



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Ciencias Ambientales

Efectos de la erosión hídrica sobre la diversidad funcional de microorganismos del suelo en laderas restauradas de la minería del carbón a cielo abierto

Water erosion effects on the functional diversity of soil micro-organisms on reclaimed slopes after open-cast coal mining

Autor

Alberto Cirera Sancho

Directores

José Manuel Nicolau (1)

Luis Merino Martín (2)

Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Escuela Politécnica Superior-Universidad de Zaragoza, Carretera de Cuarte, s/n 22071, Huesca (1); Departamento de Biología, Geología, Física y Química Inorgánica, Universidad Rey Juan Carlos, Calle Tulipán s/n 28933, Móstoles (2)

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR
2023

Declaración de autoría:

El Trabajo de Fin de Grado que presento para su exposición y defensa es original y todas las fuentes utilizadas para su realización han sido debidamente citadas en el mismo.

En Huesca, a 19 de junio de 2023

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized initial 'A' followed by a long horizontal stroke and a small flourish at the end.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
Palabras Clave.....	1
ABSTRACT	2
Key Words	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. METODOLOGÍA.....	8
2.1. Descripción del área de estudio	8
2.2. Análisis de parámetros fisicoquímicos	10
2.3. Respiración inducida por múltiples sustratos (MSIR)	12
2.4. Cálculos y métodos estadísticos	14
3. RESULTADOS	16
3.1. Efectos de la erosión y su interacción con la vegetación en la actividad y diversidad catabólica de los microorganismos del suelo.	16
3.1.1. Respiración basal.....	16
3.1.2. Diversidad funcional.....	17
3.1.3. Actividad catabólica	18
3.1.4. Análisis multivariantes	20
3.1.5. Matriz de correlaciones	24
4. DISCUSIÓN	25
4.1. Efectos de la erosión sobre la actividad catabólica y la diversidad funcional de los microorganismos del suelo	25
4.2. Efectos de la vegetación (<i>Genista scorpius</i>) en la actividad catabólica y la diversidad funcional de los microorganismos del suelo a lo largo de un gradiente de erosión.....	28
CONCLUSIONES.....	30
Conclusiones generales	30
Conclusiones prácticas enfocadas en las restauraciones	31

AGRADECIMIENTOS.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32
ANEXO A: Metodología de la respirometría inducida por múltiples sustratos (MSIR) con MicroResp™	39
1. Preparación de las placas de detección.....	39
1.1. Preparación de la solución indicadora.....	39
1.2. Preparación de las placas de detección	39
2. Preparación de los sustratos.....	40
3. Llenado de placas con suelo.....	41
4. Aplicación de los sustratos al suelo y mediciones	43

RESUMEN

La erosión es el principal factor limitante en el desarrollo de una comunidad biológica en restauraciones mineras en climas mediterráneos. A pesar de ello, existe poca información sobre cómo la erosión afecta a los microorganismos del suelo en ambientes restaurados. En este trabajo se estudia la diversidad funcional y la actividad catabólica de los suelos de laderas restauradas a lo largo de un gradiente de erosión, así como el posible efecto regulador de la vegetación sobre esta relación. Para ello se han analizado muestras de suelo en cuatro laderas restauradas con distintas tasas de erosión y en una quinta ladera natural, en zonas de suelo desnudo y debajo de aliagas (*Genista scorpius*). Se utilizó la técnica de MSIR con MicroResp™ para obtener los perfiles catabólicos de cada muestra. Los resultados muestran que la erosión disminuyó la diversidad funcional y la actividad catabólica de los microorganismos del suelo en los suelos desnudos, pero no bajo islas de fertilidad. Estos resultados no sólo ponen de manifiesto la importancia del control de la erosión para la correcta evolución de los suelos restaurados, sino también el efecto positivo de las islas de fertilidad sobre la actividad y diversidad de estos suelos.

Palabras Clave

Restauración Ecológica, Microorganismos, Actividad Catabólica, MicroResp, Perfiles Catabólicos (CLPP).

ABSTRACT

Erosion plays a critical role in impeding the establishment of functional ecosystems in mining restorations in Mediterranean climates. However, the impact of erosion on soil microorganisms in these restored environments remains poorly understood. This study aims to investigate the functional diversity and catabolic activity of soils on restored slopes along an erosion gradient, while also examining the influence of vegetation on this relationship. To achieve this objective, surface soil samples were collected from four restored slopes with varying erosion rates, as well as from a fifth natural slope, both in open areas and beneath the shrub species *Genista scorpius*. The Multiple Substrate Induced Respiration (MSIR) technique, in conjunction with the MicroResp™ protocol, was employed to obtain the catabolic profile of each soil sample. Our findings reveal a negative influence of the erosion gradient on the functional diversity and catabolic activity of soil microorganisms in open spaces. Moreover, this effect was found to be diminished within fertility islands. These outcomes underscore not only the criticality of erosion control for the proper development of restored soils but also the beneficial impact of fertility islands on the activity and diversity of these soils.

Key Words

Ecological Restoration, Microorganisms, Catabolic Activity, MicroResp™, Catabolic Profiles (CLPP).

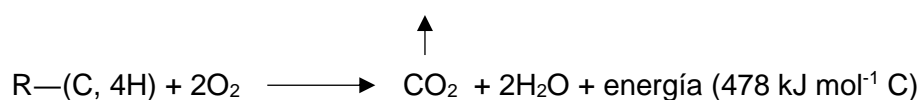
1. INTRODUCCIÓN

La minería a cielo abierto es una de las actividades realizadas por el ser humano que más impacto genera en el medio ambiente (Nicolau y Moreno-de las Heras, 2005). A nivel local, altera los 3 compartimentos de los ecosistemas terrestres: la vegetación, el suelo y la geomorfología. Dados sus impactos, y gracias a la creciente conciencia ambiental, la tecnología y el conocimiento aplicados a las restauraciones mineras han sufrido un notable aumento en los últimos años (Dixon et al., 2022; Xu et al., 2023). Sin embargo, en la práctica, muchas restauraciones mineras siguen obteniendo resultados muy limitados (Josa et al., 2012; Mansourian et al., 2005; Haigh, 2000).

En el clima mediterráneo continental, la disponibilidad de agua es el principal factor limitante en la estructura y dinámica de la vegetación tanto en ambientes naturales como restaurados (Tormo et al., 2006). La disponibilidad y distribución espacial de este recurso limitante pueden verse intensamente alteradas cuando se produce una fuerte erosión, afectando a las dinámicas y a las funciones de los ecosistemas (Pimentel et al., 1995). La reducción de esta disponibilidad de agua inducida por la erosión podría desencadenar procesos de retroalimentación positiva de degradación, reduciendo el crecimiento de la vegetación y, por lo tanto, aumentando todavía más los procesos de erosión y de pérdida de agua por escorrentía superficial (Wilcox et al., 2003; Merino-Martín et al., 2015). Además, dentro de los ambientes mediterráneos áridos, se considera que las laderas restauradas tras minería a cielo abierto son especialmente vulnerables a los efectos de la erosión (Loch, 2000; Nicolau y Asensio, 2000). En estos ambientes, con precipitaciones escasas pero concentradas, producidas de manera torrencial, con suelos pobres y poco profundos, y con una escasa y estacional vegetación, se dan procesos de erosión en regueros muy activos (Moreno-de las Heras et al., 2005). Estos limitan la disponibilidad de agua y modifican la distribución espacial de la humedad del suelo a escala de ladera, reduciendo las oportunidades de infiltración de la escorrentía y concentrando la humedad edáfica en la red de canales (Moreno-de las Heras et al., 2010). A largo plazo, estos sistemas reguerizados evolucionan hacia comunidades poco productivas y con pocas especies vegetales distribuidas por el patrón de la humedad del suelo y por las perturbaciones mecánicas de los regueros (Moreno-de las Heras et al., 2011). Esta erosión y sus consecuencias, por lo tanto, son una de las principales causas por las que muchas restauraciones de minas en ambiente mediterráneo continental fracasan (Moreno-de Las Heras et al., 2008).

La disponibilidad de agua también depende en gran medida de las características del suelo, que determinan su tasa de infiltración y su capacidad de almacenamiento y retención de agua. El suelo es fundamental como sostén de cualquier ecosistema terrestre, siendo la base en la que crece la vegetación y por tanto el soporte de los productores primarios en la cadena trófica. Sustenta funciones primarias del ecosistema y permite el crecimiento de la vegetación, gracias al sustrato y al aporte de los nutrientes necesarios (Büneman et al., 2018). Sin embargo, para que se establezca un suelo de calidad tienen que darse una serie de procesos que pueden tardar desde décadas hasta miles de años (Van Breemen y Buurman, 2002). Hasta hace relativamente poco, muchas empresas mineras desechaban los suelos junto al resto de escombros durante su explotación, dejando a las restauraciones ecológicas posteriores apenas la posibilidad de juntar estos estériles de minería con algún material mineral cercano para formar suelos artificiales y pobres (Feng et al., 2019). Actualmente, en muchos casos se realiza una gestión del suelo previa a la actividad impactante con el fin de utilizarlo en la restauración posterior (Merino-Martín et al., 2017). Sin embargo, no siempre se consideran todos los aspectos edafológicos, como la importancia de los procesos biológicos del suelo, cruciales para el éxito del ecosistema restaurado (Heneghan et al., 2008).

Dentro de estos procesos biológicos, los microorganismos edáficos representan la parte más significativa, y a pesar de su reducido tamaño, la cantidad de CO₂ producido por su respiración es 10 veces mayor que el CO₂ emitido por los combustibles fósiles (Bond-Lamberty y Thomson, 2010; Friedlingstein et al., 2022; Raich y Schlesinger, 1992). Son de vital importancia para el funcionamiento del sistema suelo (Nielsen et al., 2002), y mediante su actividad catabólica, son los principales descomponedores en numerosas cadenas tróficas, participando a su vez y siendo elementos indispensables en los ciclos del carbono, nitrógeno, azufre o fósforo (Koshila et al., 2019). Conocer la actividad catabólica de los microorganismos del suelo pasa por conocer la materia orgánica del suelo y su composición. Esta materia, que es el principal indicador de calidad de los suelos (Weil y Magdoff, 2004), es una mezcla compleja y variada de sustancias orgánicas. En un suelo bien aireado, o lo que es lo mismo, en un medio aeróbico, todos los componentes orgánicos generados por las plantas pueden ser metabolizados por los microorganismos del suelo a mayor o menor velocidad. Esto ocurre mediante reacciones de oxidación, que, de manera general, se pueden simplificar con la siguiente ecuación (Brady y Weil, 2008):



La importancia de obtener un suelo biológicamente funcional para el éxito de las restauraciones se ha reconocido desde hace tiempo (Palmer, 1992; Beeby, 1993). De hecho, Bradshaw (1988) ya apuntaba hacia la importancia de la materia orgánica y el nitrógeno en el suelo, para permitir unos procesos de mineralización activos, es decir, para obtener un suelo funcional. Aunque la relación entre los suelos, sus microorganismos y sus procesos en restauraciones ecológicas tengan especial importancia (Harris, 2009), rara vez se tienen en cuenta estas relaciones en los proyectos de restauración (Farrell et al., 2020).

Para estudiar la funcionalidad biológica de un suelo, se pueden utilizar distintas aproximaciones, como la degradación de la materia orgánica por parte de los microorganismos, o el estudio de los grupos de microorganismos que forman parte de un suelo (Visser y Parkinson, 1992; Sparling, 1997). Tres parámetros comúnmente empleados son la respiración basal, la actividad catabólica y la diversidad funcional de los microorganismos del suelo. La respiración basal es el resultado de la respiración de los microorganismos al catabolizar la materia orgánica disponible en el propio suelo (Pell et al., 2006). Para calcularla, se utilizan los valores de emisión de CO₂ de los microorganismos de un suelo tras ajustar el contenido de humedad. Zak et al. (1994), definen la diversidad funcional de los microorganismos de manera práctica, como los “números, tipos, actividades y tasas a los que una determinada cantidad de sustratos se utilizan por una comunidad de bacterias.” Una definición más simple, centrada en las funciones de los microorganismos, es la aportada por Escalas et al. (2019), sosteniendo que la diversidad funcional se conoce como “la diversidad de funciones llevadas a cabo por los organismos en el ecosistema”. Para este estudio se va a utilizar la definición de Hernández-Cáceres et al. (2022), en la que se concreta la diversidad funcional catabólica, es decir, “la capacidad de una comunidad de microorganismos de utilizar diferentes sustratos para respirar, medida mediante los perfiles catabólicos de respuesta”. Una menor diversidad funcional catabólica supone la presencia de una comunidad de microorganismos con una menor resiliencia en la función de descomposición de la materia orgánica, lo que implica una desventaja ante posibles perturbaciones (Nsabimana et al., 2004). La actividad catabólica global del suelo se define como la suma de las distintas reacciones de oxidación que tienen lugar para degradar la materia orgánica por los microorganismos heterótrofos, y se puede estimar con el CO₂ producido por la respiración de estos (Shihan et al., 2017). Estas medidas de diversidad funcional y actividad catabólica están siendo cada vez más estudiadas, proporcionando una conexión entre la biodiversidad y los servicios ecosistémicos (Tilman et al., 2014). En algunos casos pueden aportar información ecológica muy

valiosa que no aporta la riqueza taxonómica (Louca et al., 2018), aunque generalmente suelen dar informaciones complementarias.

Concretamente, la actividad catabólica y la diversidad funcional se encuentran estrechamente ligadas a factores del suelo, especialmente al pH (Moscatelli et al., 2018), al contenido de materia orgánica (Bongiorno et al., 2020), a la humedad edáfica y a la textura (Zhou et al., 2018); pero también a factores ambientales como la temperatura (D'Alò et al., 2021). Otro factor importante es la vegetación, habiéndose observado que la diversidad catabólica aumenta con la diversidad vegetal (Liu et al., 2008). Este efecto puede deberse a comunidades vegetales diversas, que aumentan la variedad de fuentes de carbono (Reverchon et al., 2015), o a especies individuales concretas, que, por sus características propias, alteran la estructura y el funcionamiento de las comunidades de microorganismos bajo su dosel (Xu et al., 2018; Hernández-Cáceres et al., 2022). También se ha observado un efecto de "isla de fertilidad", en el que, para zonas áridas o semiáridas, la calidad del suelo (materia orgánica, nutrientes, humedad edáfica) mejora bajo la vegetación, con un consecuente aumento de la diversidad catabólica (García-Moya y Mckell, 1970; Schlesinger et al., 1996; García et al., 2018).

Como ejemplo de la potencial importancia de la diversidad funcional del suelo en las restauraciones, se ha evidenciado que para ciertos casos el fracaso en reintroducir determinadas especies en una restauración podría estar causado por la falta de determinados grupos funcionales de microorganismos en el suelo (Grman et al., 2020). Sin embargo, muchos de estos estudios obtienen resultados dispares o no llegan a resultados claros (Donhauser y Frey, 2018; Collins et al., 2020).

Por otro lado, y partiendo de la base del papel crucial que cumplen los microorganismos y sus interacciones en el suelo para cualquier ecosistema, se ha reconocido la importancia de conocer cómo la erosión, uno de los principales procesos de degradación de suelos, afecta a los microorganismos del suelo (Qiu et al., 2021). De hecho, Whisenant et al. (1995) ya encontraron en los procesos erosivos una amenaza hacia la estabilidad de los recursos edáficos que no permitía la formación de un suelo biológicamente funcional. Entender los cambios bióticos y abióticos producidos por la erosión y su consecuente degradación del suelo, es fundamental si se quieren restaurar ecosistemas erosionados o en los que la erosión actúa como factor limitante. Siguiendo esta línea, Qiu et al. (2021) demostraron que la erosión hídrica redujo la diversidad funcional de los microorganismos en dos agroecosistemas distintos, y que seguramente estos cambios se pudiesen deber a la pérdida de calidad del suelo asociada a esta erosión. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estas relaciones pueden

cambiar con el clima, con el tipo de suelo o con los usos del suelo, lo que subraya la necesidad de llevar a cabo más investigaciones para entender en profundidad esta relación. Además, todavía hay menos conocimiento sobre cómo esta relación se manifiesta en ecosistemas restaurados, donde los suelos suelen ser considerablemente más pobres y sensibles a la erosión.

Por ello, es fundamental, ya no sólo para la restauración ecológica sino para el conocimiento ecológico de los suelos mediterráneos, evaluar el efecto de la erosión sobre la diversidad funcional del suelo en laderas restauradas tras minería a cielo abierto. Los objetivos de este trabajo son estudiar la manera en la que un gradiente de erosión pasado, que ha derivado en cambios geomorfológicos y en una alteración del patrón de disponibilidad de agua para las plantas, afecta a la diversidad funcional de los microorganismos del suelo, y cómo esto a su vez, se ve mediado por el efecto “isla de fertilidad” producido por *Genista scorpius* (aliaga), con vistas a la aplicación de este conocimiento a restauraciones mineras en ambientes mediterráneos. La hipótesis de partida es que este gradiente de erosión producirá una drástica reducción de la diversidad funcional y actividad catabólica de los microorganismos del suelo en los estadios con mayores tasas de erosión. Además, se hipotetiza que esta reducción de la diversidad funcional y actividad catabólica se verá modulada por el efecto de la vegetación (*G. scorpius*) que actuará como isla de fertilidad incrementando la actividad catabólica y la diversidad funcional de los microorganismos respecto al suelo desnudo y disminuyendo el efecto neto de la erosión bajo su dosel.

2. METODOLOGÍA

2.1. Descripción del área de estudio

La toma de muestras para este estudio se llevó a cabo en laderas restauradas de la mina de carbón a cielo abierto El Moral, en Utrillas, España (40°47'24" N, 0°49'48" W, 1100 m). El clima es Mediterráneo-Continental, con una temperatura media anual de 11 °C y con un periodo de heladas desde octubre hasta abril. El régimen de humedad se puede clasificar como Mediterráneo-seco, con unas precipitaciones anuales medias de 466 mm concentradas en otoño y primavera, y una evapotranspiración potencial de 758mm.

Las laderas de estudio se seleccionaron para cubrir un gradiente de erosión con 5 estadios, siendo 4 estadios restaurados tras minería y el 5º estadio el ecosistema de referencia representado por laderas naturales sin restaurar. Las otras cuatro laderas se restauraron siguiendo los mismos protocolos, entre 1988 y 1989, por la empresa *Minas y Ferrocarril de Utrillas S.A.* No se guardó el suelo en la apertura de la mina, y en la restauración, se creó un tecnosuelo con estériles de minería de la formación cretácica de Utrillas como material parental. Este consiste en un sustrato franco-arcilloso (mineralogía caolinítica-ilitica) de pH básico. La revegetación tuvo lugar en la primavera de 1989, mediante siembra de una mezcla de gramíneas perennes (*Festuca rubra*, *Festuca arundinacea*, *Poa pratensis* y *Lolium perenne*) con leguminosas herbáceas (*Medicago sativa* y *Onobrychis viciifolia*). La preparación del suelo para la siembra consistió en un arado perpendicular a la pendiente de las laderas sin enmienda orgánica. Todas las laderas tienen similar orientación y pendiente.

Aunque estas cuatro laderas se restauraron utilizando los mismos procedimientos, tuvieron unas tasas de erosión iniciales diferentes (0 a 58 t ha⁻¹ año⁻¹) lo que resultó en diferencias en el desarrollo de la red de regueros. Estas diferencias se derivan del diferente volumen de escorrentía exógena que recibe cada ladera desde su parte superior debido a un diseño geomorfológico incorrecto. Así, en las laderas "tipo A" se desarrolla una densa y voluminosa red de regueros desde la parte superior a la inferior de la ladera, y con una vegetación anual casi inexistente. En las laderas "tipo B", la erosión en regueros sigue siendo activa, pero las redes son discontinuas, de menor profundidad y longitud, y se originan en puntos intermedios de la ladera. En estas laderas ya se desarrolla más vegetación, aunque limitada principalmente a los espacios entre los regueros y con muchas zonas abiertas con suelo desnudo. En las laderas "tipo C", aunque todavía existen pequeños regueros, la erosión por escorrentía laminar es la predominante, distribuyéndose la vegetación y la humedad en claros exportadores y en

manchas importadoras de agua y de nutrientes. Y, por último, en las laderas “tipo D”, ya sin regueros, se sigue observando un patrón de la vegetación en manchas y claros, pero con menor número y tamaño de claros con suelo desnudo y mayor número y tamaño de las manchas de vegetación (Figura 1). Este gradiente ya ha sido abordado en este área de estudio en las tesis doctorales de Moreno-de las Heras (2009a) y Merino-Martín (2010), estudiando el primero los efectos de la erosión en regueros y el segundo los efectos de la erosión laminar. Este trabajo parte de la base de que a lo largo de este gradiente de erosión se producen notables diferencias en la distribución de la humedad edáfica (Moreno-de las Heras et al., 2005), de la vegetación (Espigares et al., 2011) y de diferentes parámetros del suelo (Moreno-de las Heras, 2009c). Además, estas diferencias están mediadas por el patrón regueros-interregueros en las laderas más reguerizadas (Moreno-de las Heras, 2009c), y por el patrón manchas exportadoras-sumideros importadores en las laderas en las que desaparecen los regueros y la erosión laminar adquiere mayor relevancia (Merino-Martín, 2010).

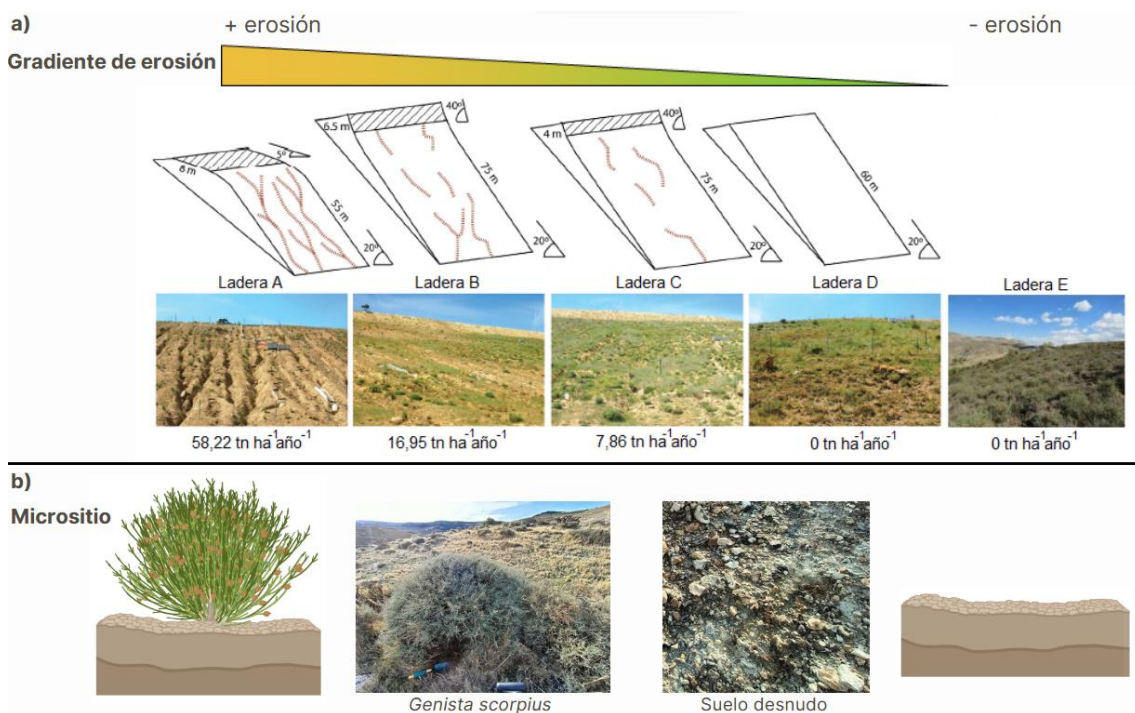


Figura 1. a) Gradiente de erosión a lo largo de los tipos de ladera. Adaptado de Moreno-de las Heras et al., (2011). b) Micrositios de los que se han obtenido muestras en cada ladera. Esquemas realizados con BioRender.

Las tasas de erosión se estimaron midiendo los metros lineales de reguero por metro cuadrado en cada ladera, y transformando los datos a valores de erosión según el procedimiento de Morgan (1995) (Moreno-de las Heras et al., 2010). De cada uno de estos estadios (incluyendo el ecosistema de referencia) se han elegido 3 réplicas. Para las réplicas de las laderas, se seleccionaron laderas con similar régimen hídrico (red de

regueros o patrón manchas-claros) y desarrollo de la vegetación a las laderas modelo (Figura 2).

Se tomaron muestras de suelo debajo de aliagas (*Genista scorpius*) y en espacios abiertos con suelo desnudo (con una distancia a la primera mancha de vegetación o al primer individuo leñoso de un mínimo de 50 cm) en las 15 laderas (Figura 1b), recogiendo 3 muestras de cada micrositio por ladera (5 estadios x 3 réplicas de estadio x 2 micrositos x 3 réplicas de micrositos) (Figura 2). En las laderas A y B todas las muestras se han recogido en los espacios entre los regueros, y en las laderas C, D y E las muestras de suelo desnudo se han recogido en claros exportadores de escorrentía, y las muestras de aliaga en las manchas importadoras de escorrentía. Las muestras se recolectaron de los primeros 5 cm del suelo, retirando la hojarasca, durante el mes de noviembre de 2022, antes de que se produjesen las primeras heladas. Estas muestras se secaron al aire en bandejas a temperatura ambiente durante 60 días, para después tamizarlas con un tamaño de poro de 2 mm de diámetro.

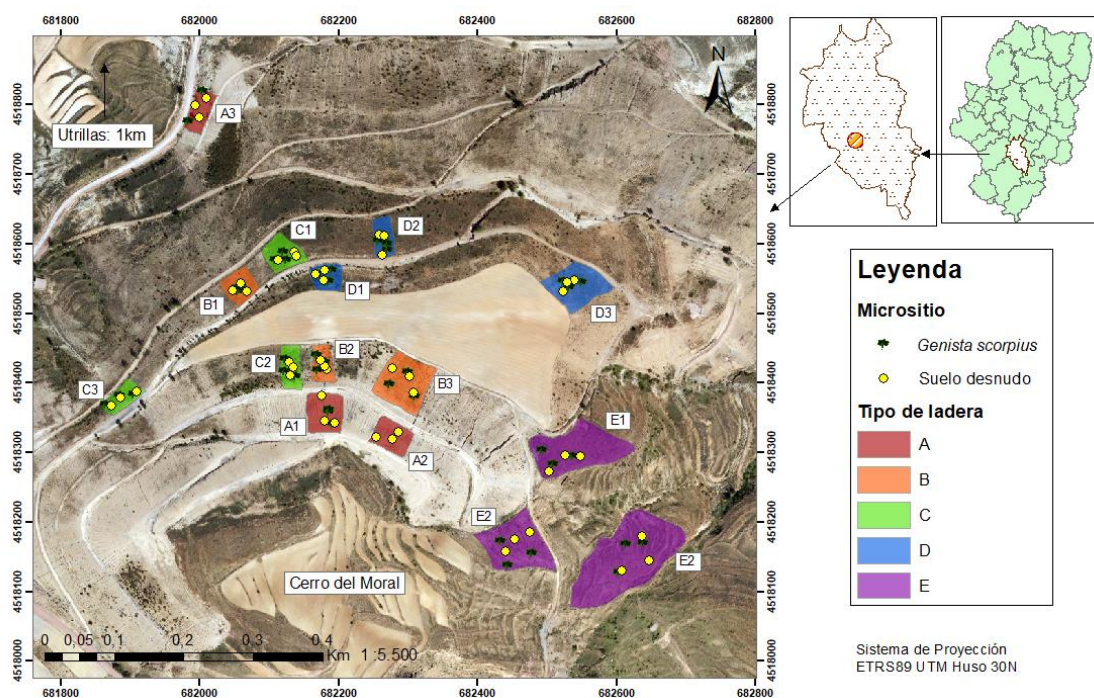


Figura 2. Mapa de las laderas y los puntos de muestreo. Elaborado con ArcGIS.

2.2. Análisis de parámetros fisicoquímicos

Se realizaron muestras compuestas de las 3 réplicas de cada micrositio en cada ladera, quedando 1 muestra por ladera para el suelo debajo de *Genista scorpius* y otra muestra por ladera para el suelo desnudo. Estas muestras compuestas se enviaron para su análisis a la Unidad de Análisis Agrícolas del Laboratorio Agroambiental del Gobierno

de Aragón para obtener el contenido de materia orgánica de cada muestra (n=30). También se determinaron el contenido de carbonatos y la textura, pero para estos parámetros se mezclaron las muestras de una misma ladera, quedando únicamente una muestra compuesta por ladera (n=15). Para el contenido de materia orgánica (MO) se calculó la materia orgánica oxidable por espectrofotometría UV-VIS, con un rango de detección a partir de 0,20 g / 100 g suelo seco, según MT-SUE-002, un método interno basado en BOE-A-1976-6778 Apdo. 25. Los carbonatos se determinaron por volumetría según MT-SUE-004, método interno basado en BOE-A-1976-6778 Apdo. 3b. La textura se determinó por sedimentación, siguiendo la clasificación del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (U.S.D.A), dividiendo los resultados en 4 clases texturales: arena, limo grueso, limo fino, y arcilla. El pH y la conductividad eléctrica (CE) se midieron en el laboratorio del Departamento de Biología, Geología, Física y Química Inorgánica de la Universidad Rey Juan Carlos, realizando una disolución de suelo en agua 1/5, con 20 g de suelo y 100 ml de agua destilada, utilizando un pHmetro y un conductímetro previamente calibrados, y con la disolución en constante agitación magnética. Los resultados de estos análisis se indican en la Tabla 1.

Tabla 1.
Características básicas de los 5 tipos de ladera

	N	Ladera A	Ladera B	Ladera C	Ladera D	Ladera E
<i>Naturaleza de las laderas, topografía y erosión</i>						
Naturaleza de la ladera		Restaurada	Restaurada	Restaurada	Restaurada	Natural
Pendiente ¹ (°)		20,35 (4,78) ^a	18,96 (4,00) ^{ab}	18,62 (5,01) ^{ab}	18,35 (4,88) ^{ab}	13,81 (6,23) ^b
Orientación		Norte	Norte	Norte	Norte	Norte
Densidad de regueros ² (m m ⁻²)		0,86	0,58	0,3	0	0
Erosión por regueros ³ (t ha ⁻¹ año ⁻¹)		58,22	16,95	7,86	0	0
Distancia para suelo desnudo ⁴ (m)	9	2,26 (0,85) ^a	1,31 (0,4) ^b	0,86 (0,24) ^b	0,74 (0,13) ^b	1,00 (0,22) ^b
Volumen de <i>Genista scorpius</i> ⁵ (m ³)	9	0,10 (0,12) ^a	1,54 (1,05) ^b	1,01 (0,54) ^{ab}	0,91 (0,34) ^{ab}	1,27 (1,33) ^{ab}
<i>Parámetros físico-químicos</i>						
<i>General</i>						
Arenas (%)	3	24,50 (3,22) ^a	35,95 (4,03) ^a	40,45 (3,97) ^a	38,03 (10,02) ^a	43,07 (13,97) ^a
Limo grueso (%)	3	11,95 (2,23) ^a	12,26 (0,76) ^a	10,88 (1,31) ^a	9,41 (0,77) ^{ab}	5,24 (3,46) ^c
Limo fino (%)	3	28,08 (4,40) ^a	24,16 (3,89) ^a	22,28 (2,58) ^a	23,02 (4,95) ^a	27,17 (10,00) ^a
Limos (%)	3	44,01 (8,96) ^a	40,51 (7,32) ^a	36,79 (6,62) ^a	35,57 (10,12) ^a	34,15 (6,20) ^a
Arcillas (%)	3	35,47 (6,52) ^a	23,54 (6,68) ^a	22,77 (8,51) ^a	26,39 (0,55) ^a	22,78 (9,58) ^a
Carbonatos (g 100g ⁻¹)	3	2,67 (1,15) ^a	11,67 (8,02) ^a	9,00 (1,00) ^a	11,67 (4,51) ^a	12,33 (17,90) ^a
<i>Suelo desnudo</i>						
MO (%)	3	1,02 (0,22) ^a	2,01 (0,57) ^{ab}	2,68 (1,42) ^{ab}	3,41 (1,74) ^{ab}	5,09 (2,17) ^b
CE (us/cm)	3	597 (322) ^{a *}	84 (18) ^b	79 (20) ^b	88 (18) ^b	62 (5) ^b
pH	3	7,53 (0,41) ^{a *}	8,64 (0,13) ^b	8,51 (0,33) ^b	8,27 (0,21) ^{ab}	8,05 (0,25) ^{ab}
<i>Genista scorpius</i>						
MO (%)	3	1,53 (0,43) ^a	4,94 (1,64) ^{ab}	6,03 (0,63) ^b	4,75 (0,83) ^{ab}	6,53 (0,28) ^b
CE (us/cm)	3	155 (103) ^{a *}	107 (18) ^a	142 (84) ^a	108 (24) ^a	164 (26) ^a
pH	3	8,60 (0,42) ^{a *}	8,61 (0,13) ^a	8,27 (0,28) ^{ab}	8,23 (0,06) ^{ab}	7,58 (0,52) ^b

N: Número de muestras; MO: Materia orgánica; CE: Conductividad eléctrica.

Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar.

Diferentes letras muestran diferencias significativas entre laderas al 95%, usando ANOVA y post-hoc Tukey o Kruskal-Wallis y post-hoc Mann-Whitney como test no paramétricos.

¹ Pendiente calculada con ArcGIS a partir de LiDAR 2020.

² Densidad de regueros de las laderas modelo, calculada por Moreno-de las Heras et al. (2009).

³ Erosión por regueros de las laderas modelo, estimada por Moreno-de las Heras et al., (2009) siguiendo el procedimiento de Morgan (1995).

2.3. Respiración inducida por múltiples sustratos (MSIR)

La diversidad funcional se estimó siguiendo el protocolo de MicroResp™ propuesto por Campbell et al. (2003), con adaptaciones de Fanin et al. (2014). La respiración inducida por múltiples sustratos (MSIR) es un método para caracterizar y evaluar la actividad y la diversidad funcional de la microbiota del suelo. Estudia la capacidad de los microorganismos del suelo de producir CO₂ tras la mineralización de diferentes sustratos, y esto se utiliza como un indicador de la actividad catabólica global y de la diversidad funcional de las comunidades de microorganismos del suelo (Beare et al., 1990; Nannipieri et al., 1990). Como la producción de CO₂ se mide 6 horas después de inducir la respiración de los microorganismos mediante la adición de los sustratos (Chapman et al., 2007), el sistema MicroResp™ tiene la ventaja de dar respuestas inmediatas a la metabolización de los sustratos por parte de los microorganismos ya existentes en el suelo, en lugar de esperar al crecimiento microbiano. De manera resumida, el principio de MicroResp™ se basa en el uso de un gel indicador (rojo de Cresol) que cambia de color con el cambio de pH provocado por el aumento de la concentración del CO₂ de acuerdo con la siguiente ecuación:



Cuando el pH disminuye, el rojo de Cresol vira de morado a amarillo, pudiéndose cuantificar esta diferencia con un espectrofotómetro UV-VIS, y transformándola a valores de respiración de CO₂ tras una correcta calibración (C-CO₂ respirado g⁻¹ suelo seco h⁻¹). El proceso simplificado se puede observar en la Figura 3.

Los sustratos empleados se seleccionaron con el objetivo de representar el rango de sustratos que naturalmente podrían mineralizar los microorganismos del suelo, incluyendo sustratos de las tres principales familias de compuestos orgánicos encontradas en el suelo y en los exudados radiculares; azúcares o carbohidratos (D-glucosa, N-acetil glucosamina, D(-)-fructosa, D(+)-galactosa y L(+)-arabinosa), aminoácidos (L(+)-asparagina monohidratada, L-serina, glicina, L-glutamina y L-cisteína) y ácidos orgánicos (ácido oxálico, ácido málico, ácido cítrico monohidratado, ácido 2-cetoglutarico y ácido 3-4-dihidroxibenzoico) (Badri y Vivanco, 2009). Los azúcares y los aminoácidos representan la principal fuente de restos orgánicos encontrados en el suelo, tanto de las hojas como de las raíces (Jones y Murphy, 2007), mientras que los ácidos orgánicos se liberan principalmente en los exudados radiculares (Farrar et al., 2003). Se calcularon las soluciones de sustrato para proporcionar 1,5 mg de C por cada gramo de suelo seco para un 80% de la capacidad de campo del suelo en el momento de los análisis (Fanin et al., 2014).

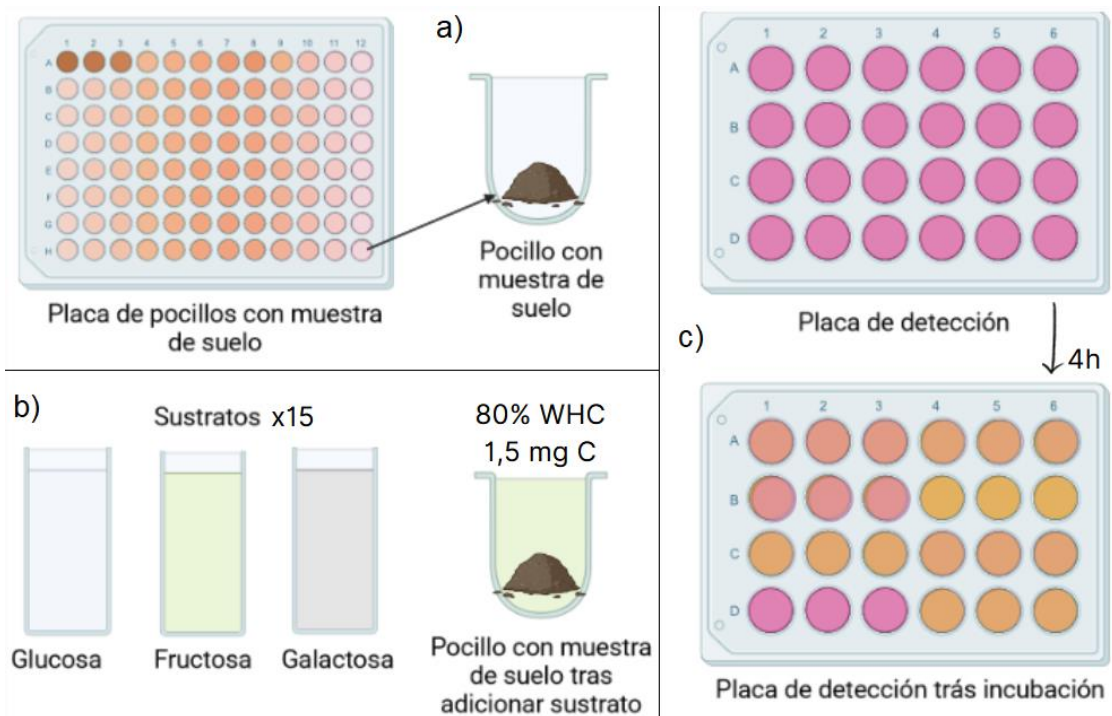


Figura 3. Protocolo de MicroResp™ simplificado, elaborado con BioRender. a) Se llena con muestra de suelo seco la placa de suelos, repartiéndolo de manera homogénea entre los pocillos. b) Se añaden 15 sustratos (+ agua para la respiración basal) al suelo, diluidos de manera que se adicionen 1,5 mg de carbono por cada gramo de suelo seco, y aportando un contenido de humedad del 80% de la capacidad de campo. c) Tras dos horas, se monta el sistema de MicroResp™ y se añade la placa de detección, se deja el suelo incubarse 4 horas más y se retira la placa, cuantificando la diferencia de color provocada por el aumento de la concentración de CO₂ con un espectrofotómetro. Esta diferencia en la concentración de CO₂ es la producida por la respiración de los microorganismos al catabolizar los diferentes sustratos.

Para ello, se estimó la capacidad de campo de los suelos y se comparó con la calculada en los suelos del área de estudio previamente, tomando el valor definitivo del 18%. Se prepararon disoluciones de 50 ml para cada sustrato, que se filtraron previamente a través de un filtro de 45 µm de diámetro de poro y se almacenaron en frío a 4°C hasta el momento de su utilización. Tras aplicar los sustratos al suelo se dejaban los suelos a oscuras sin cubrir durante dos horas para que el sustrato reaccionase con los carbonatos del suelo y escapase el CO₂ abiótico que podría causar interferencias. Una vez realizada la incubación de dos horas, las placas de suelo se tapaban con las placas de detección con rojo Cresol. Estas placas se midieron antes e inmediatamente después de la incubación del suelo (4 horas, sin luz) con un espectrofotómetro UV-VIS y a una longitud de onda de 570 nm. Los detalles del procedimiento del análisis de la respiración inducida por múltiples sustratos (MSIR) se pueden encontrar en el ANEXO A.

2.4. Cálculos y métodos estadísticos

Los valores de las pendientes de las laderas se han calculado con el programa ArcGIS, a partir de la segunda cobertura de LIDAR de 2020 (CNIG, 2020), con una precisión altimétrica de 0,2 cm y una densidad de puntos de 0,5 puntos por m².

Los valores de absorbancia se normalizaron con la ecuación [1], y se transformaron en valores de CO₂ utilizando la recta de calibración [2].

$$DO_{\text{normalizada}} = \frac{DO_{t4}}{DO_{t10}} \times DO_{t0\text{Avg}} \quad [1]$$

DO: Densidad óptica; DO_{t4} y DO_{t0}: Densidad óptica tras las 4 horas de incubación y antes de montar la placa, respectivamente; DO_{t0Avg}: Densidad óptica media para t₀.

$$\%CO_2 = -0,1546 - \frac{4,1417}{1 - (5,2191 \times DO_{\text{normalizada}})} \quad [2]$$

Los porcentajes de CO₂ se transformaron en valores de SIR, Substrate Induced Respiration, (µg C / g de suelo seco / hora) teniendo en cuenta las horas de incubación (4 h) los gramos de suelo seco por pocillo para cada placa, el volumen de la atmósfera en la que se acumula el CO₂ (945 µl) la transformación de volumen a moles para un gas (22,4 mol/l) y la masa molar del C (12 g/mol), según la ecuación [3].

$$SIR = \%CO_2 \times 12 \times 9,45 / 22,4 / g_{\text{suelo seco por pocillo}} / 4h \quad [3]$$

Se eliminó un máximo de 1 resultado de las 3 réplicas de los sustratos si el coeficiente de variación era mayor o igual al 10%. Se ordenaron los datos y se restaron los valores de respiración basal (metabolización del agua), para generar una tabla de datos con valores de metabolización para cada sustrato (Creamer et al., 2016). Para el resto de los análisis se ha utilizado el software estadístico “R” (R Core Team, 2023) con el paquete “vegan” (Oksanen et al., 2022). Tras un análisis exploratorio de los datos, para cada muestra de suelo se calcularon los siguientes parámetros: a) los índices de diversidad de Shannon (H') como indicador de la diversidad catabólica de los microorganismos del suelo;

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i \quad \text{Shannon - Weaver}$$

p_i: proporción de los valores de SIR (respiración) de un sustrato respecto a los valores de SIR de todos los sustratos para una muestra.

b) la suma de todos los sustratos, como indicador de la actividad catabólica global de los microorganismos del suelo; y c) la suma de los sustratos separándolos por su naturaleza (azúcares, aminoácidos y ácidos). Para evaluar el efecto de la erosión y el

micrositio sobre estos índices, se realizaron test ANOVA, seguidos de test post-hoc de Tukey. Se comprobó, en todos los casos, que se cumplían los supuestos de normalidad y de homocedasticidad mediante los test de Shapiro-Wilk y de Levene. En el caso de que no se cumpliera el supuesto de normalidad, pero sí el de homogeneidad de las varianzas, se evaluaban los gráficos de residuos, y si no presentaban rarezas se utilizaron los test ANOVA. Todas estas diferencias se graficaron con diagramas de cajas. Además, se realizaron test multivariante mediante NMDS (con la función metaMDS del paquete vegan) utilizando las distancias de Bray-Curtis, y se realizó un PERMANOVA para comprobar la significancia de los tratamientos de erosión (ladera) y micrositio (con la función adonis2 del paquete vegan). Asimismo, se realizó un análisis de redundancia basado en distancias (dbRDA; con la función capscale del paquete vegan) para estudiar la distancia de las muestras según las variables ambientales, efectuando un test ANOVA sobre el dbRDA para comprobar la significancia del modelo, de los ejes, y de las propias variables ambientales. Por último, se calcularon las correlaciones entre las variables que presentaban significancia (con la función cor) utilizando el coeficiente de correlación de Pearson, así como el p-valor de estas correlaciones, y se creó una matriz de correlaciones con los valores que presentaban un p-valor menor de 0,05. Para estos análisis y sus representaciones, también se utilizaron los paquetes “ggpubr” (Kassambara, 2023), “ggplot2” (Wickham, 2016), “car” (Fox y Weisberg, 2019), “cowplot” (Wilke, 2020) y “Hmisc” (Harrel, 2023).

3. RESULTADOS

3.1. Efectos de la erosión y su interacción con la vegetación en la actividad y diversidad catabólica de los microorganismos del suelo.

3.1.1. Respiración basal

La erosión y el micrositio (suelo desnudo vs. aliaga) afectaron de manera significativa a la respiración basal de las muestras del suelo (Figura 4, Tabla 2). La respiración basal aumentó conforme disminuyó la erosión ($F=4,6$; $p=0,002$; Tabla 2), y fue mayor en suelos bajo *Genista scorpius* que en suelos desnudos ($F=33,4$; $p<0,0017$; Tabla 2, Figura 4). A lo largo del gradiente de erosión se encontraron diferencias significativas para las muestras debajo de *G. scorpius* para la ladera más erosionada, pero no para las muestras de suelo desnudo, aunque en éstas también se pueden observar valores más bajos para las laderas más erosionadas (Figura 4).

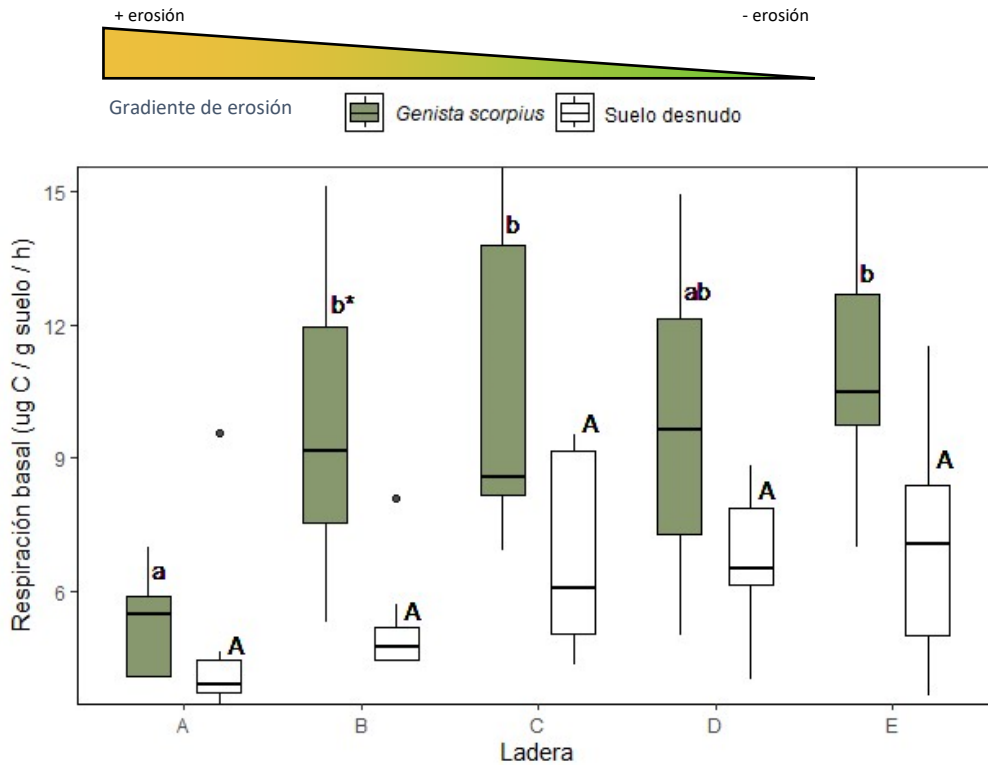


Figura 4. Respiración basal del suelo para los diferentes tipos de laderas y micrositios. La respiración basal es el resultado de no añadir sustrato al suelo y añadir únicamente H₂O. Las letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre las muestras de suelo desnudo, mientras que las letras minúsculas indican diferencias significativas entre las muestras de *Genista scorpius*. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre *Genista scorpius* y suelo desnudo dentro de una misma ladera. Todas las diferencias significativas al 95%, calculadas con ANOVA multifactorial y post-hoc Tukey, tras evaluar supuestos de normalidad y homocedasticidad.

Tabla 2.

Análisis de varianza de dos factores para la respiración basal. Las diferencias son significativas para el gradiente de erosión y para los micrositios, pero no para la interacción.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Erosión	4	184,05	46,01	4,5927	0,002245 **
Micrositio	1	334,77	334,77	33,4157	1,555e-07 ***
Erosión:Micrositio	4	59,48	14,87	1,4844	0,215295
Residuos	76	761,4	10,02		

Erosión:Micrositio responde a las interacciones entre los tipos de laderas a lo largo del gradiente de erosión y los micrositios.

Códigos de significancia: "****" 0,001; "****" 0,01

3.1.2. Diversidad funcional

La erosión disminuyó la diversidad funcional de los microorganismos del suelo en las muestras de suelo desnudo, pero en las muestras bajo *Genista scorpius* este efecto se vio modulado y los valores de diversidad funcional de los microorganismos del suelo, incluso para las laderas más erosionadas, fueron elevados y similares para todo el gradiente de erosión.

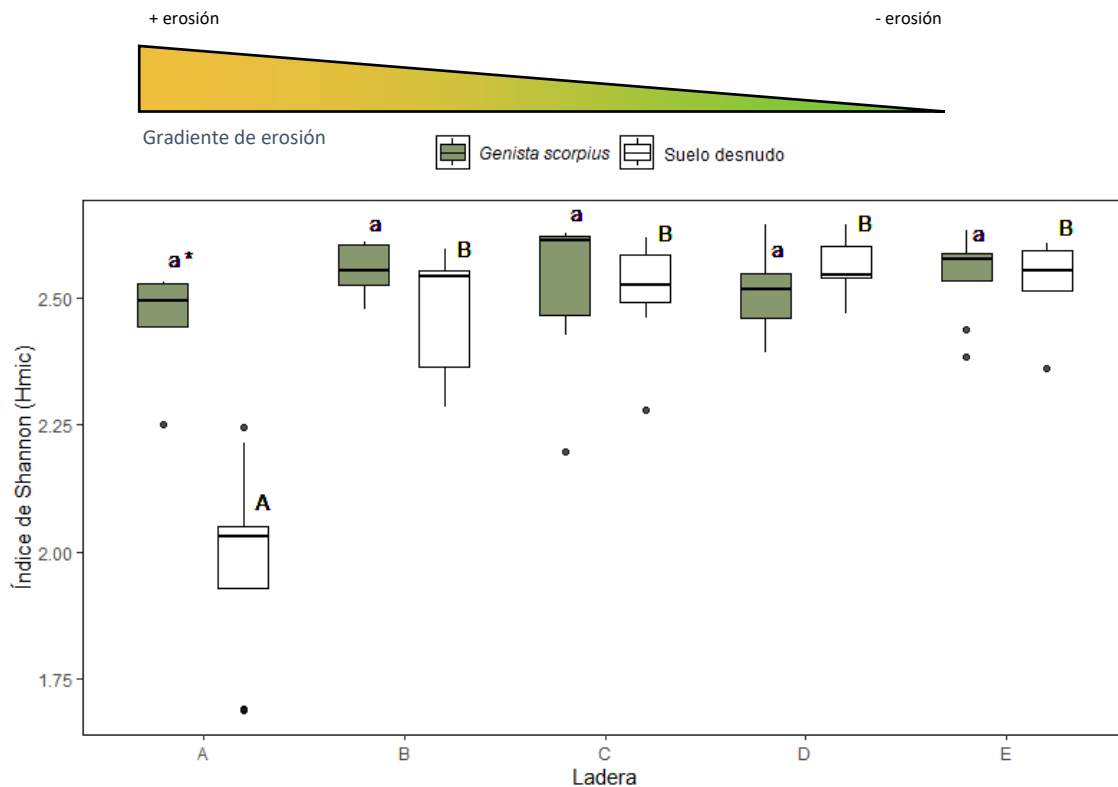


Figura 5. Diversidad catabólica del suelo para los diferentes tipos de laderas y micrositios. Las letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre las muestras de suelo desnudo, mientras que las letras minúsculas indican diferencias significativas entre las muestras de *Genista scorpius*. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre *Genista scorpius* y suelo desnudo dentro de una misma ladera. Todas las diferencias significativas al 95%, calculadas con ANOVA multifactorial y post-hoc Tukey, tras evaluar supuestos de normalidad y homocedasticidad.

Aunque la erosión afectó a la diversidad funcional de los microorganismos del suelo ($F=35,8$; $p<0.001$; Tabla 3), y la vegetación aumentó esta diversidad funcional respecto al suelo desnudo ($F=11,5$; $p=0,001$; Tabla 3), existió una interacción entre los dos factores, y la erosión no afectó por igual a las muestras en suelo desnudo que a las muestras debajo de *G. scorpius* ($F=12,9$; $p<0.001$; Tabla 3, Figura 5). De hecho, la erosión sólo disminuyó la diversidad funcional de los microorganismos del suelo en las muestras de suelo desnudo, y las muestras bajo *Genista scorpius* sólo presentaron una mayor diversidad funcional a las muestras de suelo desnudo en las laderas más erosionadas. Los suelos desnudos de las laderas tipo A, con las mayores tasas de erosión, presentaron diferencias significativas con los suelos desnudos del resto de tipos de laderas, apreciándose un umbral de erosión a partir del cual se reduce la diversidad funcional de los microorganismos del suelo. Pero esto no ocurrió para los suelos debajo de *G. scorpius*, donde no hay diferencias significativas para las laderas, con unos valores de diversidad funcional catabólica muy altos incluso para las laderas más erosionadas.

Tabla 3.

Análisis de varianza de dos factores para la diversidad funcional de los microorganismos del suelo. Los resultados de realizar el ANOVA del modelo muestran cómo las diferencias son significativas para el gradiente de erosión, para los micrositios y para la interacción entre unos y otros.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Erosión	4	1,7	0,425	35,831	<2,2e-16 ***
Micrositio	1	0,13665	0,13665	11,52	0,001097 **
Erosión:Micrositio	4	0,61274	0,15318	12,915	4,522e-08 ***
Residuos	76	0,90146	0,01186		

Erosión:Micrositio responde a las interacciones entre los tipos de laderas a lo largo del gradiente de erosión y los micrositios.

Códigos de significancia: "****" 0,001; "****" 0,01

3.1.3. Actividad catabólica

La erosión tuvo un efecto en la actividad catabólica del suelo ($F=3,7$; $p=0,009$; Tabla 4), aumentando la actividad catabólica conforme disminuyó la erosión (Figura 6), aunque estas diferencias significativas desaparecieron al comparar el gradiente de erosión con la actividad catabólica del suelo para cada micrositio por separado (Figura 6). Por otro lado, la vegetación aumentó la actividad catabólica del suelo ($F=25,3$; $p<0.001$) (Tabla 4, Figura 6). Las laderas tipo B son las únicas que presentaron diferencias significativas entre los suelos debajo de *G. scorpius* (con valores de actividad catabólica mucho más altos) y los suelos desnudos (Figura 6), pero la tendencia se comparte para todas las laderas.

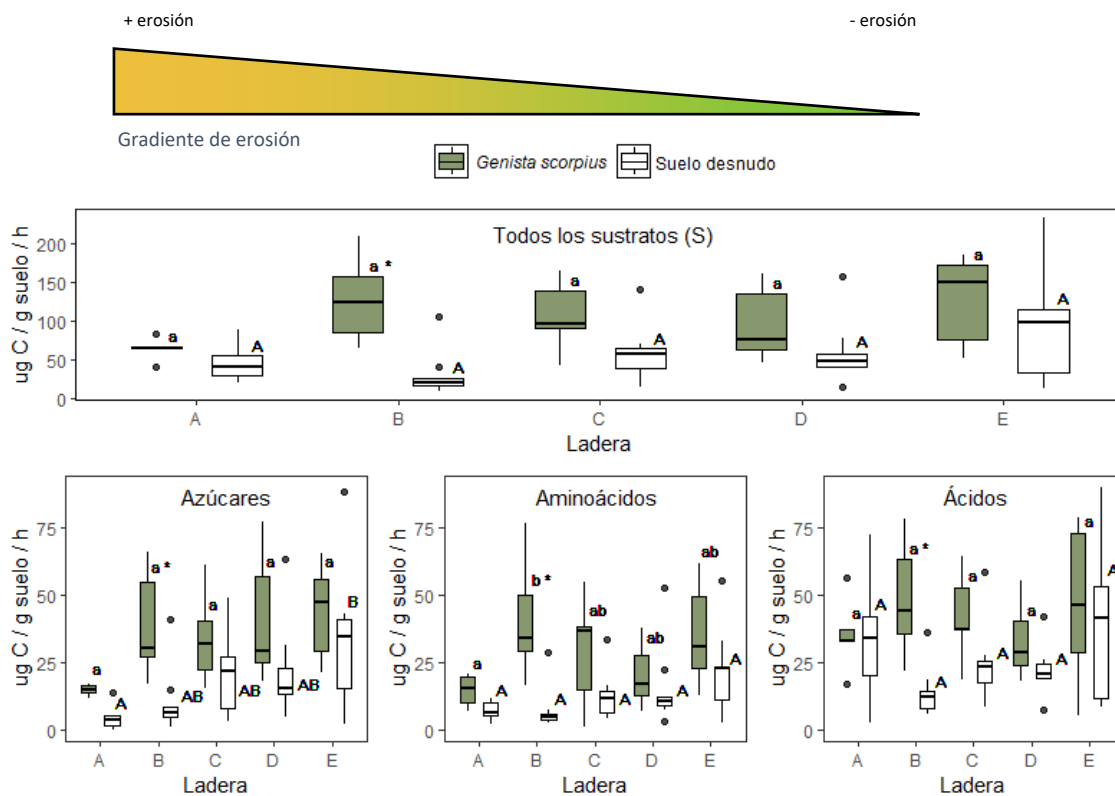


Figura 6. Diferencias en valores de SIR (Substrate Induced Respiration) tras restar el valor del H₂O para las distintas laderas y micrositios. Arriba para todos los sustratos, abajo a la izquierda para azúcares (D-glucosa, N-acetil glucosamina, D(-)-fructosa, D(+)-galactosa y L(+)-arabinosa), abajo en el centro para aminoácidos (L(+)-asparagina monohidratada, L-serina, glicina, L-glutamina y L-cisteina) y abajo a la derecha para ácidos orgánicos (ácido oxálico, ácido málico, ácido cítrico monohidratado, ácido 2-cetoglutarico y ácido 3-4-dihidroxi benzoico). Las letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre las muestras de suelo desnudo, mientras que las letras minúsculas muestran diferencias significativas entre las muestras de *Genista scorpius*. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre *Genista scorpius* y suelo desnudo dentro de una misma ladera. Todas las diferencias significativas al 95%, calculadas con ANOVA multifactorial y post-hoc Tukey, tras evaluar supuestos de normalidad y homocedasticidad.

Al separar estos sustratos según su naturaleza en azúcares (D-glucosa, N-acetil glucosamina, D(-)-fructosa, D(+)-galactosa y L(+)-arabinosa), aminoácidos (L(+)-asparagina monohidratada, L-serina, glicina, L-glutamina y L-cisteina) y ácidos (ácido oxálico, ácido málico, ácido cítrico monohidratado, ácido 2-cetoglutarico y ácido 3-4-dihidroxi benzoico), se comprobó que los resultados variaban ligeramente para cada grupo. En los 3 grupos, la actividad catabólica debajo de *Genista scorpius* fue mayor que la actividad catabólica en el suelo desnudo (azúcares (F=20,7; p<0.001), aminoácidos (F=26,6; p<0.001) ácidos (F=18,4; p<0.001)), siendo estas diferencias mayores para las laderas tipo B (Tabla 4, Figura 6). Pero el gradiente de erosión no afectó de la misma manera a cada uno de los grupos.

Tabla 4.
Análisis de varianza multifactorial para la suma de los sustratos metabolizados, tras restar el H₂O.

<i>Total</i>	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Erosión	4	27197	6799	3,6595	0,008844**
Micrositio	1	47082	47082	25,3408	3,139e-06***
Erosión:Micrositio	4	15763	3941	2,121	0,086328
Residuos	76	141206	1858		
<i>Azúcares</i>					
Erosión	4	7934,4	1983,6	7,1873	5,797e-05***
Micrositio	1	5705,1	5705,1	20,6715	2,024e-05***
Erosión:Micrositio	4	1018,3	254,6	0,9224	0,4555
Residuos	76	20975	276		
<i>Aminoácidos</i>					
Erosión	4	3083	770,8	4,2497	0,003706**
Micrositio	1	4832,2	4832,2	26,6431	1,9e-06***
Erosión:Micrositio	4	2007,9	502	2,7677	0,033230*
Residuos	76	13783,9	181,4		
<i>Ácidos</i>					
Erosión	4	1,232	0,308	0,7816	0,54064
Micrositio	1	7,2687	7,2687	18,4442	5,111e-05***
Erosión:Micrositio	4	3,8551	0,9638	2,4456	0,05356
Residuos	76	29,9509	0,3941		

Erosión:Micrositio responde a las interacciones entre los tipos de laderas a lo largo del gradiente de erosión y los micrositios.

Códigos de significancia: ***** 0,001; **** 0,01; *** 0,05

Análisis separados para el total de sustratos, los azúcares, los aminoácidos y los ácidos.

Para los azúcares, la erosión afectó a la actividad catabólica de los microorganismos del suelo ($F=7,2$; $p<0.001$) (Tabla 4), aumentando la actividad catabólica conforme disminuye la erosión en las muestras de suelo desnudo (Figura 6), y no encontrándose diferencias significativas para las muestras bajo *Genista scorpius*. Para los aminoácidos, parece que la erosión también afectó a la actividad catabólica de los microorganismos del suelo ($F=4,2$; $p=0,004$) (Tabla 4), pero si se compara la actividad catabólica a lo largo del gradiente de erosión en cada micrositio por separado, sólo se encuentran diferencias significativas entre las muestras debajo de *G. scorpius*, con las laderas tipo A con una menor actividad catabólica, y las laderas tipo B con la mayor actividad catabólica (Figura 6). Para los ácidos, no se observa un efecto de la erosión ($p=0,5$), ni tampoco para cada micrositio por separado, aunque la actividad catabólica del suelo desnudo en las laderas más erosionadas (de tipo A) fue muy elevada en comparación con el resto de las laderas.

3.1.4. Análisis multivariantes

Las diferencias entre la metabolización de los sustratos para cada muestra fueron significativas tanto para el gradiente de erosión ($F=4,9$; $p=0,001$), como para los micrositios ($F=19,4$; $p=0,001$), como para su interacción ($F=2,1$; $p=0,03$) (Tabla 5). Estas

diferencias se observan en el escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) (Figura 7). Se observan diferencias entre el gradiente de erosión, estando las laderas tipo A alejadas del resto, las laderas tipo B algo cercanas pero diferenciadas del resto de laderas, y las laderas tipo C, D, y E más próximas entre sí, con menos diferencias entre ellas. Las muestras debajo de *Genista scorpius* presentaron una respiración de los microorganismos ante los sustratos muy similar entre ellas y con diferencias respecto al suelo desnudo, que a su vez presenta una mayor separación entre las muestras. Esto supone que las muestras bajo *G. scorpius* fueron más similares entre ellas respecto a la respiración de los sustratos por los microorganismos por el hecho de encontrarse bajo *G. scorpius*, que las diferencias que pudiesen existir por el resto de variables ambientales. Para cada ladera, se advierte como las muestras de suelo desnudo se encuentran en una dirección y las muestras de *G. scorpius* en la otra, acentuándose estas diferencias para las laderas más erosionadas (Figura 7), lo que implica que, en cada ladera, y principalmente en las laderas más erosionadas, hubo diferencias en la matriz de respiración para las muestras debajo de aliagas y las muestras en suelo desnudo.

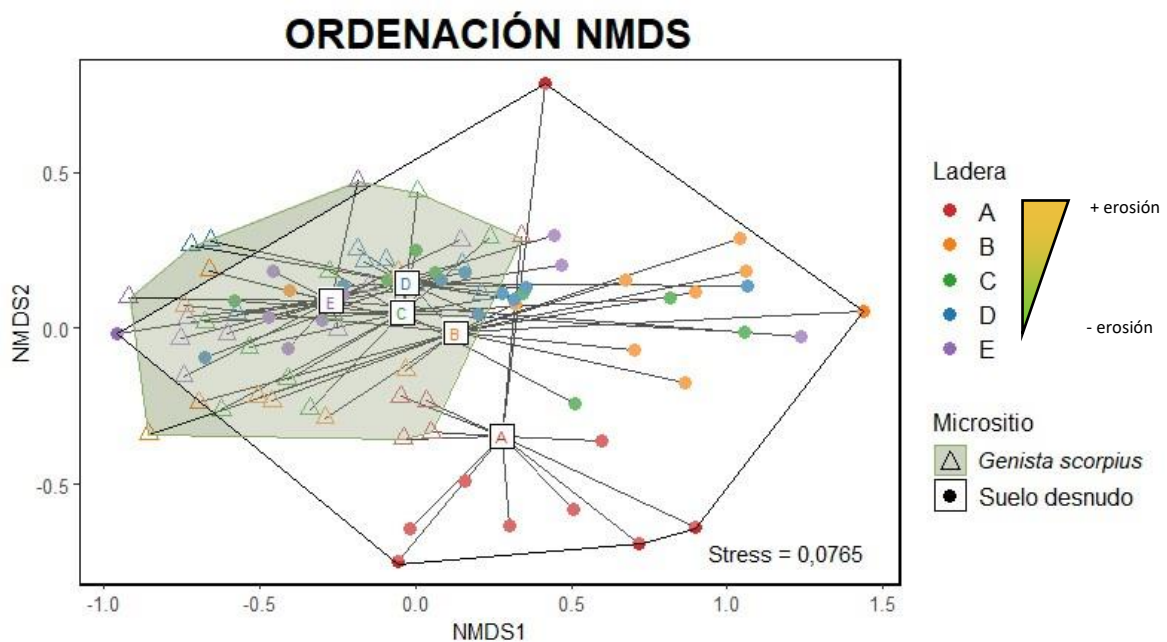


Figura 7. NMDS para los perfiles catabólicos de cada muestra de suelo. Las letras en el gráfico representan el centroide de las muestras de cada tipo de ladera.

Tabla 5.
PERMANOVA para las diferencias entre el gradiente de erosión, los micrositios y su interacción respecto a los perfiles catabólicos de cada muestra.

	Df	Sum Sq	R2	F value	Pr (>F)
Erosión	4	1,6672	0,16033	4,9443	0,001 ***
Micrositio	1	1,6315	0,1569	19,3542	0,001 ***
Erosión:Micrositio	4	0,6932	0,06666	2,0557	0,026 *
Residuos	76	6,4067	0,61611		
Total	85	10,3986	1		

Erosión:Micrositio responde a las interacciones entre los tipos de laderas a lo largo del gradiente de erosión y los micrositios.

Códigos de significancia: "****" 0,001; "****" 0,01; "*" 0,05

Tantos los grupos cómo su interacción son significativos.

El análisis de distancia basado en la redundancia (dbRDA, Figura 8) ordenó las muestras según diferencias en las variables ambientales introducidas. Al realizar una batería de ANOVAs al modelo, se comprobó que tenían significancia (Tabla 6), que los únicos ejes significantes para el modelo eran CAP1 ($F=30,9$; $p=0,001$) y CAP2 ($F=9,4$; $p=0,001$), y que las variables ambientales significativas eran la erosión ($F=12,6$; $p=0,001$), la materia orgánica ($F=20,8$; $p=0,001$) y el pH ($F=4,1$; $p=0,006$). Estos ejes explican la ordenación de la matriz de respiración al 90% (Figura 8). Al igual que con la ordenación NMDS, y en base a estas variables ambientales, se vuelven a apreciar diferencias entre las muestras debajo de *G. scorpius* y las muestras en suelo desnudo, así como una ordenación según la erosión en la que a niveles bajos de erosión se redujeron mucho las diferencias entre los micrositios (Figura 8). La materia orgánica se incrementó en sentido contrario a la erosión, así como a favor de las muestras bajo *G. scorpius*. El pH no pareció seguir ningún patrón claro, aunque las muestras de las laderas tipo A fueron las que presentaron valores más bajos de pH (Figura 8, Tabla 1).

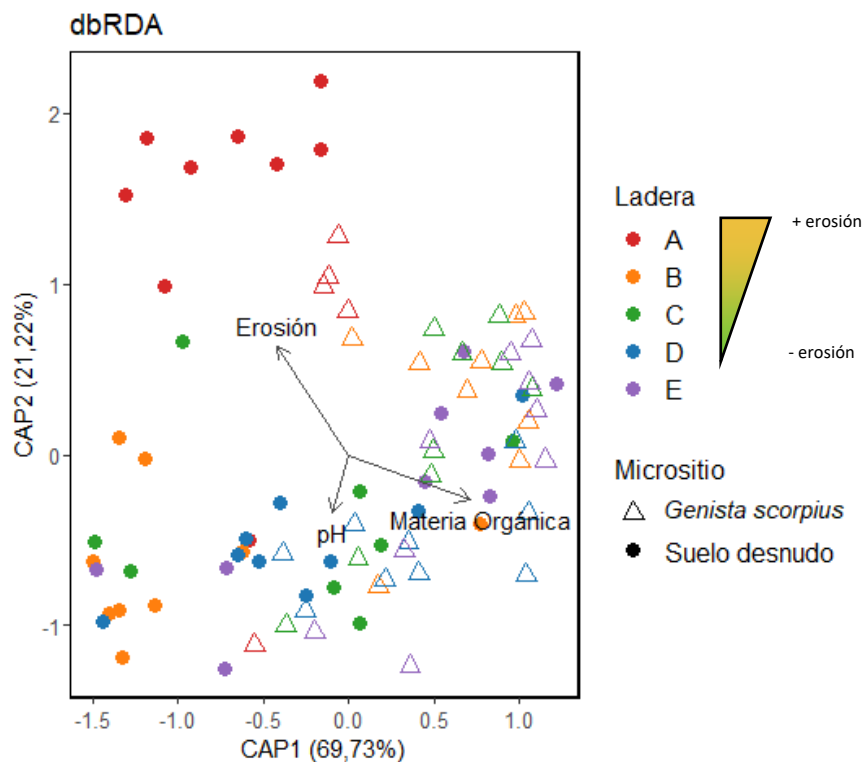


Figura 8. Análisis de redundancia basado en la distancia (dbRDA) de las variables ambientales para la metabolización de los sustratos en cada muestra. Se representan los ejes (CAP1 y CAP2) y las variables significativas "Erosión", "pH" y "Materia Orgánica" (Tabla 1).

Tabla 6. ANOVAs para el modelo, los ejes y las variables ambientales del dbRDA.

	Df	Sum Sq	F value	Pr (>F)
<i>Modelo</i>				
Modelo	8	4,2102	5,5384	0,001 ***
<i>Ejes</i>				
CAP1	1	2,9356	30,8935	0,001 ***
CAP2	1	0,8932	9,4	0,001 ***
CAP3	1	0,1394	1,4672	0,957
...				1
<i>Variables ambientales</i>				
Erosión	1	1,1977	12,6045	0,001 ***
pH	1	0,3898	4,1027	0,006 ***
M.O.	1	1,9732	20,7662	0,001 ***
CE	1	0,1249	1,3149	0,214
Carbonatos	1	0,124	1,3053	0,246
Textura	1	0,1064	1,0635	0,308
Residuos	77			

MO: Materia orgánica; CE: Conductividad eléctrica

Códigos de significancia: "****" 0,001

En el análisis de los ejes no se han añadido más ejes a la tabla por no presentar significancia.

3.1.5. Matriz de correlaciones

En la matriz de correlaciones (Tabla 7) se observa que la erosión es la variable ambiental que más explicó el contenido de materia orgánica del suelo ($r = -0,634$), así como la diversidad funcional de los microorganismos ($r = -0,688$). El pH tuvo relación con la actividad catabólica de los ácidos, que aumentó conforme el pH disminuía ($r = -0,217$), pero no la tuvo con la actividad catabólica de otros grupos ni con la actividad catabólica global. La materia orgánica es el principal parámetro del suelo que explicó las diferencias en la actividad catabólica ($r = 0,634$) y diversidad funcional del suelo ($r = 0,508$), y la principal variable ambiental en explicar la respiración basal ($r = 0,577$). Aun así, estos parámetros también estuvieron indirectamente explicados por la erosión, por condicionar el contenido de materia orgánica del suelo (Tabla 7).

Tabla 7.

Matriz de correlaciones entre las variables ambientales significativas y los índices calculados. Colores más oscuros muestran mayores correlaciones. Sólo se muestran correlaciones significativas al 95%.

Erosión		-0,634	-0,355	-0,446	-0,271		-0,688	-0,262
	pH					-0,217	0,372	
-0,634		Materia orgánica	0,577	0,660	0,605	0,466	0,508	0,634
-0,355		0,577	Respiración basal	0,639	0,568	0,482	0,258	0,624
-0,446		0,660	0,639	Actividad catabólica azúcares	0,807	0,728	0,443	0,929
-0,271		0,605	0,568	0,807	Actividad catabólica aminoácidos	0,731	0,442	0,913
	-0,217	0,466	0,482	0,728	0,731	Actividad catabólica ácidos		0,900
-0,688	0,372	0,508	0,258	0,443	0,442		Diversidad funcional	0,347
-0,262		0,634	0,624	0,929	0,913	0,900	0,347	Actividad catabólica global

4. DISCUSIÓN

Se ha observado un efecto negativo de la erosión en la actividad catabólica y diversidad funcional de los microorganismos en laderas restauradas tras minería. El contenido de materia orgánica del suelo se ha identificado como el principal factor edáfico que afecta a la funcionalidad biológica del suelo, y se ha constatado que este contenido se reduce con el aumento de la erosión. Como resultado, la erosión disminuye la actividad catabólica y la diversidad funcional de los microorganismos del suelo tanto directa como indirectamente. Este efecto se observa en las laderas más erosionadas, caracterizadas por una red de regueros muy desarrollada. En contraste, en las laderas restauradas menos erosionadas, donde prevalece una dinámica ecohidrológica de claros exportadores y manchas de vegetación importadoras, la actividad biológica es similar a la del ecosistema de referencia sin erosión.

Aunque la erosión también disminuye la actividad catabólica global, los efectos son menos marcados que para la diversidad funcional, al haber diferencias entre la respiración ante distintos grupos de sustratos. Los microorganismos, al aumentar la erosión, utilizan menos los sustratos más simples, como los azúcares, y más los sustratos ácidos. Esto podría deberse a una pérdida en la eficiencia metabólica por parte de los microorganismos que utilizan los ácidos, ante un mayor estrés, aumentando la respiración total por cantidad de biomasa.

El papel de *Genista scorpius* como isla de fertilidad y especie facilitadora, que se había observado en este sistema para otros organismos, también se ha comprobado para los microorganismos del suelo. Bajo el dosel de esta especie, independientemente de su volumen, se han registrado valores más elevados de actividad catabólica y diversidad funcional.

4.1. Efectos de la erosión sobre la actividad catabólica y la diversidad funcional de los microorganismos del suelo

La diversidad funcional y la actividad catabólica de los microorganismos del suelo disminuyen conforme aumenta la erosión (Tabla 3, 4 y 5; Figuras 5, 6 y 7). El efecto de la erosión ha sido comprobado en diversos atributos y procesos de los ecosistemas, como el descenso de la productividad de cultivos (Valentin et al., 2005), la pérdida de estructura y materia orgánica del suelo (Lal, 2001), la disminución de la disponibilidad de propágulos, de la germinación de semillas o del establecimiento de vegetación en general (Espigares et al., 2011), o incluso el descenso de la diversidad de

microorganismos del suelo (Qiu et al., 2021). De hecho, en el mismo sistema de laderas utilizado en este trabajo se halló este mismo patrón en relación al efecto del gradiente de erosión para variables ecológicas como la riqueza de especies vegetales y la biomasa aérea de plantas (Moreno-de las Heras et al., 2011). Además, la diversidad funcional del suelo está muy relacionada con la humedad edáfica (Zhou et al., 2018) y con la materia orgánica (Bongiorno et al., 2020), que disminuyeron conforme aumentó la erosión (Moreno-de las Heras et al., 2009b; 2011). En concreto, se ha visto una respuesta marcadamente diferente en cuanto a la actividad microbiana entre las laderas cuyo funcionamiento ecohidrológico está determinado por una red de regueros bien desarrollada (laderas tipo A y B), frente a las que predomina la escorrentía laminar con una dinámica de claros exportadores e islas de vegetación importadoras (laderas tipo C y D). En estas últimas, la diversidad funcional y la actividad catabólica es similar a la de las laderas del ecosistema de referencia, lo cual indica que ya se ha producido la recuperación de estos procesos ecológicos tras su restauración.

Pero el efecto de la erosión sobre la actividad catabólica no es el mismo para todos los grupos de microorganismos. Al separar la actividad catabólica según el tipo de sustrato aparecen diferentes tendencias (Figura 6). La respiración de los microorganismos al degradar los azúcares y los aminoácidos disminuye al aumentar la erosión, pero para los sustratos ácidos aumenta para las laderas más erosionadas. Creamer et al. (2016) observaron que los azúcares eran los sustratos que presentaban mayor correlación con la materia orgánica del suelo, lo que podría explicar los resultados (Tabla 1). En nuestro caso, entre los 3 grupos de sustratos, la utilización de los azúcares por parte de los microorganismos presenta la mayor correlación con la materia orgánica del suelo ($r=0,660$) (Tabla 7). Para el catabolismo de los aminoácidos, también se aprecia una cierta tendencia de aumento de la actividad catabólica con la disminución de la erosión (Figura 6), que se puede explicar del mismo modo que para los azúcares: la correlación con la materia orgánica, aunque no tan alta como en los azúcares, es elevada ($r=0,605$) (Tabla 7).

La actividad catabólica debida a la utilización de los ácidos orgánicos, sin embargo, no sigue este patrón: los valores de respiración aumentan para las laderas reguerizadas (tipo A), y en especial medida para las muestras de suelo desnudo de estas laderas más erosionadas (Figura 6). La explicación de nuestros resultados podría encontrarse en un distinto efecto de la erosión sobre distintos grupos funcionales catabólicos. No es la primera vez que se sugiere este efecto. En un estudio anterior, se observó que la utilización de los ácidos por la comunidad de microorganismos aumentaba con la degradación, pero no el uso de azúcares ni aminoácidos (Chaer et

al., 2009). Esto podría sugerir que, a partir de un nivel de erosión determinado, o de un cambio en el sistema dominado por la erosión laminar a un sistema dominado por la erosión en regueros, se produce una degradación que aumenta la utilización de sustratos ácidos por parte de los microorganismos.

Otra posible explicación podría encontrarse en los análisis fisicoquímicos. Las particularidades de las muestras de suelo desnudo en las laderas más erosionadas (tipo A) que más variaron respecto a otras laderas y microsítios fueron el pH (menos básico que los otros, pH = 7,5) y la conductividad eléctrica (mucho más elevada que las demás, CE = 597) (Tabla 1). El pH, muestra una correlación significativa y negativa con la actividad catabólica para los ácidos ($r=-0,217$) (Tabla 7), por lo que un aumento de los grupos de microorganismos que sintetizan ácidos orgánicos debido a una disminución del pH, podría ser una explicación. Un reciente estudio de revisión de los métodos para evaluar la actividad catabólica microbiana reafirmó esta diferencia entre grupos de sustratos, subrayando que, aunque el efecto del pH en los métodos MSIR está muy demostrado, este efecto depende de la naturaleza de los sustratos mineralizados por los microorganismos del suelo (Ndour et al., 2023). Por otro lado, el aumento de la conductividad eléctrica podría sugerir que una elevada salinidad sea la causa de que aumente la respiración de los microorganismos al degradar los sustratos ácidos. Un estudio que calculó el coeficiente de metabolización (CO_2 producido / biomasa de microorganismos) y lo comparó con distintos niveles de salinidad, mostró una potente relación positiva entre la conductividad eléctrica y este coeficiente, sugiriendo que un valor elevado del mismo podría significar un mayor estrés y una menor eficiencia de los microorganismos, teniendo que dedicar más recursos al mantenimiento celular (Boonthai-Iwai et al., 2012). Aunque no se disponga de datos de la biomasa bacteriana, esto puede haber ocurrido en los suelos desnudos de las laderas más erosionadas. Con una salinidad elevada, las comunidades de microorganismos podrían haber sido menos eficientes y haber tenido que emitir una mayor cantidad de CO_2 para degradar el mismo sustrato. Que esto sólo se aprecie en los sustratos ácidos, podría sugerir que los grupos de microorganismos encargados de catabolizar los ácidos son los más estresados por el aumento de la salinidad.

La erosión, pues, a partir de un cierto umbral, puede actuar reduciendo la diversidad funcional y la actividad catabólica del suelo. Y esto ocurre tanto de manera directa como de manera indirecta, siendo la erosión el principal agente que regula la materia orgánica del suelo, que a su vez es el principal factor edáfico responsable de la actividad catabólica y la diversidad funcional (Tabla 7) (Degens et al., 2000; Nsabimana et al., 2004; Bongiorno et al., 2020). El efecto de la materia orgánica se observa

especialmente para la respiración basal (Figura 3), que aumenta al aumentar el contenido de materia orgánica del suelo. La reducción de la materia orgánica en las laderas más erosionadas por efecto de la erosión, previsiblemente ocurre por dos mecanismos complementarios: a) al limitar y reducir la disponibilidad de agua en las laderas más reguerizadas, la erosión no permite que se asiente la vegetación y no hay fuentes que añadan materia orgánica al suelo (Moreno-de las Heras et al., 2005; 2009b; Espigares et al., 2011), b) la erosión actúa arrastrando sedimentos (y por tanto su materia orgánica asociada) de zonas exportadoras hasta zonas importadoras, siendo las laderas primordialmente zonas exportadoras (Schietecatte et al., 2008; Polyakov y Lal, 2004).

4.2. Efectos de la vegetación (*Genista scorpius*) en la actividad catabólica y la diversidad funcional de los microorganismos del suelo a lo largo de un gradiente de erosión

La vegetación (*Genista scorpius*) aumenta la actividad catabólica y la diversidad funcional de los microorganismos del suelo bajo su cobertura respecto al suelo desnudo, actuando como “*isla de fertilidad*”. También reduce las diferencias producidas por el efecto del gradiente de erosión sobre la diversidad funcional del suelo, de manera independiente del tamaño del matorral (Tablas 1, 2, 3, 4 y 5; Figuras 4, 5, 6 y 7).

Desde que se desarrolló el concepto de “*isla de fertilidad*”, se ha comprobado que distintas especies de arbustos pueden modificar las condiciones del suelo a su alrededor en ambientes áridos y semiáridos, concentrando más nutrientes, materia orgánica o humedad edáfica que el suelo desnudo que les rodeaba (García-Moya y Mckell, 1970; Schlesinger et al., 1996; Cross y Schlesinger, 1999) y aumentando la diversidad y la heterogeneidad espacial (Ridolfi et al., 2008). También se ha estudiado el efecto de estas islas de fertilidad en la diversidad de los microorganismos (Saul-Tcherkas y Steinberg, 2009). Li et al. (2021) observaron una mayor diversidad de bacterias con mayor actividad catabólica potencial debajo de la vegetación que en el suelo desnudo. Otro estudio de la comunidad de microorganismos en zonas áridas en el desierto de Sonora, que comparó islas de fertilidad con suelo desnudo (García et al., 2018), encontró mayor diversidad funcional y actividad catabólica de los microorganismos del suelo en las islas de fertilidad. El efecto de *Genista scorpius* como planta nodriza y facilitadora en nuestro sistema de laderas restauradas ha sido comprobado anteriormente. Merino-Martín et al. (2015) describió el comportamiento de “isla de fertilidad” de los arbustos de *Genista scorpius* en las laderas donde predomina

la erosión laminar (C y D), según el modelo de Trigger–Transfer–Reserve–Pulse propuesto por Ludwig et al. (1996). También se observó que la humedad edáfica se incrementó bajo su cobertura, así como la productividad biológica (Merino-Martín et al., 2012; Espigares et al., 2013) y la supervivencia y el crecimiento de otras especies (Vicente et al., 2022). Las diferencias entre los micrositios para la actividad catabólica son mayores que para la diversidad funcional. Esto probablemente se debe a que el contenido de materia orgánica (mayor bajo *G. scorpius*) es más explicativo para la actividad catabólica, como se observa en la matriz de correlación ($r = 0,634$). Esta relación entre el contenido de materia orgánica y la actividad catabólica de los microorganismos del suelo ya ha sido estudiada con anterioridad, con resultados similares (Nsabimana et al., 2004; Creamer et al., 2016, Pignataro et al., 2012). Estos resultados subrayan la importancia de considerar la vegetación y el diseño geomorfológico adecuado en los procesos de restauración para promover un ecosistema funcional y resiliente.

CONCLUSIONES

Conclusiones generales

- **La erosión provocó una reducción en la actividad catabólica y la diversidad funcional de los microorganismos** del suelo en laderas restauradas tras minería.
- **El efecto de la erosión se observó en las laderas más erosionadas, a partir de un determinado umbral y un cambio de sistema ecohidrológico**, del predominio de los claros exportadores y manchas de vegetación importadoras, a la red de regueros desarrollada.
- **En las laderas restauradas menos erosionadas, con un sistema de claros-manchas, la actividad biológica fue similar a la del ecosistema de referencia sin erosión.**
- El contenido de materia orgánica del suelo fue el principal factor edáfico que afectó a la funcionalidad biológica del suelo, pero también se vio reducido con el aumento de la erosión, por lo que **la erosión disminuyó la actividad catabólica y la diversidad funcional de los microorganismos del suelo tanto directa como indirectamente.**
- El efecto de la erosión fue menos marcado sobre la actividad catabólica global, debido a las **diferencias en la actividad catabólica de los microorganismos ante distintos grupos de sustratos.**
- La utilización de sustratos más simples, como los azúcares, disminuyó conforme aumentó la erosión, mientras que **la utilización de sustratos ácidos aumentó en las laderas más erosionadas.**
- **Se demostró el efecto de “isla de fertilidad” de *Genista scorpius***, que de manera independiente de su tamaño, **aumentó la diversidad funcional y la actividad catabólica bajo su dosel**, y moduló, **reduciendo hasta niveles mínimos los efectos de la erosión sobre la actividad biológica del suelo.**

Conclusiones prácticas enfocadas en las restauraciones

- Se resalta el **papel facilitador que ciertas especies vegetales pueden desempeñar en el establecimiento de una comunidad**, al **mejorar la funcionalidad de los microorganismos del suelo** en comparación con áreas sin vegetación.
- **Si se logra mantener la erosión por debajo de un cierto umbral, evitando la formación de una red de regueros desarrollada, la funcionalidad biológica del suelo se mantendrá** hasta niveles comparables a los ecosistemas de referencia, lo que permitirá el desarrollo de un ecosistema funcional.
- Estos resultados señalan la importancia de un **correcto diseño geomorfológico de las laderas restauradas para el control de los procesos de erosión**, que favorezca el desarrollo de la vegetación y conjuntamente, una adecuada evolución de los procesos microbianos en el suelo.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a David, Btiam y Berta por su ayuda en el laboratorio. Gracias a la profesora Clara Martí, por su disposición a ayudar con los análisis físico-químicos, y al profesor Jesús Guerrero, por su ayuda con ArcGIS. Gracias a Eduardo, Mariano, Tiscar y Jaume por proponer ideas que ayudaron a desarrollar este trabajo. Gracias a mis padres, por su ayuda en la toma de muestras, y a mi hermano Lorién y a mi amiga Nora, por su ayuda revisando la redacción. Gracias a Nicolau, por dirigir este trabajo y por introducirme en el mundo de la investigación. Y, por último, muchas gracias a Luis, que no sólo ha dirigido este trabajo, sino que me ha acompañado en él, tanto personal como académicamente, y lo ha hecho de la mejor manera posible.

BIBLIOGRAFÍA

- Badri, D. V., y Vivanco, J. M. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant, cell y environment*, 32(6), 666-681.
- Beare, M. H., Neely, C. L., Coleman, D. C., y Hargrove, W. L. (1990). A substrate-induced respiration (SIR) method for measurement of fungal and bacterial biomass on plant residues. *Soil Biology and Biochemistry*, 22(5), 585-594.
- Beeby A. 1993. *Applying Ecology*. Chapman y Hall, London.
- Biorender. <https://www.biorender.com/>
- Bond-Lamberty, B., y Thomson, A. (2010). Temperature-associated increases in the global soil respiration record. *Nature*, 464(7288), 579-582.
- Bongiorno, G., Bünemann, E. K., Brussaard, L., Mäder, P., Oguejiofor, C. U., y de Goede, R. G. (2020). Soil management intensity shifts microbial catabolic profiles across a range of European long-term field experiments. *Applied Soil Ecology*, 154, 103596
- Boonthai-Iwai, C., Naing-Oo, A., y Topark-ngarm, B. (2012). Soil property and microbial activity in natural salt affected soils in an alternating wet–dry tropical climate. *Geoderma*, 189, 144-152
- Bradshaw A. 1988. Alternative Endpoints for Reclamation. In: J. Cairns, Jr (ed.), *Rehabilitating Damaged Ecosystems*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 69-85.
- Brady, N. C., y Weil, R. R. (2008). *The nature and properties of soils*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.
- Bünemann, E. K., Bongiorno, G., Bai, Z., Creamer, R. E., De Deyn, G., De Goede, R., ... y Brussaard, L. (2018). Soil quality—A critical review. *Soil Biology and Biochemistry*, 120, 105-125.
- Campbell, C. D., Chapman, S. J., Cameron, C. M., Davidson, M. S., y 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.
- Chaer, G. M., Fernandes, M. F., Myrold, D. D., y Bottomley, P. J. (2009). Shifts in microbial community composition and physiological profiles across a gradient of induced soil degradation. *Soil Science Society of America Journal*, 73(4), 1327-1334.
- Chapman, S. J., Campbell, C. D., y Artz, R. R. (2007). Assessing CLPPs using MicroResp™: a comparison with Biolog and multi-SIR. *Journal of Soils and Sediments*, 7, 406-410
- CNIG (2020). LiDAR 2ª Cobertura (2015-Actualidad). Recuperado de: <http://centrodedescargas.cnig.es/CentroDescargas/catalogo.do?Serie=LIDA2>
- Collins, C. G., Spasojevic, M. J., Alados, C. L., Aronson, E. L., Benavides, J. C., Cannone, N., ... y Diez, J. M. (2020). Belowground impacts of alpine woody encroachment are determined by plant traits, local climate, and soil conditions. *Global change biology*, 26(12), 7112-7127
- Creamer, R. E., Stone, D., Berry, P., y Kuiper, I. (2016). Measuring respiration profiles of soil microbial communities across Europe using MicroResp™ method. *Applied soil ecology*, 97, 36-43.

Cross, A. F., y Schlesinger, W. H. (1999). Plant regulation of soil nutrient distribution in the northern Chihuahuan Desert. *Plant Ecology*, 145, 11-25.

D'Alò, F., Odriozola, I., Baldrian, P., Zucconi, L., Ripa, C., Cannone, N., ... y Onofri, S. (2021). Microbial activity in alpine soils under climate change. *Science of The Total Environment*, 783, 147012.

Degens, B. P., Schipper, L. A., Sparling, G. P., y Vojvodic-Vukovic, M. (2000). Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(2), 189-196.

Dixon, K., MacDonald, V., y D'Agui, H. (2022). Advances in mining restoration. *Restoration Ecology*, 30(S1), e13776.

Donhauser, J., y Frey, B. (2018). Alpine soil microbial ecology in a changing world. *FEMS microbiology ecology*, 94(9)

Doran, J. W., y Parkin, T. B. (1994). *Defining and assessing soil quality*. Defining soil quality for a sustainable environment, 35, 1-21.

Doran, J. W., y Safley, M. (1997). *Biological indicators of soil health*. Defining and assessing soil health and sustainable productivity., 1-28.

Escalas, A., Hale, L., Voordeckers, J. W., Yang, Y., Firestone, M. K., Alvarez-Cohen, L., y Zhou, J. (2019). Microbial functional diversity: From concepts to applications. *Ecology and Evolution*, 9(20), 12000-12016.

Espigares, T., Moreno-De Las Heras, M., y Nicolau, J. M. (2011). Performance of Vegetation in Reclaimed Slopes Affected by Soil Erosion. *Restoration Ecology*, 19(1), 35–44.

Espigares, T., Merino-Martín, L., Moreno-de las Heras, M., y Nicolau, J. M. (2013). Intensity of ecohydrological interactions in reclaimed Mediterranean slopes: Effects of run-off redistribution on plant performance. *Ecohydrology*, 6(5), 836-844.

Fanin, N., Hättenschwiler, S. y Fromin, N. (2014). Litter fingerprint on microbial biomass, activity, and community structure in the underlying soil. *Plant Soil* 379, 79–91.

Farrar, J., Hawes, M., Jones, D., y Lindow, S. (2003). How roots control the flux of carbon to the rhizosphere. *Ecology*, 84(4), 827-837.

Farrell, H. L., Léger, A., Breed, M. F., y Gornish, E. S. (2020). Restoration, soil organisms, and soil processes: emerging approaches. *Restoration Ecology*, 28, S307-S310.

Feng, Y., Wang, J., Bai, Z., y Reading, L. (2019). Effects of surface coal mining and land reclamation on soil properties: A review. *Earth-Science Reviews*, 191, 12-25.

Fox J., y Weisberg S (2019). *An R Companion to Applied Regression*, Third edition. Sage, Thousand Oaks CA.

Friedlingstein, P., O'Sullivan, M., Jones, M. W., Andrew, R. M., Gregor, L., Hauck, J., ... y Zheng, B. (2022). Global Carbon Budget 2022, *Earth System Science Data*, 14, 4811–4900.

Garcia, D. E., Lopez, B. R., De-Bashan, L. E., Hirsch, A. M., Maymon, M., y Bashan, Y. (2018). Functional metabolic diversity of the bacterial community in undisturbed resource island soils in the southern Sonoran Desert. *Land Degradation y Development*, 29(5), 1467-1477.

Garcia-Moya, E., y McKell, C. M. (1970). Contribution of shrubs to the nitrogen economy of a desert-wash plant community. *Ecology*, 51(1), 81-88.

Grman, E., Allen, J., Galloway, E., McBride, J., Bauer, J. T., y Price, P. A. (2020). Inoculation with remnant prairie soils increased the growth of three native prairie legumes but not necessarily their associations with beneficial soil microbes. *Restoration Ecology*, 28, 393-399.

Haigh, M. (2000). *The aims of Land reclamation*. Reclaimed Land. Erosion Control, Soils and Ecology. AA Balkema, Rotterdam, The Netherlands, 1-20.

Harrell, F. (2023). Hmisc: Harrell Miscellaneous. R package version 5.0-1, <https://CRAN.R-project.org/package=Hmisc>.

Harris, J. (2009). Soil microbial communities and restoration ecology: facilitators or followers?. *Science*, 325(5940), 573-574.

Heneghan, L., Miller, S. P., Baer, S., Callahan Jr, M. A., Montgomery, J., Pavao-Zuckerman, M., ... y Richardson, S. (2008). Integrating soil ecological knowledge into restoration management. *Restoration ecology*, 16(4), 608-617.

Hernández-Cáceres, D., Stokes, A., Angeles-Alvarez, G., Abadie, J., Anthelme, F., Bounous, M., ... y Reverchon, F. (2022). Vegetation creates microenvironments that influence soil microbial activity and functional diversity along an elevation gradient. *Soil Biology and Biochemistry*, 165, 108485.

Jones, D. L., y Murphy, D. V. (2007). Microbial response time to sugar and amino acid additions to soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), 2178-2182.

Josa, R., Jorba, M., y Vallejo, V. R. (2012). Opencast mine restoration in a Mediterranean semi-arid environment: failure of some common practices. *Ecological Engineering*, 42, 183-191.

Kassambara, A. (2023). ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. R package version 0.6.0, <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>

Koshila Ravi, R., Anusuya, S., Balachandar, M., y Muthukumar, T. (2019). Microbial interactions in soil formation and nutrient cycling. *Mycorrhizosphere and pedogenesis*, 363-382.

Lal, R. (2001). Soil degradation by erosion. *Land degradation y development*, 12(6), 519-539.

Liu, Z., Liu, G., Fu, B., y Zheng, X. (2008). Relationship between plant species diversity and soil microbial functional diversity along a longitudinal gradient in temperate grasslands of Hulunbeir, Inner Mongolia, China. *Ecological Research*, 23, 511-518.

Loch, R. J. (2000). Using rainfall simulation to guide planning and management of rehabilitated areas: Part I. Experimental methods and results from a study at the Northparkes Mine, Australia. *Land Degradation y Development*, 11(3), 221-240.

Louca, S., Polz, M. F., Mazel, F., Albright, M. B., Huber, J. A., O'Connor, M. I., ... y Parfrey, L. W. (2018). Function and functional redundancy in microbial systems. *Nature ecology y evolution*, 2(6), 936-943.

Ludwig, J., Tongway, D., Hodgkinson, K., Freudenberger, D., y Noble, J. (1996). *Landscape ecology, function and management: principles from Australia's rangelands*. Csiro Publishing.

Mansourian, S., Vallauri, D., Dudley, N., Nicolau, J. M., y Moreno-de las Heras, M. (2005). *Opencast mining reclamation*. Forest Restoration in Landscapes: Beyond Planting Trees, 370-378.

Martens, R. (1987). Estimation of microbial biomass in soil by the

respiration method: importance of soil pH and flushing methods for the measurement of respired CO₂. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(1), 77-81.

Merino-Martín, L. (2010). *Ecología de laderas restauradas de la minería de carbón a cielo abierto: interacciones ecohidrológicas*. [Tesis de doctorado, Universidad de Alcalá, Departamento de Ecología]. Biblioteca Digital Universidad de Alcalá.

Merino-Martín, L., Moreno-de las Heras, M., Pérez-Domingo, S., Espigares, T., and Nicolau, J. M. (2012). Hydrological heterogeneity in Mediterranean reclaimed slopes: runoff and sediment yield at the patch and slope scales along a gradient of overland flow, *Hydrology and Earth System Sciences*, 16(5), 1305–1320.

Merino-Martin, L., Moreno-de Las Heras, M., Espigares, T., y Nicolau, J. M. (2015). Overland flow directs soil moisture and ecosystem processes at patch scale in Mediterranean restored hillslopes. *Catena*, 133, 71-84.

Merino-Martín, L., Commander, L., Mao, Z., Stevens, J. C., Miller, B. P., Golos, P. J., ... y Dixon, K. (2017). Overcoming topsoil deficits in restoration of semiarid lands: designing hydrologically favourable soil covers for seedling emergence. *Ecological Engineering*, 105, 102-117.

Moreno-de las Heras, M., Nicolau, J.M., Espigares, M.T. (2005). Interacción entre la erosión en regueros, contenido de humedad edáfica y colonización vegetal en laderas restauradas de la minería a cielo abierto del carbón en ambiente mediterráneo–continental (Teruel). In: Samper-Calvete, F.J., Paz-González, A. (Eds.), *Estudios de la Zona No Saturada del Suelo, VII*. Universidade da Coruña, La Coruña, Spain, pp. 345–350.

Moreno-de Las Heras, M., Nicolau, J. M., y Espigares, T. (2008). Vegetation succession in reclaimed coal-mining slopes in a Mediterranean-dry environment. *Ecological engineering*, 34(2), 168-178.

Moreno-de las Heras, M. (2009a). *Efectos ecológicos de la erosión en laderas derivadas de la minería del carbón a cielo abierto*. [Tesis de doctorado, Universidad de Alcalá, Departamento de Ecología]. Biblioteca Digital Universidad de Alcalá.

Moreno-de las Heras, M., Merino-Martín, L., y Nicolau, J. M. (2009b). Effect of vegetation cover on the hydrology of reclaimed mining soils under Mediterranean-Continental climate. *Catena*, 77(1), 39–47.

Moreno-De Las Heras, M. (2009c). Development of soil physical structure and biological functionality in mining spoils affected by soil erosion in a Mediterranean-Continental environment. *Geoderma*, 149(3-4), 249-256.

Moreno-de las Heras, M., Nicolau, J. M., Merino-Martín, L., y Wilcox, B. P. (2010). Plot-scale effects on runoff and erosion along a slope degradation gradient. *Water Resources Research*, 46(4).

Moreno-de las Heras, M., Espigares, T., Merino-Martín, L., y Nicolau, J. M. (2011). Water-related ecological impacts of rill erosion processes in Mediterranean-dry reclaimed slopes. *Catena*, 84(3), 114–124.

Morgan, R.P.C., 1995. *Measurement of soil erosion*, In: Morgan, R.P.C. (Ed.), *Soil Erosion and Conservation*, 2nd Edition. Longman, Essex, UK, pp. 84–95

Moscatelli, M. C., Secondi, L., Marabottini, R., Papp, R., Stazi, S. R., Mania, E., y Marinari, S. (2018). Assessment of soil microbial functional diversity: land use and soil properties affect CLPP-MicroResp and enzymes responses. *Pedobiologia*, 66, 36-42.

Nannipieri, P., GRECO, S., y Ceccanti, B. (2017). *Ecological significance of the biological activity in soil*. *Soil biochemistry*, 293-356.

Nicolau, J. M., y Asensio, E. (2000). Rainfall erosion on opencast coal-mine lands: ecological perspective. *Land Reconstruction and Management*, 1, 51-73.

Nicolau, J. M. (2002). Runoff generation and routing on artificial slopes in a Mediterranean-continental environment: The Teruel coalfield, Spain. *Hydrological Processes*, 16(3), 631–647.

Nicolau, J.M., Moreno-de las Heras, M. (2005). *Opencast mining reclamation*. In: Mansourian, S., Vallauri, D., Dudley, N. (Eds.), *Forest Restoration in Landscapes: Beyond Planting Trees*. WWF/Springer, Berlin, Germany, pp. 370–376.

Nielsen, M. N., Winding, A., Binnerup, S., y Hansen, B. M. (2002). *Microorganisms as indicators of soil health*.

Ndour, P. M. S., Bargaz, A., Rchiad, Z., Pawlett, M., Clark, I. M., Mauchline, T. H., ... y Lyamlouli, K. (2023). Microbial Catabolic Activity: Methods, Pertinence, and Potential Interest for Improving Microbial Inoculant Efficiency. *Microbial Ecology*, 1-20.

Nsabimana, D., Haynes, R. J., y Wallis, F. M. (2004). Size, activity and catabolic diversity of the soil microbial biomass as affected by land use. *Applied Soil Ecology*, 26(2), 81-92.

Oksanen, J., Simpson, G., Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., ... y Weedon, J. (2022). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.6-4, <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

Orden de 5 de diciembre de 1975 por la que se aprueban como oficiales los métodos de análisis de suelos y aguas, Orden (1976, 31 de marzo) (España). Boletín Oficial del Estado, (78). <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1976-6778>

Palmer J. (1992). *Nutrient Cycling: Key to Reclamation Success*. In: Chambers J, Wade J. (eds): *Evaluating Reclamation Success: The Ecological Consideration*: 27-36. USDA, General Technical Report EN-164.

Pell, M., Stenström, J., y Granhall, U. (2006). Soil Respiration. *Methods for Assessing Soil Quality*, 117.

Pignataro, A., Moscatelli, M. C., Mocali, S., Grego, S., y Benedetti, A. (2012). Assessment of soil microbial functional diversity in a coppiced forest system. *Applied soil ecology*, 62, 115-123.

Pimentel, D., Harvey, C., Resosudarmo, P., Sinclair, K., Kurz, D., McNair, M., ... y Blair, R. (1995). Environmental and economic costs of soil erosion and conservation benefits. *Science*, 267(5201), 1117-1123.

Polyakov, V., y Lal, R. (2004). Modeling soil organic matter dynamics as affected by soil water erosion. *Environment International*, 30(4), 547-556

Qiu, L., Zhang, Q., Zhu, H., Reich, P. B., Banerjee, S., van der Heijden, M. G., ... y Wei, X. (2021). Erosion reduces soil microbial diversity, network complexity and multifunctionality. *The ISME journal*, 15(8), 2474-2489.

Raich, J. W., y Schlesinger, W. H. (1992). The global carbon dioxide flux in soil respiration and its relationship to vegetation and climate. *Tellus B*, 44(2), 81-99.

R Core Team (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Reverchon, F., Bai, S. H., Liu, X., y Blumfield, T. J. (2015). Tree plantation systems influence nitrogen retention and the abundance of nitrogen functional genes in the Solomon Islands. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1439.

Ridolfi, L., Laio, F., y D'Odorico, P. (2008). Fertility island formation and evolution in dryland ecosystems. *Ecology and Society*, 13(1).

Sánchez De Prager, M., Prager Mósquera, M., E. Naranjo, R., y E. Sanclemente, O. (2012). El suelo, su metabolismo, ciclaje de nutrientes y prácticas agroecológicas. *Agroecología*, 7(1), 16.

Saul-Tcherkas, V., y Steinberger, Y. (2009). Substrate utilization patterns of desert soil microbial communities in response to xeric and mesic conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(9), 1882-1893.

Schiettecatte, W., Gabriels, D., Cornelis, W. M., y Hofman, G. (2008). Enrichment of organic carbon in sediment transport by interrill and rill erosion processes. *Soil Science Society of America Journal*, 72(1), 50-55.

Shihan, A., Hättenschwiler, S., Milcu, A., Joly, F. X., Santonja, M., y Fromin, N. (2017). Changes in soil microbial substrate utilization in response to altered litter diversity and precipitation in a Mediterranean shrubland. *Biology and Fertility of Soils*, 53, 171-185.

Sparling, G. P. (1997). Soil microbial biomass, activity and nutrient cycling as indicators of soil health. *Biological indicators of soil health*, 97-119.

Tilman, D., Isbell, F., y Cowles, J. M. (2014). Biodiversity and ecosystem functioning. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 45, 471-493.

Tormo, J., Bochet, E., y García-Fayos, P. (2006). Is seed availability enough to ensure colonization success?: An experimental study in road embankments. *Ecological Engineering*, 26(3), 224-230.

Unidad de Análisis Agrícolas del Laboratorio Agroambiental del Gobierno de Aragón. <https://www.aragon.es/-/laboratorio-agroambiental-unidad-analisis-agricolas#anchor1>

Valentin, C., Poesen, J., y Li, Y. (2005). Gully erosion: Impacts, factors, and control. *Catena*, 63(2-3), 132-153.

Van Breemen, N., y Buurman, P. (2002). *Soil formation*. Springer Science y Business Media.

Vicente, E., Moreno-de las Heras, M., Merino-Martín, L., Nicolau, J. M., & Espigares, T. (2022). Assessing the effects of nurse shrubs, sink patches and plant water-use strategies for the establishment of late-successional tree seedlings in Mediterranean reclaimed mining hillslopes. *Ecological Engineering*, 176, 106538.

Visser, S., y Parkinson, D. (1992). Soil biological criteria as indicators of soil quality: soil microorganisms. *American Journal of Alternative Agriculture*, 7(1-2), 33-37.

Weil, R. R., y Magdoff, F. (2004). Significance of soil organic matter to soil quality and health. *Soil organic matter in sustainable agriculture*, 1-43.

Whisenant, S. G. (2005). First steps in erosion control. Pages 350–355 in S. Mansourian, D. Vallauri, and N. Dudley, editors. Forest restoration in landscapes: beyond planting trees. Springer (in cooperation with WWF), New York, USA.

Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.

Wilcox, B. P., Breshears, D. D., y Allen, C. D. (2003). Ecohydrology of a resource-conserving semiarid woodland: Effects of scale and disturbance. *Ecological monographs*, 73(2), 223-239.

Wilke C (2020). cowplot: Streamlined Plot Theme and Plot Annotations for 'ggplot2'. R package version 1.1.1, <https://CRAN.R-project.org/package=cowplot>.

Xu, Z., Yu, G., Zhang, X., He, N., Wang, Q., Wang, S., ... y Zhao, N. (2018). Divergence of dominant factors in soil microbial communities and functions in forest ecosystems along a climatic gradient. *Biogeosciences*, 15(4), 1217-1228.

Xu, D., Li, X., Chen, J., y Li, J. (2023). Research Progress of Soil and Vegetation Restoration Technology in Open-Pit Coal Mine: A Review. *Agriculture*, 13(2), 226.

Zak, J. C., Willig, M. R., Moorhead, D. L., y Wildman, H. G. (1994). Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(9), 1101-1108.

Zhou, Z., Wang, C., y Luo, Y. (2018). Response of soil microbial communities to altered precipitation: A global synthesis. *Global Ecology and Biogeography*, 27(9), 1121-1136.

ANEXO A: Metodología de la respirometría inducida por múltiples sustratos (MSIR) con MicroResp™

En este Anexo se va a explicar con mayor detalle la metodología del análisis de respirometría inducida por múltiples sustratos (MSIR) realizada con el protocolo de MicroResp™.

El principio de MicroResp™ es utilizar un gel indicador (rojo de Cresol) que cambia de color con el cambio de pH provocado por el aumento de la concentración del CO₂ gracias a la actividad catabólica de los microorganismos del suelo. Para ello, es necesario preparar las placas de detección y preparar las disoluciones de los sustratos, así como llenar las placas con los suelos, verter los sustratos encima de los estos y realizar las mediciones correspondientes.

1. Preparación de las placas de detección

Se preparó una solución indicadora y se juntó con Agar al 3% en proporción 2:1 (solución indicadora – agar) para conseguir una concentración de 1% de Agar purificado. Estas placas de detección reaccionan con el CO₂ cambiando de color con el cambio de pH de acuerdo con la siguiente ecuación:



Cuando el pH disminuye, el rojo de Cresol cambia de morado a amarillo, pudiéndose cuantificar esta diferencia con un espectrofotómetro UV-VIS.

1.1. Preparación de la solución indicadora

Se disolvieron 18,75mg de rojo de Cresol con 16,77 g de cloruro de potasio (KCL) y con 0,315 g de bicarbonato sódico (NaHCO₃) en 1000 ml de agua MilliQ. Esta solución no se puede calentar por encima de 65 °C, aunque sí que se calentó sobre una placa calefactora a 50 °C para facilitar la disolución. Se reservaron 400 ml para mezclar con el Agar y el resto se conservó a 4 °C (Aguantando un máximo de 6 meses, se utilizó durante 3 meses).

1.2. Preparación de las placas de detección

Se prepararon 200 ml de disolución con Agar purificado al 3%, diluyendo 6 g Agar Oxoid en 200 ml de agua MilliQ, e introduciéndolo en el autoclave 20 minutos a 120 °C. Tras el autoclavado se enfrió la disolución en agua, sin llegar nunca a bajar de los 60° para evitar que solidificase el Agar. Una vez se alcanzaron los 60 °C, esta

disolución de Agar se mezcló con 400 ml de la solución indicadora, manteniendo esta mezcla a 60 °C en baño maría. Después se pipeteó esta mezcla en placas de detección, todo a temperaturas altas para evitar la formación de burbujas de aire en el agar y que este solidificase antes de tiempo. Para ello se volcó una pequeña cantidad de la mezcla (100 ml) en una bandeja que se mantenía a baño maría, y con una pipeta multicanal se distribuyeron 150 µl de solución por pocillo en las placas de 96 pocillos (Figura A1) todo mediante pipeteo inverso. Las puntas también se calentaron a baño maría para que el choque de temperaturas no solidificase el agar y se creasen burbujas. Este gel se dejó solidificar por 30 minutos, y las placas se almacenaron a temperatura ambiente en la oscuridad con un absorbente de CO₂ de soda y una taza de agua durante 2 días. Todas las placas se introdujeron en el espectrofotómetro y se descartaron las que tenían un coeficiente de variación mayor al 5%. Esto también se comprobó antes de cada medición. Las placas de detección se pueden reutilizar volviéndolas a introducir en la atmósfera absorbente de CO₂ y dejando pasar un mínimo de 48 horas desde su última utilización.

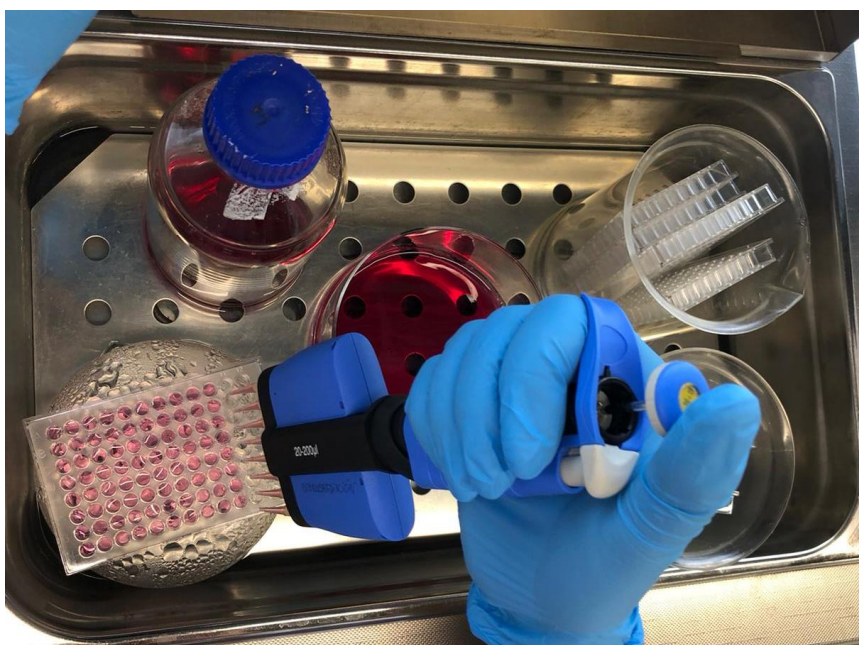


Figura A1. Preparación de las placas de detección mediante pipeteo múltiple inverso sobre baño maría a 60 °C.

2. Preparación de los sustratos

Los sustratos elegidos incluyen azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos. Se calcularon las soluciones de sustrato para proporcionar 1,5 mg de C por cada gramo de suelo seco para un 80% de la capacidad de campo del suelo en el momento de los análisis (Fanin et al., 2014)

Para medir la capacidad de campo de los suelos, se utilizó una muestra compuesta de suelo de cada ladera (A, B, C, D y E). Se pesaron los suelos y se saturaron con agua por capilaridad, metiéndolos en un cono de papel de filtro y contactando este cono con agua. Después se dejaron escurrir 24 horas y se volvieron a pesar. Para conocer la humedad inicial del suelo, se dejaron secar 24h en estufa a 105°C, y se pesaron de nuevo. Esta capacidad de campo se calculó restando al peso del suelo seco en estufa el peso del suelo saturado y dividiéndolo por el peso del suelo seco en estufa, obteniéndose así los gramos máximos de agua que podían retenerse en el suelo por cada gramo de suelo seco. De estas capacidades de campo, se obtuvo la media (16%) y se comparó con datos de la bibliografía sobre las mismas laderas (18%). Se optó por tomar este valor (18%) como la capacidad de campo media de todas las muestras.

Para saber cuántos gramos de suelo había en cada pocillo, se hizo una aproximación para simplificar los cálculos, en la que se midió el peso del suelo tras adicionarlo a la placa de 96 pozos profundos para 4 suelos distintos y se consideró la media por pocillo de los 4 suelos como la masa de suelo por pocillo para todas las muestras. Para ello, se procedió al llenado de una placa de pozo profundo según el procedimiento "Llenado de placas con suelo", y se pesó para cada uno de los suelos antes y después de su llenado, obteniendo un peso medio por pocillo de 0,5 g. Con eso se estimó que había que añadir 0,06 ml de agua (o disolución) por pocillo, y la cantidad de cada sustrato que había que añadir a 1 ml de la solución para conseguir aportar 1,5 mg de C por cada g de suelo seco. Se calcularon estas concentraciones para disoluciones de 50 ml, para poder preparar disoluciones grandes y almacenarlas. Para esterilizar las disoluciones se filtraron a través de un filtro de 45 µm de diámetro de poro y se almacenaron en frío a 4 °C hasta el momento de su utilización.

3. Llenado de placas con suelo

Las preparaciones anteriores se realizaron una vez y sirvieron para la medición de todas las muestras. Pero para cada muestra, fue necesario preparar las placas de pozo profundo con los suelos, y aplicar los sustratos a estas. En el laboratorio se disponía de dos sistemas de MicroRespTM, con 4 placas de pozo profundo para suelos y 1 para sustratos, por lo que se podían preparar y medir 2 placas simultáneamente. Teniendo 96 pocillos por placa y 15 sustratos (16 incluyendo el agua, utilizada para estimar la respiración basal), se decidió llenar cada placa con 2 suelos, teniendo 3 réplicas por sustrato para cada suelo ($2 \times 3 \times 16 = 96$), según la distribución de la Tabla A1,

como se ha hecho otras veces en la bibliografía (Fanin et al., 2014; 2015). No se considera necesario aleatorizar cada placa ya que el protocolo establece que el efecto borde en este método se considera insignificante.

Tabla A1.

Distribución de suelos y sustratos en placa de 96 pocillos

	SUELO 1						SUELO 2					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GLU	GLU	GLU	FRU	FRU	FRU	GLU	GLU	GLU	FRU	FRU	FRU
B	GAL	GAL	GAL	GLY	GLY	GLY	GAL	GAL	GAL	GLY	GLY	GLY
C	SER	SER	SER	CIS	CIS	CIS	SER	SER	SER	CIS	CIS	CIS
D	MAL	MAL	MAL	CIT	CIT	CIT	MAL	MAL	MAL	CIT	CIT	CIT
E	ARA	ARA	ARA	ASP	ASP	ASP	ARA	ARA	ARA	ASP	ASP	ASP
F	OX	OX	OX	GLUT	GLUT	GLUT	OX	OX	OX	GLUT	GLUT	GLUT
G	KET	KET	KET	NAC	NAC	NAC	KET	KET	KET	NAC	NAC	NAC
H	BEN	BEN	BEN	H2O	H2O	H2O	BEN	BEN	BEN	H2O	H2O	H2O

Abreviaciones, de derecha a izquierda y de arriba a abajo: GLU: D-glucosa, FRU: D(-)-fructosa, GAL: D(+)-galactosa, GLY: glicina, SER: L-serina, CIS: L-cisteina, MAL: ácido málico, CIT: ácido cítrico monohidratado, ARA: L(+)-arabinosa, ASP: (L+)-Asparagina monohidratada, OX: ácido oxálico, GLUT: L-glutamina, KET: ácido 2-cetoglutarico, NAC: N-acetil glucosamina, BEN: ácido 3-4-dihidroxibenzoico, H2O: Agua MilliQ.

Para el llenado de cada placa, se utilizó el dispositivo de llenado de MicroResp™, en el que se llena la misma cantidad de volumen para cada pocillo, que luego se vuelca en la placa. Se considera que el error por aproximar el volumen es menor que el error de pesar individualmente cada muestra y echarla en cada pocillo. Para ello se cubrieron la mitad de la placa de suelos y la mitad del dispositivo de llenado con celo, se puso la pantalla protectora entre el dispositivo de llenado y la placa de pocillo profundo, se llenó el dispositivo de llenado desechando el exceso de suelo, y se retiró la pantalla protectora, cayendo todo el suelo a la placa de pocillos profundos (Figura A2). Luego se cambiaron los celos a la otra mitad y se repitió el proceso, pero con otro suelo. Es importante anotar el peso por pocillo de cada suelo de cara a los cálculos, por lo que se la placa se pesó antes y después de cada llenado.

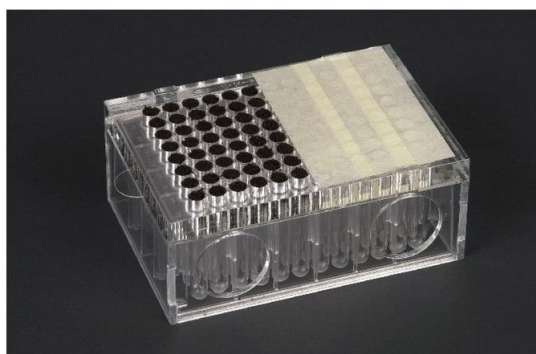


Figura A2. Dispositivo de llenado de MicroResp™ con celos y suelos listos para volcar (Campell et al., 2003).

4. Aplicación de los sustratos al suelo y mediciones

El sustrato se tenía que aplicar al suelo al mismo tiempo, en la medida de lo posible, por lo que habiendo 96 pocillos no se realizó un pipeteo individual. Por lo tanto, cada vez que se iba a añadir el sustrato a la placa con muestras de suelo, se preparó una placa de sustratos con la cantidad suficiente como para llenar las dos placas con suelo preparadas, y con una pipeta múltiple de 8 canales, se realizó el pipeteo de cada suelo. Como los sustratos se guardaban en la nevera, era necesario atemperarlos sacándolos a temperatura ambiente una hora antes de su aplicación al sustrato. En el caso del ácido 3-4-dihidroxibenzoico (BEN), su solubilidad es menor que la concentración de la que se preparó la disolución, por lo que al sacarlo de la nevera había que volver a disolverlo aplicando 30 minutos de ultrasonido y calor.

Una vez se aplicaban los sustratos al suelo, se dejaban los suelos a oscuras durante dos horas sin cubrir para que el sustrato reaccionase con el suelo y escapase el CO₂ abiótico que podía causar interferencias (Martens, 1987). Tras esas dos horas se realizaba una primera medición de las placas de detección en el espectrofotómetro, a 570nm, justo antes de poner el suelo a incubar. Después se ponía el recubrimiento de MicroResp™ -encargado de dejar pasar el CO₂ producido- sobre el suelo, se colocaba encima la placa de detección (Figura A3, izquierda), se cerraba con el sistema de sellado (Figura A3, derecha) y se dejaba incubar en oscuridad durante 4 horas. Tras esas 4 horas se retiraba la placa de detección del suelo y se medía nuevamente la absorbancia en el espectrofotómetro.



Figura A3. Izquierda: colocación de placa de detección sobre la placa con suelos y sustratos, con el sistema de Microresp™ que permite el paso de gases. Derecha: Sistema de sellado de Microresp™ (Campbell et al., 2003).