p. Pegalajar I	0	51	38	13	0	13	0	0	0	1	1
7. Pegalajar II	7	53	17	23	6	27	4	5	5	5	5
7p. Pegalajar II	1	52	26	24	1	25	1	3	4	4	2
8. Virgen de los Milagros	3	54	30	20	2	22	1	3	3	4	4
8p. Virgen de los Milagros	0	51	35	16	0	13	0	0	1	1	1
9. Cortijo Guadiana	3	52	30	18	1	16	2	2	3	4	4
9p. Cortijo Guadiana	0	50	40	15	0	15	0	0	0	0	3
10. Finca San José	2	54	38	14	0	13	1	1	2	3	4
10p. Finca San José	2	51	28	18	3	21	1	4	4	4	4

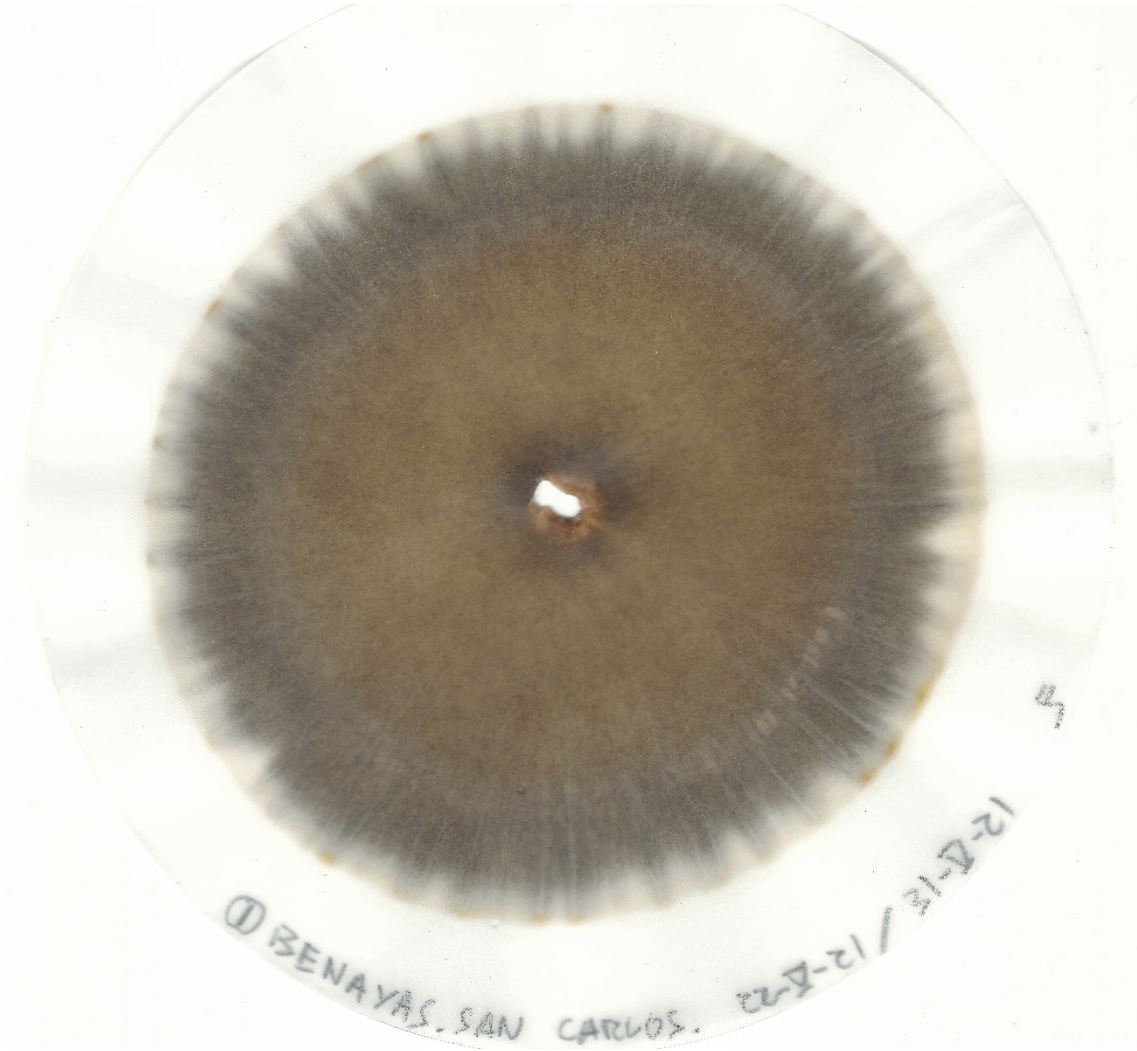


Figura A17. Cromatograma perteneciente a la finca 1, Benayas.

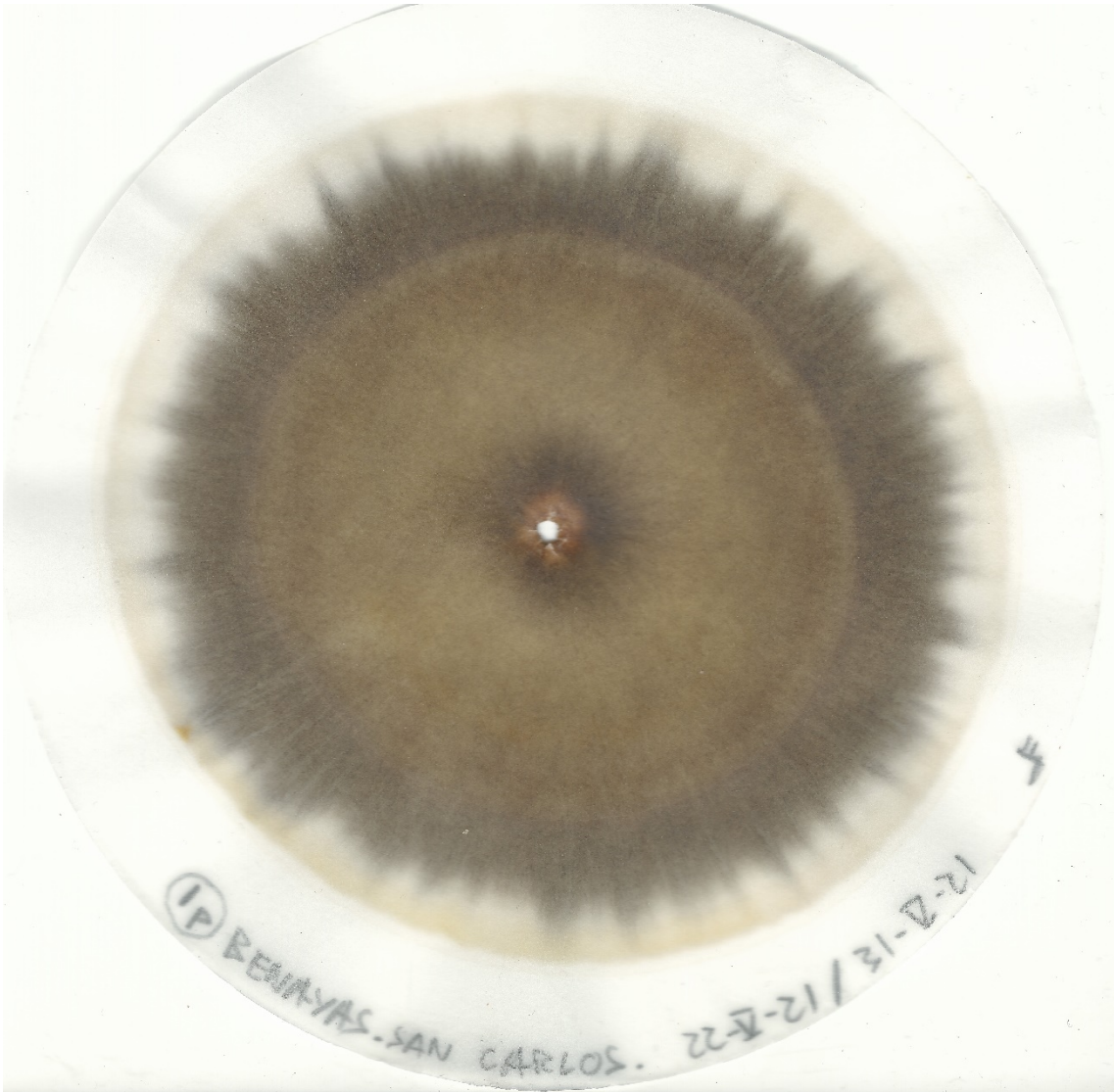


Figura A18. Cromatograma perteneciente a la finca 1p, Benayas.

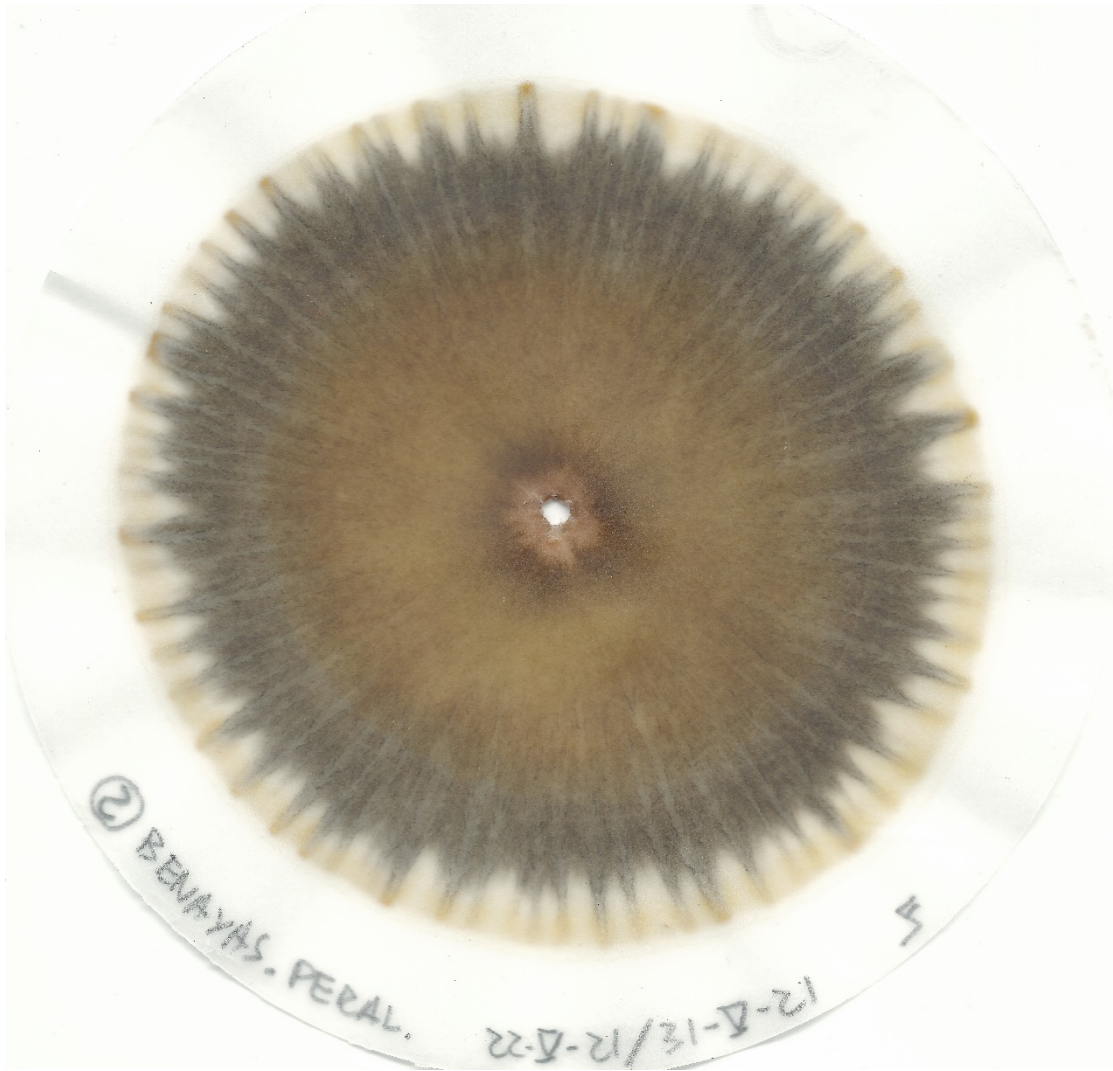


Figura A19. Cromatograma perteneciente a la finca 2, Benayas.

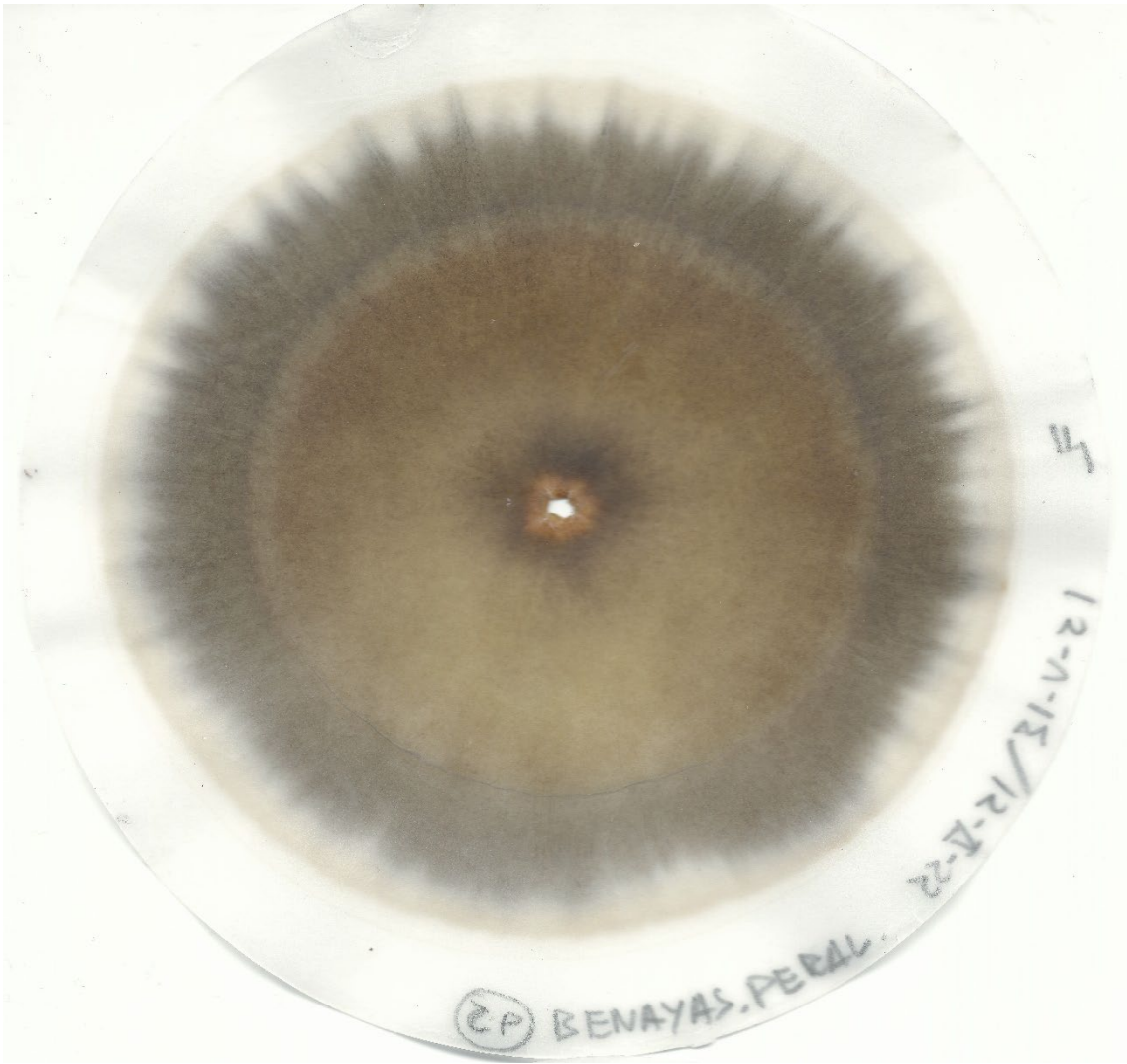


Figura A20. Cromatograma perteneciente a la finca 2p, Benayas.

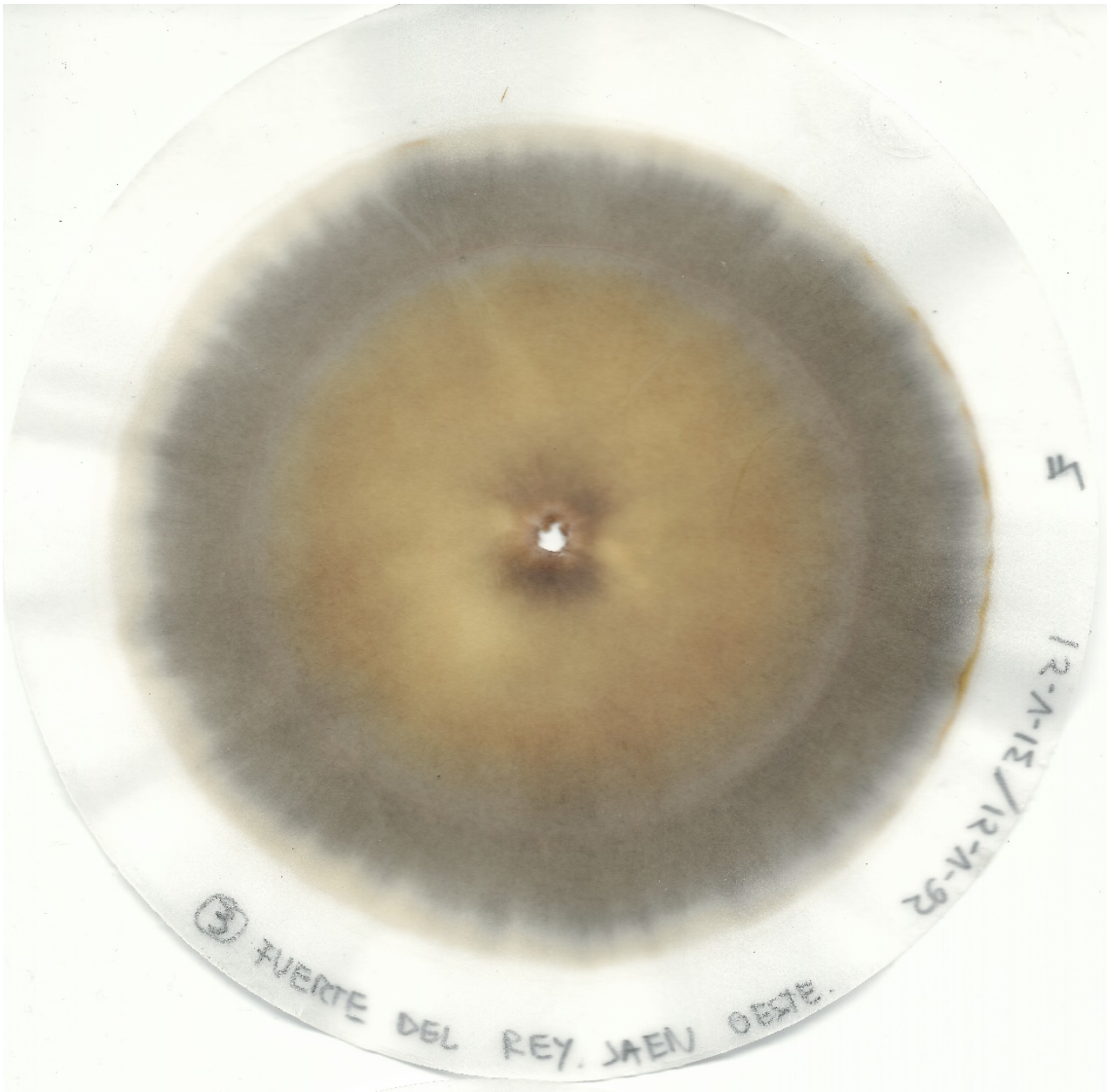


Figura A21. Cromatograma perteneciente a la finca 3, Fuerte del Rey.

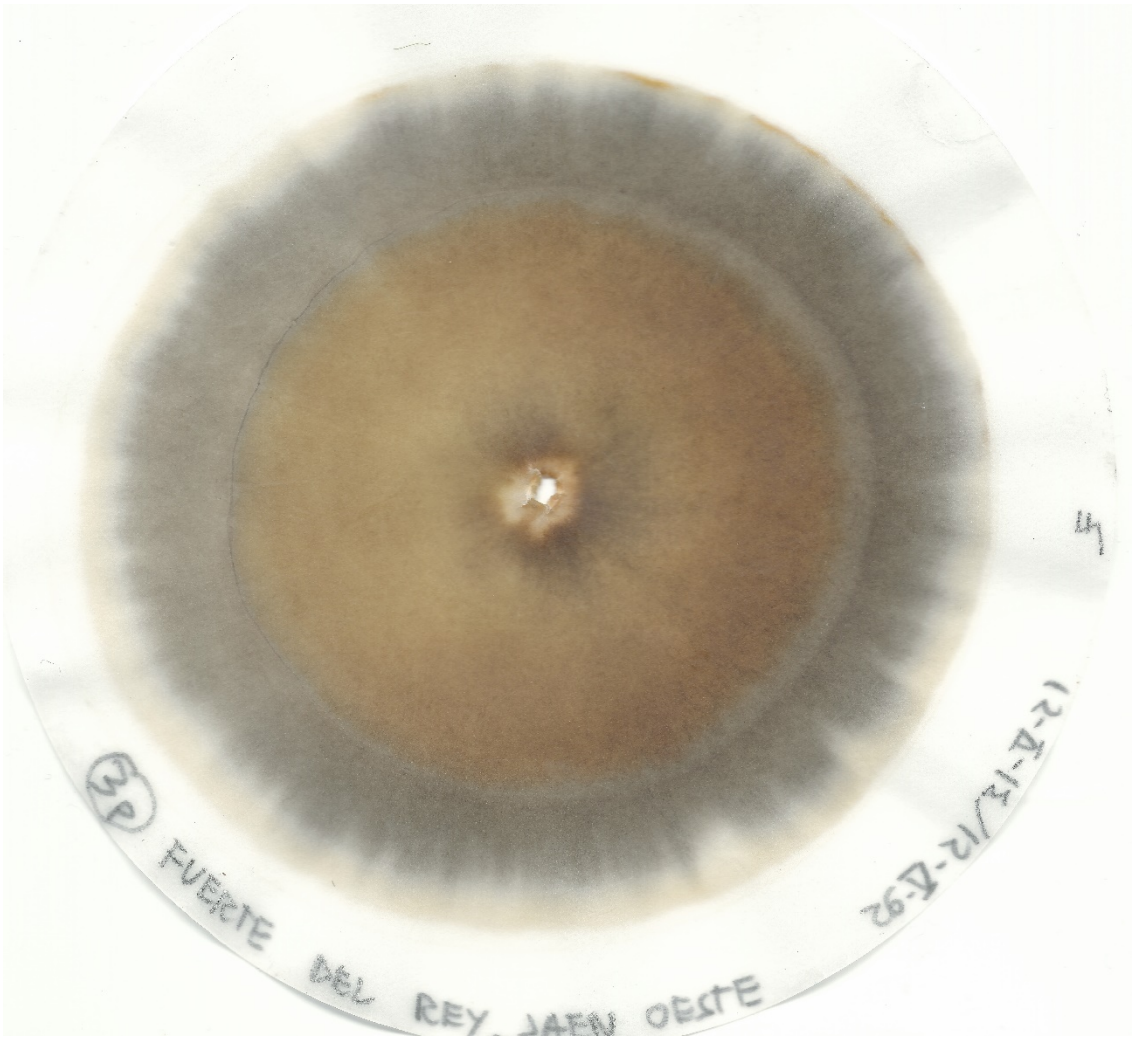


Figura A22. Cromatograma perteneciente a la finca 3p, Fuerte del Rey.

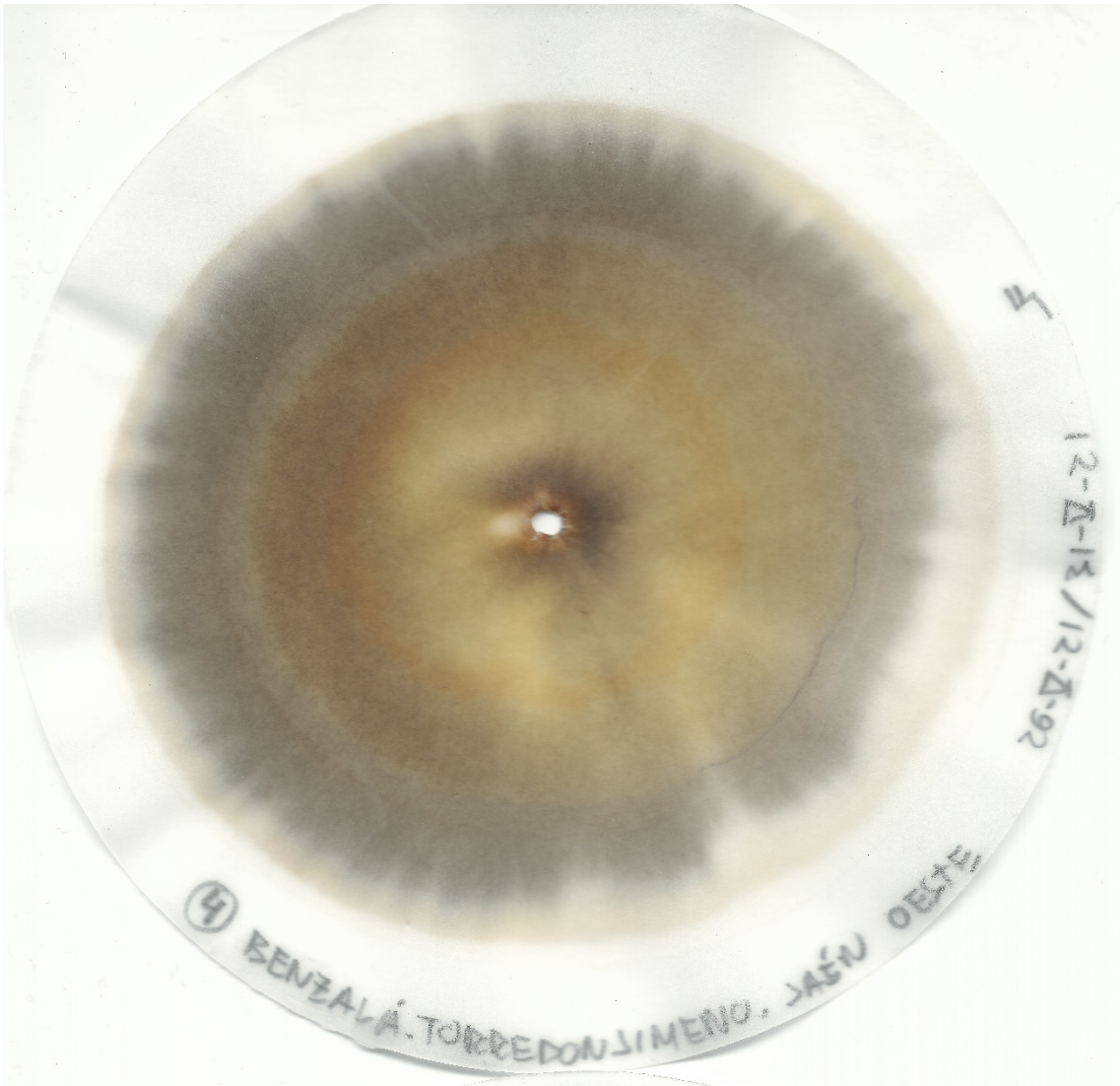


Figura A23. Cromatograma perteneciente a la finca 4, Benzalá.

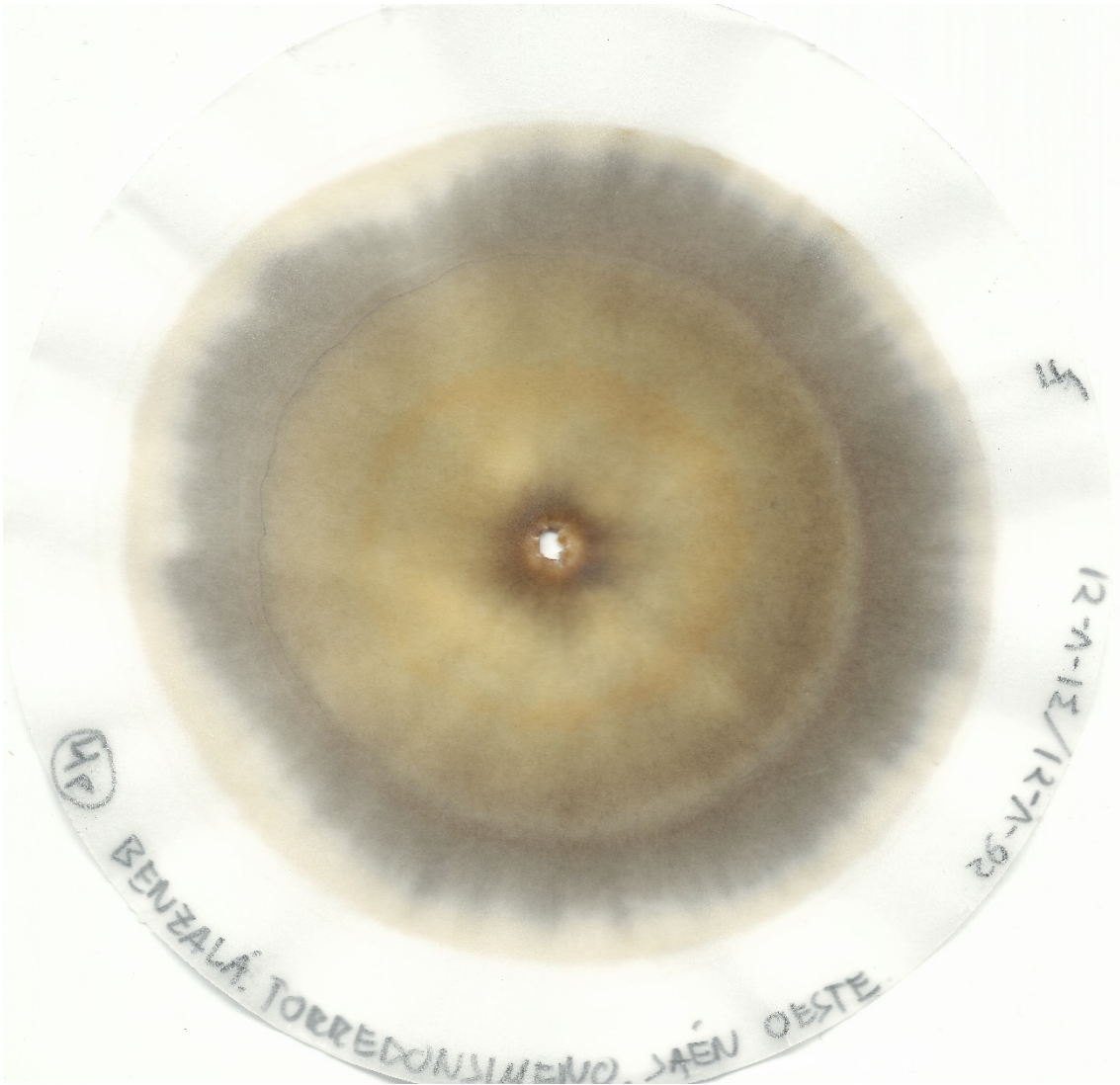


Figura A24. Cromatograma perteneciente a la finca 4p, Benzalá.

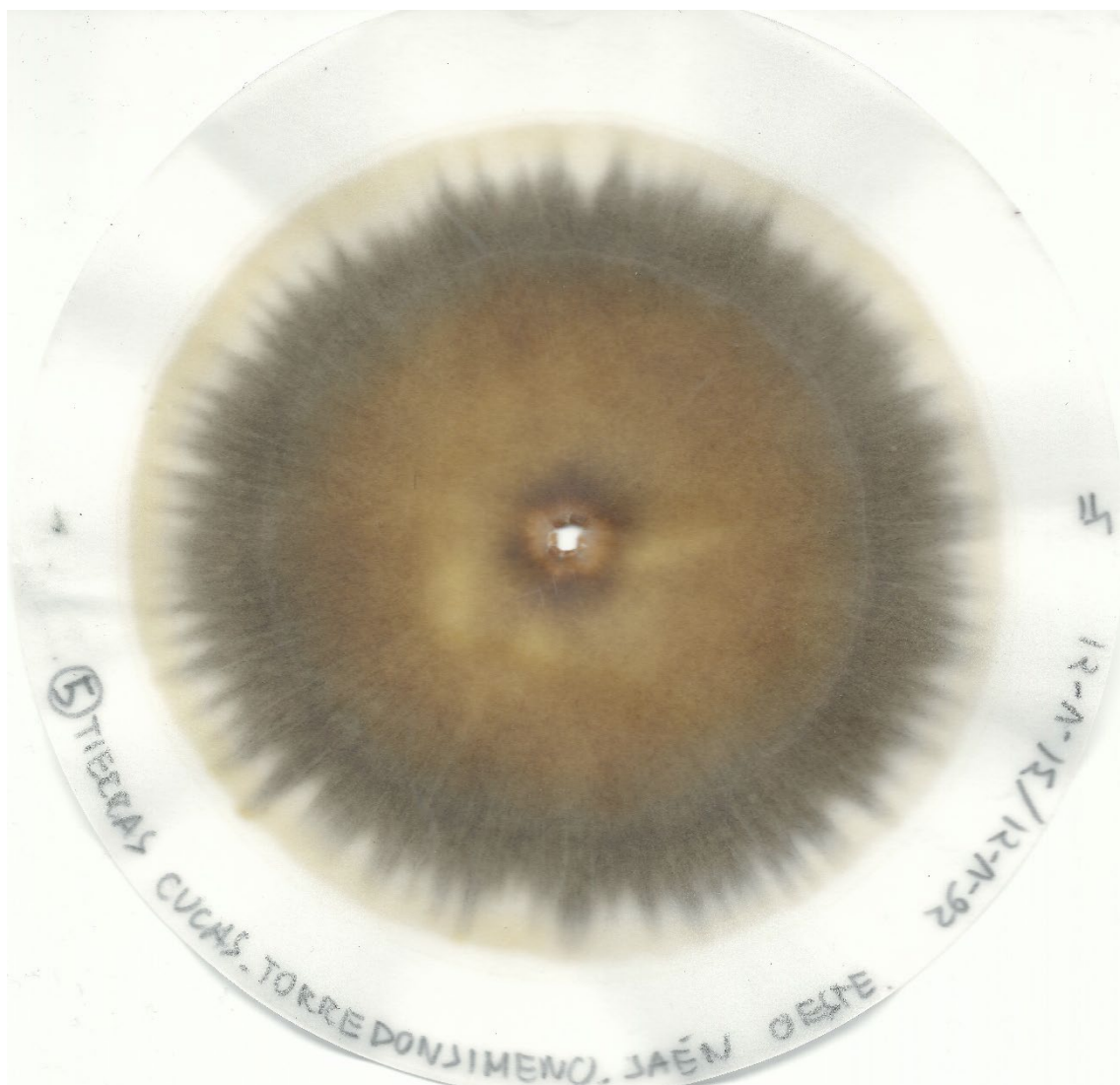


Figura A25. Cromatograma perteneciente a la finca 5, Tierras Cucas.

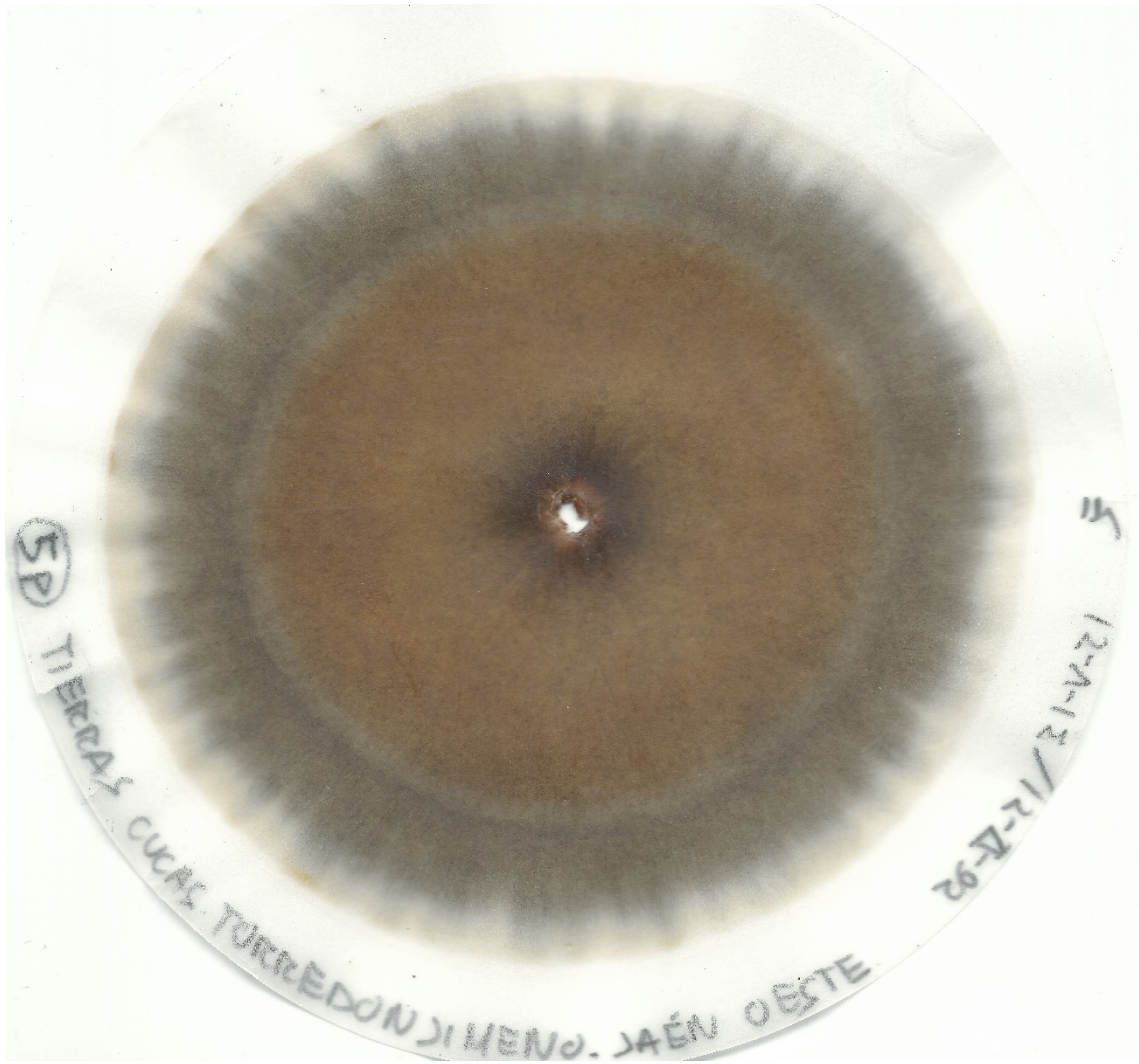


Figura A26. Cromatograma perteneciente a la finca 5p, Tierras Cucas.

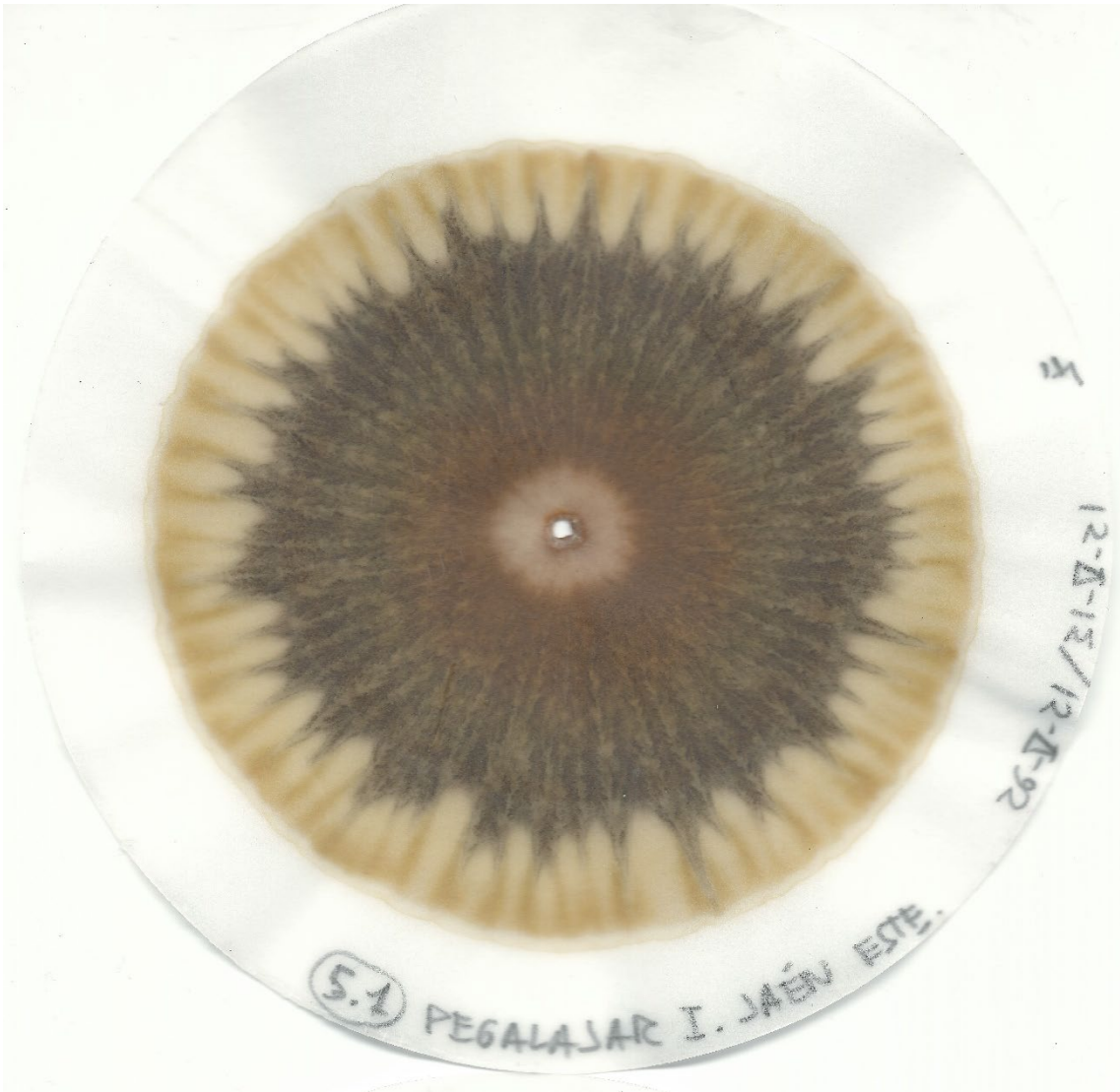


Figura A27. Cromatograma perteneciente a la finca 6, Pegalajar I.

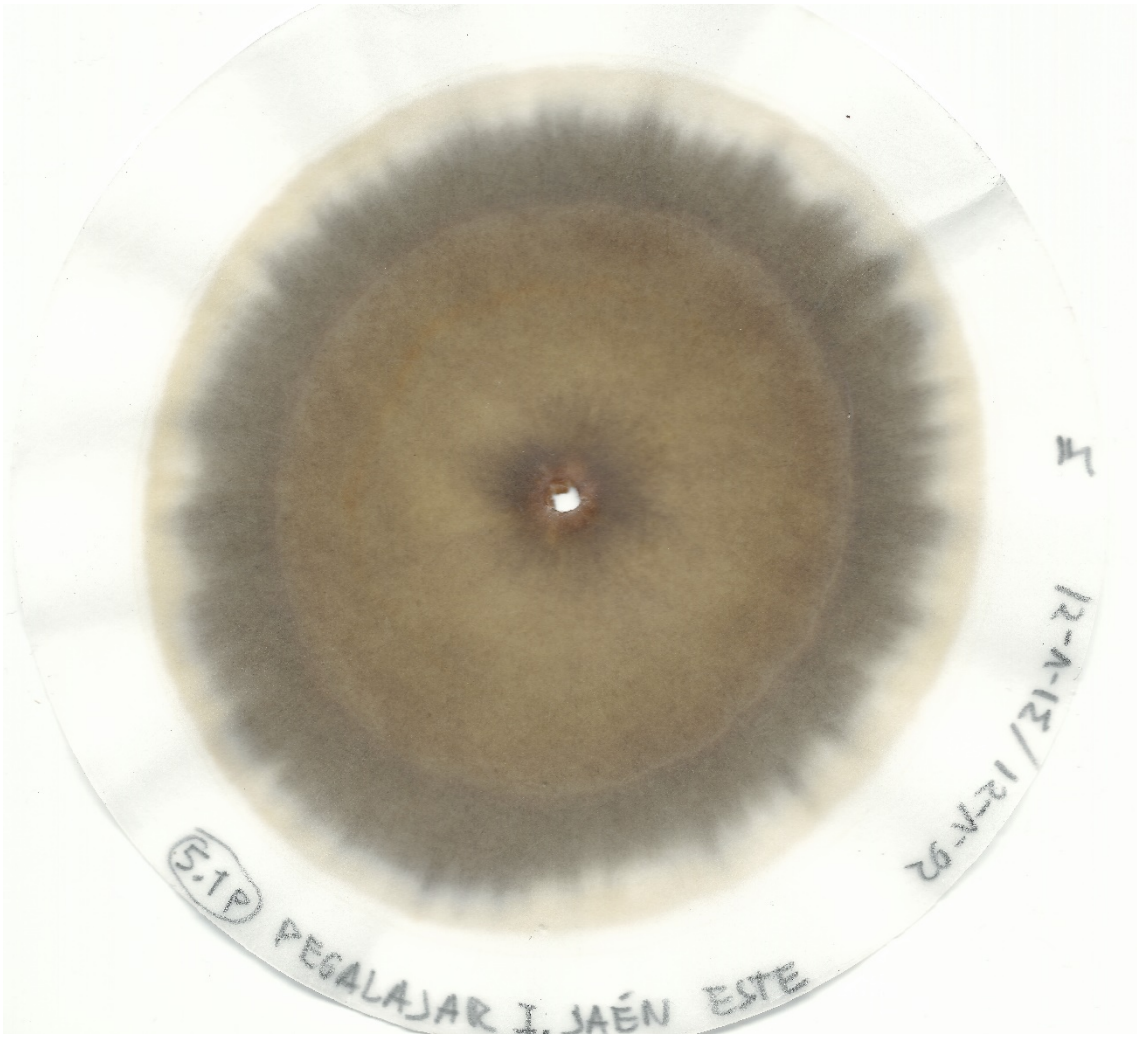


Figura A28. Cromatograma perteneciente a la finca 6p, Pegalajar I.



Figura A29. Cromatograma perteneciente a la finca 7, Pegalajar II.



Figura A30. Cromatograma perteneciente a la finca 7p, Pegalajar II.

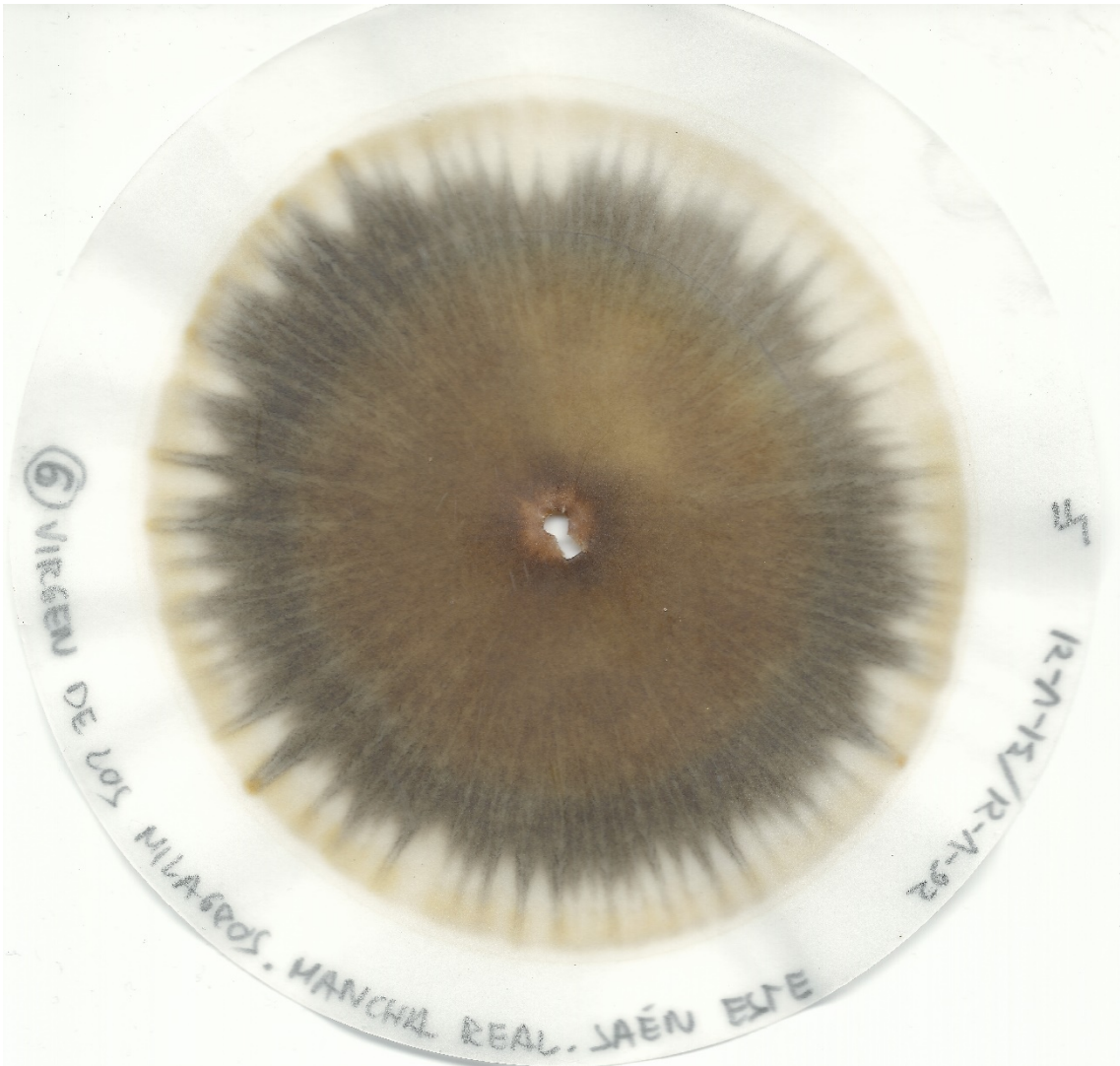


Figura A31. Cromatograma perteneciente a la finca 8, Virgen de los Milagros.

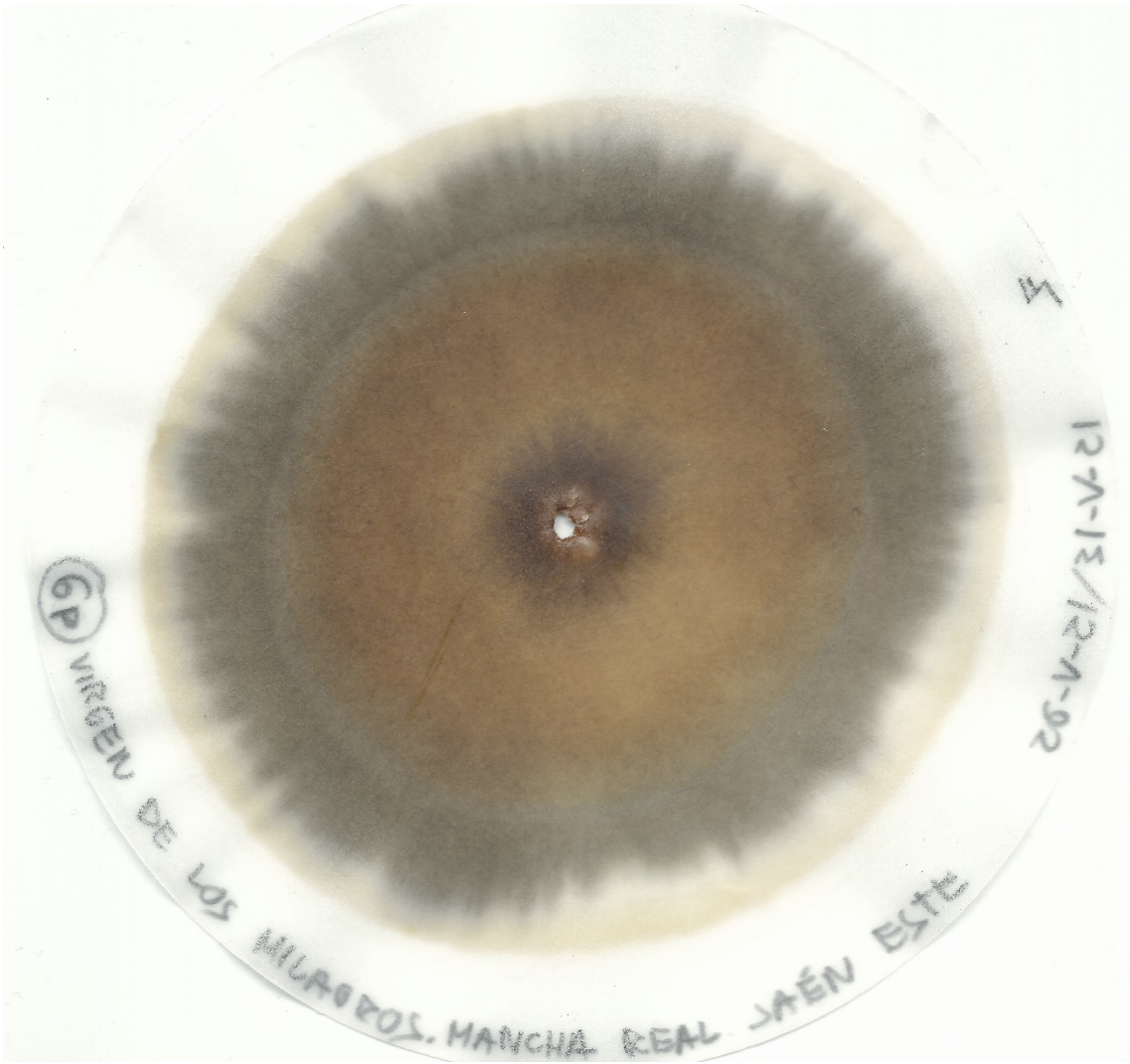


Figura A32. Cromatograma perteneciente a la finca 8p, Virgen de los Milagros.

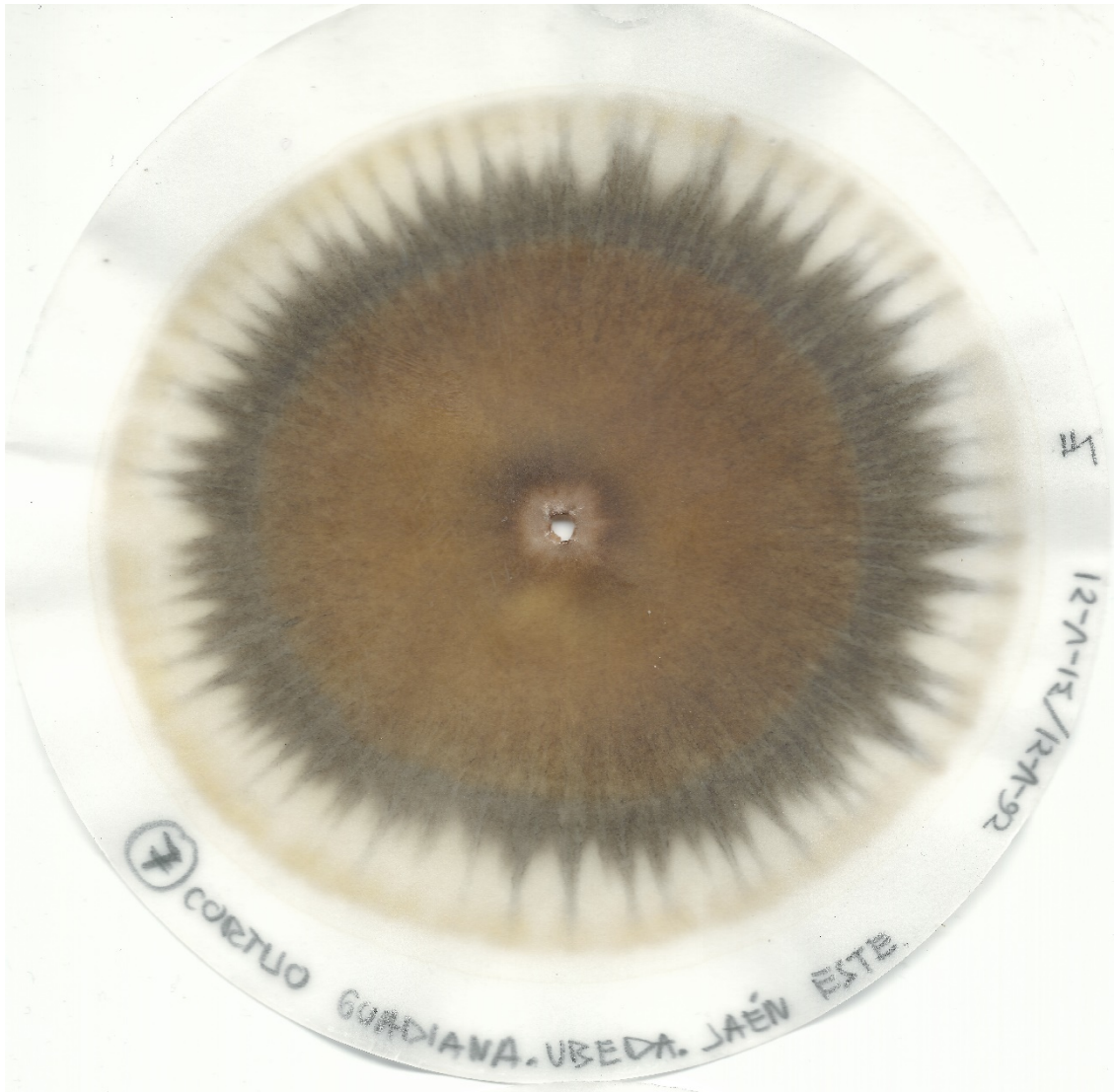


Figura A33. Cromatograma perteneciente a la finca 9, Cortijo Guadiana.

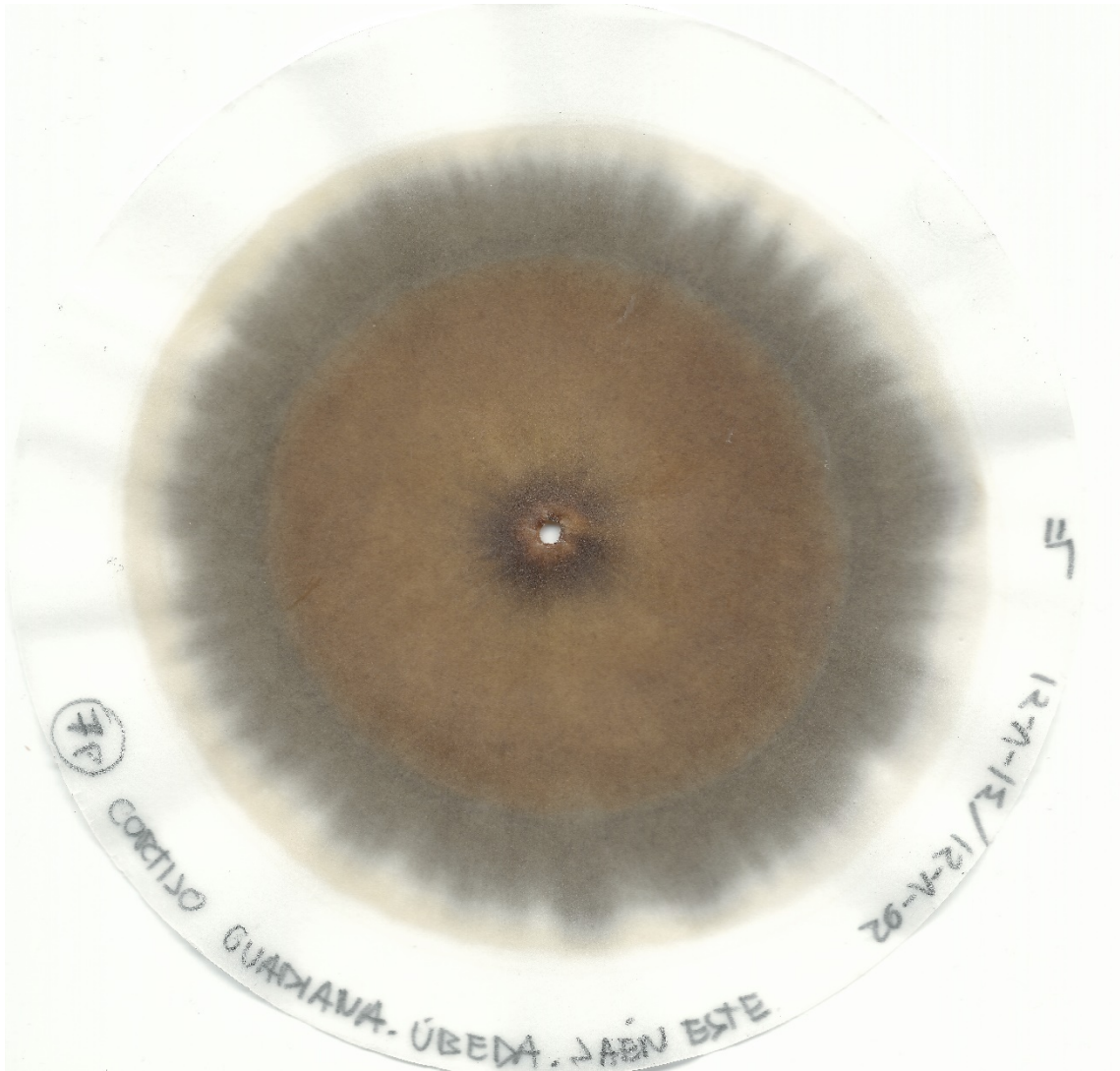


Figura A34. Cromatograma perteneciente a la finca 9p, Cortijo Guadiana.

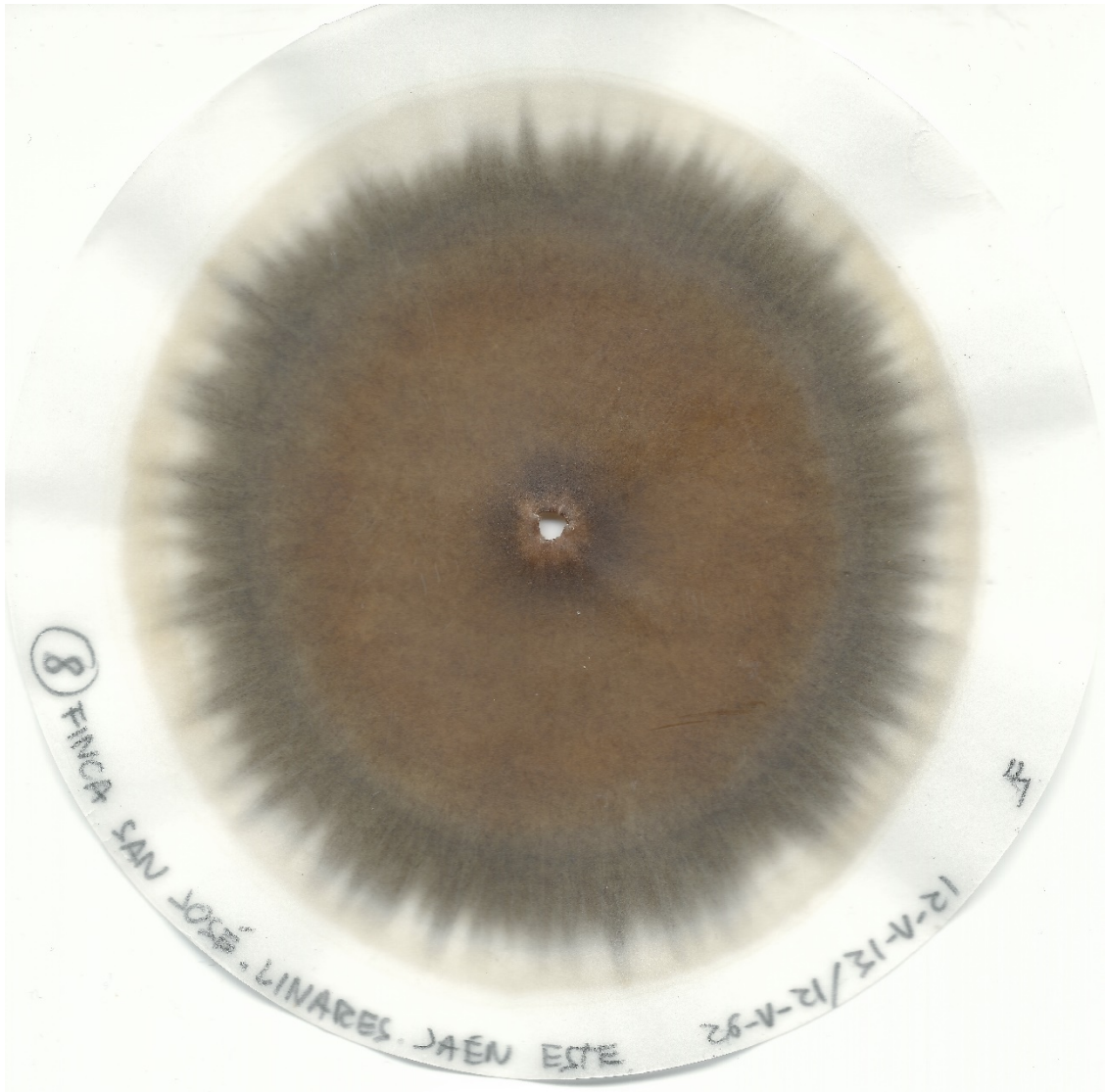


Figura A35. Cromatograma perteneciente a la finca 10, Finca San José.

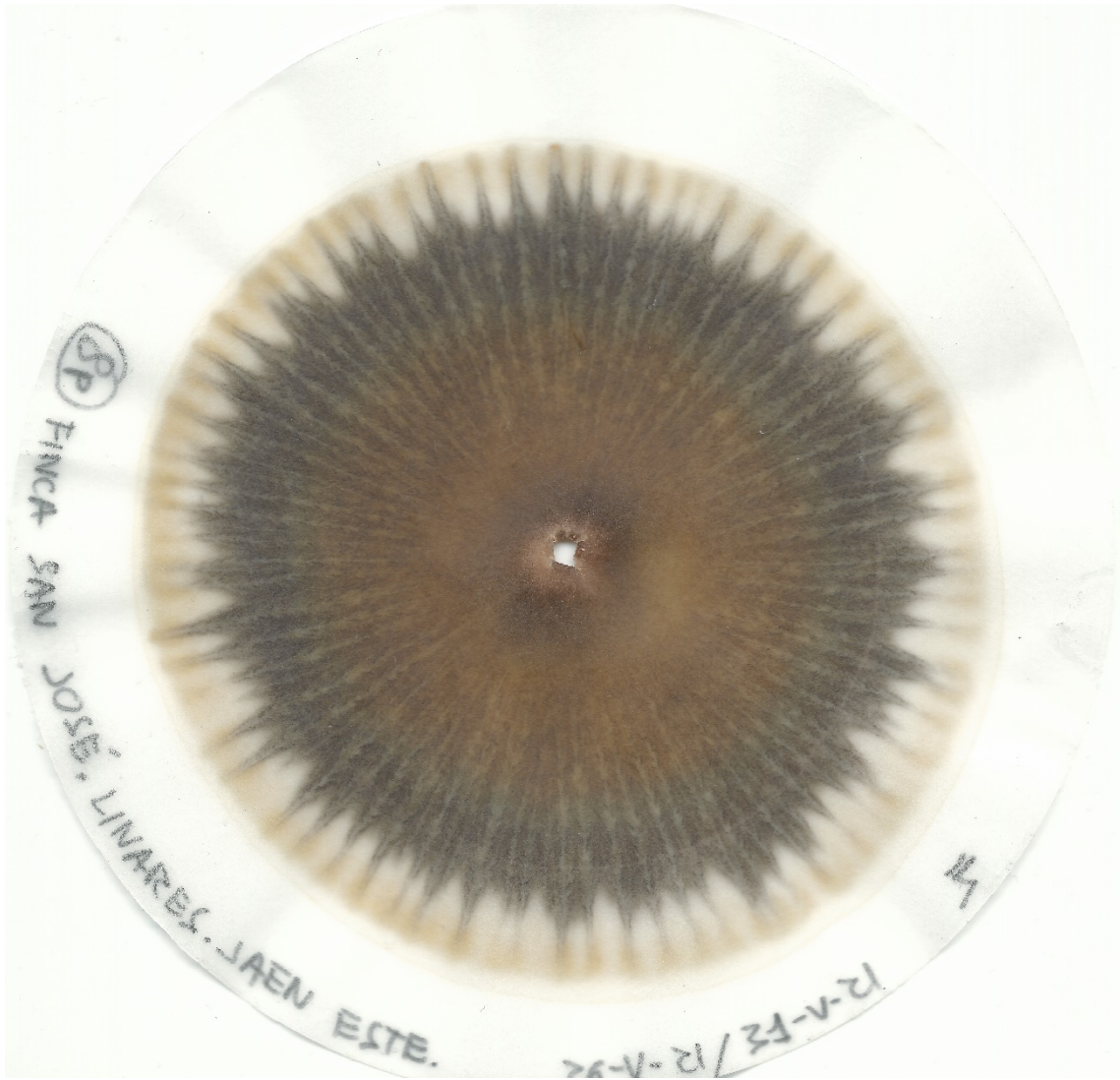


Figura A36. Cromatograma perteneciente a la finca 10p, Finca San José.

ANEXO 4.-INDICADORES QUIMICOS Y BIOLÓGICOS DE LAS MUESTRAS DE SUELO

Anexo 4.1 Indicadores químicos del suelo

Los análisis químicos de las muestras de suelo presentaron diferentes niveles de nutrientes, pH y conductividad (**Tabla A2**).

Tabla A2. Resultados de los análisis de indicadores químicos de la calidad del suelo. Las muestras con un número seguido de una “p” indica el control pareado de los olivares sostenibles.

Muestra de suelo	Potasio (mg K/kg)	Carbono (%C)	Nitrógeno Total (mg N/Kg)	Fósforo Total (mg P/Kg)	Conductividad (μS/cm)	pH
1 Benayas	80.01	0.43	1027.66	437.32	388	8.42
1p Benayas	6.64	0.17	649.88	377.72	303	8.25
2 Benayas	45.00	0.41	918.00	400.60	334	8.47
2p Benayas	56.35	0.02	469.89	282.31	240	8.53
3 Fuerte del Rey	18.32	0.12	559.28	331.78	302	8.42
3p Fuerte del Rey	5.79	0.18	498.87	498.70	1251	8.03
4 Benzalá	19.39	0.06	616.62	252.41	238	8.36
4p Benzalá	5.59	1.21	249.84	139.00	256	8.56
5 Tierras Cucas	31.83	0.52	1003.32	488.30	498	8.17
5p Tierras Cucas	10.35	0.24	762.66	344.66	266	8.43
6 Pegalajar	26.32	2.06	2039.58	300.02	316	8.22
6p Pegalajar	25.41	0.21	377.34	139.75	234	8.53
7 Pegalajar II	25.13	2.04	2095.32	529.26	435	8.08
7p Pegalajar II	10.85	0.71	957.91	258.94	290	8.30
8 Virgen de los Milagros	3.80	0.27	720.36	311.62	686	8.29
8p Virgen de los Milagros	29.91	0.18	638.08	432.31	364	8.41
9 Cortijo de Guadina	36.59	0.21	793.91	283.41	701	8.42
9p Cortijo de Guadina	23.75	0.19	687.94	383.08	379	8.54
10 Finca San José	275.28	1.40	1392.84	366.03	387	7.68
10p Finca San José	87.71	0.61	901.48	221.78	283	6.41

- Contenido Carbono

Los valores del contenido de carbono están clasificados en base al porcentaje de carbono en el suelo de *Griffin et al.* (2013) y *Hazelton y Murphy* (2016), (**Tabla A3**). En la tabla 10 se reflejan el resumen de estos valores, los cuales varían entre un mínimo de 0,02 % (clasificado como muy bajo) y un máximo de 2,06 % (clasificado como muy alto 1), correspondientes a las muestras 2p Benayas y 6 Pegalajar respectivamente.

Tabla A3. Categorías del contenido de carbono dependiendo de su porcentaje. (Hazelton y Murphy, 2016)

CATEGORIA	RANGO %
Muy bajo	<0,40
Bajo	0,4 – 0,99
Moderado	1 – 1,59
Alto	1,6 – 1,99
Muy alto 1	2 – 2,39
Muy alto 2	2,40 – 2,99
Extremadamente alto	>3

- Nitrógeno Total

Los valores de nitrógeno total en las muestras de suelo bajo estudio, varían entre un máximo de 2095,32 mg N/Kg y un mínimo de 249,84 mg N/Kg en las fincas 7 Pegalajar II y 4p Benzalá, respectivamente (**Tabla A2**). Su valor medio es de 868, 04 mg N/Kg.

- Fósforo Total

El valor máximo de fósforo, corresponde a la muestra 7 Pegalajar II, y el valor mínimo a la muestra 4p Benzalá, (**Tabla A2**).

- pH

Los valores de pH de las muestras de suelo se clasificaron basándose en la clasificación presentada por Hazelton y Murphy (2016), (**Tabla A4**); todas las muestras de suelo pertenecen a la categoría “Moderadamente alcalino”, mostrando un valor máximo en la finca 4p Benzalá y un valor mínimo en la muestra 10p Finca San José (**Tabla A2**).

Tabla A4. Categorías de pH. (Hazelton y Murphy, 2016).

pH	CLASIFICACION
>9.0	Muy fuertemente alcalino
9.0–8.5	Fuertemente alcalino
8.4–7.9	Moderadamente alcalino
7.8–7.4	Suavemente alcalino
7.3–6.6	Neutro
6.5–6.1	Ligeramente ácido
6.0–5.6	Moderadamente ácido
5.5–5.1	Fuertemente ácido
5.0–4.5	Muy fuertemente ácido

- Conductividad

Se midió la conductividad eléctrica (CE - $\mu\text{S}/\text{cm}$) de las muestras de suelo para representar la salinidad, y se categorizaron los valores según *Hazelton y Murphy* (2016), (**Tabla A5**). Todos los valores se encuentran en la categoría "No salina", con un intervalo de valores que oscilan entre un mínimo de 234 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y un máximo de 1251 $\mu\text{S}/\text{cm}$, para las fincas 6p Pegalajar y 3p Fuerte del rey respectivamente, (**Tabla A2**).

Tabla A5. Categorías de salinidad. (*Hazelton y Murphy, 2016*)

CATEGORIA	RANGO ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
No salino	< 2000
Ligeramente salino	2000 – 4000
Moderadamente salino	4000 – 8000
Altamente salino	8000 – 16000
Extremadamente salino	>16000

Anexo 4.2 Indicadores biológicos del suelo

Se midieron las tasas de CO_2 y el contenido de glucosidasa para las muestras de suelo (**Tabla A6**),

- Respiración microbiana (Tasa de producción de CO_2).

En el presente estudio la mayor tasa de CO_2 corresponde a la muestra 6 Pegalajar I, mientras que la mínima corresponde a la muestra 2p Benayas (**Tabla A6**).

- Glucosidasa.

El valor máximo corresponde a la muestra de suelo procedente de la finca 10 San José, mientras que el mínimo corresponde a la finca 3p Fuerte del Rey (**Tabla A6**).

Tabla A6. Valores de los indicadores de calidad biológicos de las muestras de suelo

Muestra de suelo	Sustrato	Tasa CO₂ (ug CO₂-C/g/h)	Glucosidasa (μmol·g⁻¹·h⁻¹)
1 Benayas	Glucosa	0.226	0.836
1p Benayas	Glucosa	0.211	0.296
2 Benayas	Glucosa	0.224	0.443
2p Benayas	Glucosa	0.173	0.414
3 Fuerte del rey	Glucosa	0.323	0.934
3p Fuerte del rey	Glucosa	0.230	0.187
4 Benzalá	Glucosa	0.278	0.908
4p Benzalá	Glucosa	0.265	0.365
5 Tierras Cucas	Glucosa	0.301	1.592
5p Tierras Cucas	Glucosa	0.361	0.885
6 Pegalajar I	Glucosa	0.673	1.699
6p Pegalajar I	Glucosa	0.251	0.721
7 Pegalajar II	Glucosa	0.499	1.742
7p Pegalajar II	Glucosa	0.302	0.984
8 Virgen de los Milagros	Glucosa	0.366	0.781
8p Virgen de los Milagros	Glucosa	0.359	1.171
9 Cortijo de Guadiana	Glucosa	0.319	0.702
9p Cortijo de Guadiana	Glucosa	0.240	0.615
10 Finca San José	Glucosa	0.298	2.441
10p Finca San José	Glucosa	0.280	1.176