

**UNIVERSIDAD DE BURGOS  
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
AREA DE EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA**



**TESIS DOCTORAL**

**ACCIÓN NEMATICIDA (*G. rostochiensis*) Y  
METABÓLICA DEL SUELO EN PROCESOS DE  
BIODESINFECCIÓN POR APLICACIÓN DE  
ENMIENDAS DE ORIGEN ANIMAL, VEGETAL Y  
ANTRÓPICO**

**YOLANDA ARRIBAS SANTAMARIA**

**BURGOS 2013**

**UNIVERSIDAD DE BURGOS  
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
AREA DE EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA**

**MEMORIA DE TESIS DOCTORAL**

**ACCIÓN NEMATICIDA (*G. rostochiensis*) Y  
METABÓLICA DEL SUELO EN PROCESOS DE  
BIODESINFECCIÓN POR APLICACIÓN DE ENMIENDAS  
DE ORIGEN ANIMAL, VEGETAL Y ANTRÓPICO**

Realizada en el Departamento de Química (Área de Edafología y Química Agrícola) bajo la dirección del **Dr. D. Salvador González Carcedo**, Catedrático de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Burgos y de **Dr D. Domingo Javier López Robles** profesor Titular de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Burgos.

Presentada por **D<sup>a</sup> Yolanda Arribas Santamaría** para optar al grado de Doctora en Ciencias, por la Universidad de Burgos.

**I. INTRODUCCIÓN**

1. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	1
-------------------------------------	---

**II. REVISION TEORICA**

2. PATÓGENOS VEGETALES .....	3
2.1. DE LOS NEMATODOS EL SUELO Y LAS PLANTAS.....	3
2.2. DE LOS NEMATODOS DE LA PATATA EN GENERAL Y DE <i>Globodera rostochiensis</i> EN PARTICULAR.....	11
2.2.1. Ciclo biológico de <i>Globodera rostochiensis</i> .....	14
2.2.2. De la composición de paredes y membranas .....	19
2.2.3. Aspectos metabólicos de interés de <i>G. rostochiensis</i> .....	23
2.3. DEL CONTROL AGRONÓMICO DE LOS NEMATODOS.....	26
2.3.1. Estrategias globalizadas en el manejo de nematodos.....	26
2.3.2. El factor suelo .....	27
2.3.3. Qué son suelos supresivos .....	32
2.3.4. Cómo manejar la materia orgánica (MOS) para eliminar patógenos, conservando la calidad del suelo .....	34
2.3.5. Hongos nematicidas y formas de actuación.....	42
2.4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SUELO, APORTES ORGÁNICOS Y CAPACIDAD NEMATICIDA .....	50
2.4.1. Indicadores ecológicos asociados al control de la calidad del suelo	50
2.4.2. Actividades enzimáticas como índices de calidad.....	53
2.4.3. Índices metabólicos de calidad del suelo.....	57
2.5. LOS ENZIMAS DEL SUELO .....	60
2.5.1. Selección de actividades enzimáticas relacionadas con la evolución de los suelos y la mortalidad de los nematodos .....	65

**III. MATERIAL, MÉTODOS Y EXPERIENCIAS**

3. MATERIAL, MÉTODOS Y EXPERIENCIAS .....	89
3.1. SUELOS Y ENMIENDAS .....	89
3.1.1. Suelo empleados en las experiencias.....	89
3.1.2. Enmiendas orgánicas empleadas en las experiencias.....	89
a) Residuos ganaderos .....	89
b) Residuos vegetal .....	90

---

c) Residuos antrópicos.....	91
3.2. MÉTODOS .....	92
3.2.1. Toma y preparación de las muestras de suelo .....	92
3.2.2. Manejo de residuos.....	93
3.2.3. Preparación de muestras para biodesinfección.....	94
3.2.4. Muestras para actividades enzimáticas .....	94
3.2.5. Métodos físico-químicos para suelos y residuos .....	94
a) pH.....	94
b) Conductividad eléctrica .....	95
c) N total .....	95
d) N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mediante equipo analítico automatizado de flujo continuo skalar .....	95
e) Fósforo total.....	96
f) Fósforo asimilable.....	97
g) Materia orgánica (MO) y carbono orgánico total .....	98
h) Materia seca .....	98
i) Macroelementos asimilables .....	98
j) Microelementos .....	98
3.2.6 Análisis nematológico.....	98
a) Extracción de quistes de <i>G. rostochiensis</i> .....	99
b) Conteo de huevos y juveniles de segundo estadio (J2).....	101
3.3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DEL SUELO.....	102
3.3.1. Preparación de la muestra de suelo para medidas enzimáticas .....	102
a) Reactivos .....	102
a.1. Sustratos .....	103
a.2. Solución tampón .....	103
3.4. MÉTODO DE MICROPLACAS .....	103
3.4.1. Preparación del sustrato .....	104
3.4.2. Protocolo de medida.....	104
3.4.3. Actividades enzimáticas según medida tradicional (para estudio comparado de métodos) .....	105
a) Actividad fosfatasa ácida .....	106
b) Actividad fosfatasa alcalina.....	106
c) Actividad β-glucosidasa .....	106
3.5. PUESTA A PUNTO DEL METODO DE MEDIDA SIMULTANEA DE ENZIMAS ...	107
3.5.1. Elección de enzimas .....	108

3.5.2. Optimización de parámetros.....	108
3.5.3. Comparación entre la metodología tradicional y medida con microplacas.....	114
3.6. PROTOCOLO DE EXPERIENCIAS REALIZADAS .....	116
3.6.1. Experiencia I. suelo sin y con saturación de agua, aportes orgánicos (purín líquido y fragmentos de rábano).....	116
3.6.2. Experiencia II. Aporte de purín líquido y fragmentos de rábano a diferentes dosis.....	117
3.6.3. Experiencia III. Aplicación de purín sólido en campo en dosis única.....	118
3.6.4. Experiencia IV. Aplicación en laboratorio de purín deshidratado con dosis de 5, 10, y 20 g en 500 g de suelo.....	119
3.6.5. Experiencia V. Aplicación en laboratorio de aporte de estiércol de oveja a dosis de 5, 10 y 20 g en 500 g de suelo .....	120
3.6.6. EXPERIENCIA VI. Aplicación en laboratorio de estiércol de gallina en dosis de 5, 10, y 20 g en 500 g de suelo.....	121
3.6.7. Experiencia VII. Experiencia en laboratorio con diferentes dosis de restos de planta de fresa de 5, 10, y 20 g en 500 g de suelo...	122
3.6.8. Experiencia VIII. Aplicación en laboratorio de restos de cultivo de setas ( <i>Pleurotus ostreatus</i> ) en dosis de 5, 10, y 20 g en 500 g de suelo .....	123
3.6.9. Experiencia IX. Aplicación en laboratorio de restos de cultivo de maíz con urea en dosis de 5, 10 y 20 g en 500 g de suelo.....	124
3.6.10. Experiencia X. Aplicación en laboratorio de bioresiduo estabilizado de lodo de depuradora y de lodo con cal en dosis de 5, 10 y 20 g en 500 g de suelo.....	126
3.6.11. Experiencia XI. Aplicación en laboratorio de residuo sólido urbano bioestabilizado dosis de 5, 10 y 20 g en 500 g de suelo.	127
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	128

### III. RESULTADOS

4. ANALISIS DE RESULTADOS DE LAS MODIFICACIONES DEL PERFIL ENZIMATICO DE UN SUELO CON APORTES ORGANICOS Y SU POTENCIAL NEMATICIDA .....	131
4.1. EXPERIENCIA I. ANÁLISIS DE RESULTADOS EN LA EXPERIENCIA DE APORTES ORGÁNICOS CON Y SIN DEFICIENCIA DE OXÍGENO. ESTUDIO CONJUNTO DE LOS APORTES ORGÁNICOS.....	131
4.1.1. Modificación de parámetros químicos durante el proceso .....	131
4.1.2. Mortalidad de nematodos asociada a la aplicación de agua y diferentes enmiendas .....	133
4.1.3. Expresión gráfica de las actividades enzimáticas estudiadas .....	134

4.1.4. Análisis de resultados enzimáticos .....	136
4.1.5. Análisis estadístico .....	138
a) Comportamiento del suelo como valor de referencia en la actividad nematocida .....	138
b) Resultados de las actividades estudiadas, parámetros químicos y mortalidad asociada .....	138
c) Matriz de correlaciones .....	139
d) Componentes principales .....	140
4.1.6. Estudio aislado del comportamiento del aporte de rábano en aplicación con y sin intercambio de gases .....	142
a) Correlaciones establecidas en la aplicación de fragmentos de rábano .....	142
b) Análisis de componentes principales .....	143
4.1.7. Estudio aislado del comportamiento del aporte de purín en aplicación con y sin intercambio de gases .....	146
a) Correlaciones establecidas para la aplicación de purín .....	146
b) Análisis de componentes principales .....	147
4.2. EXPERIENCIA II. APORTES DE PURÍN Y RÁBANO A DIFERENTES DOSIS..	150
4.2.1. Modificación de algunos parámetros químicos durante el proceso .	150
4.2.2. Mortalidad de los nematodos según la aplicación de enmiendas ...	152
4.2.3. Resultados de actividades enzimáticas .....	152
a) Valores de actividad .....	152
b) Representación gráfica de actividades enzimáticas .....	154
4.2.4. Análisis de resultados enzimáticos .....	156
4.2.5. Análisis diferenciados de los aportes independientes .....	159
4.2.5.1. Análisis estadístico de la aplicación de rábano .....	159
a) Correlaciones del rábano a diferentes dosis con suelo testigo..	159
b) Análisis de componentes principales .....	160
4.2.5.2 Análisis estadístico de la aplicación de purín .....	161
a) Correlaciones del purín a diferentes dosis con suelo testigo ....	161
b) Análisis de componentes principales .....	162
4.3. EXPERIENCIA III. APLICACIÓN DE PURÍN SÓLIDO EN CAMPO .....	165
4.3.1. Modificación de algunos parámetros químicos durante el proceso efecto sobre pH, conductividad y nitratos .....	165
4.3.2. Mortalidad del nematodo <i>G.rostochiensis</i> con la aplicación de purín sólido en campo .....	167
4.3.3. Resultados de actividades enzimáticas .....	167
a) Valores de actividad .....	167
b) Representación gráfica de las actividades enzimáticas .....	168

c) Análisis de resultados enzimáticos.....	170
4.3.4. Análisis estadístico .....	171
a) Matriz de correlaciones.....	171
b) Análisis de componentes principales .....	172
4.4. EXPERIENCIA IV. APLICACIÓN DE PURÍN SÓLIDO EN LABORATORIO A DIFERENTES DOSIS .....	175
4.4.1. Resultados del análisis nematológico.....	175
4.4.2. Resultados de actividades enzimáticas.....	175
a) Valores de actividad .....	175
b) Expresión gráfica de las actividades enzimáticas .....	176
c) Análisis de resultados enzimáticos.....	178
4.4.3. Análisis estadístico .....	179
a) Matriz de correlaciones.....	179
b) Análisis de componentes principales .....	180
4.5. EXPERIENCIA V. APLICACIÓN DE ESTIÉRCOL DE OVEJA A DIFERENTES DOSIS .....	183
4.5.1. Resultados del análisis nematológico.....	183
4.5.2. Resultados de actividades enzimáticas.....	183
a) Valores de actividad .....	183
b) Expresión gráfica de las actividades enzimáticas .....	184
c) Análisis de resultados enzimáticos.....	186
4.5.3. Análisis estadístico .....	188
a) Matriz de correlaciones.....	188
b) Análisis de componentes principales .....	188
4.6. EXPERIENCIA VI. APLICACIÓN DE ESTIÉRCOL DE GALLINA A DIFERENTES DOSIS .....	191
4.6.1. Resultados del análisis nematológico.....	191
4.6.2. Resultados de actividades enzimáticas.....	191
a) Valores de actividad .....	191
b) Expresión gráfica de las actividades enzimáticas .....	192
c) Análisis de resultados enzimáticos.....	194
4.6.3. Análisis estadístico .....	195
a) Matriz de correlaciones.....	195
b) Análisis de componentes principales .....	196
4.7. EXPERIENCIA VII. APLICACIÓN DE RESTOS DE FRESA A DIFERENTES DOSIS .....	199
4.7.1. Resultados del análisis nematológico.....	199
4.7.2. Resultados de actividades enzimáticas.....	199

a) Valores de actividad .....	199
b) Expresión gráfica de las actividades enzimáticas .....	200
c) Análisis de resultados enzimáticos.....	202
4.7.3. Análisis estadístico .....	203
a) Matriz de correlaciones.....	203
b) Análisis de componentes principales .....	204
4.8. EXPERIENCIA VIII. APLICACIÓN DE RESTOS DE CULTIVO DE SETAS A DIFERENTES DOSIS .....	207
4.8.1. Resultados del análisis nematológico.....	207
4.8.2. Resultados de actividades enzimáticas.....	207
a) Valores de actividad .....	207
b) Expresión gráfica de las actividades enzimáticas .....	208
c) Análisis de resultados enzimáticos.....	210
4.8.3. Análisis estadístico .....	211
a) Matriz de correlaciones.....	211
b) Análisis de componentes principales .....	212
4.9. EXPERIENCIA IX. APLICACIÓN DE RESTOS DE COSECHA DE MAÍZ CON UREA A DIFERENTES DOSIS.....	215
4.9.1. Modificaciones de pH y CE.....	215
4.9.2. Resultado del análisis nematológico.....	215
4.9.3. Resultados de actividades enzimáticas.....	216
a) Valores de actividad .....	216
b) Expresión gráfica de las actividades enzimáticas .....	218
c) Análisis de resultados enzimáticos.....	220
4.9.4. Análisis estadístico .....	220
a) Matriz de correlaciones.....	220
b) Análisis de componentes principales .....	221
4.10. EXPERIENCIA X. APLICACIÓN EN LABORATORIO DE RESIDUO DE EDAR BIOESTABILIZADO SIN Y CON CAL A DIFERENTES DOSIS.....	223
4.10.1. Resultado del análisis nematológico .....	223
4.10.2. Resultados de actividades enzimáticas .....	225
a) Valores de actividad .....	225
b) Expresión gráfica de las actividades enzimáticas .....	226
b.1. Lodo estabilizado .....	226
b.2. Lodo estabilizado con cal .....	228
c) Análisis de resultados enzimáticos.....	230
4.10.3. Análisis estadístico de aplicación de biosólido.....	231
a) Matriz de correlaciones .....	231



---

b) Análisis de componentes principales.....	232
4.10.4. Análisis estadístico de aplicación de biosólido con cal .....	234
a) Matriz de correlaciones .....	234
b) Análisis de componentes principales.....	235
4.11. EXPERIENCIA XI. APLICACIÓN EN LABORATORIO A DIFERENTES DOSIS DE RSU BIOESTABILIZADO .....	239
4.11.1. Resultados del análisis nematológico .....	239
4.11.2. Resultados de actividades enzimáticas .....	239
a) Valores de actividad .....	239
b) Expresión gráfica de las actividades enzimáticas .....	240
c) Análisis de resultados enzimáticos.....	242
4.11.3. Análisis estadístico.....	244
a) Matriz de correlaciones .....	244
b) Análisis de componentes principales.....	245
 <b>V. DISCUSIÓN</b>	
5. DISCUSIÓN .....	249
5.1. PUESTA DE MANIFIESTO EN LABORATORIO DE LAS ACTIVIDADES NEMATICIDA Y METABÓLICA RESILENTE .....	254
5.2. APLICACIÓN COMO BIODESINFECTANTE DEL PURÍN DE CERDO.....	261
5.3. APLICACIÓN DE OTROS BIODESINFECTANTES DE ORIGEN ANIMAL, ESTIÉRCOLES DE OVEJA Y DE GALLINA.....	275
5.4. APLICACIÓN BIODESINFECTANTES DE ORIGEN VEGETAL: EL RÁBANO.....	281
5.5. APLICACIÓN DE OTROS BIODESINFECTANTES DE ORIGEN VEGETAL FRESA CHAMPIÑÓN Y MAÍZ ENRIQUECIDO CON UREA .....	285
5.6. APLICACIÓN BIODESINFECTANTES DE ORIGEN ANTRÓPICOS: BIOSÓLIDO ESTABILIZADO DE EDAR Y DE RSU .....	293
 <b>VI. CONCLUSIONES</b>	
6. CONCLUSIONES .....	301
 <b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	
7. BIBLIOGRAFÍA.....	303

## 1. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Los nematodos fitoparásitos son individualidades biológicas que colonizan los suelos y causan daños muy significativos en la agricultura moderna. En particular *Globodera rostochiensis* afecta al cultivo de la patata, reduciendo su producción en un 75%.

La prohibición del uso del bromuro de metilo (BM) como fumigante para controlar un gran número de patógenos, ha implicado un incremento en el interés por desarrollar otras estrategias alternativas para controlar los patógenos del suelo, entre las que aparece la utilización de materia orgánica, como una de las más viables.

Entre ellas destaca la aplicación de aportes de materia orgánica residual al suelo de diferentes orígenes: animal, vegetal y antrópica, mediante estrategias de biodesinfección/biosolarización. De ellas y tras su desintegración en el suelo, se dice que mejoran el rendimiento siendo capaces de regular las poblaciones de nematodos, patógenos fúngicos y malas hierbas.

La determinación de la actividad metabólica en el suelo a través del seguimiento de un perfil enzimático determinado es una herramienta muy sensible ante procesos de contaminación, degradación o desertificación del suelo. En su conjunto, o de forma aislada, los enzimas explican una cantidad hechos que afectan a las transformaciones biogeoquímicas que ocurren en el suelo, son extraordinariamente sensibles a variaciones ambientales de la temperatura, la humedad, la salinidad o la presencia en el suelo de xenobióticos, y se las atribuye el papel de indicadores iniciales de alteraciones en la calidad de dicho suelo, más que otras propiedades de evolución mas lenta.

De la incorporación de residuos orgánicos se indica su capacidad para generar una reactivación de sus propiedades biológicas y bioquímicas, si son capaces de estimular la proliferación microbiana y su actividad metabólica. Esta revitalización del sistema, se asocia a incrementos de actividad y concentración de enzimas de excreción y/o a la liberación de metabolitos, captación de micronutrientes y generación de complejos organominerales. Las enzimas más significativas son las que participan en la despolimerización de las macromoléculas, de origen vegetal o animal, al estar directamente involucradas en la fase terminal de los ciclos biogeoquímicos del de C, N, P y S. Sin embargo se encuentran en la bibliografía hechos aislados y fragmentados tanto de la intervención de determinados enzimas que afectan a la muerte de *G. rostochiensis* sin ubicar sobre que lugar o etapa del animal en el que actúan. De la

misma forma, los hechos se repiten sobre vagas afirmaciones que afectan al metabolismo del suelo.

Al plantearse esta tesis doctoral se busca en primer lugar el/los componente(s) enzimático (s) que son causa de la acción nematocida sobre *G.rostochiensis* y si es posible descifrando en que ámbito enzimático/físico-químico se integra.

De esta forma, se pretende conocer en primer lugar donde radica (si es que existe) la capacidad nematocida resiliente de un determinado suelo.

El uso de estrategias matemáticas que permitan establecer correlación entre enzimas y su evaluación entre ellas y con la mortalidad del nematodo, facilitarán el conocimiento de la componente nematocida principal y en un primer intento, establecer diagramas de flujos metabólicos que nos permitan establecer criterios metabólicos claros sobre el impacto de la enmienda sobre el suelo. De paso, y con esta herramienta se comparará y se obtendrán criterios sobre la validez y aceptabilidad de los resultados obtenidos en el laboratorio frente a las experiencias de campo y los efectos de ¿mejora? que sugiere la bibliografía sobre el impacto de las enmiendas orgánicas sobre el suelo.

En este trabajo de investigación se aborda el estudio de los efectos producidos por la aplicación de diferentes residuos orgánicos agrupándolos por su origen en animales, vegetales y antrópicos, sobre las poblaciones de nematodos en suelo, su influencia sobre un perfil enzimático específico y su impacto sobre el flujo metabólico de un suelo que actualmente sirve a la producción de patata.

De esta forma se pretende, en definitiva, mejorar determinados criterios, actualmente en vigor, sobre la muerte de *G.rostochiensis* y sobre criterios de mejora del suelo, asociados a la aplicación de enmiendas.

## 2. PATÓGENOS VEGETALES

Son organismos capaces de causar plagas y enfermedades a las plantas. Una forma de clasificar y estudiar estas alteraciones de las plantas es aquella que tiene en cuenta su etiología y por esto una de las agrupaciones sería por plagas, enfermedades parasitarias, y enfermedades no parasitarias (abióticas). Ante esta situación es conveniente conocer las interacciones por las que el suelo condiciona su presencia y persistencia.

Los patógenos estudiados son:

- Nematodos fitoparásitos: *Globodera rostochiensis*.
- Hongos por su relación con la mortalidad de *G.rostochiensis*.

### 2.1. DE LOS NEMATODOS, EL SUELO Y LAS PLANTAS

Los nematodos se pueden encontrar en todos los lugares, el mar, agua dulce, suelo y distintas partes de las plantas (Nickle, 1991). Son organismos muy abundantes en cualquier tipo de suelo y de organismo.

Necesitan lugares húmedos para vivir con poca propagación activa pero son fáciles de diseminar, con agua de riego, lluvia, viento y aperos de labranza.

De forma y tamaño variados, unos son más o menos alargados o cilíndricos (vermiformes), otros tienen forma de pera o limón. El tamaño medio de los nematodos vermiformes es aproximadamente de un mm, y por ello, difíciles de ver a simple vista, aunque sí se distinguen con facilidad a los que forman quistes (*Heterodera*) o nódulos (*Meloidogyne*). Sólo por las variaciones en forma o tamaño, hay una gran cantidad de grupos diferentes, inclusive formas excepcionales, helicoidales y esféricas.

Animales con una organización muy sencilla, algunos son especies parásitas de plantas y causan graves problemas en los cultivos, pero también existen nematodos saprófagos que favorecen la descomposición de la materia orgánica, omnívoros e incluso depredadores, o nematodos parásitos de animales, como los entomopatógenos que parasitan insectos, y se utilizan ampliamente en control biológico de plagas (familias de *Heterorhabditidae*, *Phasmarhabditidae* y *Steinernematidae*).

La agrupación de los nematodos en función de una actividad trófica similar y su estrategia histórica de vida proporcionan una base para el análisis de los restos de alimentos y el uso de la fauna de nematodo en

una evaluación integral de su situación dentro de la web. Así se hace necesario, para una mejor comprensión de la función de los nematodos en el suelo, es esencial conocer los hábitos alimentarios de la fauna de nematodos, por ejemplo, en el reciclaje de nutrientes o en la interacción de unas especies con otras.

Los nematodos son buenos bioindicadores, ya que proporcionan una valoración integrada de las condiciones abióticas y de las funciones bióticas y nutricionales del suelo (Bongers y Bongers, 1998; Bongers y Ferris, 1999; Freckman y Ettema, 1993) y sus poblaciones se pueden correlacionar con estados sucesionales de la vegetación, probablemente como respuesta a cambios físicos y químicos ocurridos en el suelo (Matlack, 2001).

En los suelos de Toledo se ha observado que, especies del orden *Mononchida*, (Bello, 1979) (consideradas como depredadoras, Yeates, 1987), se alimentan a base, casi exclusiva, de nematodos bacteriofagos y actinomicetos, de forma que, incluso pueden completar su ciclo biológico sin la ingestión de otro tipo de alimento (Arpin y Kilbertus, 1981; Saur y Arpin, 1989). Esta información suele ser la consecuencia de experiencias de laboratorio y sus resultados difícilmente extrapolables a las condiciones de campo (Yeates *et al.*, 1993), pues con frecuencia, los Monónquidos dejan restos de sus presas sin digerir totalmente, lo que permite conocer la composición de su dieta en condiciones naturales (Small, 1988). Su régimen alimentario es polivalente y aleatorio (Bilgrami *et al.*, 1986; Small, 1988), aunque los nematodos saprófagos parecen ser sus presas más habituales, posiblemente por las facilidades (tamaño adecuado, cutícula no especialmente gruesa, número de individuos elevado) que ofrecen a la depredación.

Los grupos funcionales de nematodos del suelo se han caracterizado por el hábito de la alimentación (grupo trófico) y por las características del ciclo de vida expresada a lo largo de una escala colonizador-almacenador (cp) (Bongers y Bongers, 1998). Se designan los gremios que son indicadores de la ubicación en la red trófica (Web) de los restos de alimentos (basal, estructurado, enriquecido), y las ponderaciones de los gremios a lo largo de la estructura y se proporcionan las trayectorias de enriquecimiento, para la determinación del índice de enriquecimiento (IE) y la estructura del índice (SI) de la cadena alimenticia.

El valor bioindicador de los nematodos tiene su origen en la evolución del índice de madurez (IM) propuesto por Bongers (1990). A cada familia se le asigna un valor como colonizador-persistente (c-p) basado en los rasgos de su historia vital. Los valores c-p más bajos se

caracterizan generalmente por su capacidad de colonización secundaria, tiempos cortos entre generaciones, grandes fluctuaciones de las poblaciones, capacidad de supervivencia en escenarios con condiciones desfavorables, gónadas grandes, y producción de muchos huevos.

En todo caso la escala de colonizador-almacenador (cp) ubica a los taxones de nematodos del suelo y de agua dulce en una escala lineal del 1 al 5 (tabla 2.1) en función de sus características  $r$  y  $K$ , según se describe en el cuadro siguiente (Bongers, 1990).

**Tabla 2.1.-** Clasificación de nematodos

Valor c-p	Base de clasificación
cp-1:	Tiempo de generación corto, huevos pequeños, fecundidad alta, principalmente bacterívoros, se alimentan continuamente en medios enriquecidos, actúan limitando drásticamente el nº de bacterias.
cp-2:	Tiempo más largo de generación y menor fecundidad que el grupo de CP-1, muy tolerantes a las condiciones adversas y puede llegar a ser criptobióticos. Deliberadamente acumulan alimentos de más en épocas de abundancia y pueden seguir así alimentando de sus reservas a medida que disminuyen los recursos. Principalmente, bacterívoros y fungívoros.
cp-3:	Mayor tiempo de generación, mayor sensibilidad a las condiciones adversas. Fungívoros, bacterívoros y carnívoros.
cp-4:	Tiempo más largo generación, menor fecundidad, una mayor sensibilidad a las perturbaciones. Además de los roles tróficos otros, omnívoro menor especies
cp-5:	Mayor tiempo de generación, los mayores tamaños corporales más bajo de fecundidad, mayor sensibilidad a las perturbaciones. Predominan los carnívoros y omnívoros

Los indicadores de la estructura y función de las webs alimentarias del suelo son herramientas útiles para el seguimiento y la comprensión de los efectos de las prácticas de gestión de la calidad o la salud suelo y en la recuperación de daños que se generan en los agroecosistemas (Rapport *et al.*, 1997).

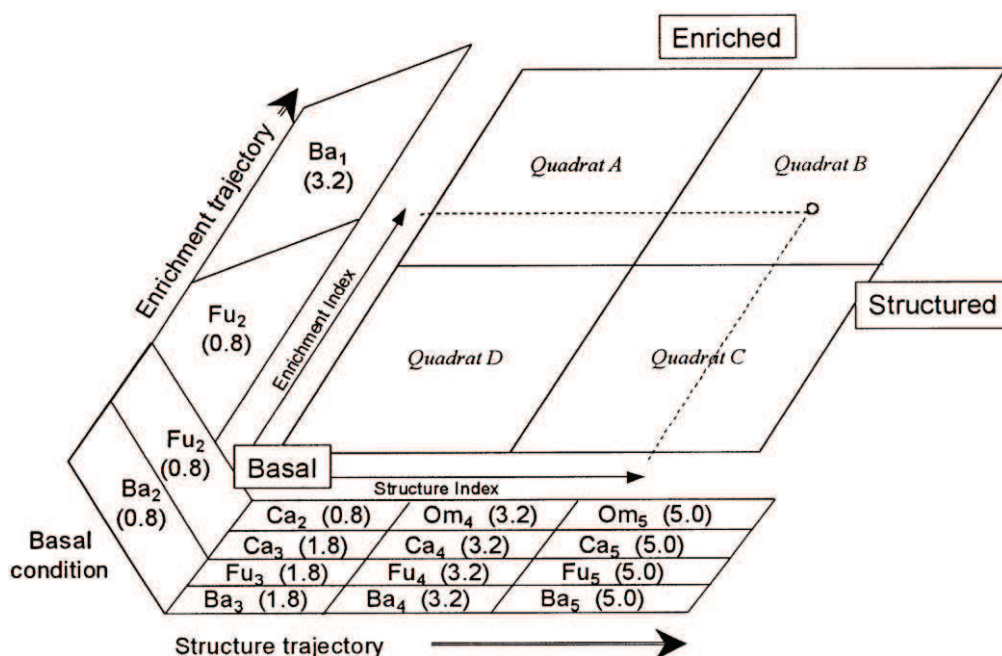
La adición de enmiendas orgánicas de diferente cualidad ha demostrado su capacidad para alterar la composición de la comunidad de nematodos (Ferris y Matute, 2003). Estos autores mostraron que los nematodos bacteriófagos (con alimentación bacteriana) se estimularon con aportes de material de alta calidad orgánica, mientras que los fungívoros se han mejorado con la adición de sustratos de calidad inferior (paja de trigo). Forge *et al.* (2005) mostraron que después de 1 año de la aplicación de estiércol, la abundancia de nematodos bacteriófagos y fungívoros se aumentó a niveles equivalentes a la de aquellos suelos con 6 años de aplicación continua de estiércol. Muchos autores también han demostrado el incremento del potencial de mineralización del N y del reciclado de biomasa microbiana, con el aumento de la acción de los

nematodos predadores de bacterias y de hongos como fuente de alimentación (Griffiths, 1994; Ingham, 1985). Más recientemente, se encontró una correlación positiva entre las concentraciones de P de hojas de manzano y la abundancia de nematodos oportunistas (Forge *et al.* 2005).

La posibilidad de aplicación al conocimiento del suelo y a prácticas de producción agrícola en forma sostenible, depende de la capacidad de los organismos del suelo para generar procesos que determinen el crecimiento del cultivo y mantengan la calidad del suelo (por ejemplo, disponibilidad de agua y nutrientes, supresión de patógenos y plagas, mejora de la estructura del suelo, etc.).

En suelos cultivados, los nematodos omnívoros y predadores no son abundantes, y se clasifican generalmente en el extremo superior de los colonizadores-persistentes (cp) y continuos dentro de los grupos de nematodos funcionales. Estos nematodos son más sensibles a las concentraciones de metales pesados que los de otros grupos c-p, y las razones que conducen, a un descenso del nº de nematodos con alto c-p y limitada sensibilidad a los productos agroquímicos son limitadas y poco conocidas.

Una guía para establecer criterios a futuro del uso de los suelos nos lo proporciona este esquema (Fig. 2.1) (Bongers y Bongers, 1998).



**Figura 2.1.-** Grupos funcionales de nematodos del suelo caracterizados por el hábito de la alimentación (grupo trófico) y por las características del ciclo de vida expresada a lo largo de una escala colonizador-almacenador (cp) (Bongers y Bongers, 1998).

En él se nos orienta de la evolución de los suelos en dos direcciones:

- a) Enriquecimiento trófico del suelo, que permite incrementar las capacidades tróficas del mismo, orientadas hacia la producción vegetal y
- b) reorganización espacial del suelo, conducente a la formación de estructuras agregacionales a partir de las texturales, que mejorarán sus condiciones físicas, químicas y biológicas y su estabilidad ante la erosión y con ellas a una mejora de la calidad y salud de los suelos.

De una visualización del esquema (Fig. 2.4) se infiere la ubicación de los distintos grupos biológicos y el daño que la presión osmótica (derivada de la aplicación de fertilizantes inorgánicos) ejerce sobre poblaciones incapaces de soportarla, al poder ubicar su intervención en la evolución nutricional edáfica y/o en su capacidad como estructurante agregacional (Tenuta y Ferris, 2004).

Los nematodos de vida libre (con un c-p entre 4 y 5) aceleran la descomposición de la materia orgánica (MO) del suelo (Abrams y Mitchell, 1980). Por ello, el nº de nematodos microbivoros de vida libre aumenta rápidamente tras una adición de fertilizantes orgánicos e inorgánicos (Marshall, 1977), y se acompaña de un descenso en el nº de nematodos fitoparásitos (Heald y Burton, 1968; Tomerlin y Smart, 1969; Tello y Bello, 1994).

Los organismos que se asocian con las raíces de las plantas presentan previamente una fase de reconocimiento, atraídas por los rizodepósitos de las mismas. Incluso, la eclosión de algunos géneros de nematodos está afectada por la composición de estos exudados (Taylor y Sasser, 1983). Sin embargo, los rizodepósitos de plantas hospedantes no tenían efecto sobre la eclosión de larvas de *Meloidogyne chitwoodi* (Inserra *et al.*, 1985) siendo la temperatura del suelo el factor determinante de la eclosión y del establecimiento del nematodo.

El reconocimiento, establecimiento y eficiencia de una asociación micorrízica (hongo-raíz) dependen de factores como:

- a) tipo de hongo (y su tasa de crecimiento interior y exterior en la raíz),
- b) planta hospedante (como genotipo, rizodepósitos, geometría radical, presencia de pelos radicales y de raíces laterales) y
- c) factores bio-físico-químicos del suelo (pH, humedad, textura, espacio poral, fertilidad, tipo de microorganismos) (Graham *et al.*, 1981; Estañol, 1987; Tester *et al.*, 1987; Smith y Giaginazzi, 1988; Varela y Estrada, 1991).



Otro factor se centra en la detección de acumulaciones localizadas de polisacáridos insolubles en la pared celular y un incremento en la producción de ligninas en el xilema de plantas en asociación (Nehemiah, 1977). Algunos autores señalan que la presencia eficaz de un hongo micorrizante reduce la invasión y reproducción de nematodos (Hussey y Roncadori, 1982; Roncadori y Hussey, 1982). Las asociaciones micorrízicas generan cambios fisiológicos en la planta que modifican el reconocimiento y establecimiento de los microorganismos que colonizan la rizosfera (Posta *et al.*, 1995) y producen incrementos en la respiración de raíces micorrizadas (Kaspari, 1973).

Por su parte, Fries *et al.* (1996), al combinar *Glomus intraradices* con maíz, detectaron cambios fisiológicos importantes al inicio de la asociación. Durante el establecimiento de la misma se lleva a cabo la degradación sucesiva de arbúsculos, lo que implica una actividad quitinolítica elevada, y conlleva en sí misma, la presencia de enzimas capaces de inhibir el establecimiento de otros organismos. En el suelo, al morir la planta, aparecen glicoproteínas, capaces de englobar partículas arcillosas y de polimerizarse en el entorno de los tricoblastos, participando de esta forma en la transformación de las estructuras texturales en agregacionales, reordenación de las arcillas y modificación del espacio poral y la capacidad de retención de agua y nutrientes.

Los microorganismos del suelo son los responsables primarios de la descomposición de los componentes orgánicos de la red alimentaria y su actividad se desarrolla en el segundo nivel trófico (el primero son las plantas, las microalgas y las bacterias fotosintetizadoras). Sus poblaciones afectan y son afectados por los nematodos, pues estos últimos atacan a bacterias, hongos y raíces vegetales, entre otros. Cuando el nº de poblaciones de nematodos es bajo, la alimentación de los nematodos puede estimular el crecimiento microbiano o de la planta a través de la liberación de residuos ricos en nutrientes.

Según Yeates, (1999), los nematodos son heterótrofos, que en última instancia dependen de autótrofos, como las plantas superiores, por los recursos que les proporcionan (aportes de exudados de raíces y hojarasca). Por ello, De Deyn *et al.* (2004), acabaron afirmando que la diversidad de especies de plantas y la composición vegetal, probablemente afectan a la composición de los nematodos del suelo fundamentalmente a través de la complementariedad en la calidad de los recursos que aportan las especies vegetales presentes, tanto o más que en un incremento en la cantidad total de recursos aportados.

La depredación nematológica de poblaciones bacterianas y fúngicas puede controlar el equilibrio de su número en el suelo. De esta forma,

la estructura de la comunidad de nematodos (nº, tipo y diversidad de nematodos) juega un papel importante en las vías de la mineralización y la inmovilización de los materiales orgánicos del suelo (Neher, 2001), y ha sido propuesto como un indicador útil de la calidad del sustrato y liberación de nutrientes (Griffiths, 1994; Ingham, 1985).

Es difícil la comprensión de cómo la adición de N afecta a la riqueza taxonómica y a la composición relativa de los distintos nematodos del suelo debido a las complejas interacciones entre los efectos directos de la adición de N en la biota del suelo y los efectos indirectos mediados por la composición alterada de la comunidad vegetal (Wardle, 2002).

Se ha propuesto la acidificación de los agrosistemas consecuencia de la adición de N, como uno de los factores mas importantes de la inhibición de los nematodos del suelo (Qi *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010). En el lado opuesto, los nematodos contribuyen a la mineralización de N, a la liberación de  $\text{NH}_4^+$  y al almacenamiento de N en su biomasa (Griffiths, 1994; Ingham, 1985).

Como consecuencia de la disponibilidad en el uso de los recursos, a alta densidad de nematodos, la productividad de la planta y el desarrollo de las asociaciones micorrízicas pueden verse afectadas negativamente.

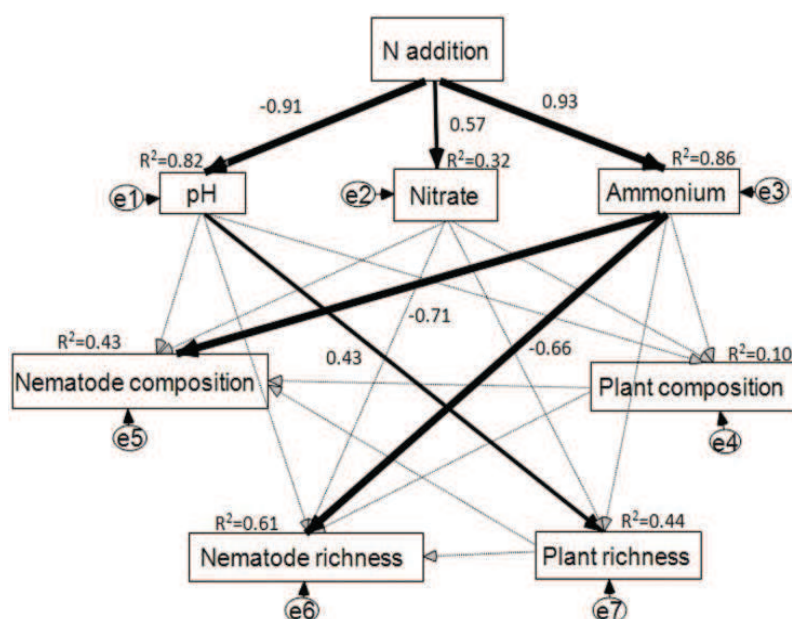
Se ha observado en todo el mundo que tras la adición de N, la alteración de la composición de la comunidad vegetal y la pérdida de especies se generaliza (Xia y Wan, 2008; Bai *et al.*, 2010).

En otros estudios, se encontraron correlaciones negativas entre las concentraciones de N-  $\text{NO}_3^-$  y N-  $\text{NH}_4^+$  y los herbívoros radiculares y los fungívoros (Liang *et al.*, 2009; Rodríguez-Kábana, 1986), lo que sugiere efectos directos entre la adición de N y los nematodos del suelo.

Es importante destacar que los nematodos del suelo no sólo pueden estar influenciados por los cambios en las condiciones físicas del suelo, sino también, indirectamente, por los cambios en la composición de la comunidad vegetal residente (De Deyn *et al.*, 2004) (Fig. 2.2.).

Además, la composición bio-físico-química de la solución del suelo es alterada por la constante demanda de nutrientes minerales, la liberación de compuestos orgánicos por parte de la raíz (Marschner, 1986) y la acción de enzimas libres presentes en la solución del suelo. En el caso de maíz, se ha detectado en los rizodepósitos una gran cantidad de sustancias del tipo galactosa-arabinosa, al compararlas con exudados de otros cultivos, y se ha visto la participación de estas sustancias en

la capacidad de retención de agua y en la asociación de la raíz con otras macromoléculas (Chaboud, 1983).



**Figura 2.2.-** Modelo de ecuaciones estructurales de la adición de N al suelo factores fisicoquímicos, la composición de la comunidad vegetal y riqueza, composición y abundancia de la comunidad nematodos

En las raíces de cebolla micorrizada se ha detectado una mayor concentración de fenilalanina y serina, sustancias que son inhibidoras de nematodos. En soja (*Glycine max.* L.) micorrizada se acumula cumestrol, el cual inhibió la movilidad del nematodo *Pratylenchus scribneri* (Morandi *et al.*, 1984; Dehne *et al.*, y Suresh, citados por García y Ocampo, 1987). De una forma general, los aportes de enmiendas orgánicas inducen a una disminución del número de nematodos fitoparásitos debido a dos fenómenos principales (Norton, 1979):

- (1) cuando se realizan los aportes de materia orgánica, los organismos antagonistas de los nematodos (predadores y parásitos) pueden hacerse más abundantes,
- (2) algunos ácidos orgánicos procedentes de la descomposición de la materia orgánica (ácido fórmico, acético, propiónico o butírico) son tóxicos para los nematodos cuando gasifican.

Además, en esta lista hay que incluir la capacidad osmótica de muchos compuestos orgánicos sencillos, que son liberados de las estructuras orgánicas presentes en las enmiendas, y que en determinadas circunstancias, poco conocidas, son capaces de generar la muerte de nematodo, tanto de vida libre como fitoparásito.

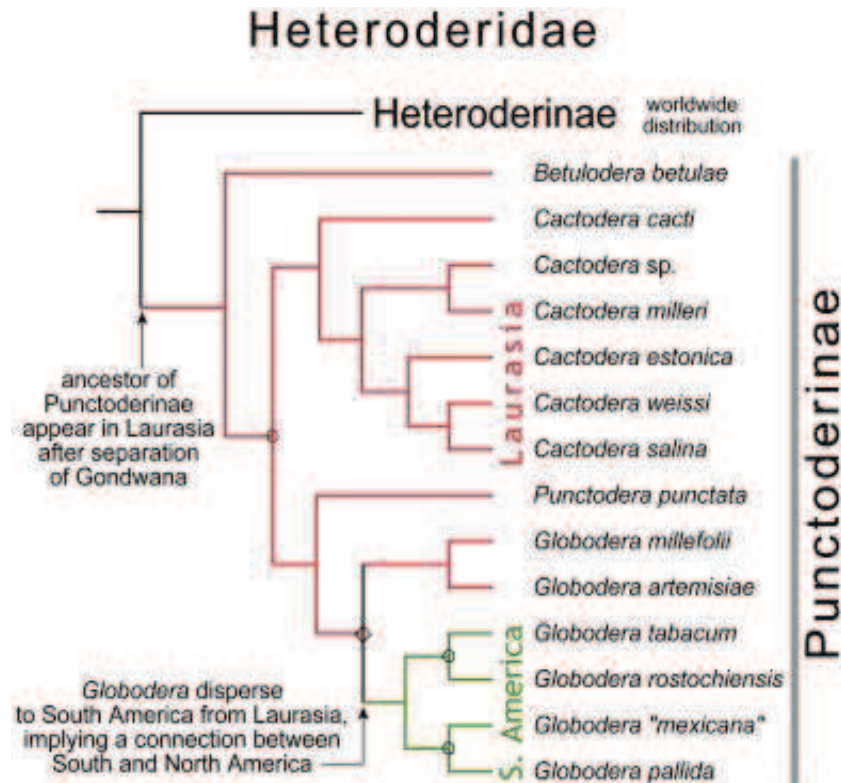
## 2.2. DE LOS NEMATODOS DE LA PATATA EN GENERAL Y DE *Globodera rostochiensis* EN PARTICULAR

Los nematodos son animales con una organización muy sencilla, con especies parásitas de plantas que pueden causar problemas graves en los cultivos, pero también existen nematodos **saprófagos** que favorecen la descomposición de la materia orgánica, **omnívoros** e incluso **depredadores**, o nematodos parásitos de animales, como los **entomopatógenos** que parasitan insectos, y pueden utilizarse en control biológico de plagas (Neher, 2001).

Dentro de **los fitoparásitos** hay dos grandes grupos: **los ectoparásitos**, de los que unos que se alimentan sobre los pelos radiculares y en las células epidérmicas de la raíz, con un estilete muy débil (*Tylenchus*), y otros que se alimentan de las células profundas de los tejidos, como los **transmisores de virus**, que poseen un estilete muy largo (*Longidorus* y *Xiphinema*); otros son **endoparásitos**, dentro de estos unos son sedentarios, principalmente (*Heterodera*, *Globodera* y *Meloidogyne*), y otros son móviles (*Pratylenchus*).

Los nematodos de la patata son endoparásitos sedentarios, originarios posiblemente de los Andes donde se dan la mayoría de las plantas silvestres del género *Solanum*. Se introdujeron en Europa mediante material vegetal portador de quistes. Especies muy similares, *G.rostochiensis* y *G.pallida*, ocupan el mismo nicho ecológico, pero han evolucionado de manera diferente, debido a una adaptación específica a la temperatura, a la duración de las horas de sol, y a las diferentes prácticas de cultivo (Turner y Evans, 1998). Las especies del género *Solanum* son las más sensibles y se encuentran incluidos en la lista EPPO A2 list: No. 125, con una amplia distribución en Europa.

*G. rostochiensis*, se detecta como parásito por primera vez en Alemania en 1881, por Wollenweber, 1923 (Franklin, 1971). Su alta reproducción (200-500 huevos/quiste) y supervivencia de 20 años del quiste en el suelo (Evans *et al.*, 1993; Franco, 1994) son las causa de su extensión como enfermedad (Fig. 2.3).

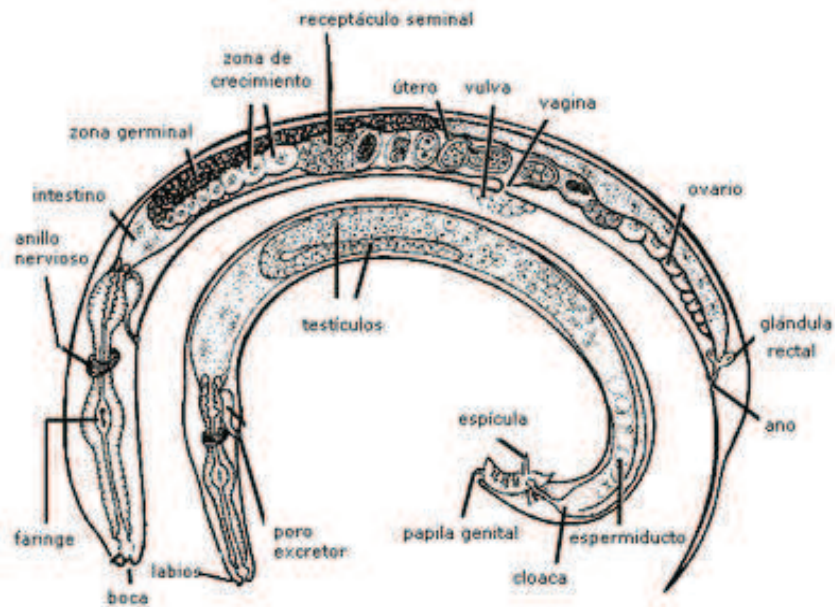


**Figura 2.3.-** Claves de expansión de *Globodera* en el mundo. (Picard *et al.*, 2008),

Hoy afecta al menos a 90 especies de solanáceas, siendo declarado problema agronómico por los daños que causa en la raíces de la patata *Solanum tuberosum* (FAO, 1996).

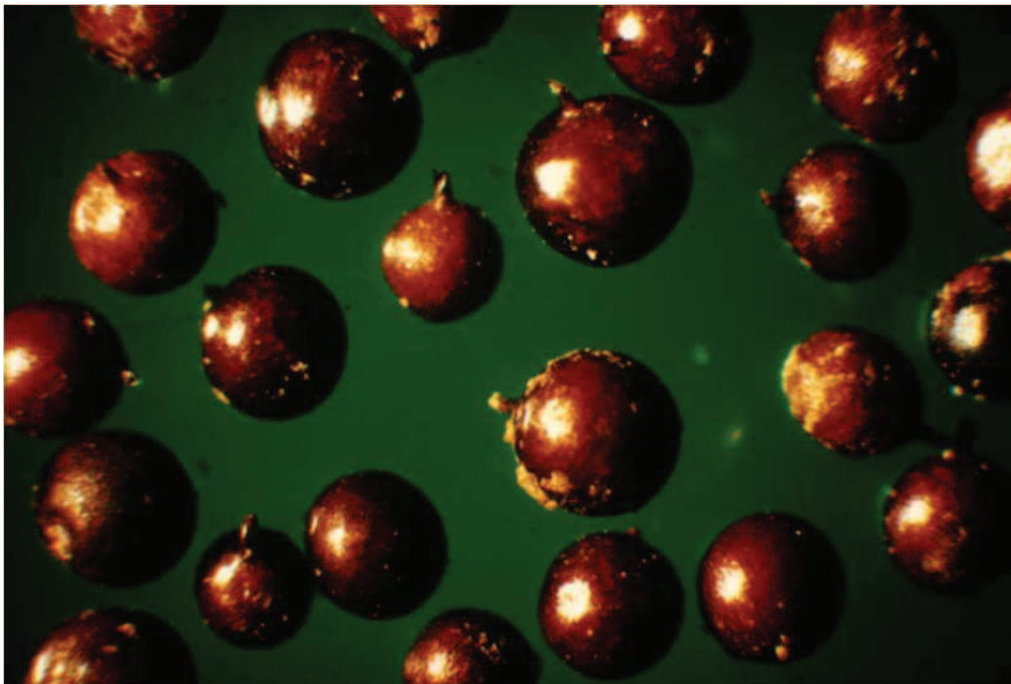
Los nematodos del quiste de la patata presentan la siguiente posición taxonómica: *Nematoda: Tylenchida: Heteroderidae*. Se han descrito dos especies *Globodera rostochiensis* (Wollenwerber) Behrens y *Globodera pallida* (Stone) Behrens. Ambas están reconocidas como organismos nocivos para el cultivo de las patatas, presentan un dimorfismo sexual muy acusado, con machos móviles de aspecto vermiforme, mientras que las hembras son redondeadas y sedentarias.

Los nematodos fitoparásitos se caracterizan por poseer estilete, que es una especie de aguja hipodérmica, provista de un conducto interior, y una musculatura que permite que el órgano sea retráctil y se pueda introducir dentro de la raíz y los tejidos de las plantas, para su alimentación. El esófago de estos parásitos actúa como bomba aspirante y permite el paso del jugo celular hacia el intestino (Fig.2.4).



**Figura 2.4.-** Esquema de un nematodo

La denominación de nematodos formadores de quistes, alude a la propiedad que presentan las hembras maduras cuando mueren, de endurecer su cutícula, formando de éste modo fases de resistencia, en cuyo interior se encuentran los huevos embrionados que pueden permanecer así varios años, hasta que las condiciones vuelvan a ser favorables (Fig. 2.5).

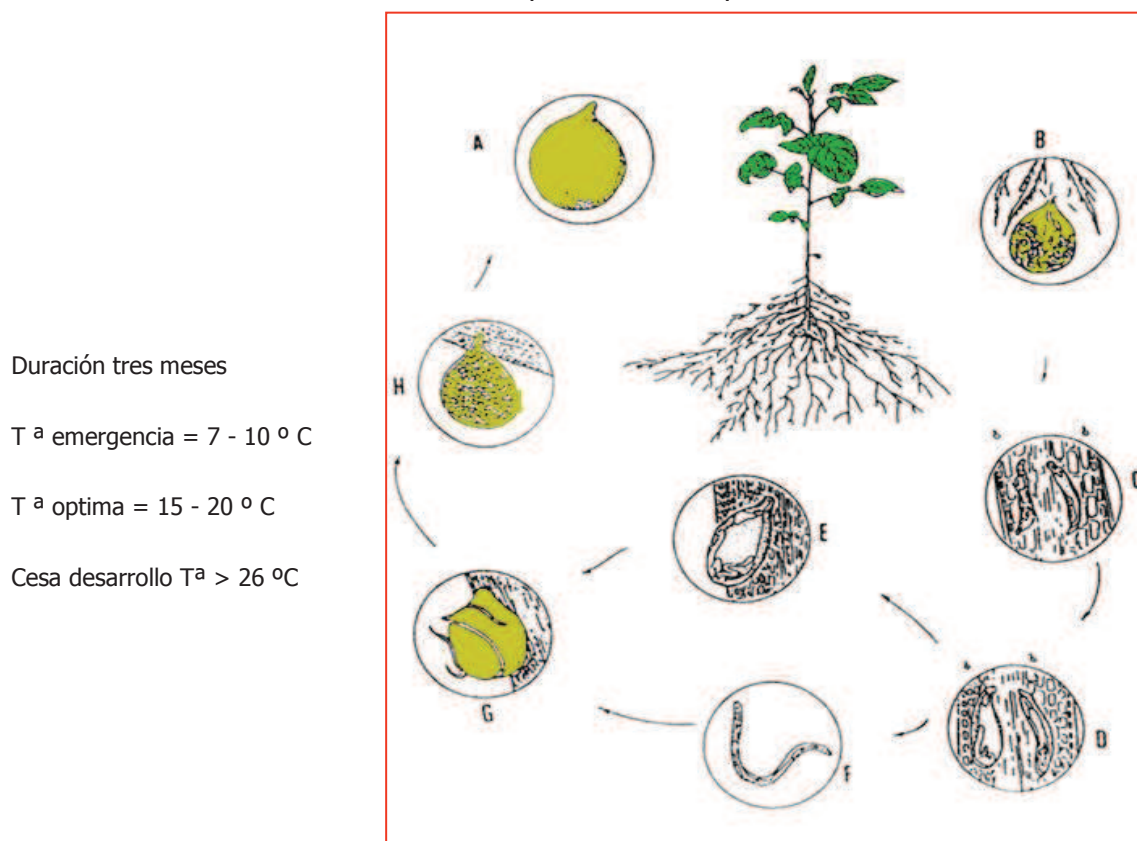


**Figura 2.5.-** Quistes del nematodo *G. rostochiensis*.

### 2.2.1. Del ciclo biológico de *G. rostochiensis*

El ciclo biológico de los nematodos se inicia en un huevo, inmerso en un quiste, con un período de incubación variable entre 20-30 días según la temperatura del suelo. Normalmente el ciclo se desarrolla en cinco estadios, diferenciándose cuatro fases juveniles que acaban todas en una muda, para posteriormente dar lugar los individuos adultos, unas veces machos y otras hembras, produciéndose la cópula y cerrando el ciclo. (Fig. 2.6).

La parte activa del ciclo empieza cuando los juveniles de 2º estadio (J2) del quiste emergen del huevo. El avivamiento se estimula gracias a determinadas sustancias como los exudados radiculares que emanan de los extremos de las raíces de las plantas huésped.

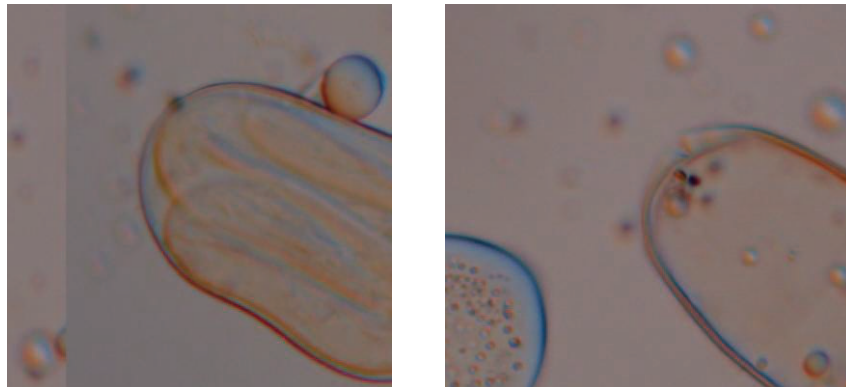


**Figura 2.6.-** Ciclo de vida del nematodo *G.rostochhiensis*.

En los nematodos del quiste de la patata (NQP), esta estimulación es específica de las plantas de la familia *Solanaceae* (*S. tuberosum*, *S. dulcamara*, *S. nigrum*, *Lycopersicum lycopersicum*...) y pueden dañar más del 80% de la emergencia en condiciones ambientales favorables.

En ausencia de una planta huésped, el avivamiento espontáneo se da en una proporción que suele rondar en torno al 30% anual.

Se desarrolla bien en suelos arenosos bien drenados y turbas, con un contenido en humedad de 50-70% de su capacidad de campo, para asegurarse una buena aireación. El pH óptimo adecuado a su desarrollo está próximo a la neutralidad. La temperatura óptima, para que se desarrolle, está entre 15-20°C. Las larvas no suelen emerger del huevo con  $T^a < 7-10^{\circ}\text{C}$  y cesa su desarrollo con  $T^a > 26^{\circ}\text{C}$ , durante periodos prolongados, lo que limitará la reproducción.



**Figura 2.7.**-Huevo con el nematodo y huevo ya eclosionado de *G.rostochhiensis*



**Figura 2.8.**-Huevo con el nematodo antes de su eclosión Detalle del estilete en el estadio J2 .

Los NQP poseen 4 estadios juveniles y un estadio adulto, siendo J2 el estadio invasor de la raíz (Figs 2.7 y 2.8). El juvenil de segundo estadio, J2, es atraído por el crecimiento del extremo de la raíz gracias a sus órganos receptores (ánfidos) situados en la región anterior de su cuerpo, los cuales son capaces de detectar gradientes químicos de ciertos componentes de los rizodepósitos. Entonces el J2, una vez alcanzada la raíz, incide sobre ella cerca del punto de máximo crecimiento o en un tricoblasto lateral, rompiendo las paredes de las



células de su epidermis con el estilete y adentrándose, poco a poco, hasta tejidos más internos, dejando un rastro de células rotas.

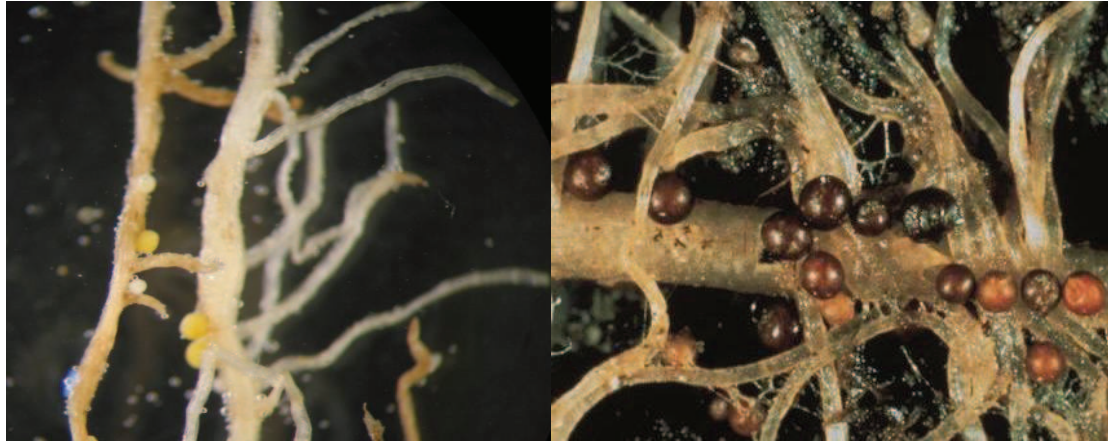
La disponibilidad de nutrientes que provee el vegetal afecta a la acepción del sexo de los juveniles; así, cuando la cantidad de nutrientes es adecuada, un juvenil llegará a ser hembra. Los machos adultos se desarrollan bajo condiciones de estrés nutricional, necesitando, tanto solo, el 1% de lo que requieren las hembras.

Con el sustento necesario, los juveniles mudan hasta alcanzar el 3º y 4º estadios juveniles, llegando así hasta adulto. Los machos de 4º estadio continúan enrollados dentro de una envoltura propia del 3º estadio, y emergen de la raíz antes de llegar a su etapa de adulto. Los machos no se alimentan una vez superado el 3º estadio, pese a poseer un aparato digestivo completo. Son vermiformes, tienen aproximadamente 1mm de longitud, y una vez en el suelo pueden sobrevivir unos diez días.



**Figura 2.9.-** Quistes rotos con eclosión e imagen de J2 del nematodo *G.rostochienseis*

En el tercer estadio, las hembras inician una especie de sáculo, que se hace más pronunciado en el 4º estadio, donde el individuo ya esférico, queda totalmente rodeado por una cutícula. La hembra adulta y sus gónadas incrementan su tamaño, rompe la corteza de la raíz quedando la mayor parte de su cuerpo expuesto al medio y restando únicamente la parte anterior y el cuello dentro de la raíz, sujetas a ella por un compuesto cementante que excreta por la parte anterior. Las hembras receptivas expelen feromonas sexuales que atraen a los machos del suelo, con los que se aparean repetidamente. La fertilización de los huevos es esencial en las especies de *Globodera*. (Figs. 2.8 y 2.9)



**Figura 2.10.-**Quistes del nematodo *G. rostochiensis* en raíz.

Los embriones crecen dentro de los huevos hasta llegar al 2º estadio juvenil sin abandonar, el cuerpo de la hembra. Posteriormente la hembra muere y su cutícula se endurece y oscurece, formándose un resistente quiste compuesto mayoritariamente por quitina, que puede llegar a contener entre 200 – 500 huevos. La hembra muerta y enquistada se suelta de la raíz, lo que suele coincidir con la muerte de la planta, quedando aislada en el suelo, a la espera del siguiente cultivo susceptible.

En Castilla y León tiene una generación al año, y puede completar una 2ª en patata tardía según condiciones ambientales.

Debido a la alimentación de los J2 en los tejidos radiculares, la planta sufre una lesión mecánica que afecta a los vasos conductores, los cuales se deforman y/o rompen. Una vez deformadas, se reducen o por el contrario, proliferan por estimulación de raíces secundarias. Esta acción mecánica sobre la raíz se traduce en una ineficacia funcional del sistema radicular ya que se ven interrumpidos el flujo y la asimilación de agua y nutrientes al resto de la planta. Esta disminución de eficacia funcional de la raíz causa una sintomatología no muy característica, sino más bien un reflejo de la carencia en el suelo de agua o nutrientes.

La existencia de Si fitodisponible en el suelo interfiere esta acción, dado el engrosamiento que sufren las paredes y tejidos radiculares. Datos fisiológicos, histoquímicos, y de biología molecular muestran que el Si tiene un impacto activo en la anatomía radicular, en general, y en los procesos de suberización y lignificación, y en su capacidad oxidativa del tramo radicular, en particular (Fleck *et al.*, 2012). El déficit de Si reduce a la mitad la zona de oxidación de las raíces. La zona donde hay Si disponible coincide con una mejora de la suberización de la exodermis y de la lignificación del esclerénquima.

Además, su deposición se cree que sirve para proteger los tejidos vasculares en la estela de la invasión de parásitos y secado del suelo, a través de endurecimiento de las células del endodermo, dificultando la invasión del nematodo (Hattori *et al.*, 2003).

La acción patogénica de algunos organismos se favorece por la interacción de los nematodos con otros organismos patógenos. Los mecanismos de interacción son muy variados, unas veces son vectores activos de otros patógenos como es el caso de virus, o pasivos para bacterias y hongos, originando heridas en las raíces que permiten el paso de patógenos secundarios, que pueden llegar a ser la causa principal del problema, como es el caso de *Meloidogyne* spp. y *Fusarium* spp. en tomate, o incrementando la susceptibilidad del hospedador frente a ciertos patógenos al estimular la producción de rizodepósitos, en la interacción *Globodera* spp. / *Verticillium* spp. en patata.

Es importante el hecho de que los nematodos contribuyen a la ruptura de resistencia de ciertas plantas frente a hongos. La ruptura de resistencia frente a *Fusarium* spp. se incrementa por la acción de los nematodos, que provocan la secreción de un rizodepósito que atrae al hongo, contribuyen a la inhibición de los antagonistas, causan una elevada tasa de mutación e incrementan la virulencia del hongo e inducen cambios bioquímicos en la planta suprimiendo los inhibidores en los tejidos y provocando un aumento de los nutrientes para el hongo (Page y Bridge, 1985).

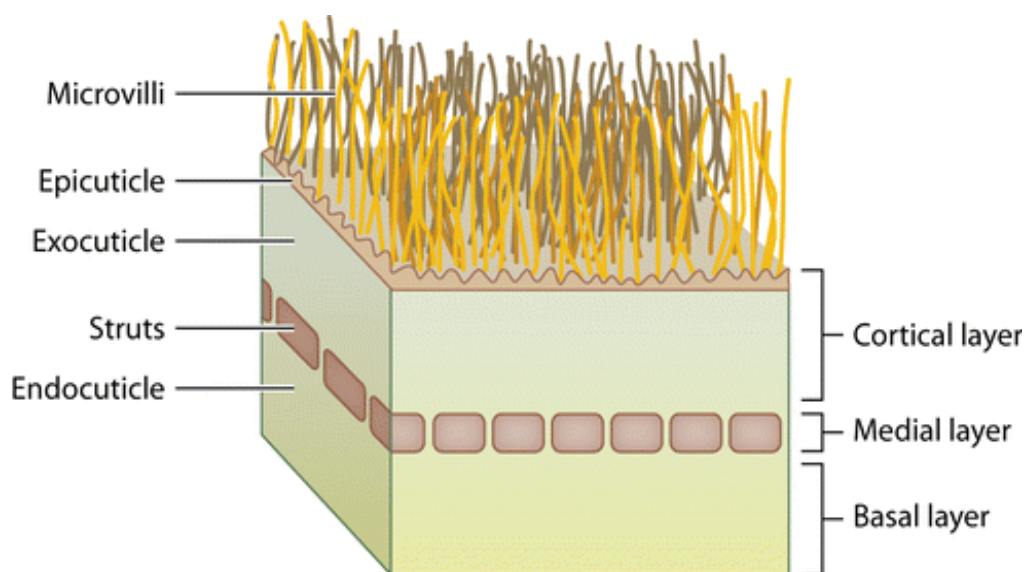
Las relaciones entre los nematodos fitoparásitos y los demás microorganismos suelen ser sinérgicas, es decir predisponen a las plantas frente a la acción de otros patógenos o las hacen susceptibles a organismos que no parasitarían a las plantas. Se ha demostrado el valor regulador de las asociaciones hongos-nematodos, en cuanto a la intensidad del daño que producen estos organismos en las plantas. Se produce un cambio fisiológico, que tiene como origen la ruptura física del tejido radicular en el lugar donde el nematodo se alimenta.

Es importante la interacción que se establece entre nematodos y plantas micorrizadas, ya que éstas además de facilitar a la planta la absorción de determinados nutrientes, aumentan su tolerancia frente a los nematodos.

### 2.2.2. De la composición de paredes y membranas

Las paredes del quiste de *G. rostochiensis* contienen principalmente proteínas (72%, (N x 6.25) muy sensibles a tratamientos enzimáticos con proteasas). En la hidrólisis ácida alrededor del 77% de la pared del quiste entra en solución. Entre los 19 aminoácidos detectados glicina, prolina, alanina, y ácido glutámico, conformaban el 58% en peso de la los aminoácidos totales siendo también abundante la hidroxiprolina. La cutícula es un segregado de colágeno asociado a ácido hialurónico, y condroitina-sulfato, integrado en muco-polisacáridos y pequeñas cantidades de lípidos (Lee *et al.*, 2006). Todo ello es exponente de un intenso metabolismo nitrogenado.

Además tiene una pequeña cantidad de glucosamina (1-5%), pero no se detectó quitina en las paredes quísticas. Otros conjuntos moleculares de estas paredes son el lipídico (2%), los carbohidratos (0-5%) y una pequeña cantidad de materia inorgánica (cenizas, 5%). Polifenoles (2% en peso de las paredes quísticas) aparecen en los hidrolizados ácidos. Los pigmentos oscuros de la pared del quiste no presentaban indol, que contienen las melaninas.



**Figura 2.11.-** Modelo de organización de la cutícula de los nematodos (Davies and. Curtis, 2011).

Respecto a la capa superficial (SC) de la cutícula del nematodo fitoparásito es un aspecto poco tratado, a pesar de que probablemente juega un papel clave tanto en la interacción nematodo-plantas como nematodo-microbios (Davies y Curtis, 2011).

Respecto al contenido lipídico, ascendió al 29,4% del peso seco del nematodo. Las hembras de *G. tabacum* presentan 7 tipos de esteroides

(menos del 0,01% del peso seco) del que los estanoles (campestanol y stigmastanol) representan el 50% (Orcutt *et al.*, 1978).

Triglicéridos, ácidos grasos libres, y distintas clases de fosfolípidos son mayoritarios. Del peso total de ácidos grasos encontrados en hembras de *G. tabacum*, la mayor parte aparecen en la fracción de triglicéridos, seguida por la fracción de ácido graso libres procedentes de la fracción de fosfolípidos entre los que predominaron ácidos poliinsaturados 20:4, 20:1, y 18:1 (Orcutt *et al.*, 1978).

Veinte años después, Gibson *et al.* (1995), aportan analíticas de la composición lipídica realizadas sobre las distintas etapas de los quistes blanco, amarillo y marrón de *G. rostochiensis* (nematodo del quiste dorado) que informan sobre su edad.

Los triacilgliceroles fueron la fracción más grande de lípidos en todas las etapas examinadas, que van desde 55-75% de lípidos totales.

Fosfátidos de etanolamina (cefalinas) y colina (lecitinas) están presentes en grandes cantidades en todas las fracciones del quiste, con un contenido de fosfolípidos totales de 20%, 14,7%, y 12,8% en las etapas del quiste de color blanco, amarillo y marrón, respectivamente. Esteroles, ésteres de esterilo, esfingomielinas, cardiolipinas se hallaron en cantidades menores, junto a otras clases de lípidos.

La composición en ácidos grasos era similar durante las tres etapas. Los ácidos eicosenoico (20:1) y araquidónico (20:4) predominaban sobre otros ácidos grasos, en todos los casos, seguidos del ácido vaccénico (18:1). Más del 78% del total de ácidos grasos eran insaturados en todas las etapas del quiste, y más del 60% son de longitud de cadena de C20 o más.

El perfil lipídico de las tres etapas del quiste es una respuesta adaptativa de los invertebrados a ambientes de baja temperatura (Gibson *et al.*, 1995).

Respecto a la edad de los quistes de *G. rostochiensis*, no es posible determinarla por su perfil de ácidos grasos, pero es posible utilizar los valores relativos de las principales clases de lípidos como un indicador de la misma. Además los lípidos neutros y libres de fracciones de ácidos grasos presentaban cambios en sus perfiles después de la eclosión tras un largo retraso por su almacenamiento en seco a 4 ° C durante 1, 7 y 13 años (Holz *et al.*, 1998 a y b).

La concentración total de hidrocarburos conforma el 0,20% del peso seco. Varios hidrocarburos no identificados fueron detectados. Los hidrocarburos parafínicos detectados variaron en longitud de carbonos de C15 a C29 (Orcutt *et al.*, 1978).

Los análisis lipídicos también se llevaron a cabo en distintas etapas del quiste de *G. rostochiensis* según color. Así, en su etapa blanca (hembra grávida) posee un 4,2% (con huevos no desarrollados), en la amarilla un 4,8% (huevos con madurez variable) y en la marrón un 2,0% sobre gramo peso fresco (huevos totalmente maduros) y de forma mas pormenorizada, la evolución de sus componentes (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2.-** Clases de lípidos en los tres estados de desarrollo de los quistes de la *Globodera rostochiensis* (Gibson *et al.*, 1995). Los resultados se expresan como  $\mu\text{g}/\text{mg} \pm \text{SD}$  de los lípidos totales.

Lípidos	blanco	amarillo	marrón
Estearil ésteres	27.4±0.4	23.3 ± 2.1	77.8 ± 2.1
Triacilgliceroles	697.7±34.2	748.2 ± 27.6	542.3 ± 20.9
Esteroles libres	45.2 ± 11.3	35.3 ± 9.6	27.9±6.2
Acidos grasos libres	21.8 ± 4.0	20.1 ± 2.2	211.8±10.3
Cardiolipina	8.8± 0.1	12.5 ± 0.3	trazas
Fosfatidil etanolamina	60.7±2.4	48.1±0.4	50.9±0.5
fosfatidil colina	151.5±5.9	99.2 ± 1.0	77.5 ±0.8
Esfingomielinas	5.5 ± 0.7	13.2 ± 3.7	12,7 +0,7

En cantidad menor, aparecen, esteroles, ésteres de estearilo, esfingomielinas y cardiolipina, y mostraban cambios mayores que otras clases de lípidos, en función de la etapa. Estos datos obligan a reflexionar sobre la intensa participación de las lipasas en el intensísimo reciclado de triglicéridos+fosfolípidos de membrana y en la liberación de los ácidos grasos.

El brusco descenso de determinados ácidos insaturados revela, en el quiste marrón la intensidad de un metabolismo degradativo asociable tanto a procesos de adaptación como al uso de estos ácidos como reserva energética en los estadíos previos a la eclosión (Tabla 2.3).

No cabe duda de que la capa lipídica de la cáscara de huevo de la *G. rostochiensis* proporciona una barrera ante la desecación (Krusberg *et al.*, 1973) y parece desempeñar un papel clave en la eclosión, en respuesta al rizodepósito de la patata (Clarke y Perry, 1977; Perry *et al.*, 1982).

**Tabla 2.3.-** Composición en ácidos grasos de los tres estados de desarrollo del quiste de *Globodera rostochiensis* cysts, expresada como % relativo respecto al total de ácidos grasos. (Gibson *et al.*, 1995) % Peso  $\pm$  SD

ácidos grasos	blanco	amarillo	marrón
C16:0	1.88 $\pm$ 0.02	1.98 $\pm$ 0.01	2.74 $\pm$ 0.01
C16:1 $\Delta$ 9	0.44 $\pm$ 0.05	0.52 $\pm$ 0.01	0.65 $\pm$ 0.02
C18:0	7.97 $\pm$ 0.01	8,73 $\pm$ 0.10	8.73 $\pm$ 0.02
C18:1 $\Delta$ 9	2.68 $\pm$ 0.05	2.35 $\pm$ 0.01	2.36 $\pm$ 0.06
C18:1 $\Delta$ 11	13.31 $\pm$ 0.06	12.41 $\pm$ 0.11	13.89 $\pm$ 0.02
C18:2 $\Delta$ 9 $\Delta$ 11	2.63 $\pm$ 0.23	2.63 $\pm$ 0.01	2.78 $\pm$ 0.06
C18:3 $\Delta$ 6,9,12	3.41 $\pm$ 0.31	3.42 $\pm$ 0.04	2.20 $\pm$ 0.04
C20: 0	5.15 $\pm$ 0.11	5.08 $\pm$ 0.04	6.61 $\pm$ 0.05
C20:1 $\Delta$ 11	22.19 $\pm$ 0.61	22.95 $\pm$ 0.04	24.85 $\pm$ 0.03
C20:2 $\Delta$ 11,14	1.31 $\pm$ 0.11	1.47 $\pm$ 0.07	1.30 $\pm$ 0.11
C20:3 $\Delta$ 11,14,17	10.16 $\pm$ 0.02	8.95 $\pm$ 0.02	6.40 $\pm$ 0.24
C20:4 $\Delta$ 5,8,11,14	20.93 $\pm$ 0.08	23.33 $\pm$ 0.36	21.25 $\pm$ 0.04
C20:5 $\Delta$ 5,8,11,14,17	trazas	0.25 $\pm$ 0.03	trazas
C22:0	1.99 $\pm$ 0.01	1.84 $\pm$ 0.04	1.82 $\pm$ 0.16
C22:1 $\Delta$ 13	0.63 $\pm$ 0.04	0.51 $\pm$ 0.02	0.47 $\pm$ 0.01
Otros	5.83 $\pm$ 0.48	4.08 $\pm$ 0.30	4.20 $\pm$ 0.02

Después de la eclosión, los lípidos de reserva son importantes para la supervivencia en etapas "sin alimentación externa" de los diversos nematodos parásito de plantas, y el agotamiento de reservas de lípidos se correlaciona con la reducción de la infectividad, la motilidad y el retraso en el desarrollo en juveniles (Robinson *et al.*, 1987 a y b; Storey, 1983, 1984).

Es evidente que las esterasas que participan en este reciclado tienen que desinhibirse cuando el quiste alcanza la fase marrón.

Hoy, mediante el sistema elaborador de los perfiles de sus ácidos grasos (FAME) se identifica directamente a las especies de nematodos fitoparásitos junto a bacterias y hongos (Ruess *et al.*, 2002; Sekora *et al.*, 2009).

### **2.2.3. Aspectos metabólicos de interés de *G. rostochiensis***

Entre los aspectos metabólicos que justifican la capacidad de expansión geográfica de esta especie parásita, aparece la capacidad de adaptación a distintas alturas y su supervivencia a bajas temperaturas. Para ello se precisa conocer el consumo de O<sub>2</sub>, la producción de calor y los niveles de ATP de *G. rostochiensis* y para ello se han utilizado inhibidores metabólicos.

Se han empleado tres grupos de inhibidores (nematicidas de plantas, antihelmínticos animales, e inhibidores metabólicos específicas). Los dos primeros han actuado sobre la captación de O<sub>2</sub> y emisión de calor, pero ninguno tuvo un marcado efecto sobre los niveles de ATP. Esta falta de acción explica que para mantenerse los nematodos (y con ellos su actividad) usan procesos metabólicos alternativos ante las exigencias ambientales, de una forma adaptativa (Barrett *et al.*, 1970).

Específicamente, el inhibidor de la amino-transferasa del ácido oxalacético (amino-oxiacetato), del glicólico (yodo-acetamida) y del de la β-oxidación (ácido 4-pentenoico) dieron una marcada inhibición de la absorción de O<sub>2</sub> y emisión de calor. Esto indica que hidratos de carbono, lípidos, y aminoácidos pueden ser utilizados como sustratos.

Los inhibidores del citocromo aa<sub>3</sub> de la cadena de oxido-reducción respiratoria con cianuro, 2,4-dinitrofenol y rotenona tuvo un marcado efecto en el uso del O<sub>2</sub> respirométrico en las cadenas respiratorias y la producción de calor, lo que muestra la existencia de un componente alternativo en el metabolismo aeróbico de estos nematodos en el que la recarga del "poder reductor del sistema" se encuentra ubicado en los ácidos grasos de la membrana. Pero la relativa falta de efecto de los inhibidores del citocromo aa<sub>3</sub> en la cadena en la producción de ATP también indica que estos organismos tienen otras vías aeróbicas facultativas (cuando la tasa de O<sub>2</sub> disponible descende) y en las cuales participan los elevados contenidos en ácidos grasos de membrana y el reciclado constante de sus dobles enlaces (controlador del poder reductor del sistema biológico (NADP / NADPH).

La inhibición del ácido itacónico sugiere que la actividad del ciclo del glioxilato (expresado en dos enzimas: isocitrato liasa y malato sintetasa) es un gran captador de excedentes de acetyl-CoA procedente de la β-oxidación de ácidos grasos. Los nematodos son el único grupo de metazoos que tiene la derivación del glioxilato completa, una variante ciclo de Krebs (Barrett *et al.*, 1970), hecho que permite la utilización de los ácidos grasos como fuente de energía y neoformación de hidratos de carbono, isoprenoides y de componentes nitrogenados.



La relativa falta de efecto del ácido salicil-hidroxiámico y de la antimicina en comparación con la rotenona puede ser debido al fracaso de aquellos compuestos para penetrar en la cutícula. La permeabilidad selectiva a los diferentes inhibidores complica considerablemente la interpretación de los resultados. Al menos algunas de las diferencias entre las respuestas de *Panagrellus redivivus* y *G. rostochiensis* a los diferentes inhibidores puede ser debido a la dificultad de estos para penetrar la cutícula de *G. rostochiensis* (Barrett *et al.*, 1970).

En este sentido metabólico se encuentran los estudios de las actividades amino-peptidásicas (responsables del reciclado del N entre distintos soportes carbonados) en extractos crudos de todo el cuerpo de *Caenorhabditis elegans* (nematodo parásitos de vida libre) y de los quiste de nematodos *Heterodera glycines* de las plantas de soja (Masler *et al.*, 2001). Entre las características comunes se observó que el pH óptimo, la labilidad al calor, y la inactivación de las enzimas por un disolvente orgánico fueron las mismas para las dos especies. Todas las etapas de desarrollo de *H. glycines* exhibieron actividad. En las hembras mayores, la actividad estuvo presente principalmente en los huevos.

La afinidad por el sustrato L-alanina-4-nitroanilida era la misma, independientemente de la etapa examinada, y fue similar para las dos especies (*Caenorhabditis elegans* y *H. glycines*). Casi toda la actividad de la amino-peptidasa (> 95%) de *C. elegans* estuvo presente en la fracción soluble del extracto, mientras que en *H. glycines* la actividad estaba distribuída entre las fracciones soluble y de membrana. El peso molecular aparente de la enzima soluble de *C. elegans* es 70-80 kDa, pero entre el 80-90% de su actividad se asocia con un componente de peso molecular muy alto (> 240 kDa). La enzima de *C. elegans* era sensible a diferentes inhibidores de aminopeptidasas, especialmente a amastatina y leuhistina, (Masler *et al.*, 2001) de gran importancia en el control de la infectividad vegetal de la *G. rostochiensis*.

En este mismo sentido adaptativo, Moore-Kucera *et al.* (2010) atribuyen a la variabilidad de actividades enzimáticas tales como  $\beta$ -D-glucosidasa y N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, la capacidad de localización geográfica específica, según la precipitación media anual y la textura del suelo.

Un aspecto novedoso del metabolismo lipídico se centra en la posible variabilidad de los lípidos de la pared celular, asociado a su capacidad infectiva, dado que *G. rostochiensis* tiene una relación íntima con su huésped (*Solanum tuberosum* y especies afines de patata).

Estudios recientes nos muestran que las células vivas y térmicamente muertas de la rizobacteria *Rhizobium etli* cepa G12 inducen en las raíces

de la patata una resistencia sistémica a la infección por *G. pallida*. Sus EPS (exopolisacáridos de superficie) y LPS (lipopolisacáridos) son básicos en el reconocimiento de la interacción simbiótica *Rhizobium*-leguminosa. Una vez aislados y aplicados a las raíces de patata, desarrollaron su actividad como inductores de la resistencia de la patata a *G. pallida* (Reitz *et al.*, 2000).

Los mecanismos por los que los microorganismos antagónicos afectan a las poblaciones de patógenos no siempre son claros, pero en general se atribuyen a uno de estos efectos:

- Parasitismo directo y muerte del patógeno.
- Competencia con el patógeno por el alimento.
- Efectos tóxicos directos sobre el patógeno por medio de sustancias antibióticas liberadas por el antagonista.
- Efectos tóxicos indirectos sobre el patógeno por sustancias volátiles liberadas por las actividades metabólicas del organismo antagonista.

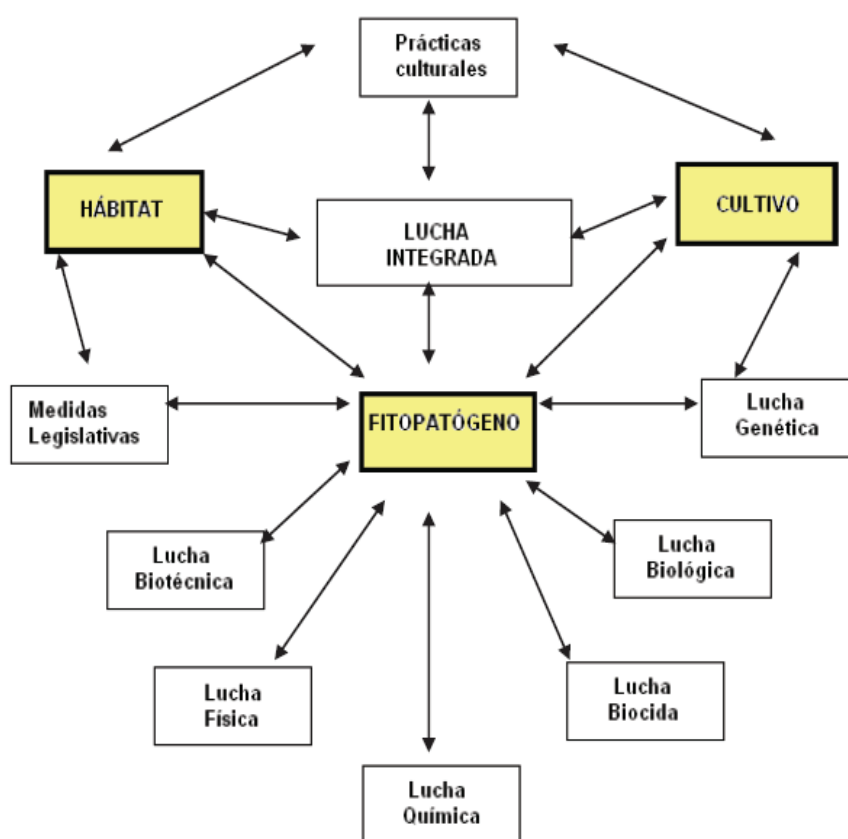
En la mayoría de los agentes patógenos que viven en el suelo, el desarrollo y las dimensiones de los daños dependen del potencial de infección en el suelo, de las condiciones climáticas y de medidas culturales. Según el momento de la infección, las pérdidas pueden superar el 50 por ciento.

Entre las medidas culturales que pueden contrarrestar daños se encuentran: Rotación de cosechas, que separan convenientemente los cultivos sensibles ya que con su repetición incrementa el número de patógenos y agrava los daños. Control del encharcamiento, ya que favorece el daño de *Rhizoctonia.solani* en el cuello de las plantas y en los frutos en contacto con el suelo. Manejo del agua, pues los riegos de inundación favorecen a los hongos que se propagan por zoosporas. Trabajo del suelo, por eliminación de restos aéreos y radiculares de los cultivos. Control del abonado, pues excesos o defectos pueden favorecer o perjudicar a los patógenos. Protección fitosanitaria y uso de variedades vegetales.

## 2.3. DEL CONTROL AGRONÓMICO DE LOS NEMATODOS

### 2.3.1. Estrategias globalizadas en el manejo de nematodos

En este esquema (Fig. 2.12) se resumen las posibles actividades para la erradicación de patógenos del suelo.



**Figura 2.12.-** Técnicas o medios de lucha disponibles contra las plagas (Carrero y Planes, 2008)

Ante el daño económico, la UE ha considerado la necesidad de aplicación de un marco legislativo considerable:

**Medidas legislativas** (Delimitación de zonas afectadas para evitar la extensión). *Globodera rostochiensis* es considerada una enfermedad de cuarentena incluida en la lista EPPO A2 list: No. 125, con la Directiva Europea: 2007/33/EC (*European and Mediterranean Plant Protection Organization – EPPO Lista A2*), son parásitos presentes en la región pero no muy comunes u oficialmente controlados. La legislación incluye la prohibición de introducir libremente vegetales, frutos o partes vivas de plantas procedentes de otros países, para evitar la entrada involuntaria de flora y fauna ajena. Se someterán a cuarentena para asegurarse que estén libres de plagas y enfermedades.

De forma paralela se ha realizado una profunda revisión del uso de los agroquímicos disponibles, referida a la seguridad para el medio ambiente y la salud humana y animal, que ha conducido a una drástica limitación de su uso de pesticidas en los cultivos agrícolas, y plasmado en recientes legislaciones de la UE (Reg. CE 396/2005, 1095/2007, 299/2008 y 1107/2009).

Como consecuencia de ambos hechos legislativos, la investigación ha recibido un fuerte estímulo, para encontrar nuevas estrategias alternativas de control al uso de productos químicos que sean ecológicamente racionales y simultáneamente, económicamente convenientes. Y ello nos hace volver los ojos al suelo y a su defensa, como recurso natural que es necesario proteger, y ya legislado en otras áreas geográficas, pero no en España.

Así, en la lucha para el control de plagas, se considera una amplia gama de opciones que incluyen desde métodos agronómicos y físicos (uso de abonos verdes, rotación de cultivos, aporte edáfico de enmiendas, el uso de cultivares resistentes y hongos micorrizógenos arbusculares, solarización del suelo y vapor de agua), hasta el uso de productos naturales de origen vegetal y los agentes de control biológico (Gamliel *et al.*, 2000.; Vannacci y Gullino, 2000; Sasanelli *et al.*, 2002, 2008, 2009; D'Addabbo y Sasanelli, 2003; Nico *et al.*, 2004; Atungwu 2005; D'Addabbo *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 2006).

### **2.3.2. El factor suelo**

Desde hace tiempo a las interacciones entre plantas y suelo se las reconocen como un importante factor director formador del suelo (Brady y Weil, 2002) en la composición de las comunidades vegetales residentes y en sus sucesiones (Kardol *et al.*, 2006).

Estas interacciones pueden ser positivas y negativas, y aparecen cuando una comunidad, tanto por causas como por sus repuestas subsecuentes, responde a cambios en las propiedades físicas, químicas, enzimáticas, metabólicas y biológicas del suelo que las soporta (Ehrenfeld *et al.*, 2005).

En general los indicadores basados en las propiedades físicas y químicas del suelo son los que generalmente, han sido usados para evaluar la productividad del suelo desde el punto de vista agronómico. En consecuencia, las características físicas del suelo son una parte necesaria en la evaluación de la calidad de este recurso porque no se pueden mejorar fácilmente (Singer y Ewing, 2000).

Las propiedades físicas que pueden ser utilizadas como indicadores de la calidad del suelo son aquellas que reflejan la manera en que este recurso acepta, retiene y transfiere agua a las plantas, así como las limitaciones que se pueden encontrar en el crecimiento de las raíces, la emergencia de las plántulas, la infiltración o el movimiento del agua dentro del perfil y que además estén relacionadas con la reordenación espacial de las partículas y los poros (Tabla 2.4).

**Tabla 2.4.-** Propiedades físicas relacionadas con la calidad del suelo

Propiedad	Relación con la condición y función del suelo	Valores o unidades relevantes ecológicamente Comparaciones para evaluación
<b>Físicas suelo</b>		
Textura	Retención y transporte de agua y compuestos químicos; erosión del suelo	% de arena, limo y arcilla; pérdida del sitio o posición del paisaje
Profundidad del suelo, suelo superficial y raíces	Estima la productividad potencial y la erosión	cm ó m
Infiltración y densidad aparente	Potencial de lavado; productividad y erosividad	minutos/2.5 cm de agua y g/cm <sup>3</sup>
Capacidad retención de agua	Relación con la retención de agua, transporte, erosividad humedad aprovechable, textura y materia orgánica	% (cm <sup>3</sup> /cm <sup>3</sup> ), cm de humedad aprovechable/30 cm; intensidad de precipitación

La textura, densidad aparente, estabilidad de agregados, infiltración, profundidad del suelo superficial, capacidad de almacenamiento del agua y conductividad hidráulica saturada son las características físicas del suelo que se han propuesto como indicadores de su calidad (Larson y Pierce, 1991; Doran y Parkin, 1994; Seybold *et al.*, 1997).

De ellas y de su seguimiento dependen procesos y propiedades edáficas de gran interés funcional y productivo.

Las características químicas afectan las relaciones suelo planta, la calidad del agua, la capacidad amortiguadora del suelo, la disponibilidad de agua y nutrimentos para las plantas y microorganismos (SQI-Soil Quality Institute, 1996).

Algunos indicadores (Tabla 2.5.) son la disponibilidad de nutrientes, carbono orgánico total, carbono orgánico lábil, pH, conductividad eléctrica, capacidad de adsorción de fosfatos, capacidad de intercambio de cationes, cambios en la MO, N<sub>t</sub> y N<sub>min</sub>. (Larson y Pierce, 1991; Doran y Parkin, 1994; Seybold *et al.*, 1997).

**Tabla 2.5.-** Propiedades químicas relacionadas con la calidad del suelo

Propiedad	Relación con la condición y función del suelo	Valores o unidades relevantes ecológicamente Comparaciones para evaluación
<b>Químicas</b>		
Materia orgánica (N y C total)	Define la fertilidad del suelo; estabilidad; erosión	Kg de C o N ha <sup>-1</sup>
pH	Condiciona la actividad química y biológica	comparación entre los límites superiores e inferiores para la actividad vegetal y microbiana
Conductividad eléctrica	Condiciona la actividad vegetal y microbiana	dSm <sup>-1</sup> ; comparación entre los límites superiores e inferiores para la actividad vegetal y microbiana
P, N, y K extractables	Nutrientes disponibles para la planta, pérdida potencial de N; productividad e indicadores de la calidad ambiental	Kg ha <sup>-1</sup> ; niveles suficientes para el desarrollo de los cultivos
Na y otros		Niveles de toxicidad para el desarrollo de los cultivos

Los indicadores físicos y químicos atienden en general la productividad y uso agrario de los agro-tecno-sistemas pero no tienen en cuenta su sostenibilidad.

Por el contrario, los indicadores biológicos propuestos integran gran cantidad de factores que afectan a la calidad del suelo como la abundancia de subproductos degradados, transformados y neoformados por micro y macroorganismos, incluidos bacterias, hongos, nemátodos, lombrices, anélidos y artrópodos.

Incluyen funciones (Tabla 2.6.) como la tasa de respiración, ergosterol y otros subproductos de los hongos, tasas de descomposición de los residuos vegetales y N y C de la biomasa microbiana (Larson y Pierce, 1991; Doran y Parkin, 1994; Seybold *et al.*, 1997).

Como la biomasa microbiana es mucho más sensible al cambio que el C total se ha propuesto la relación  $C_{\text{microbiano}} / C_{\text{orgánico}}$  del suelo para detectar cambios tempranos en la dinámica de la MO (Sparling, 1997).

**Tabla 2.6.-** Indicadores biológicos de la calidad del suelo.

<b>Propiedad</b>	<b>Relación con la condición y función del suelo</b>	<b>Valores o unidades relevantes ecológicamente Comparaciones para evaluación</b>
<b>Biológicas</b>		
C y N de la biomasa microbiana	Potencial microbiano catalítico y depósito para el C y N, cambios tempranos de los efectos del manejo sobre la materia orgánica	Kg de N ó C ha <sup>-1</sup> relativo al C y N total o CO <sub>2</sub> producidos
Respiración, contenido de humedad y Temperatura	Mide la actividad microbiana estima la actividad de la biomasa	Kg de C/ ha relativo a la actividad de la biomasa microbiana; pérdida de C contra entrada al reservorio total de C
N potencialmente mineralizable	Productividad del suelo y suministro potencial de N	Kg de N ha <sup>-1</sup> relativo al contenido de C y N total

Los expertos en agricultura reconocen que este hecho puede afectar a las futuras producciones, ya que ciertos cultivos modifican la composición cuali y cuantitativa de determinados nutrientes específicos, lo que conlleva en monocultivos la aparición de patógenos, por lo que se hace necesario rotar las producciones buscando su optimización.

El trabajo con comunidades vegetales muy simples, (de una o dos especies), acentúa la retroalimentación planta-suelo y, como resultado, los agricultores fueron los primeros en reconocer y aplicar una operativa que también la abarca (Ehrenfeld *et al.*, 2005).

La respuesta de la planta al suelo ha sido desde siempre un principio fundamental de la agricultura, pero su aplicación a la comprensión funcional de las comunidades vegetales naturales presenta un desarrollo sorprendentemente reciente. Por otra parte, una breve discusión sobre comunidades y biomasa, con retroalimentación muy significativa, revela que ésta es intensa en ambientes extremos, donde las comunidades están dominadas por unas pocas especies (Ehrenfeld *et al.*, 2005; Kulmatiski *et al.*, 2008).

Las investigaciones más cuidadosas sobre retroalimentación planta-suelo se realizan como estudios de invernadero usando monocultivos puros en macetas (Callaway *et al.*, 2004; Klironomos, 2002). Y, mientras que la comprensión de la teoría y los mecanismos que subyacen en la retroalimentación planta-suelo han avanzado, la comprensión de cómo la retroalimentación funciona en la estructuración de las comunidades naturales es mucho más limitado y sólo se ha probado en sistemas

simplificados, como los campos de cultivo, los monocultivos, o ambientes simplificados extremos.

Hay una serie de factores emergentes, propios de ecosistemas naturales complejos, que no se reflejan en los estudios sobre retroalimentación planta/suelo en los monocultivos. Pero, las comunidades ricas en especies exhiben propiedades emergentes en la estructura de la comunidad microbiana del suelo (Zak *et al.*, 2003) que pueden alterar la intensidad y dirección de la retroalimentación (Bartelt-Ryser *et al.*, 2005). La co-evolución es otra propiedad de los sistemas complejos naturales que podrían alterar las previsiones, al dar lugar a reacciones únicas durante la invasión de plantas no nativas (Callaway y Aschehoug, 2000; Klironomos, 2002; Ehrenfeld *et al.*, 2001).

Sobre un mismo suelo, una misma especie vegetal puede generar efectos de retroalimentación diferentes de sus tejidos vivos respecto de los muertos (Ehrenfeld *et al.*, 2005), y en las comunidades vegetales complejas, compuestas de una mezcla de tejidos vegetales vivos y muertos, y es importante entender cómo la interacción de estos factores emergentes, es un proceso de retroalimentación.

Klironomos (2002), muestra como los agentes patógenos y saprobios tenían un efecto relativamente pequeño sobre el crecimiento de las especies invasoras, mientras que tiene un fuerte efecto negativo sobre las especies nativas. Como la mayoría de las especies se beneficiaron de las micorrizas, el efecto neto fue negativo para las especies nativas, y positivo para las especies invasoras. Como en éste, otros muchos autores han demostrado que la retroalimentación entre las plantas invasoras y patógenos del suelo juega un papel importante en la invasión (van Grunsven *et al.*, 2007; van der Putten *et al.*, 2007; Reinhart y Callaway, 2004,2006).

Aunque se conoce bastante bien como evitar a los enemigos y patógenos vegetales que viven en el suelo, la retroalimentación planta-suelo también puede promover la invasión de componentes exóticos, cuando el invasor cambia las condiciones abióticas del suelo (Vivrette y Muller, 1977; Callaway y Aschehoug, 2000). Esto aparece en los sistemas agrícolas, cuando la rotación de cultivos se basa no sólo en evitar las plagas del suelo y patógenos, sino también en las necesidades nutricionales de las especies de cultivos diferentes.

En los sistemas naturales, el componente abiótico de retroalimentación no ha sido muy bien estudiado, y muchos estudios se centran en el papel de la alelopatía y "nuevas armas" de invasión (Bais *et al.*, 2003; Callaway y Aschehoug, 2000; Callaway *et al.*, 2004). Mientras que esto



ha sido sugerido para una pocas plantas invasoras, los resultados de estos estudios son muy controvertidos (Blair *et al.*, 2005, Blair *et al.*, 2006, Callaway *et al.*, 2004, Inderjit *et al.*, 2006). Aunque la alelopatía no es un factor en todas las invasiones de plantas, muchas invasiones de plantas no afectan al medio ambiente del suelo, a menudo mediante el aumento de la disponibilidad de nutrientes (Ehrenfeld, 2003; Hawkes *et al.*, 2005).

Recientemente ha sido revisado el potencial de aumento de la disponibilidad de nutrientes durante la invasión para producir una retroalimentación planta-suelo positiva (Elgersma, 2010).

### **2.3.3. *Qué son los suelos supresivos***

En 1974, Baker y Cook definen a un suelo como supresor, cuando pese a las condiciones ambientales favorables, un determinado patógeno no puede establecerse en el suelo o se establece pero no produce enfermedad o si se establece y produce enfermedad durante un tiempo, luego ésta declina. En términos biológicos, la capacidad supresiva puede ser el resultado de la actividad específica de uno o pocos microorganismos antagonistas o de la acción colectiva de los miembros de la comunidad microbiana (Baker y Cook, 1974).

Sin embargo, en muchos patosistemas, el mecanismo pertinente detrás la supresividad del suelo, todavía no se entiende. En un amplio estudio que incluye cerca de 40 parámetros del suelo (bióticos y abióticos) aparecen correlaciones positivas, negativas e independientes con respecto a la supresividad (Janvier *et al.*, 2007). Entre ellos aparecían con correlaciones positivas dominantes a favor de la supresividad.

Entre las características fisicoquímicas aparecen el contenido en Ca, textura, estructura, pH, (Höper y Alabouvette, 1996), junto a la composición de las poblaciones bacterianas y fúngicas dominantes, la relación C/N de la MO y su porcentaje, la biomasa, tasa de crecimiento bacteriano y potencial de mineralización de N-orgánico (Janvier *et al.*, 2007).

Entonces, un suelo supresor es capaz de eliminar enfermedades vegetales inherentes a factores abióticos y bióticos (Alabouvette, 1999; Murakami *et al.*, 2000; Toyota *et al.*, 2000; Domínguez *et al.*, 2001; Stone *et al.*, 2001). Por lo tanto, la supresividad de un suelo específico es un indicador de la salud para las plantas.

Sin embargo, la mayoría de los indicadores propuestos para la salud del suelo se centran más en la presencia de organismos beneficiosos que en

la ausencia de organismos perjudiciales, aunque ambas son importantes (Singer y Ewing, 2000). La presencia de patógenos de plantas en el suelo (Vg.: hongos) puede ser indicador de la existencia de otros problemas, como un desequilibrio de nutrientes (Hornby y Bateman, 1997).

Hoy se sigue luchando para suprimir enfermedades generadas por diversos agentes patógenos como *Fusarium oxysporum*, *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Streptomyces scabies* (Alabouvette 1999; Lifshitz *et al.*, 1984; Schottel *et al.*, 2001; Mazzola y Gu, 2002; Weller *et al.*, 2002).

Los mecanismos que emplea la biota del suelo para desarrollar supresividad actúan mediante el control del patógeno a través de la competencia, la antibiosis, el (hiper) parasitismo, o la mejora de la resistencia de la planta. Por ello, ciertas características microbiológicas del suelo se han relacionado con la supresividad, como la actividad microbiana y la respiración del suelo (un exponente microbiano de la competencia) (Hoitink y Boehm, 1999; van Os y van Ginkel, 2001), comunidad diversidad y composición (Garbeva *et al.*, 2006; Pérez-Piqueres *et al.*, 2006), tamaño de la población de ciertos grupos microbianos como actinomicetos y bacterias oligotróficas (Workneh y van Bruggen, 1994; Tuitert *et al.*, 1998). En otros casos, la presencia de genes responsables de la síntesis de antibióticos están correlacionados con la supresividad suelo (Raaijmakers y Weller, 1998; Garbeva *et al.*, 2006).

Hay varios métodos disponibles para determinar la supresividad del suelo (van Bruggen y Grünwald, 1996). Se puede determinar por inoculación directa de las semillas de plantas diana (trampa) en el suelo o en una prueba donde el patógeno infeste al suelo (Toyota *et al.*, 1995; Knudsen *et al.*, 1999; Persson *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2000).

#### **2.3.4. *Cómo manejar la Materia Orgánica (MOS) para eliminar patógenos, conservando la calidad del suelo.***

Se sabe de la dificultad para definir y cuantificar la calidad de un suelo ya que varían los criterios según el uso a que se destine, las prácticas de manejo e incluso las prioridades económicas (García *et al.*, 2000).

La transición hacia una agricultura moderna mediante la adopción de la rotación de cultivos cortos o monocultivos, operaciones de labranza profunda y el declive en el uso de estiércol u otros fertilizantes orgánicos, ha facilitado una drástica reducción de los niveles de SOM (Gardi y Sconosciuto, 2007; Moeskops *et al.*, 2012).

La presencia de MOS interactúa con las propiedades físicas como la textura, densidad aparente, capacidad de retención de agua y la temperatura del suelo, químicas como el pH la conductividad C orgánico total, N, P, K total y extraíble... pero el lento cambio de estas variables en función del tiempo hace imperceptible su evolución significativa, exigiendo periodos largos para apreciar su deriva (Doran y Parkin, 1994, 1996; Gil-Sotres *et al.*, 2005).

Por todo ello, MOS es un atributo clave de la calidad del suelo (Gregorich *et al.*, 1994) al ser crucial para su calidad física (Reeves, 1997), su fertilidad (Rhoton *et al.*, 1993; Riffaldi *et al.*, 1994) y servir como fuente de energía y nutrientes para una población diversa de bacterias, hongos (Bünemann *et al.*, 2004; Birkhofer *et al.*, 2008) e invertebrados como las lombrices de tierra (Hendrix *et al.*, 1992; Leroy *et al.*, 2008) y los nematodos de todo tipo.

Una técnica para la eliminación de patógenos que afecta al suelo de forma temporal y no reduce el contenido en SOM es su saturación con agua.

Consiste en que quince días antes de la siembra, el suelo sufra un pase de rotovator, para conseguir una distribución uniforme de los quistes en los veinticinco primeros centímetros del suelo. Posteriormente, el suelo se mantiene encharcado durante una semana. De esta forma se duplica el número de quistes en los cinco primeros centímetros del suelo, donde la temperatura de éste es más alta (Bello y González, 1994).

Una vez realizada, se recubre con un plástico para evitar que el calor del suelo se disipe y conseguir que suba la temperatura (los quistes de nematodos, son muy sensibles en un entorno temperaturas próximas a los 40°C, si están sumergidos en un medio líquido).

Además, y debido a la saturación por agua, el espacio poral se convierte un medio hipóxico / anóxico, por desplazamiento del O<sub>2</sub> gas, disponiendo los patógenos únicamente del O<sub>2</sub> disuelto. El descenso de la tensión de O<sub>2</sub> y el incremento de gases orgánicos, que como el metano o los NO<sub>x</sub> y otros, que son tóxicos para los nematodos, aboca a su muerte.

Practicado este sistema en verano el proceso se acelera, pero también a temperaturas relativamente poco elevadas sucede la mortandad masiva de huevos y larvas (Martínez, 1990). Se han hecho ensayos, simulando en estufa el encharcamiento en suelos arenosos durante siete días que resultó ser suficiente para hacer disminuir las poblaciones a niveles no detectables.

Establecida la importancia de MOS en la calidad del suelo, la fertilización orgánica es indispensable para una producción agrícola sostenible. Su utilización como alternativa al uso de agroquímicos para la desinfección, se está volviendo ahora más viable y factible para los productores.

El MBTOC (Methyl Bromide Technical Options Committee) perteneciente al Protocolo de Montreal para la eliminación del bromuro de metilo (BM) como fumigante por su acción en la destrucción de la capa de ozono estratosférico, (MBTOC 2009) nos indica que las alternativas no químicas para la desinfección de suelos basadas en la utilización de materia orgánica, se están volviendo cada vez más viables para los productores.

Existe la posibilidad de controlar determinados patógenos de los vegetales de origen edáfico (bacterias, hongos, virus, nematodos, y también para la flora arvense) de cultivos agrícolas, mediante la incorporación de MO al suelo (Bello *et al.*, 2003; Diánez *et al.*, 2002; López *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2007; Zanón, 2009)

Agricultura y Medio Ambiente admiten y promocionan el uso de materiales orgánicos de origen diverso (residuos de cultivos, abonos, turba y enmiendas de residuos bioestabilizados diversos), pero cada uno tiene efectos específicos sobre las reservas de MOS, el funcionamiento del suelo y de su biodiversidad.

Es necesario ampliar la información sobre aspectos tales como cantidad y tipo de MOE (materia orgánica exógena) a aplicar, edad del material vegetal, momento de aplicación, fitotóxicidad, textura del suelo, condiciones ambientales, y tener en cuenta la influencia de otros

factores que puedan interferir con la acción de aquella (fertilización, o riego, entre otros).

La presencia de patógenos de origen edáfico es uno de los principales factores limitantes de la producción agraria. Se relaciona tanto con prácticas de monocultivo, como con cultivos anteriores en el sistema de rotación (Bello *et al.*, 2001, 2003, 2004; Diez Rojo *et al.*, 2006).

Algunas plantas (y sus restos vegetales) contienen compuestos alelopáticos, es decir, sustancias capaces de inhibir o ser tóxicas para el desarrollo de otras plantas, de patógenos o de nematodos. Estos compuestos vegetales pueden llegar al suelo al incorporarlas, con lo que se pueden usar en rotaciones o asociaciones de cultivos.

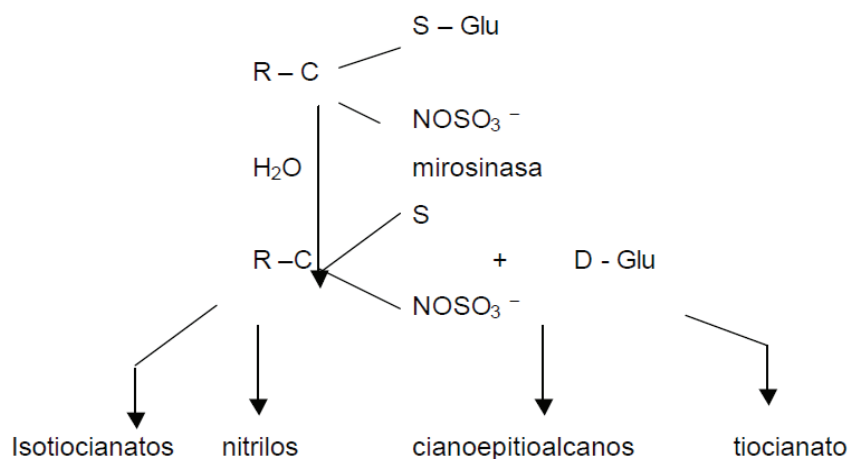
Para Stirling (1991 a y b), los residuos de las plantas crucíferas se usan especialmente para la reducción de patógenos, insectos y malas hierbas. El efecto nematicida de determinados aportes vegetales es una consecuencia de la liberación de compuestos tóxicos por acción del metabolismo edáfico (fenoles, taninos, derivados azufrados...) algunos de ellos volátiles como amonio, nitritos, acetaldehído, formaldehído, isotiocianatos o sulfuro de hidrógeno (Piedra Buena, 2004), o porque al favorecer el desarrollo de la microflora y microfauna edáfica se incrementan además los microorganismos antagonistas (Bonanomi *et al.*, 2010).

Aires *et al.*, (2009) evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de glucosinolatos totales aportados en extractos de plantas (brócoli, coliflor, nabo, col y berro) sobre la población del quiste del nematodo de la patata. Se apreció un efecto altamente significativo en función del tipo y concentración de glucosinolatos en los extractos.

Kirkegaard *et al.*, (1993a,b,1994) y Angus *et al.*, (1994) emplean el término de **biofumigación** solo para rotación o abonos verdes de crucíferas haciendo referencia a los efectos supresivos asociados a la liberación de los isotiocianatos generados durante la hidrólisis de los glucosinolatos, mediante la acción de la mirosinasa, enzima presente en los suelos (Lazzeri y Manici 2000; Lazzeri *et al.*, 2008; Kirkegaard y Matthiessen, 2004; Kirkegaard, *et al.*, 1994,2008).

Estos compuestos tienen una actividad biológica similar a la acción de fumigantes de amplio espectro al generar metilisocianato (Angus *et al.*, 1994), (Fig.13) y su efectividad diferente según el tipo de crucífera, el tipo de suelo y las condiciones externas climatológicas. Se ha encontrado en cereales que con residuos de *Brassica napus* y *B.juncea* se controlan los hongos del suelo.

Angus, (1994) y Kirkegaard y Sarwar (1998), señalan que la eficacia de la biofumigación depende de varios factores, pero fundamentalmente del tipo de brassica empleada.



**Figura 2.13.-** Hidrólisis de los glucosinolatos por la mirosinasa del suelo (Bonnes y Rossiter, 1996)

Sarwar *et al.*, (1998) investigan el efecto de la biofumigación con brásicas (Goud *et al.*, 2004) sobre el crecimiento de 5 patógenos de los cereales: *Gaeumannomyces graminis*, *R.solani*, *Fusarium graminearum*, *Bipolaris sorokiniana* y *Pythium irregulare*. De ellos, *Gaeumannomyces* es el más sensible a los tratamientos, seguido por *Rhizoctonia* y *Fusarium*, siendo *Bipolaris* y *Pythium* los menos sensibles. Se demuestra así el efecto en el control de hongos de los cereales.

El grado de control de los patógenos del suelo fue en general variable y varios estudios posteriores, han demostrado que la eficacia en el control de nematodos no se correlaciona solo con los glucosinolatos contenidos en las plantas (Potter *et al.*, 1998, McLeod y Steel, 1999). También se observa que cuando se separan las fases sólida de la líquida y gaseosa del fermentado de brassicas y se aplican por separado o conjuntamente, todas ellas son efectivas en control de nematodos. Esto ocurre debido a dos mecanismos diferentes: uno sería el debido a la definición propiamente dicha de la biofumigación como la liberación de isotiocianatos, y el segundo mecanismo se da pasadas tres o cuatro semanas y se relaciona con la modificación edáfica de la materia orgánica aplicada (Kirkegaard, 2006; Kirkegaard *et al.*, 2008).

Aunque los efectos del tipo de suelo sobre la eficacia de la biofumigación no han sido bien estudiados, los suelos arenosos, con bajo contenido en MO permiten una mejor actividad biofumigante.

La práctica del **abono verde** consiste en la incorporación de una masa vegetal de plantas cultivadas con la finalidad de incrementar la productividad del suelo (Hargrove y Frye, 1987). Pero para Fancelli (1990), esta práctica agrícola se refiere a su cultivo con la finalidad de incorporarlas al suelo, promoviendo su enriquecimiento en materia orgánica y nutrientes, principalmente N. Posteriormente, se propone un concepto más amplio de los abonos verdes, argumentando que son plantas utilizadas en rotación, sucesión o asociación con los cultivos, y que incorporadas al suelo o dejadas en su superficie, son capaces de mantener o mejorar las características físicas, químicas y biológicas de dicho suelo (Hargrove, 1991).

Las plantas utilizadas como abonos verdes pertenecen generalmente a la familia de las leguminosas, por la posibilidad que tienen éstas de fijar nitrógeno atmosférico en asociación con las bacterias del género *Rhizobium*, aunque en los últimos tiempos se cultivan otras especies de crecimiento rápido y elevada producción de biomasa, como es el caso de algunas gramíneas, crucíferas o compuestas.

El método de aplicación de los abonos verdes varía para cada MO teniendo en cuenta la necesidad de control de los gases producidos en esa descomposición de la materia orgánica, puesto que estos por lo general tienen un efecto biostático, lo que hace necesario prolongar en el tiempo su acción sobre los patógenos (Díez Rojo *et al.*, 2006, 2010; Zanón, 2009).

Las plantas cultivadas son una fábrica que proporciona una variada gama de compuestos orgánicos naturales, aplicables a los suelos (Grainge y Ahmed, 1988). Algunas plantas muestran resultados prometedores en su aplicación para el control de nemátodos parásitos (Alam *et al.*, 1990). Las propiedades de los restos vegetales para el control de patógenos puede utilizarse de dos formas distintas (Grainge y Ahmed, 1988):

- a) Utilizar determinados tejidos vegetales o derivados, aplicando extractos acuosos, orgánicos o polvo de productos liofilizados.
- b) Aislar, identificar y procesar principios activos de las plantas, y si es posible, producir industrialmente, esos compuestos y sus análogos como compuestos aplicables a los suelos.

La toxicidad de los extractos se incrementa con el incremento de la concentración aplicada.

Si además se combina con otras técnicas supresivas como la solarización, su eficacia se incrementa, pudiendo reducir la cantidad de materia orgánica usada para lograr el mismo efecto positivo (Bello *et*

*al.*, 2000,2001). Ros *et al.*, (2002) señalan que la biofumigación con solarización (biosolarización) realizada de forma reiterada, mejora el estado nutricional del suelo, aumenta los contenidos de materia orgánica, revitaliza la actividad microbiana y los ciclos biogeoquímicos, y ha demostrado ser un método eficaz para regular las poblaciones de nematodos, patógenos fúngicos y malas hierbas. Su efecto sobre la actividad microbiana es selectivo favoreciendo a los antagonistas y disminuyendo el nivel de nematodos.

La **biodesinfección de suelos**, así como la biofumigación, se basan en la inducción de procesos y en la producción de sustancias volátiles que actúan como fumigantes para el control de los organismos patógenos de vegetales, mediante la descomposición de las enmiendas orgánicas y residuos agroindustriales (Bello, 1998; Díez Rojo *et al.*, 2010).

El efecto de la biodesinfección sobre la actividad microbiana es selectivo, favoreciendo a los antagonistas y disminuyendo el nivel de las poblaciones de nematodos fitoparásitos. Por una parte la susceptibilidad de los patógenos a los compuestos volátiles, que se desprenden durante la descomposición de la MO, aumenta al elevarse la temperatura del suelo. Por otra, la incorporación de MO puede incrementar entre 2-3 °C la temperatura del suelo, así como la profundidad del suelo a la cual llega el efecto de la desinfección (Lal *et al.*, 1991; Altieri, 1997; Bello *et al.*, 2000, 2001).

Por lo expuesto, el Control Biológico de Plagas plantea la aplicación de diversos residuos orgánicos en la gestión de las enfermedades de las plantas de origen edáfico, incluida su uso como nematicidas basada en la capacidad para estimular su actividad microbiológica, que se evidencia por el aumento y/o renovación/sucesión de las poblaciones de actinomicetos, algas, bacterias, hongos y de otros organismos, tales como nematodos microbívoros. Este estímulo va acompañado del incremento de la actividad metabólica y de las actividades enzimáticas responsables, y de la acumulación de determinados productos finales, compuestos que puede ser nematicidas, en el suelo enmendado (Badra *et al.*, 1979; Rodríguez-Kabana y Hollis, 1965; Rodríguez Kábana, 1986; Kandeler *et al.*, 1999; Peacock *et al.*, 2001; Ros *et al.*, 2006).

La efectividad de una enmienda, como propuesta biodesinfectante, (fungicida o nematicida) dependerá de su composición química por las características de los materiales utilizados, por la dosis y por el método de aplicación y las especies de los microorganismos que se desarrollen en el suelo. Cook y Baker, (1983), Hoitink, (1988), D´Adabbo, (1995) entre otros, aprecian notables diferencias en la producción pero no



diferencian si la MO actúa como enmienda y/o como supresor de las enfermedades.

Con frecuencia, en la literatura aparece el efecto supresor de las enmiendas del suelo, asociado a una amplia gama de materiales residuales compostados/bioestabilizados, sobre nematodos fitoparásitos, aunque también se indica que el control de los nematodos es inconsistente o sus efectos, variables (Szczzech *et al.*, 1993; McSorley y Gallagher, 1996; McSorley *et al.*, 1997; Akhtar, 2000; Akhtar y Malik, 2000; Zhao *et al.*, 2003).

Al día de hoy, el efecto nematicida de las enmiendas de compost es poco predecible en función de los materiales de partida, el tipo de proceso de compostaje, la madurez del producto final incorporado al suelo, las especies de nematodos presentes y la época de aplicación (Rodríguez-Kábana *et al.*, 1987; Rivera y Aballay, 2008).

Algunos materiales orgánicos contienen compuestos nematotóxicos, como tortas de aceite de ricino (*Ricinus communis*) y el neem (*Azadirachta indica*) (Rodríguez-Kabana, 1986; Singh y Sitaramaiah, 1973).

Un gran grupo de materiales orgánicos actúa específicamente contra los nematodos a través de la actividad microbiana y la liberación de NH<sub>3</sub>. Estos materiales tienen típicamente baja relación C/N y tienen alto valor proteico y elevado contenido de aminos. Cuando las enmiendas orgánicas se añaden al suelo en tasas del 1,0% (w/w) aparece una relación directa entre el contenido de N, o inversa con la relación C/N, de las enmiendas y su eficacia contra nematodos fitoparásitos (Tabla 2.7) (Mian *et al.*, 1982; Mian y Rodríguez-Kábana, 1982 a y b).

**Tabla 2.7.-** Resumen de los valores de la relación C:N, actividad fitotoxica y nematicida. Existe una gama óptima de C: N valores de la enmienda en la que se produce actividad nematicida sin fototoxicidad (Mian *et al.*, 1982).

<b>Fitotóxico</b>				<b>No fitotóxico</b>				
<b>Valor C:N</b>	5	10	15	20	25	30	35	40
<b>Nematicida</b>				<b>No nematicida</b>				

La adición de enmiendas que modifiquen la relación C:N con finalidad nematicida debe concebirse en función de la estimulación de un espectro amplio y no selectivo de las microflora/microfauna del suelo. Entre las enmiendas nitrogenadas que estimulan una microflora

especializada del suelo, se encuentran aquellos restos que contienen quitina, muco-polisacáridos, o similares.

Aunque el  $\text{NH}_3$  y los abonos orgánicos con bajas relaciones C / N son nematocidas (Badra *et al.*, 1979; Rodríguez-Kábana y King, 1980; Rodríguez-Kábana *et al.*, 1981), para obtener el control efectivo de los nematodos en el suelo se precisa aplicar en el campo grandes cantidades de estos materiales. Así, la urea es un buen nematocida cuando se aplica a niveles en exceso, de 300 mg N/kg suelo (Rodríguez-Kabana, 1986; Akhtar, 2000) pues conduce a acumulaciones significativas de  $\text{N-NH}_4$  y  $\text{N-NO}_3$  que en el suelo generar fitotoxicidad. Hay que recordar que el proceso de oxidación de N consume elevadas cantidades de  $\text{O}_2$  presente en el espacio poral y del  $\text{O}_2$  disuelto en la solución del suelo, impulsando los procesos bacterianos en anaerobiosis.

Estos efectos fitotóxicos asociados a enmiendas con alto contenido en N se pueden reducir mediante un aumento de la relación C/N mediante adición de una fuente suplementaria de carbono fácilmente disponible para los microorganismos del suelo (Huebner *et al.*, 1983; Rodríguez-Kábana y King, 1980). Así se permite la utilización microbiana de todo el N, y se ralentiza la formación productos finales y su acumulación en niveles fitotóxicos para la actividad microbiana.

Muchos mecanismos pueden estar implicados en este efecto supresor, tal como el proceso de descomposición e integración del aporte en el suelo y la producción de amoníaco, la estimulación de la biomasa microbiana edáfica y la liberación de sustancias biocidas, que tengan actividad nematocida (McSorley y Gallaher, 1996; Oka y Yirmeyahu, 2002; Oka y Pivonia, 2002).

El uso de materia orgánica residual como los estiércoles con alto contenido en N, así como enmiendas con alto contenido en proteínas, o en quitina, pueden controlar gran número de patógenos debido a diferentes efectos como la anaerobiosis, la acumulación de amoníaco (Blok *et al.*, 2000) o también a la estimulación de la actividad biológica de los suelos incrementando las poblaciones de antagonistas de los patógenos. También se considera a estos estiércoles como una fuente de ácidos grasos de cadena corta, que pueden favorecerse con la variación del pH y la producción de acético ya sea del estiércol o del suelo (Mahran *et al.*, 2008 a y b).

Culbreath *et al.*, (1985) demostraron que la adición al suelo de materiales ligno-hemicelulósicos enriquecidos con quitina, puede aumentar su eficacia nematocida y evitar algunos de los efectos perjudiciales de la misma, cuando se aplica a altos niveles (1,0% (w /

w). Es posible que el beneficio asociado al suplemento ligno-hemicelulósico puede ser consecuencia de una mayor selectividad de los tratamientos para los antagonistas de nematodos en suelos.

La función de la materia orgánica en la regulación de los patógenos de los vegetales, es una alternativa basada en el mismo principio que los fumigantes convencionales, con la única diferencia en cuanto a los gases resultantes de la biodescomposición de la materia orgánica, y no se conocen efectos negativos sobre el ambiente y la salud (Bello, 1998).

Durante la descomposición de la materia orgánica fresca como pastos, restos vegetales, forrajes, estiércoles, restos de cosecha, e incluso líquidos como las vinazas de remolacha o de vino y los purines de cerdo y otros residuos, se liberan una gran cantidad de productos químicos que realizan el control de los patógenos del suelo, como puede ser amoníaco, nitratos, sulfuro de hidrogeno, ácidos orgánicos, sustancias orgánicas volátiles, enzimas fenoles...etc. (Barres *et al.*, 2007; Zanón, 2009; Diez Rojo, 2010).

Compuestos nematicidas muy estudiados, son los ácidos orgánicos generados por la descomposición de enmiendas ricas en C<sub>org</sub> fermentados, por acción de los microorganismos en condiciones de anaerobiosis, en particular el ácido butírico se ha usado como alternativa a la fumigación para nematodos y hongos patógenos (Browning *et al.*, 2004, 2006). Pero la actividad nematicida de las enmiendas orgánicas que bajo condiciones de anaerobiosis liberan ácidos orgánicos, está muy influida por las condiciones del suelo, que incluyen concentraciones de oxígeno, potencial redox, pH, actividad microbiana y temperatura del suelo. **Como consecuencia, la actividad nematicida, debe ser específicamente evaluada para cada aporte.**

### **2.3.5. Hongos nematicidas y formas de actuación.**

La habilidad saprofítica/parásita de los hongos nematófagos, es importante en la relación de biocontrol de los nemátodos por hongos (Kerry y De Leij, 1992; Barron, 1992). Esto sugiere que poseen semejanzas que los habilitan para alimentarse de los nemátodos y sobrevivir en el ecosistema del suelo (Nordbring-Hertz *et al.*, 1995, 2006).

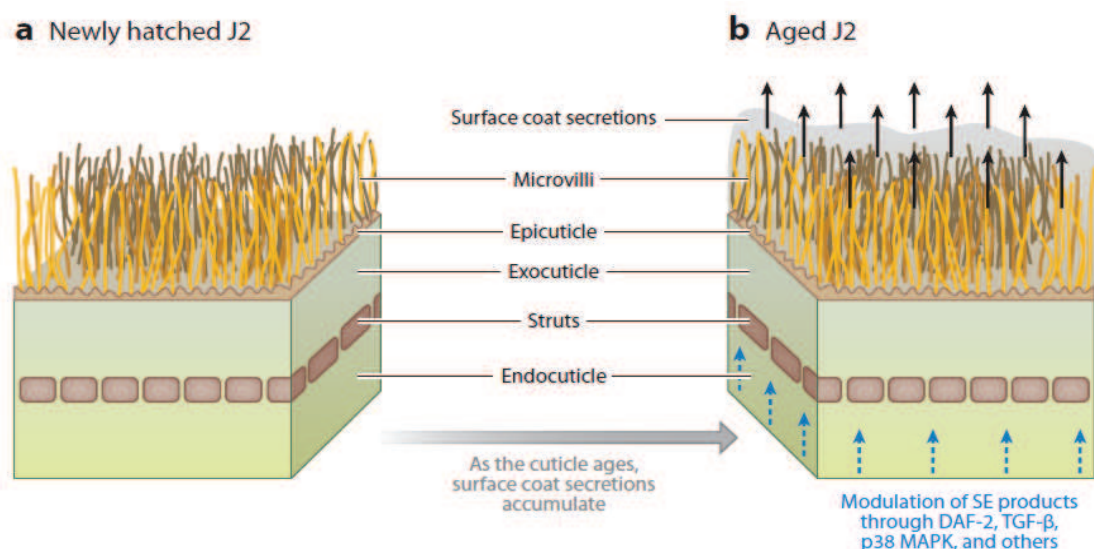
Las capacidades bioquímicas que condicionan el parasitismo y la predación de los hongos con los nematodos han evolucionado entre los distintos grupos de hongos del suelo (Gray, 1988). La función de estos hongos juega un papel en el control natural y también por el interés

biológico y bioquímico asociado con los procesos de captura, penetración y digestión (Dackman *et al.*, 1992; Barron, 1992).

De forma paralela, se empiezan a conocer aspectos metabólicos por parte del animal, que facilitan el acercamiento y la fijación de los hongos a la cubierta exterior de los nematodos a la (SC) del nematodo (que es la capa más externa de la cutícula, en contacto con el suelo, y que protege al nematodo de los patógenos microbianos).

Dado que los nematodos pueden cambiar rápidamente su composición superficial en respuesta a las señales de las plantas, que la composición de la superficie se puede cambiar dentro de una sola etapa del ciclo de vida durante el entrada de nematodos parásitos en un nuevo huésped y que las proteínas efectoras de nematodos puede estar presente en la SC, existe una creciente evidencia de que algunas de estas moléculas sirven como una defensa activa contra las respuestas de los huéspedes vegetales.

Dado que las formas J2 infectivas de *Meloidogyne spp.* exhiben una amplia variación en la unión de endosporas del parásito *P. penetrans* a la cutícula, se revela una cierta forma de proceso de reconocimiento molecular en que la cutícula se modula (Fig. 2.14).



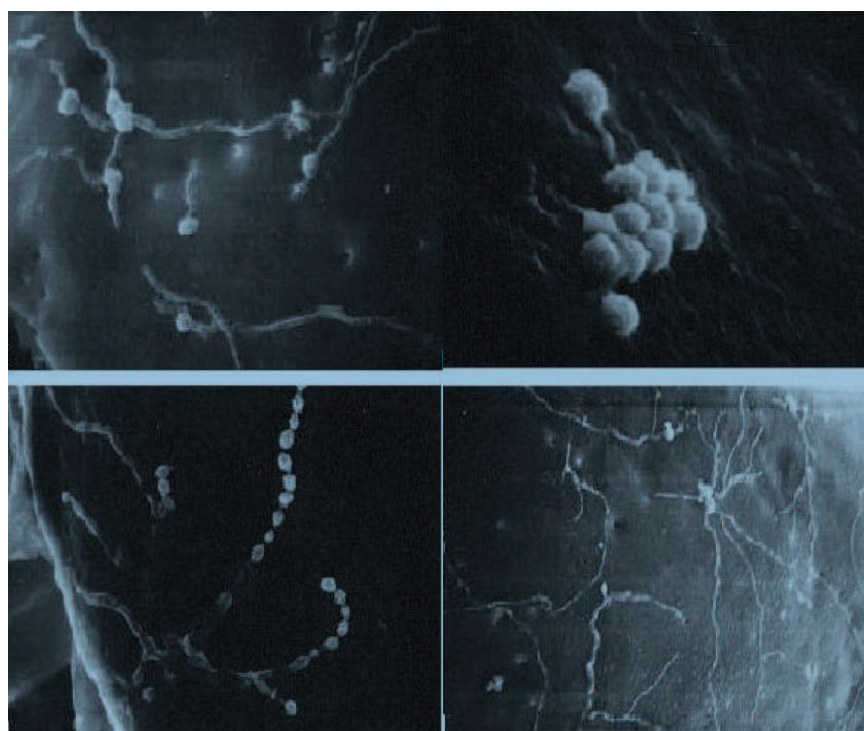
**Figura 2.14.-** Modelo generalizado de la cutícula de nematodos infectantes juvenil que consta de tres capas fácilmente definibles (como se describe en **Fig.2.11**). La capa mas superficial se superpone a la epicutícula y es una estructura amorfa, difusa, rica en carbohidrato y que contiene mucinas y microvellosidades (Davies y Curtis, 2011). Con la edad disminuye la susceptibilidad a la fijación (infección) de la capa exterior de las formas juveniles frente a *Pasteuria endospora*.

Así, las esporas de los hongos se han adaptado y especializado en la captura y penetración de los nemátodos, posiblemente de acuerdo con la composición química específica conformada por las excreciones en las

que se embeben las microvellosidades, lo que facilitará el tropismo positivo hacia los nematodos, que manifiestan las zoosporas móviles de los hongos inferiores. Y también el que la mayoría de las especies con zoosporas no móviles sean capaces de adherirse instantáneamente a las cutículas de los nemátodos transeúntes, justificando propiedades adhesivas especiales.

Los experimentos preliminares sugieren que las secreciones en superficie de la capa se modulan a través de las vías de señalización, como la exposición a péptidos que inhiben IGF-1 de las células estimuladas, implicadas en la inmunidad innata que también reduce la unión de endosporas.

Las capacidades nutricionales de los predadores del nematodo, siguen siendo un aspecto enigmático de su biología que permita comprender que es lo que inicia la actividad predatora y cuanto tiempo pueda durar.



Grupo de esporas germinando.  
Micelio desarrollado sobre el corión del nematodo

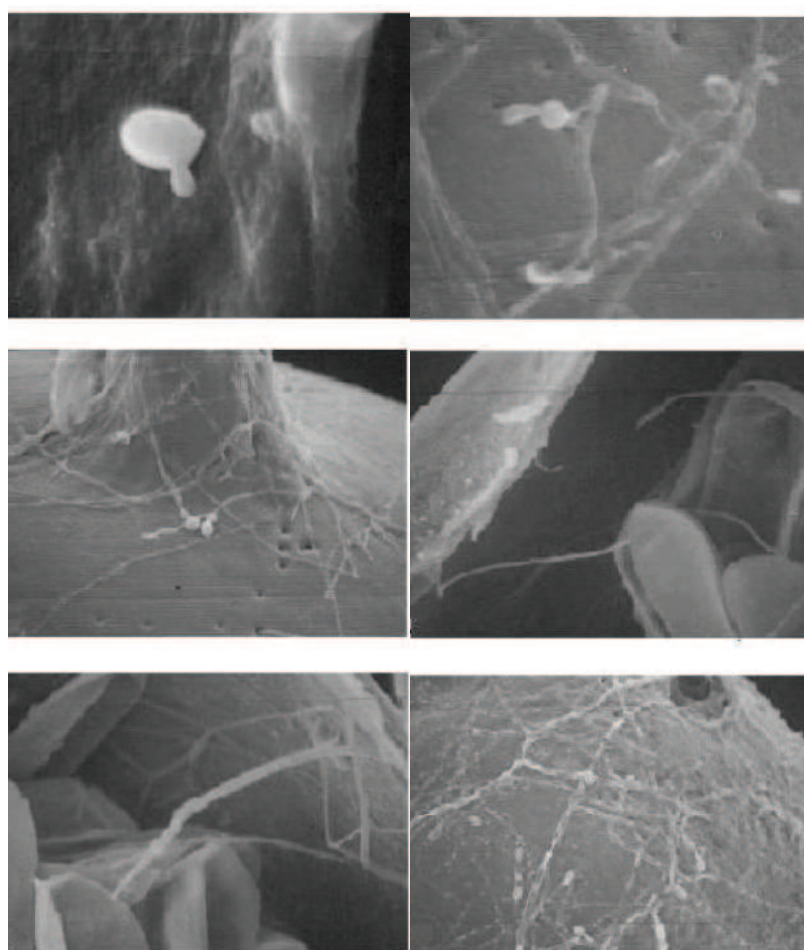
Esporas en grupos germinativos inmersos y superficiales  
Formación de conidióforos esporulando

**Figura. 2.15** .- *Paecilomyces carnei* infectando al nematodo *G. rostochiensis* . (Núñez Sánchez, 2002).

Diversos autores han clasificado a los hongos del suelo según el modo de infectar, o el estadio del nematodo que infectan los predadores o atrapadores de nemátodos, endoparásitos de huevos, parásitos de huevos, hembras y productores de toxinas (Núñez Sánchez, 2002).

Muchas especies tienen conidios que no toleran la desecación y por lo tanto no son el escenario en el cual la mayoría de los hongos sobrevive en condiciones adversas en el suelo, y también parecen ser fácilmente disueltas o destruidas por acción de las lisinas.

Aparentemente, los conidios proporcionan un método de propagación a más corto plazo y podría ser la manera en que el hongo puede cambiar, según les convenga, de modo nutricional predatorio a saprofítico y viceversa.



Germinación de espора  
 Micelio en desarrollo sobre corión  
 Parte interna del corión con micelio

Tubos germinativos  
 Micelio en desarrollo sobre huevos  
 Quiste recubierto de micelio

**Figura 2.16.-** Infección de quistes de *G. rostochiensis* por *Phialophora malorum* (Núñez Sánchez, 2002)

Hasta la mitad de la década de los setenta, no aparecieron registros de hongos que parasitaran a quistes de *G. rostochiensis*. Tribe, en 1980, demostró que la dificultad de encontrarlos, estribaba en la reducida apertura del cono vulvar y la presencia de una cutícula adicional, que funcionaban como barreras adicionales a la penetración de los hongos parásitos y depredadores.

### **Los predadores o atrapadores de nemátodos**

Desarrollan hifas, ramificaciones, redes semejantes a una telaraña y protuberancias pegajosas, o bien forman anillos que pueden ser constrictores o no constrictores, con los que atrapan las larvas de nematodos (Dackman y Norbreng-Hertz, 1992). Según Jansson y López-Llorca, 2001, 2004), hongos como *Arthrobotrys* y *Monacrosporium* penetran la cutícula del nematodo por la trampa, formando el bulbo de infección en su interior. A partir de éste, las hifas tróficas crecen dentro del cuerpo y digieren su contenido.

También exponen que la depredación no se relaciona aparentemente con la densidad de población del nematodo, a pesar de que la adaptación a los cambios en el componente orgánico del suelo conlleva un aumento de la población de nematodos libres; de hecho, el incremento del número de aportes orgánicos, en ciertos casos conduce a una reducción en la actividad depredadora de los hongos (Cook y Baker, 1983). Esto sucede debido a la intensificación en la actividad de los microorganismos del suelo que compiten por los nutrientes, con los hongos predadores. Obviamente las interacciones complejas entre los predadores, que descomponen sustancias orgánicas, y el remanente de la población microbiana del suelo, determinan el número final de cada uno de ellos en el suelo.

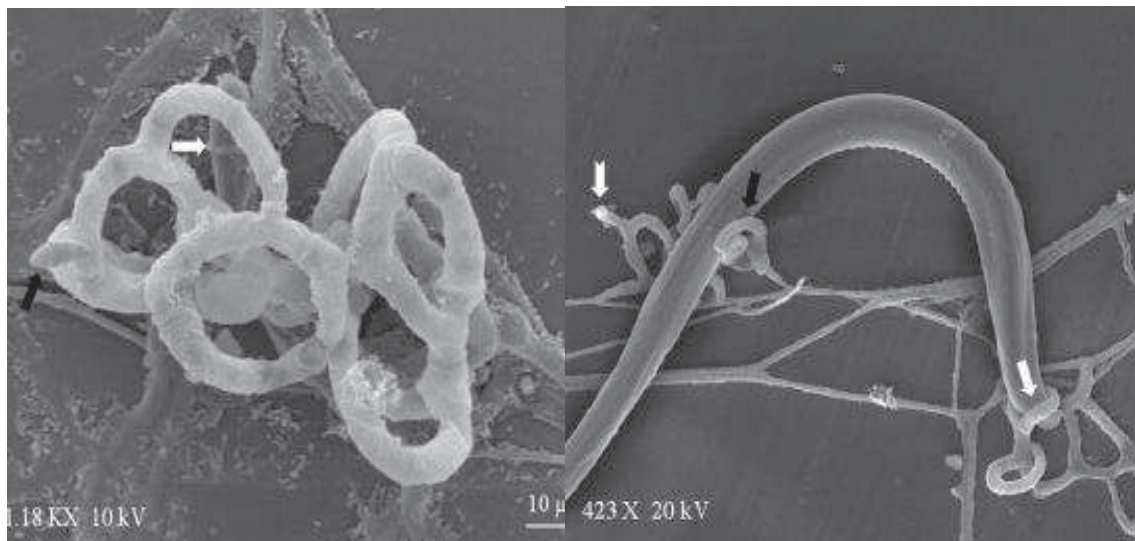
Los conidios de hongos predadores de nemátodos son de mayor tamaño que la mayoría de los saprófitos del suelo, y tienen abundantes reservas de nutrientes que pueden ser utilizados para producir inmediatamente una o mas trampas de las que posteriormente dependerán, para así alimentarse y desarrollarse en un medio predatorio.

Las adaptaciones de las hifas que hacen trampas son comunes. Sin embargo, se ha mostrado recientemente que, especies que producen estas trampas o clavijas de infección que penetran en los nemátodos capturados, liberan una sustancia toxica que inmoviliza al nematodo casi inmediatamente. Además algunos de estos hongos tienen órganos que expulsan sustancias atractivas para los nemátodos (Jansson, 1982).

Los mecanismos de adhesión, las estructuras infecciosas del hongo y la competencia por la infección han sido investigadas (Barron, 1992). Después de la captura, los hongos desarrollan un aprensorio, el cual se ramifica y crece a lo largo del cuerpo. Las especies de este tipo de hongos pertenecen a los grupos de Zygomycetes, Deuteromycetes y Basidiomycetes que se relaciona con los estados larvarios.

### Hongos productores de toxinas

El hongo más común de éste grupo es el descomponedor de madera *Pleurotus ostreatus* (seta yesquera) y otros *Pleurotus* spp. Cook and Baker (1983), indicaron, que la captura de los nemátodos por hongos podría ser un medio de actividad en microhabitats con sustratos fácilmente disponibles. Las hifas de estos hongos contienen una gota de toxina. Tras ponerse en contacto con la toxina, el nematodo queda rápidamente inmovilizado y las hifas del hongo crecen dirigidas quimiotrópicamente a través de la boca del nematodo, que como en el caso de los anteriores hongos nematófagos, es digerido (Fig 2.17).



El hongo atrapa al nematodo después de 6 horas de interacción.

Ataque del hongo sobre la porción cefálica (blanco) y en medio del cuerpo (negro).

**Figura 2.17.-** Proceso de interacción múltiple entre el hongo captor de nematodos *Duddingtonia flagrans* y las larvas del nematodo *Ancylostoma* spp. (parásito de perros) (Maciel *et al.*, 2009)

También parece ser una buena evidencia, que las hifas asimilativas o austorios de los hongos predadores encontrados dentro del nematodo liberan un antibiótico que impide el desarrollo de microorganismos competidores, en el nematodo capturado (Barron, 1977). El contenido de los cuerpos de los nemátodos capturados es consumido, mientras permanece una cutícula llena de hifas asimilativas lisas.



### **Hongos endoparásitos**

Más que hongos endoparásitos se les considera como específicos para desarrollarse sobre nemátodos (Barron, 1977; Bird, 1987). Los endoparásitos han sido estudiados principalmente en laboratorio e invernadero y aunque se han hecho aplicaciones de este tipo de hongos, directamente sobre el suelo para el control de nemátodos, los resultados no han sido uniformes (Jaffee y Zehr, 1982; Jansson, 1982; Kerry, 1999; Schuster y Sikora, 1992; Sikora *et al.*, 1990; Uziel y Sikora, 1992; Roessner, 1987; Morgan-Jones *et al.*, 1986).

Estos hongos, que no forman hifas para atrapar nematodos, emplean sus esporas para entrar en contacto con la cutícula del nematodo o entran en su vía digestiva, germinando posteriormente en el esófago y desarrollando su micelio en el interior, hasta que las estructuras reproductoras del hongo rompen su pared debido a la esporulación. De esta forma se pueden parasitar larvas, hembras, quistes y huevos. Los grupos a los que pertenecen estos hongos son *Chytridiomycetes*, *Oomycetes*, *Zygomycetes*, *Deuteromycetes* y *Basidiomycetes*.

Estos hongos, que a menudo son parásitos obligados de nematodos, fuera del cuerpo infectado aparecen sólo como estructuras de diseminación. Las esporas de estos hongos pueden ser zoosporas móviles (como las de *Catenaria* spp.) que se enquistan sobre el nematodo adhiriéndose a él y penetrando la cutícula, conidios adhesivos (por ejemplo en *Drechmeria coniospora*) o conidios que son ingeridos (*Harposporium* spp.) por los nematodos bacteriófagos.

*Arthrobotrys oligospora*, Corda) forma redes de hifas, *Monacrosporium cyanopagum*, Oudem) desarrolla ramificaciones, *Dactylaria candida*, Sacc) produce protuberancias y también es considerada como un hongo constrictor. *Stylopage* spp. y *Cytopage* spp. tienen hifas inmodificadas. Entre los formadores de anillos constrictores están *D. brochopaga* y *A. dactyloides*. En hongos endoparásitos los conidios también muestran sofisticadas adaptaciones morfológicas para realizar su interacción con los nemátodos.

Por aberturas naturales tales como la cavidad bucal, poro excretorio, vulva y ano, pueden introducirse los microorganismos secundarios. No obstante, los microorganismos competidores rara vez se desarrollan en los nematodos capturados en las trampas de hifas de la mayoría de las especies de hongos predadores.

**Tabla 4.8.-** Hongos predadores y endoparásitos de larvas de nemátodos (Barron, 1977)

Predadores	Endoparásitos
<i>Arthobotrys anchonia</i>	<i>Acrostalagmus goniodes</i>
<i>A. arthobotryoides</i>	<i>A. obocatus</i>
<i>A. conoides</i>	<i>A. zeosporus</i>
<i>A. dactyloides</i>	<i>Cephalosporium balanoides</i>
<i>A. fragans</i>	<i>Gonimochaete horridula</i>
<i>A. musiformis</i>	<i>Haptoglossa heterospora</i>
<i>A. oligospora</i>	<i>Harposporium anguillulae</i>
<i>Dactilaria candida</i>	<i>H. baculiforme</i>
<i>D. haptospora</i>	<i>H. crassum</i>
<i>D. megalospora</i>	<i>H. diceraeum</i>
<i>D. thaumasia</i>	<i>H. helicoides</i>
<i>D. brochopaga</i>	<i>H. sicyodes</i>
<i>Dactylella bembicodes</i>	<i>Meria coniospora</i>
<i>D. cionopaga</i>	<i>Nematoctonus leiosporus</i>
<i>D. gephyropaga</i>	<i>N. lectosporus</i>
<i>Nematoctonus ampylosporus</i>	<i>N. pachysporus</i>
<i>N. concurrens</i>	<i>N. tylosporus</i>
<i>N. haptocladus</i>	<i>Paecilomyces coccospora</i>
<i>N. robustus</i>	<i>Verticillium sphaerosporum</i>

### Hongos parásitos de huevos, hembras y quistes

**Hongos parásitos de huevo** infectan estadíos no móviles (huevos) de nematodos. Producen apresorios (estructuras de infección en los extremos de las hifas que se adhieren a la cubierta del huevo. La cubierta del huevo es penetrada por el hongo y el contenido es digerido. Los géneros más comunes de este grupo son *Pochonia* (= *Verticillium*) spp. y *Paecilomyces* spp.

La mayoría de los hongos atacan a los huevos y parecen producir hifas internas bastante similares, y solo pueden ser identificados después del aislamiento y la subsecuente esporulación (Kerry y De Leij, 1992).

Goswami y Rumperhorst, (1978) encontraron que *Fusarium oxysporum* y *F. solani* junto a otros del género *Exophiala* (*E. jeanselmi*, *E. mansonii*, *E. pisciplila*) se asociaban a quistes de *G. rostochiensis*. Un selecto grupo de patógenos de nematodos patógenos enquistados que aparecen en quistes y en huevos de *Globodera*, *Heterodera* y *Meloidogyne* pertenecen al género de *Verticillium* spp. (Morgan-Jones y Rodríguez-Kábana, 1988).

## **2.4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SUELO, APORTES ORGÁNICOS Y CAPACIDAD NEMATICIDA**

Las enmiendas de MO aplicadas a los suelos (residuos de cultivos, residuos animales sólidos y líquidos, residuos bioestabilizados de materiales orgánicos de origen urbano) pueden tener múltiples efectos directos e indirectos sobre los patógenos vegetales y los sistemas microbianos beneficiosos. La comprensión de la importancia relativa de estos efectos es vital para una gestión racional de los mismos y su integración al suelo.

El impacto de estos materiales sobre el suelo, debe de ser de equilibrio entre los efectos negativos (es decir, fitotoxicidad y nutrición de los agentes patógenos) y los positivos (es decir, los efectos fungitóxico y fungistático y la inducción de resistencia) para evitar un aumento de las enfermedades (Bonanomi *et al.*, 2007). Los enzimas generan acciones importantes, principalmente en la transformación de los aportes de MO, en la liberación de nutrientes inorgánicos y orgánicos que permiten el crecimiento de las plantas y microorganismos, en la fijación del N<sub>2</sub> atmosférico, en la eliminación de sustancias xenobióticas, en la nitrificación y desnitrificación (Tate, 2000).

En este apartado, se han incluido indicadores de calidad del suelo para desarrollar, si es posible, una vertiente nematicida, donde participen las actividades enzimáticas ubicadas en el suelo y sus correspondientes modificaciones, derivadas del aporte de los materiales orgánicos en condiciones experimentales y/o saber si las consecuencias bioquímicas derivadas de su actividad nos pueden dar luz sobre la muerte de los nematodos, sin dañar o incluso mejorar la calidad del suelo.

### **2.4.1. *Indicadores ecológicos asociados al control de la calidad del suelo***

La edafofauna dotada de un tracto gastrointestinal completo, en una primera acción, tritura las partículas y organizaciones de MO por masticación, lo que permite desintegrar las estructuras orgánicas complejas, generando una masa que, enriquecida con agua y enzimas, constituirá el bolo alimenticio.

Durante un segundo paso (digestión intestinal), en la que se desarrollará la demolición de macromoléculas con participación de enzimas exocelulares procedentes de una gran variedad y alta densidad de bacterias propias de cada intestino y altamente especializadas en procesos digestivos. Ahora, los alimentos digeridos se transforman en nutrientes (iones inorgánicos, monómeros, y oligómeros) de los que

parte son captados por el propio animal y el resto conforma la masa coprógena o coprolito. Este proceso, pero con otros actores biológicos se repite en el suelo conformando la red de detritívoros, lo que permite mantener la biodiversidad del suelo.

El aporte natural integrado en restos fecales que recibe el suelo con cada eslabón edafobiológico, es un gigantesco aporte de bacterias intestinales biodiversas (en cantidad y variedad) junto a restos orgánicos no degradados, estructuras biológicas y macromoléculas semidegradadas, excedentes nutricionales y enzimas exocelulares, y todo ello, embebido en muco-polisacáridos intestinales y acompañados de los catabolitos microbianos y del propio animal.

En consecuencia, al suelo llegan, en los restos coprógenos, conjuntos enzimáticos completos exocelulares y libres junto a sus bacterias generadoras, capaces de continuar su actividad en un ámbito abierto, lo que modifica drásticamente sus condiciones de trabajo. Las características de los sustratos a degradar en este nuevo medio, también muestran modificaciones, cuya complejidad y orden de degradación también deben de resolver los enzimas, con el refuerzo que supone la web edáfo-trófica.

El aporte de aquel "procesado" se refiere a un punto edáfico preciso de la red trófica de consumidores edáficos, que se repite un número variable de veces, hasta alcanzar el aporte orgánico su mineralización total. La acumulación de componentes orgánicos bioresistentes o su neoformación en nueva biomasa, la diversidad de procesos metabólicos y conjuntos enzimáticos (endo y exo-celulares) que participan son muy elevados, tanto en el seno de los individuos como en la solución del suelo y en las superficies minerales, donde se desarrollan parte de estos procesos y los enzimas actúan (muy redundantes) como catalizadores bioquímicos de los mismos.

Cuando todo ello funciona armónicamente y de manera suficiente, decimos que el suelo goza de buena salud.

Algunos estudios utilizan métodos de todo tipo (incluidas actividades enzimáticas del suelo), para establecer descriptores básicos de carácter ecológico que nos indiquen el nivel de su actividad biológica y de la diversidad de los microorganismos como responsables de los ciclos biogeoquímicos. Así pueden usarse como indicativos del grado de calidad del suelo, siendo algunos de ellos indicadores sensibles y tempranos de cambios para el manejo de la calidad edáfica (Masciandaro y Ceccanti, 1999; Pascual *et al.*, 1999; Nannipieri *et al.*, 2003) (Tabla 2.9).

**Tabla 2.9.-** Estrategias ecológicas de la calidad del suelo en agro-ecosistemas que emplean entre otras actividades enzimáticas como indicadores (Ochoa *et al.*, (2007)

PROPIEDAD BIOLÓGICA DEL SUELO	INDICADOR MICROBIOLÓGICO	MÉTODOS DE MEDIDA
BIODIVERSIDAD	Diversidad Genética Diversidad Funcional Marcadores de Lípidos	PCR – DGCE BIOLOG. MICRORESP PLFA
CICLO DEL CARBONO	Respiración del suelo Cociente Metabólico (qCO <sub>2</sub> ) Descomposición de MO Actividades enzimáticas  Organismos metanotróficos	Producción CO <sub>2</sub> /Consumo O <sub>2</sub> . C respiratorio / C biomasa En bolsas de descomposición Deshidrogenasas, Fosfatasas, hidrolasas... MPN PLFA
CICLO DEL NITRÓGENO	Mineralización del N Nitrificación Desnitrificación  Fijación de N por <i>Rhizobium</i>  Fijación de N por <i>Cyanobacterias</i>	Acumulación de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Oxidación de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Ensayo de inhibición con acetileno  Test de Pot  Nitrogenasa / MPN
BIOMASA MICROBIANA	Biomasa microbiana (métodos directos) Biomasa microbiana (métodos indirectos) Cociente microbiano Hongos Relación Hongos : bacterias Protozoos	PLFA CFI, CFE, SIR C microb / C org PLFA PLFA MPN

PLFA: análisis de fosfolípidos de membrana - MPN:Nº más probable - CFI: Incubación y fumigación con cloroformo – CFE : extracción y fumigación con cloroformo  
SIR :Respiración inducida común sustrato – PCR DGGE: Electroforesis con gel en gradiente desnaturizante.

El interés de los microorganismos en cuanto a su capacidad patológica y/o con los procesos de degradación, estará en función del conocimiento de su presencia/ausencia de actividades enzimáticas que permitan identificar cada proceso, lo que será útil para el estudio de la calidad biológica del suelo para fines concretos (Nannipieri *et al.*, 1990; Gil-Sotres *et al.*, 1992).

Desde otra óptica particular, algunos parámetros biológicos de los suelos, como su biomasa microbiana y su actividad respiratoria, junto con las estimaciones de sus actividades enzimáticas oxidorreductasas (en particular deshidrogenasas, catalasas y peroxidasas) e hidrolasas (fosfatasas, proteasas y ureasas), pueden servir como bioindicadores sensibles a los cambios que están ocurriendo sobre la SOM (Ceccanti y

García, 1994; Bandick y Dick, 1999; García Ruiz *et al.*, 2008; Bastida *et al.*, 2008) e informarnos sobre el estado ecológico de los suelos.

En general los parámetros biológicos y bioquímicos tienen una respuesta rápida y sensible, (días horas o minutos), lo que lleva a plantearse medidas que serán más rápidas y útiles que las asociadas a las propiedades físicas o químicas (Nannipieri *et al.*, 1990).

#### **2.4.2. Actividades enzimáticas como índices de calidad**

La determinación del perfil enzimático del suelo es crucial en la identificación de la diversidad funcional de las comunidades microbianas y podría complementar los datos sobre su composición estructural, proporcionada por las técnicas moleculares, como la huella dactilar genética, el uso de marcadores biológicos microbianos, o los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana.

En general, se evalúa en el suelo la existencia de capacidades enzimáticas, por su efecto de satisfacción de la demanda nutricional de conjuntos vegetales y/o microbiológicos específicos, olvidándonos de la gran biodiversidad animal y vegetal, que por la misma razón ejercen esta acción de síntesis y excreción y la que aportan las enmiendas orgánicas en sí mismas, fermentadas totalmente o como inductoras al crecimiento.

En el funcionamiento de los sistemas agropecuarios, la MOS (en cantidad y composición) juega un papel primordial, al modificar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo ya referidas (Rotenberg *et al.*, 2007). El procesado de los aportes orgánicos, naturales (animales, vegetales y microbianos) o antrópicos (residuos de producciones agrarias, industriales y urbanas) que el suelo recibe hasta convertirlos en MOS, y que desarrolla la edafofauna, es mucho más complejo de lo que se indica habitualmente, y en cada fase emplea conjuntos biológicos y enzimáticos muy diversos. Ello hace imprescindible establecer criterios que definan el origen de los componentes biológico, bacteriano, fúngico y enzimático en cada caso, y las circunstancias que rodean al momento del procesado de la MO, en cada lugar particular.

El análisis comparado y la interpretación de sus resultados requieren tener presente una serie de factores. La redundancia catalítica de cada actividad enzimática edáfica solo representa una especificidad de sustrato en su origen, que será relativa en la solución del suelo, por lo que la relación de un enzima con las actividades metabólica y biológica global del suelo debe establecerse con precaución.

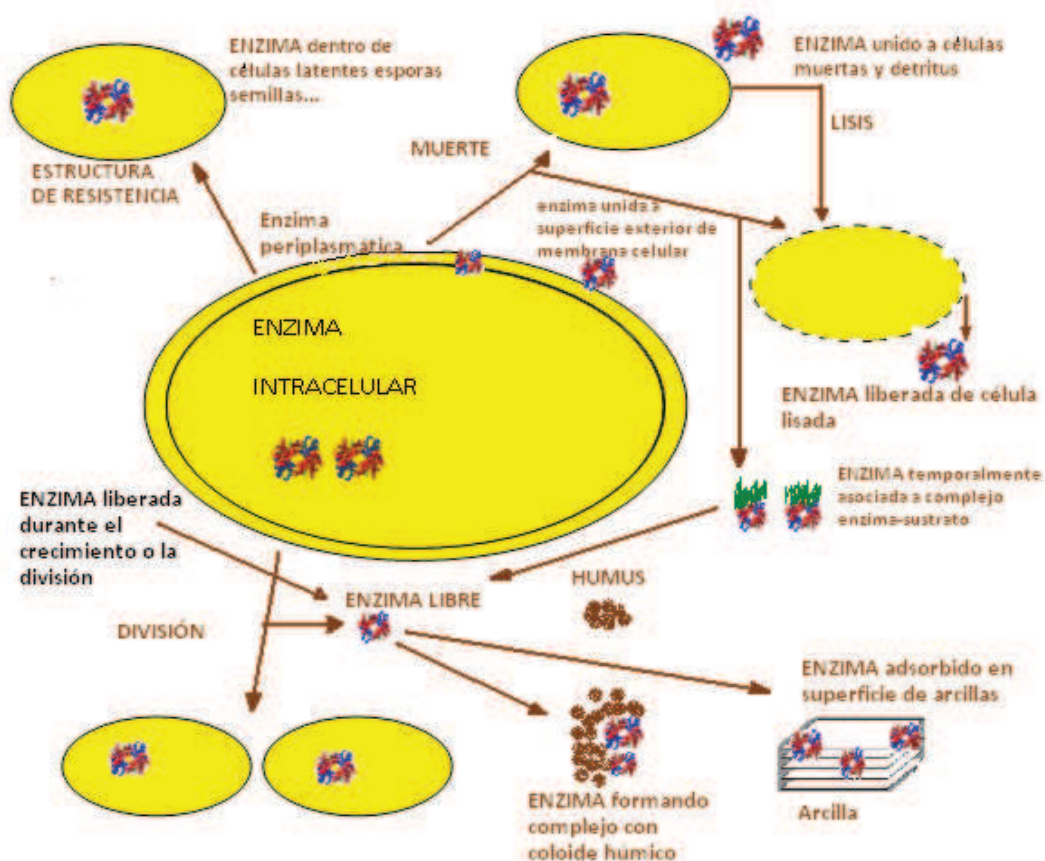
En el suelo, los procesos de degradación exobiótica, utilizan conjuntos enzimáticos exocelulares específicos y redundantes en su acción (intestinales, fúngicos y bacterianos), que son aerobios (si el espacio poral del suelo retiene suficiente cantidad de O<sub>2</sub>) y anaerobios (si el suelo se encuentra saturado en agua y/o las condiciones respirométricas son de anoxigenia facultativa o estricta).

Los enzimas del suelo se encuentran en tres localizaciones básicas:

- i) intracelular, desarrollando su acción catalítica en el interior de células vivas,
- ii) extracelular, que desarrolla su función en el espacio que media entre la membrana y la pared de muchos microorganismos
- iii) abióticos, (de excreción) que desarrollan su función en la solución del suelo, y se ubican en el espacio poral y sobre las superficies de minerales o geles orgánicos e inorgánicos (Joinville *et al.*, 2004), desde donde interactúan con la solución edáfica o en el seno de biofilms, como un recinto edáfico temporal y de extraordinaria eficacia metabólica (González Carcedo, 2011) (Fig.2.18).

A los enzimas abióticos se les asocia una vida media corta, condicionada por las propiedades físicas, químicas, bioquímicas y biológicas de la solución de cada suelo. Sin embargo, algunas de ellas alargan su vida por: i) asociación a las superficies externas o interlamelares de las arcillas (Boyd y Mortland, 1990), ii) complejación con los coloides húmicos mediante reacciones de adsorción, copolimerización, enlace iónico, puentes de hidrógeno o simple atrapamiento físico, durante la formación de materia humificada, (Dick y Tabatabai, 1992; Nannipieri *et al.*, 1996). Su velocidad de reacción dependerá entre otros factores, del pH, fuerza iónica, temperatura y presencia o ausencia de inhibidores (Burns, 1982).

Como en el intestino, en las transformaciones biológicas que tienen lugar en el suelo, las enzimas desempeñan un papel relevante (Burns, 1982, Stryer *et al.*, 1995) ya reseñado.



**Figura 2.18.-** Fuentes y estados de las enzimas en el suelo Ochoa, *et al.* (2007)

Por ello ejercen una gran influencia en numerosas reacciones de oxidación, hidrólisis y degradación de la MO, que a su vez tienen reflejo en los ciclos del agua, C, N, P y S, al favorecer su disponibilidad, por la mineralización de la MO, y estableciendo así las condiciones para el desarrollo de una cubierta vegetal y contenido edafo-biológico estables. Pero esa acción se ve influida por los componentes físicos y químicos del suelo y los rizodepósitos vegetales, a la par que proporcionan información sobre los cambios de las actividades microbianas (Sinsabaug, 1994). Se convierten en indicadores de la capacidad potencial de cada suelo para llevar a cabo reacciones específicas que son importantes en la biodisponibilidad inmediata de nutrientes, una vez sustraída y satisfecha la demanda trófica de los componentes detritívoros.

Entre ellas destacan las oxidoreductasas o las hidrolasas implicadas en los ciclos del C, N, P y S (García *et al.*, 2000; Trasar-Cepeda *et al.*, 1998, 2008; García-Gil *et al.*, 2000) que suelen considerarse como apartados finales de la mineralización de los aportes orgánicos.

Ciertas fosfatasa persisten activas durante largos periodos de tiempo



en la rizosfera, mostrando una resistencia destacable a la desnaturalización proteolítica (González Carcedo *et al.*, 1995; Sagredo *et al.*, 1995) y térmica (Nannipieri *et al.*, 1990; Tabatabai y Dick, 2002), hablando entonces de la resiliencia enzimática. Su función es degradar pequeñas moléculas orgánicas (Negrín *et al.*, 1995) y obtener nutrientes, que como el P, se incorporan a la planta mediante los sistemas de transporte, ubicados en sus tricoblastos.

Si actividades enzimáticas como las fosfatásicas se consideran como la memoria de la historia catalítica de un suelo en función de su productividad (Nannipieri *et al.*, 2003), aunque una parte de ellas aparezca como consecuencia de muerte y lisis celular, de microorganismos en particular y de seres vivos del suelo en general, *¿es posible que también podamos generar su historia como patosistemas si medimos otras actividades enzimáticas?*

En el suelo, el proceso degradativo puede no finalizar en la mineralización. Y por ello, algunos parámetros biológicos, como su biomasa microbiana y su actividad respiratoria, junto con las estimaciones de sus correspondiente actividades enzimáticas de óxido-reducción (catalasas, deshidrogenasas, y peroxidasas) e hidrólisis (fosfatasas, proteasas y ureasas), pueden servir como bioindicadores sensibles a los cambios que están ocurriendo sobre la MO (Ceccanti y García, 1994; Bandick y Dick, 1999; García Ruiz *et al.*, 2008) e informarnos sobre el estado ecológico de los suelos o la capacidad de uso agrícola (Bastida *et al.*, 2008).

De hecho, muchos estudios sugieren que la actividad enzimática del suelo es una medida muy sensible para diferenciar las prácticas de fertilización del suelo tales como el uso de estiércoles animales, restos vegetales de cosecha, abonos verdes, residuos urbanos, etc. (Albiach *et al.*, 1998, 2000; García Ruiz *et al.*, 2008) (Tabla 2.9).

Pero nos olvidamos de que en los estudios de MOS no hay una referencia precisa a la transferencia de masa "intervivos" y de neoformación de biomasa, cuando nos referimos a los procesos de predación, o nos referimos a la digestión mediante vacuolas digestivas, que abre las puertas a nuevos procesos agradativos específicos como el desarrollo de una biomasa, ni tampoco a la agradación abiótica por formación de complejos órgano-metálicos y órgano-minerales derivada de la hidrólisis enzimática que caracterizan a cada suelo.

**Tabla 2.10.-** Índices de calidad de suelos agrícolas y no agrícolas que utilizan entre otros indicadores, actividades enzimáticas.

OBJETIVO	INDICADORES	Autores
Calidad biológica	C biomasa microbiana, fosfo-mono-esterasa, glucosidasa, ureasa.	Leirós <i>et al.</i> ,(1999)
Evaluación de la calidad del suelo	C biomasa microbiana mineralizado, fosfatasa, glucosidasa y ureasa.	Trasar-Cepeda <i>et al.</i> , (1998)
Índice de degradación microbiana	Deshidrogenasa, ureasa, C soluble, carbohidratos solubles	Bastida <i>et al.</i> ,(2006 <sup>a</sup> y b)
Índice de calidad biológica	C soluble, respiración del suelo, celulasa, deshidrogenasa, glucosidasa.	Armas <i>et al.</i> ,(2007)
Índice de fertilidad bioquímica del suelo	C orgánico, N total, deshidrogenasa, fosfatasa, proteasa, amilasa.	Koper y Piotrowska (2003)

Y sin embargo, cuando nos referimos a estos hechos estamos hablando de autorregulación de la salud del sistema suelo, y de los componentes químicos y biológicos que los conforman.

Con este trabajo de Tesis Doctoral se pretende aumentar nuestra comprensión de la posible función nematicida de determinados enzimas, como una forma de competencia entre especies para la obtención de nutrientes (transferencia de masa), como una forma de diversidad funcional del suelo (Nannipieri *et al.*, 2003) o de recuperación de los agrosistemas implementados con restos orgánicos de distinto origen.

### **2.4.3. Índices metabólicos de calidad del suelo**

Seguramente el índice más sencillo usado en la bibliografía es el cociente metabólico que indica la respiración (emisión de CO<sub>2</sub> del suelo) encontrándose que a mayor cantidad de CO<sub>2</sub> correspondería a comunidades más jóvenes, y también se ha usado como un buen indicador de las alteraciones que tienen lugar debido a la posible contaminación por metales pesados, la erosión, la temperatura, e incluso cambios en los diferentes manejos del suelo (De la Paz-Jiménez *et al.*, 2002).

También se ha usado como índice el carbono de la biomasa microbiana puesto que responde de forma rápida a los cambios, usando la relación entre carbono de la biomasa microbiana/carbono orgánico, pero con el inconveniente de que esta relación puede tener cambios debido a las diferentes prácticas de cultivo.

Otro posible parámetro sería el análisis de una actividad enzimática concreta pero que no puede alcanzar el grado de indicador de la calidad del suelo debido a la especificidad de cada enzima y también a los efectos específicos de los fertilizantes sobre las enzimas entre otras causas. El análisis simultáneo de varias enzimas, es más válido para estimar la actividad microbiana global y su respuesta a prácticas de manejo del suelo, situaciones de estrés ambiental y cambios de condiciones ambientales que la determinación de la actividad de una única enzima.

En consecuencia, se prefiere manejar la combinación de varias actividades enzimáticas o de índices bioquímicos, ya que el empleo de una sola puede conducir a resultados contradictorios en función de las características del suelo o las condiciones ambientales (Gil-Sotres *et al.*, 2005).

Dado que la actividad enzimática del suelo pretende ser una medida muy sensible para diferenciar las prácticas de fertilización del suelo, tales como el uso de estiércoles animales, restos vegetales de cosecha, abonos verdes, residuos urbanos, etc. (Albiach *et al.*, 1998, 2000; García Ruiz *et al.*, 2008; Bastida *et al.*, 2008), la utilización de los parámetros enzimáticos como base para una mejor discriminación entre los efectos que sobre la calidad de los suelos suponen aquellos, se ve notablemente mejorada introduciendo técnicas de análisis multivariante como el análisis de componentes principales, encontrando que dichos componentes principales son capaces de discriminar entre sistemas de cultivo (Kandeler *et al.*, 1999), regímenes de fertilización (Svensson y Pell, 2001) o a efectos de la adición de lodos de depuradora (Johansson *et al.*, 1999).

Según Bastida *et al.*, (2008) se pueden generar diversos índices de calidad de suelo usando exclusivamente actividades enzimáticas y en suelos agrícolas y no agrícolas los agrupa de la forma siguiente (Tabla 2.11).

Dado que los enzimas son catalizadores protéicos, liberados por los microorganismos del suelo y la rizosfera vegetal a través de secreciones y de lisis celular (Ladd, 1985), al quedarse en forma abiótica parte de ellos quedan inmovilizados y estabilizados sobre arcillas, moléculas orgánicas y complejos órgano minerales (Joinville *et al.*, 2004), o simplemente libres en el espacio poral o suspendidas sobre soportes organominerales o disueltas en la fase acuosa, cambiando su comportamiento cinético.

**Tabla 2.11.-** Índices de calidad de los suelos asociados únicamente a su actividad enzimática. DH: deshidrogenasa.- CA: catalasa.- P: fosfatasa.- PR: proteasa.- AM: amilasa.- AR: arilsulfatasa.- GL: glucosidasa.- U: ureasa.- I: invertasa

NOMBRE	FÓRMULA	Autores
Número de Actividad enzimática (EAN)	$EAN=0.2 \times (0.15 \times DH + CA + 1.25 \times 10^{-5} \times P + 4 \times 10^{-2} \times PR + 6 \times 10^{-4} \times AM)$	Beck (1984)
Índice biológico de Fertilidad (BIF)	$BIF = (1.5 \times DH + K \times 100 \times CA) / 2$	Stefanic <i>et al.</i> , (1984)
Índice de alteración del suelo (AI 1)	$AI1 = 21.30 \times AR + 35.2 \times GL + 10.20 \times P^{0.52} \times U - 4.53 \times I + 14.3 \times DH + 0.003 \times PO$	Puglisi <i>et al.</i> , (2006)
Carbono orgánico	$Corg = 0.4008 \times AR + 0.4153 \times DH + 0.4033 \times P + 0.4916 \times GL$	De la Paz-Jiménez <i>et al.</i> , (2002)

Por ello, hay que considerar que los métodos empleados nos proporcionan un valor potencial de su actividad enzimática al optimizar el método de medida para unas condiciones de pH, temperatura y sustrato, que difieren de las condiciones de la actividad real en el suelo y en la interfase suelo/planta. Por ello, son parámetros que muestran una variabilidad muy grande debido a las características del suelo, variaciones estacionales y climáticas, localización geográfica, etc. y los rangos encontrados en suelos naturales son muy amplios aunque este inconveniente se puede superar estableciendo comparaciones con un suelo de referencia (Nannipieri *et al.*, 1990, 2003).

Se puede concluir que la utilización de índices metabólicos puede resultar muy útil

- como monitores de las labores de rehabilitación de suelos
- como indicadores del efecto de los procesos de contaminación de suelos, sobre todo con metales pesados
- como indicadores de los efectos a largo plazo de diferentes usos agronómicos del suelo como tipos de cultivos, técnicas de laboreo, rotación de cultivos, abonos verdes incorporación de residuos o tipos de fertilización
- queda como reto, la estandarización de sus metodologías dentro de la perspectiva global de estandarización de las metodologías de muestreo y análisis de suelos que está llevando a cabo la International Standardisation Organisation (ISO), lo que les permitiría ser introducidos como aceptables indicadores de la calidad del suelo (Nortcliff, 2002), así como la definición de sus valores críticos para los agrosistemas (Arshad y Martin, 2002).

## 2.5. LOS ENZIMAS DEL SUELO

Los enzimas del suelo constituyen la principal herramientas que usa el componente biológico para el desarrollo de sus actividades, procesos y funciones: descomposición de MOE, y neoformación de MOS, (Burns, 1983; Sinsabaugh *et al.*, 1991), reciclado de nutrientes inorgánicos (Dick, 1994) y orgánicos, nutrición, mantenimiento y crecimiento de su biomasa microbiana/vegetal y de su actividad, generación de complejos organominerales, estabilización de la estructura agregacional, y detoxificación de compuestos orgánicos (Dick, 1994, 1997; Tabatabai, 1994).

Sus niveles de actividad varían en cada suelo en función de la cantidad de MO presente, de su composición y accesibilidad, siendo la actividad de microorganismos quien condiciona intensidad de los procesos biológicos y su metabolismo en el suelo (Stevenson y Cole, 1986; Stevenson, 1994).

Como catalizadores, su presencia y actividades concretas se acomodan a la estacionalidad climática y a los ritmos biológicos de los seres que conforman cada edafosfera (Stevenson y Cole, 1986; Stevenson, 1994). Se refuerzan con las excreciones animales (superiores y edafofauna), la biosíntesis de enzimas de excreción y/o la lisis celular microbiológica/vegetal/animal (Kanfer *et al.*, 1974; McLaren, 1975; Hans y Snivasan, 1969; Shawale y Sadana, 1981; Dick y Tabatabai, 1984,1992; James *et al.*, 1991; Richmond, 1991). Finalmente se someten a procesos de regulación metabólica (propios de un sistema integrado, como es el que se presenta en cada edafogenia (Khaziyev y Gülke, 1991).

Tradicionalmente, la cuantificación de la actividad enzimática en suelos se ha realizado recurriendo a sustratos artificiales, especialmente en el caso de enzimas hidrolíticas. Dichos sustratos, estructuralmente similares a los sustratos naturales, ofrecen la ventaja de permitir una rápida determinación de sus productos de reacción, lo que permite cuantificar de forma precisa la velocidad de la reacción enzimática.

Desde que Tabatabai y Bremner, (1969) propusieran el uso del *p*-nitrofenilfosfato para el análisis de fosfomonoesterasas, en enzimología del suelo se ha generalizado el uso de *p*-nitrofenil derivados como sustratos artificiales, dada la facilidad de extracción del suelo del producto de la hidrólisis, el *p*-nitrofenol, su alta absorbancia a 410 nm y su estabilidad en medio básico, lo que permite una buena determinación espectrofotométrica.

A lo largo del desarrollo de la enzimología en suelos, se han desarrollado de esta forma protocolos para la determinación de fosfomonoesterasas ácida o alcalina (Eivazi y Tabatabai, 1977), fosfodiesterasa (Browman y Tabatabai, 1978), arilsulfatasa (Tabatabai y Bremner, 1970 a y b),  $\beta$ -glucosidasas,  $\beta$ -xilosidasas y  $\beta$ -galactosidasas (Eivazi y Tabatabai, 1977,1988), N-Acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (Parham y Deng, 2000) y arilesterasas (Zornoza *et al.*, 2009).

Sin embargo, la determinación de las actividades enzimáticas por estas metodologías tradicionales implica operaciones de pesado de un número elevado de muestras de suelo, la adición de reactivos, su incubación, la filtración de las muestras y posterior dilución, lo que supone el empleo de tiempos de proceso elevados, un alto consumo de reactivos y sustratos y la necesidad de cantidades importantes de suelo, lo que restringe notablemente su aplicación como monitores ambientales.

La miniaturización de estos ensayos en un formato de microplacas de 96-pocillos y el uso de sustratos fluorescentes derivados de la 4-metil-umbeliferona (MUB) o la 7-amino-4-metil-cumarina (AMC), han supuesto un notable avance en el procesado simultáneo de un número importante de muestras y en la determinación de un conjunto relevante de actividades enzimáticas.

La metodología fue inicialmente desarrollada para el análisis enzimático en estudios ecológicos sobre muestras naturales de agua (Hoppe, 1983), siendo posteriormente adaptada a la determinación de enzimas hidrolíticos en muestras de suelo (Darrah y Harris, 1986; Jordan y Kremer, 1994; Freeman *et al.*, 1995). Tras su adaptación al formato de microplacas de 96 pocillos (Marx *et al.*, 2001), actualmente su uso se encuentra bastante generalizado en numerosos estudios ecológicos y bajo una amplia gama de condiciones (Saiya-Cork *et al.*, 2002; Marx *et al.*, 2005; Grandy *et al.*, 2007; Allison y Jastrow, 2006; DeForest, 2009).

Si bien el uso de derivados de MUB o AMC supone una notable mejora en los límites de detección del ensayo (Drouillon y Mercks, 2005), la técnica también presenta algunos inconvenientes que han de ser resueltos antes de proceder a su generalización. Uno de ellos es el apagamiento de la fluorescencia de la metil-umbeliferona que ejerce la suspensión del suelo y que puede alcanzar valores del 60% de la fluorescencia en solución, algo que depende de las características del suelo (Freeman *et al.*, 1995).

Otro problema es que la MUB y la AMC presentan sus máximos de fluorescencia a valores de pH alcalinos y que en esas condiciones la estabilidad de la señal fluorescente disminuye con el tiempo.

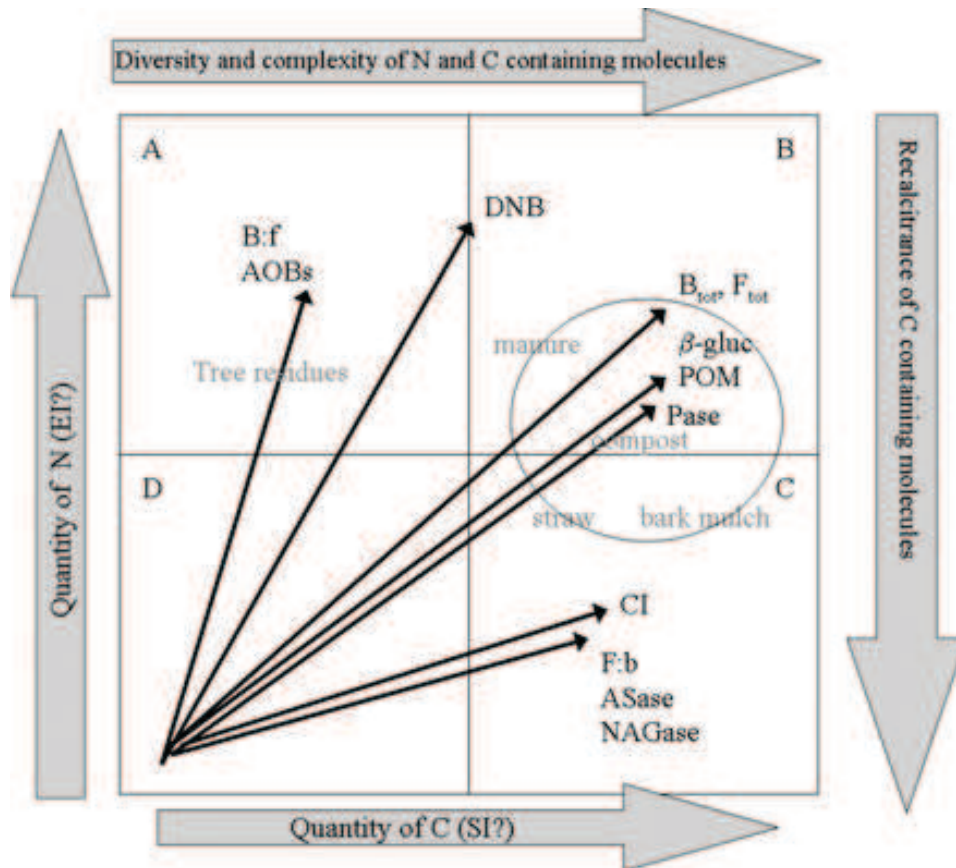
A estos problemas se suman otros de índole más práctico, como que el suelo se introduce mediante el pipeteo de una suspensión diluida del mismo, lo que plantea problemas de homogeneidad dependiendo de su textura, del estado organizativo y composición de la MO y de la forma de lograr una suspensión estable, la insolubilidad e inestabilidad de algunos substratos dependiendo de la fuerza iónica y el pH del medio de incubación, lo que inevitablemente conduce a la obtención de una mayor variabilidad en los resultados (DeForest, 2009).

A pesar de todo ello, existe un progresivo uso de esta técnica, lo cual no va en detrimento de la metodología tradicional, sino que supone una cierta complementariedad entre ambas, si bien es necesaria una precisa y correcta puesta a punto de la metodología de forma que se obtengan resultados homogéneos y comparables para un número elevado de suelos (German *et al.*, 2011). Todo ello contribuirá a una generalización mayor de estos análisis cuya significación y normalización todavía es notablemente inferior a los ensayos tradicionales, contribuyendo con un porcentaje todavía bajo a los estudios de enzimología del suelo (Nannipieri *et al.*, 2003).

Una mejor comprensión del papel de la actividad de estas enzimas edáficas en el ecosistema nos la proporciona, como oportunidad única, la evaluación metabólica integrada de cada edafosistema, por su facilidad de medición, y las respuestas rápidas de aquellas a los cambios en las prácticas de manejo del suelo (Dick, 1994; Bandick y Dick, 1999) y al estrés ambiental (Dick, 1997; Yakovchenko *et al.*, 1996).

En relación a los suelos Ferris *et al.*, (2001), establecen un marco conceptual en relación con el modelo de perfil nematológico que permite determinar el estado de salud de los suelos en su marco de evolución potencial. Ferris *et al.*, (2001), sugirieron ejemplos de ecosistemas asociados a cada cuadrante.

El punto "basal", situado en la esquina inferior izquierda del cuadrante D en la Fig. 2.19, es representativo de los sistemas que están estresados, con los recursos agotados y una red alimentaria degradada. Cuando se trabaja hacia la derecha a partir de este punto, los sistemas se enriquecen, con materiales orgánicos cuya relación C/N son bajas y redes alimentarias maduras.



**Figura 2.19.-** Marco conceptual en relación con el modelo perfil nematológico de fauna propuesta por Ferris *et al.*, (2001) para las propiedades biológicas del suelo y el rendimiento hortícola con sistemas de gestión del suelo de frutales. b o B, las bacterias, donde son menores las cantidades relativas (b) respecto de las más elevadas (B); el mismo criterio para hongos (f o F), AOB, (bacterias oxidantes del amoníaco); DNB (bacterias desnitrificantes),  $\beta$ -glucosidasa ( $\beta$ -gluc), fosfatasa (Pase); arilsulfatasa (Asase); N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (NAGase), materia orgánica particulada (POM), índice de estructura (SI), índice de enriquecimiento (IE); índice de canales para nematodos (IC).

Moviéndose a lo largo del eje x, aparecen sistemas de transición desde el dominio bacteriano al fúngico. Los sistemas dominados por bacterívoros se encuentran en la parte superior izquierda cuadrante (A), mientras que los fungívoros se encuentran más frecuentemente en los dos cuadrantes inferiores (C y D). Colocan los cultivos anuales convencionales en el cuadrante inferior izquierdo (D); las praderas o pastizales manejados y orgánicos cultivos anuales en los cuadrantes A y B; sistemas naturales no perturbados en cuadrante C, y los cultivos perennes en los cuadrantes B o C, dependiendo de la dirección (Fig. 2.19).

Para ayudar a determinar cuál de las propiedades del suelo que estamos controlando son las más sensibles a las prácticas OPM, se amplió el modelo de Ferris et al. (2001) para incluir la hipótesis de la dinámica de la población microbiana y su actividades cluster (Fig. 2.19).



Al incorporar las posibles respuestas de las poblaciones microbianas del suelo (representado por las cinco actividades enzimáticas y biomarcadores moleculares) a la calidad y cantidad de C y N compuestos (como se indica en POM-C, N-POM, POM y las relaciones C a N) proporcionados por mantillos, estiércol, compost, abonos verdes, o paja utilizados en un "enfoque sistémico" para la gestión huerto. El área encerrada en la Fig. 2.19. es el área selectiva propuesta para un sistema de gestión óptima dados los parámetros de prueba seleccionados.

En esta hipótesis, dentro de los huertos cultivados con cerezos, que dependen de fertilizantes sintéticos y residuos orgánicos suministrados exclusivamente por la caída de las hojas (residuos forestales) se caracterizarán por un bajo valor del índice de estructura, una diversidad biológica baja, que está acompañada de una baja complejidad de las moléculas portadoras del N y del C. Por lo tanto se encontrará dominado por el componente bacteriano (y, consecuentemente presentarán una mayor población de nematodos bacteriófagos) con actividades enzimáticas relativas más bajas.

Ello contrasta con un sistema agregado con materiales orgánicos mas complejos, tales como corteza de madera, paja o compost, mas compatible con la nutrición de las poblaciones fúngicas (dominantes) y por ende de hongos que alimentan a las poblaciones de nematodos. Las fosfatasas han demostrado ser más prevalente en las reacciones de MOP (materia orgánica particulada).

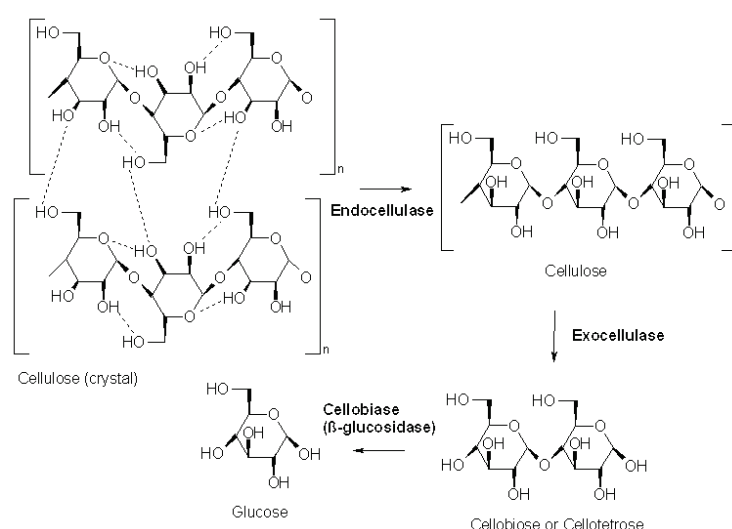
Aunque hay disponibles amplias revisiones sobre los enzimas del suelo (Ross, 1976; Perucci y Scarponi, 1984; Wirth y Wolf, 1992; Lizararo *et al.*, 2005; Mungai *et al.*, 2005; Makoi y Ndakidemi, 2008) poco se ha informado sobre su papel en el desarrollo de su actividad sobre el control y muerte los nemátodos fitoparásitos, que convierte a los suelos, en supresores de determinadas enfermedades vegetales, como es el caso que nos ocupa en este trabajo de Tesis Doctoral.

### 2.5.1. Selección de actividades enzimáticas relacionadas con la evolución de los suelos y la mortalidad de los nematodos

En los suelos estos enzimas son de interés común a todos los seres vivos, al participar en muchos procesos naturales como la degradación de biomasa, la defensa contra las bacterias, los mecanismos de patogénesis y en el normal funcionamiento celular. En bacterias y células procariotas, se encuentran tanto en forma de enzimas intracelulares como de extracelulares, estando muy involucradas en el proceso de liberación / adquisición de nutrientes.

La celulosa se compone de polímeros lineares de  $\beta$ - glucosa unidas por enlaces  $\beta 1 \rightarrow 4$ . Dentro del proceso general de hidrólisis interesa ubicar las agrupaciones de celulasas, en base al tipo de reacción que catalizan:

- Endocelulasas (EC 3.2.1.4), actúan sobre ámbitos amorfos internos de estructuras celulósicas hidrolizando enlaces osídicos y creando nuevas cadenas y más cortas del polisacárido.
- Exocelulasas (EC 3.2.1.91), liberan tetrasacáridos o disacáridos (celobiosa) de los ámbitos terminales de las fibras fragmentadas por la acción de las endocelulasas.  
Hay dos tipos principales de exocelulasas [o celobiohidrolasas (CBH)] – CBH I que actúan procesando el terminal reductor y CBHII que lo hacen procesando el extremo no reductor.
- Celobiasa (EC 3.2.1.21), o  $\beta$ -glucosidasa que hidroliza los productos de la hidrólisis de las exocelulasas hasta monosacáridos individuales. (Fig. 2.20)



**Figura 2.20.-** Secuencia de degradación enzimática de la celulosa (Turner *et al.*, 2002)

Turner *et al.*, (2002) nos indican que entre los enzimas que participan en la degradación de la MO son de particular interés: la celobiohidrolasa (EC 3.1.2.91) y la  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21).

Dentro de las **celobiohidrolasas**, se distinguen dos tipos: celobiohidrolasas de tipo I (CBH I) y celobiohidrolasas de tipo II (CBH II), que se diferencian en su especificidad por el extremo de la molécula de celulosa que atacan. Mientras las CBH I actúan sobre los extremos reductores, las CBH II liberan unidades de celobiosa a partir de los extremos no reductores. La EC 3.2.1.176 eleva su nivel de actividad con el incremento de CO<sub>2</sub> en el suelo (Mayr *et al.*, 1999), (Fig 2.20).

La  **$\beta$  Glucosidasa** (EC 3.2.1.21), actúa sobre enlaces  $\beta$ 1→4 que unen dos moléculas de glucosa (celobiosa) o glucosa-sustituidos. Se trata de una exocelulasa común y predominante en suelos (Eivazi y Tabatabai, 1988; Tabatabai, 1994) con baja especificidad, pues actúa sobre una variada gama de  $\beta$ -D-glucósidos y aborda su hidrólisis por los terminales no reductores con la liberación de glucosa (Jeng *et al.*, 2010).

En el caso más familiar, este tipo de celulasas se produce principalmente por la simbiosis entre las bacterias que colonizan el estómago de los herbívoros rumiantes. Allí, en el suelo o en sus biofilms, muchas bacterias organizan el complejo celulolítico en celulosomas. En su seno, aunque coexistan otras subunidades enzimáticas, únicamente se hidrolizan enlaces  $\beta$  (1→4) mediante endocelulasas y celobiohidrolasas. Dentro de los tipos de proceso celulolítico intervienen celulasas progresivas (solo procesan las fibras de celulosa de una en una) y no progresivas (interactuarán con distintas cadenas de polisacáridos, saltando de una a otra). El resto de los animales (incluidos los humanos) no producen celulasa intestinal y sólo pueden degradar la celulosa parcialmente a través de la fermentación.

Las celulasas fúngicas tienen una estructura de dos dominios, uno catalítico y otro de unión a celulosa, que están conectados entre si por un enlazador flexible. Esta estructura está adaptada para trabajar en un sustrato insoluble, y permite al enzima difundirse sobre una superficie en dos dimensiones, de manera similar al movimiento de la oruga. Sin embargo, hay también celulasas (principalmente endoglucanasas) que carecen de dominios de unión a celulosa.

En el suelo este enzima puede estar desligado del resto del complejo celulolítico (ubicado en la detritusfera). Al aparecer se asocia más a la rizosfera, donde su funcionalidad se acopla a la necesidad energética de las bacterias para liberar los nutrientes precisos para los vegetales (Esen, 1993; Tabatabai, 1994).

También puede actuar como bactericida frente a fitopatógenos. En este sentido, no nos conviene olvidar que la lisozima, (otra  $\beta$ -D-glucosidasa bactericida), presente en las lágrimas, escinde enlaces  $\beta 1 \rightarrow 4$  entre los ácidos la N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina y N-acetil-murámico dentro de los peptidoglicanos de las paredes celulares de bacterias gram-negativas, evitando de esta forma infecciones oculares.

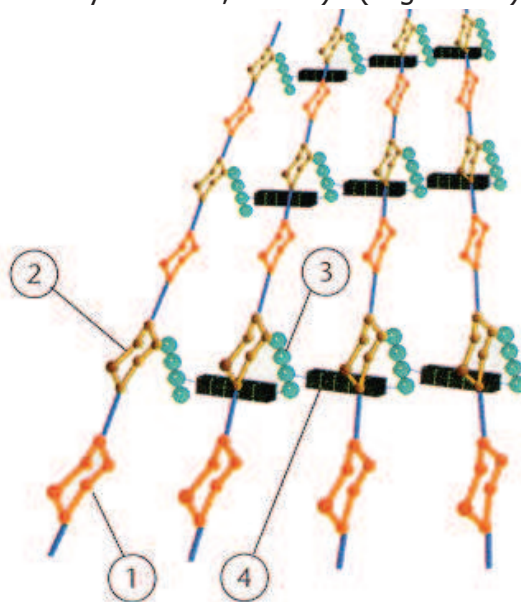
La actividad  $\beta$ -glucosidasa se utiliza como un indicador sensible de los cambios en la calidad del suelo y de su fertilidad en los estudios de rotación de cultivos (Dick *et al.*, 1996; Kuperman y Carreiro, 1997; Bergstrom *et al.*, 1998; Bandick y Dick, 1999; Leirós *et al.*, 1999; Ndiaye *et al.*, 2000; Acosta-Martínez y Tabatabai, 2000; Acosta-Martínez *et al.*, 2004; Madejon *et al.*, 2001).

En este sentido, la actividad  $\beta$ -glucosidasa puede ser inhibida por un variado número de metales con potencialidad tóxica (Haanstra y Doelman, 1991; Deng y Tabatabai, 1994, 1995; Wenzel *et al.*, 1995) limitando la descomposición de los restos vegetales, y se obtiene una información indirecta sobre el grado de contaminación y de los cambios ecológicos resultantes de la acidificación del suelo que pueden justificar la entrada en solución de aquellos (Watson *et al.*, 1976; Geiger *et al.*, 1993).

Esta enzima también juega un papel importante en los suelos al implicarse en la hidrólisis y biodegradación de otros  $\beta$ -glucósidos acetil derivados. Por ejemplo, algunos de los agliconas se sabe que son los precursores de sustancias tóxicas que causan la enfermedad del suelo donde las plantas han sido generadas como monocultivos (Patrick, 1955; Borner, 1958). Muchos componentes de paredes y membranas vegetales, y animales, bacterias y hongos (fito-patógenos o no) tienen glúcidos acetilados en su composición. La información asociada a los ritmos de degradación y síntesis de estas estructuras contribuye al conocimiento de la salud del suelo (Davis *et al.*, 1953; Sherrod y Domsch, 1970; Melouk y Horner, 1973; Ajwa y Tabatabai, 1994; Martínez *et al.*, 2005, Martínez y Tabatabai, 1997; Bandick y Dick, 1999; Makoi y Ndakidemi, 2008).

La actividad "actual" proporciona evidencias avanzadas del estado de los cambios que sufren las cadenas alifáticas largas, antes de que puedan medirse con precisión por otros métodos de rutina (Dick, 1994; Dick *et al.*, 1996; Wick *et al.*, 1998) lo cual pudiera tener interés en la lucha contra los nematodos y en poner en evidencia cambios cuantitativos en determinados grupos de hongos y bacterias del suelo.

La  **$\beta$ -galactosidasa** (EC 3.2.1.23), es una Zn proteína que hidroliza residuos terminales no reductores de  $\beta$ -D-galactosa en  $\beta$ -D-1,4 D-galactósidos (de lactosa), glucosaminoglicanos glicoproteínas y gangliósidos. Ampliamente distribuida en la naturaleza en distintos tipos de microorganismos, y tejidos vegetales y animales, hoy se investiga para usos alimentarios (Eliwa y El-Hofi, 2010). (Fig. 2.21).



**Figura 2.21.-** Ejemplo de estructura de un peptidoglucano (gangliósido). Las cadenas glucídicas se forman por la repetición alternativa de aminoazúcares NAG (1) y NAM (2). Cada molécula de NAM está unida a una pequeña cadena formada por cuatro aminoácidos (tetrapéptido) (3); a su vez, los tetrapéptidos de las cadenas vecinas se unen entre sí mediante puentes transversales, formada por otros péptidos y constituidos por la repetición de cinco aminoácidos de glicina (penta glicina).

Los sustratos vegetales sobre los que puede actuar en el suelo se resumen a continuación: Homo (poli) galacturonanos ácidos (PGA) polímero lineal del ácido  $\alpha$ -1,4 galacturónico, Ramnogalacturonanos ácidos tipo I (RG I) cadena principal de [ $\alpha$ -1,2 ácido galacturónico- $\alpha$ 1,4 ramnosa] unida a cadenas laterales del oligoglicósidos, compuestas por arabinosa y galactosa unidas a la posición C4 de una ramnosa y Ramnogalacturonanos ácidos tipo II (RG II) polímero del ácido  $\alpha$  1.4 galacturónico muy sustituido, con cadenas laterales de oligoglicósidos (al menos 11 azúcares distintos, arabinosa, ramnosa, fucosa, galactosa y apiosa entre otros).

Las  $\beta$ -galactosidasas son muy sensibles a los cambios de pH y a las prácticas de manejo del suelo desempeñan un papel clave en la obtención de energía por los microorganismos. (Dick, 1994, 1997; Leirós *et al.*, 1999; Bandick y Dick, 1999; Acosta-Martínez y Tabatabai 2000).

La actividad del enzima  $\beta$ -galactosidasa, es sensible e indicador de la presencia de contaminantes (Conesa *et al.*, 2007) en el suelo. Aparece como componente de los rizodepósitos (Duineveld *et al.*, 1998), y en menor medida en los suelos contaminados no alcalinos.

En microcosmos contaminados con Zn las actividades  $\beta$ -galactosidasa, nitrato reductasa y la denitrificación potencial, están asociadas en un proceso natural de restauración (por quelación o volatilización) que permite transformar al metal tóxico en formas no tóxicas (Cattani *et al.*, 2008; Rinklebe *et al.*, 2010). De esta forma, resistencia (cambios genéticos que permiten a una especie sobrevivir a la exposición de un tóxico) (Klers y Weis, 1987) y tolerancia (capacidad de una población a sobrevivir y persistir en una ambiente contaminado) (Blanck *et al.*, 1988) estarían unidos en el suelo (Trevisan *et al.*, 2012).

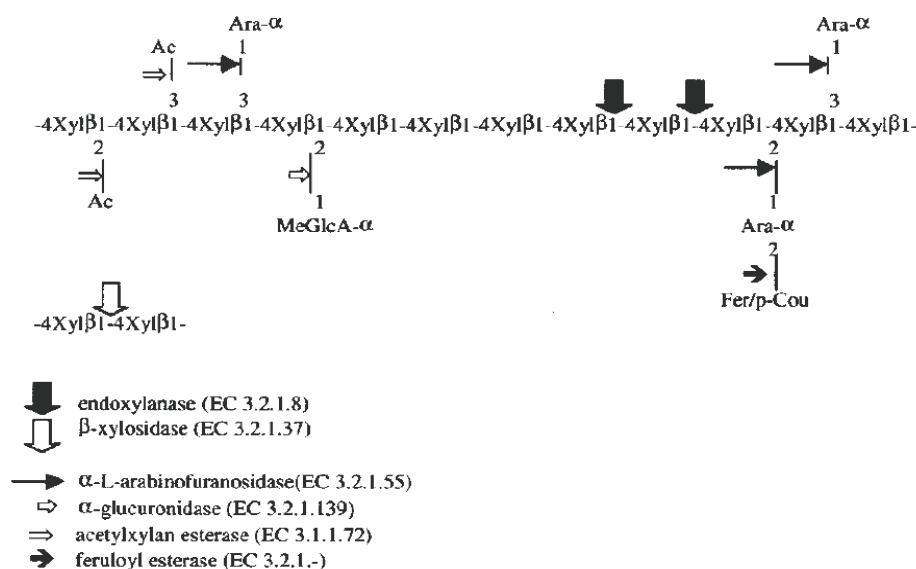
El gen *unc-22* forma parte de un conjunto de genes que afectan a la estructura y función muscular del nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans*. Un anticuerpo policlonal producido contra una cepa de *E. coli* (una proteína de fusión  $\beta$ -galactosidasa-*unc-22*) reconoce a un polipéptido (500 - 600 Kd) del extracto del músculo intestinal del nematodo. La interacción con la miosina del nematodo regula su función y paraliza al animal. En su intestino las bacterias que lo producen, matan al animal al organizarse en biofilm, y si cuenta con un número suficiente permite desarrollar su virulencia (Köthe *et al.*, 2003).

Las  $\beta$  **xilosidasas** (exo 1,4- $\beta$ -D-xilano-xilosidasa, EC 3.2.1.37), catalizan la liberación de xilosa a partir de los extremos no reductores de los xilooligosacáridos generados por las endo-xilanasas (Cleemput *et al.*, 1997; Aro *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2002). La degradación de la hemicelulosa requiere enzimas accesorias como las xilano esterasas, ferúlico y coumárico esterasas,  $\alpha$ -arabinofuranosidasas y  $\alpha$ -4-metil glucuronosidasas, entre otras, que actúan de manera sinérgica para hidrolizar eficientemente la hemicelulosa (Sánchez, 2009).

El xilano es el componente más abundante en la hemicelulosa (constituye más del 70% de su composición) y está formado por la unión  $\beta$ -1,4 de unidades de D-xilosa. Es un polímero complejo de heteropolisacáridos, formado principalmente por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) usualmente acetiladas, que forman cadenas ramificadas, además de los azúcares ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, unidos por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 y ocasionalmente por enlaces  $\beta$ -1,3. Se clasifican en xilanos, xiloglucanos, mananos, glucomananos y glucanos unidos por enlaces  $\beta$ -1,3 o  $\beta$ -1,4. Pueden tener diversas sustituciones, y

originar los arabinoxilanos (si contienen arabinosa) presentes en los pastos, o los glucuronoxilanos y glucurono-arabino-xilanos (si contienen residuos de glucosa y glucosa-arabinosa, respectivamente) que son los principales componentes de la pared secundaria de las plantas.

En contraste con la celulosa, la hemicelulosa posee ramificaciones laterales cortas formadas de distintos azúcares que la hacen menos recalcitrante (Fig. 2.22) (Pérez *et al.*, 2002).



**Figura 2.22.-** Composición de Xilano-derivados y enzimas implicados en su degradación por nematodos, en el momento de la penetración sobre el vegetal (Biely, 1985; Coughlan y Hazlewood, 1993)

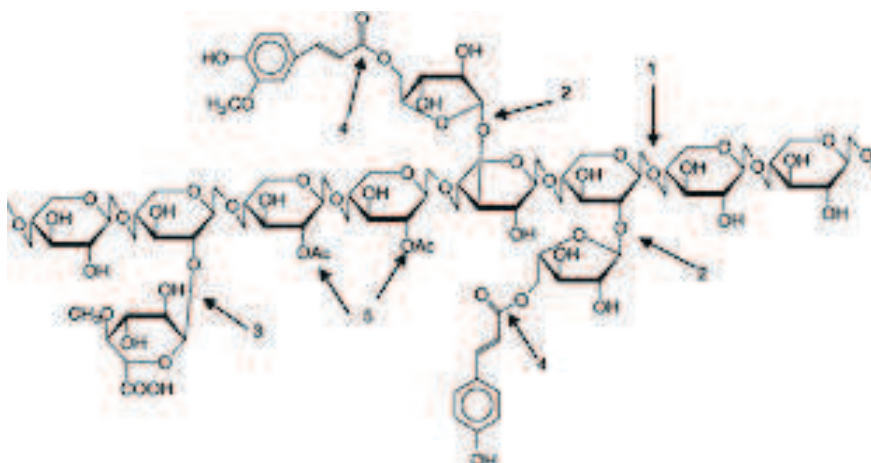
Aunque las xilanasas son generadas edafobiológicamente por una amplia gama de organismos (algas, protozoos, gasterópodos y artrópodos), la información disponible sobre sus propiedades se deriva casi exclusivamente de estudios con enzimas bacterianas y fúngicas (Chi *et al.*, 2009). Las xilanasas microbianas están conformadas por una sola subunidad proteica con masas moleculares de entre 8 y 145 kDa. Aunque son estables en un amplio intervalo de pH (3-10), muestran un óptimo de actividad en el intervalo entre 4 y 7. Las xilanasas fúngicas presentan óptimos de pH entre 2 y 6. Las bacterias son conocidas por producir dos xilanasas: i) xilanasas ácidas de alta masa molecular, ii) xilanasas básicas bajo peso molecular.

Las xilanasas, como otras enzimas celulolíticas, poseen una estructura en base a dominios catalíticos y de unión. El primero determina la especificidad y reactividad sobre el sustrato, mientras que el segundo dominio favorece la unión del enzima al sustrato (Pérez *et al.*, 2002). En diversas especies de *Aspergillus* se han clonado genes que codifican endoxilanasas y β-xilosidasas; también se han clonado genes de

xilanasas de hongos como *Penicillium*, *Agaricus bisporus* y *Magnaporthe grisea* (Polizeli *et al.*, 2005; Kimura *et al.*, 1995).

Las expansinas (enzimas responsables de ruptura de puentes de hidrógeno), se han relacionado con procesos de desarrollo en los que ocurre un relajamiento de la pared celular, como la maduración de frutos, la formación del xilema, la abscisión del desarrollo de plantas parásitas, la germinación de semillas, la penetración del tubo polínico a través del estigma, la formación de asociaciones tipo micorriza con hongos simbioses en raíces, el desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno en leguminosas, el desarrollo de plantas parásitas, y la rehidratación de la planta de resurrección *Craterostigma plantagineum*, que se curva cuando se seca y se expande cuando se hidrata (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011). En el nematodo *G. rostochiensis* que infecta la patata, se han encontrado algunos miembros de la superfamilia expansina, que favorecen el proceso de infección (Li *et al.*, 2002; Sampedro *et al.*, 2006; Kudla *et al.*, 2006).

El gen Gus 1 codifica una hidrolasa, la glucuronidasa, que degrada glicosaminoglicanos, incluyendo el sulfato de heparina, sulfato de dermatán, y condroitín-4,6-sulfato (Fig 2.23). **La  $\beta$ -glucuronidasa** EC 3.2.1.31, forma un homotetrámero que se localiza en el lisosoma en *G. rostochiensis*



**Figura 2.23.-** Ejemplo de glucosamina glicano (condroitina)

La muerte del animal, por pérdida de la impermeabilidad de la cutícula, se contrasta con el procedimiento de tinción, método que tiene como valor añadido la capacidad de detectar las formas hermafroditas de *C. elegans* y mostrar que en su útero retienen los huevos fertilizados.

Los huevos de *G. rostochiensis* están protegidos del ambiente por una membrana vitelina y una cubierta quitinosa. Se ha encontrado que un



tratamiento corto con el detergente iónico SDS (dodecil sulfato de sodio), aunque mata al adulto, permeabiliza a los gusanos sin inactivar al enzima y sin matar a los embriones.

Cuando a estos gusanos así permeabilizados se les incuban, su actividad  $\beta$ -glucuronidasa se reduce drásticamente o se hace indetectable, (menos de 0,2% de la de tipo salvaje), aunque no otros enzimas como la  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucosidasa,  $\alpha$ -y  $\beta$ -galactosidasa y una  $\alpha$ -fucosidasa.

En esta situación, los hongos degradan los polisacáridos que contienen residuos de ácido glucurónico o galacturónico (Kitamoto *et al.*, 2001; Kuroyama *et al.*, 2001), pero sus enzimas no pueden escindir los glucurónidos de manera eficiente debido a la distinta composición y configuración química de los residuos no azucarados de los glucurónidos (Sutherland, 1995; Kuroyama *et al.*, 2001).

Posiblemente los hongos pueden utilizar el resto de ácido glucurónico de los glucurónidos como un fuente de C, al ser capaces de metabolizar ácido galacturónico, un epímero del ácido glucurónico (Nakagawa *et al.*, 2000; Alves de Cunha *et al.*, 2003).

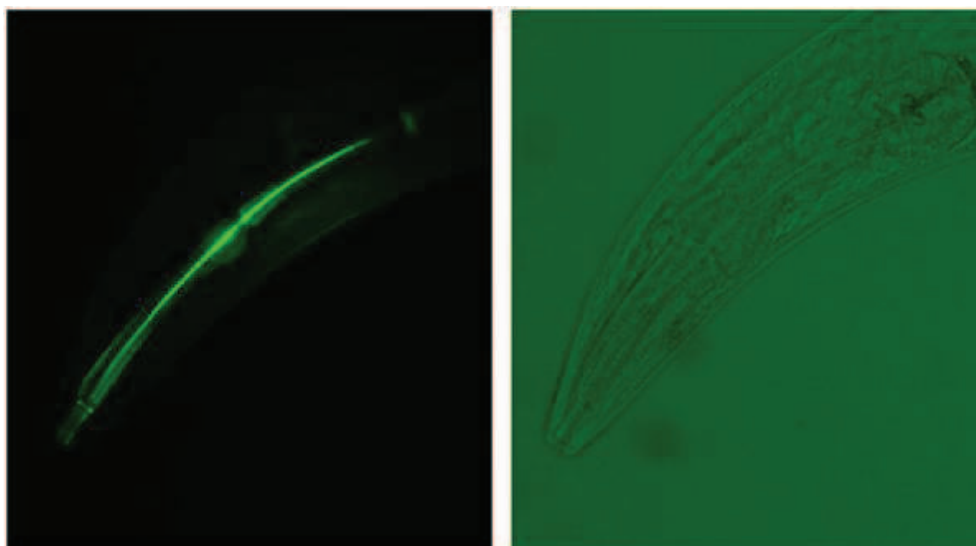
**N-acetil  $\beta$ -D-Glucosaminidasa (EC 3.1.1.30)**, también agrupa a la  $\beta$ -hexosaminidasa (EC 3.2.1.52).

Al igual que el xilano, la quitina (polímero de la  $\beta$ -1,4-N-acetilglucosamina) es otro de los compuestos más abundantes del planeta y se encuentra relacionado con protección y resistencia en animales inferiores como crustáceos, zooplancton y fitoplancton y hongos con excepción de los oomicetos. A *Globodera* le proporciona su revestimiento faríngeo y a la cáscara de sus huevos, integridad estructural (Cronin *et al.*, 1997).

Adicionalmente es uno de los polisacáridos más insolubles que existen y se encuentra en diferentes formas:  $\alpha$ -quitina,  $\beta$ -quitina y  $\gamma$ -quitina (Yoon *et al.*, 2000; Sastoque, 2005). Se sintetiza en los nematodos, pero no en las plantas y vertebrados, que a menudo son anfitriones de nematodos parásitos, por lo que la vía de metabolismo de la quitina se considera una diana potencial para intervenciones selectivas (Fig. 2.25).

Dado que la ultraestructura e histoquímica de la cáscara de huevo de *G. rostochiensis* muestra una capa exterior vitelina (que no es una unidad de tipo membrana pues tiene hebras de material particulado unido a su superficie exterior), una capa quitinosa (conformada por fibras: núcleo de microfibrillas de quitina, rodeado por una capa protéica) y una capa lipídica interna (conformada por dos o tres capas de lipoproteínas (Perry

*et al.*, 1982)), el estudio de la actividad N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa cobra un especial interés a la hora de la eclosión natural o forzada de los huevos.



**Figura 2.25-** Áreas diana de la acción enzimática

También se considera un componente estructural de muchas paredes fúngicas, que utilizan el hiperparasitismo como un mecanismo contra plagas y el ataque de patógenos (Bartinicki-García, 1968; Chet y Henis, 1969, 1975; Chet, 1987). Estos componentes edafo-biológicos también reducen enfermedades vegetales mediante el uso de otros mecanismos no enzimáticos tales como la antibiosis o la competencia (Park, 1960).

La N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa cataliza la hidrólisis de residuos de N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina presentes en el extremo terminal no reductor de los quitooligosacáridos (Deshpande, 1986; Parham y Deng, 2000). Esta hidrólisis, se considera importante en los ciclos del C y del N porque participa en el proceso por el que la quitina se convierte en aminoazúcares, gran fuente de C y de N fácilmente mineralizable en suelos húmedos (Stevenson, 1994; Ekenler y Tabatabai, 2002). En los actinomicetos, específicamente en *Streptomyces* se han descrito muchas quitinasas, tanto endo como exocelulares. Algunos como *S. lividans* presentan hasta tres isoenzimas diferentes capaces de hidrolizar otros tantos tipos naturales de quitina (Yoon *et al.*, 2000).

En suelos, la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa se correlaciona con sistemas dominados por hongos (Miller *et al.*, 1998), habiendo sido propuesta como un indicador indirecto de la actividad fúngica (Bandick y Dick, 1999; Parham y Deng, 2000), la existencia de sucesiones fúngicas en un suelo determinado (Dodor y Tabatabai, 2002; Ekenler y Tabatabai, 2002), e indicador indirecto de su actividad, al permitir la evaluación de

los ácidos grasos de membrana (Parham y Deng, 2000; Acosta-Martínez *et al.*, 2004).

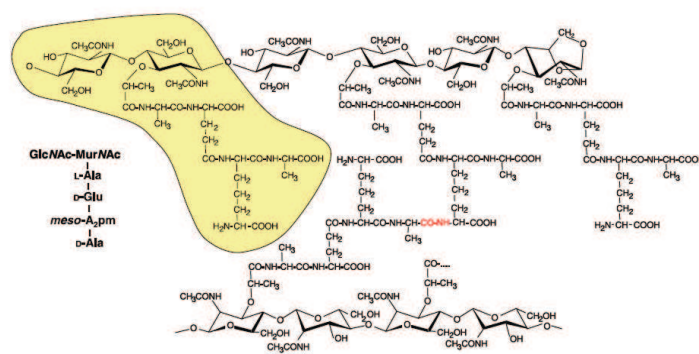
La actividad N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa de origen vegetal es uno de los mecanismos propuestos (no el único), que causan la degradación de las paredes celulares de hongos patógenos (Sneh, 1981; Elad *et al.*, 1980,1982; Hadar *et al.*, 1983; Ordentlich *et al.*, 1988; Chet *et al.*, 1990; Singh *et al.*, 1999), lo que justifica que estas plantas induzcan la síntesis de quitinasa y/o la acumulen/excreten como una respuesta defensiva frente a infecciones de aquellos. Su presencia en diferentes formas en el ecosistema ha demostrado su eficacia en el control de las enfermedades transmitidas por el suelo tales como *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani* en frijol y algodón (Ordentlich *et al.*, 1988; Shapira *et al.*, 1989).

Dado que la quitinasa comercial purificada es activa "in vitro" frente a los huevos de quiste de *G.rostochiensis*, un aspecto de interés, se ha centrado en conocer la capacidad de las bacterias del suelo para producir este enzima y establecer un nuevo criterio de supresividad edáfica de origen bacteriano. Solo un 4,1% de las mismas, aisladas en rizosferas ya infestados por *Globodera* spp. entre las que se encuentran una cepa de *Stenotrophomonas maltophilia* y una segunda de un *Chromobacterium* spp. las cuales eran capaces de afectar en un 90% al poro del huevo, inhibiendo su eclosión, de forma muy eficaz. Como consecuencia, la inhibición de la eclosión de los huevos de *G. rostochiensis* por quitinasa bacteriana se sugiere como una estrategia de control biológico para la defensa del cultivos de la patata frente al quiste de nematodos.

En hongos ectomicorrícicos existe un control de la síntesis de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (Bidochka y Khachatourians 1993) que quizás se comporta como una herramienta defensiva frente a la penetración de los nemátodos fitoparásitos. En el citoplasma y núcleo de las células este enzima, está involucrada en la liberación de grupos N-acetil-glucosamina desde los residuos de serina y treonina. Y es, un nuevo aspecto del mismo problema que permite aunar situaciones, al asociar la presencia y el potencial degradativo que proporcionan los peptidoglicanos.

Los peptidoglicanos (mureinas) ubicados en el espacio periplásmico, constituyen el componente principal, específico y esencial de la pared celular bacteriana. Determinan la forma celular y confieren resistencia frente a la presión de turgor (Weidel y Pelzer, 1964; Rogers *et al.*, 1980; Park, 1996; Nanninga, 1998; Mengin-Lecreulx y Lemaitre, 2005). La red del peptidoglicano consiste en fibras de glicano configuradas, de forma alternativa, por residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) 2 y N-

acetilmurámico (MurNAc) estableciendo una redícula con péptidos cortos de diferentes composiciones (Vollmer *et al.*, 2008 a y b) (Fig 2.25).



**Fig. 2.25.-** Estructura del pectidoglucano responsable de la resistencia a la presión osmótica de la mayor parte de las bacterias. La parte amarilla representa la subunidad disacárido-tetrapéptido básico (monómero). La parte central muestra un péptido reticulado, que se une con el grupo amida mediante un enlace peptídico (Mengin-Lecreulx y Lemaitre, 2005).

Su presencia se encuentra muy extendida tanto en los nemátodos, como en otros componentes de la edafosfera. (Tabla 2.12)

**Tabla 2.12.-** Ubicación, localización y acción de péptido glicanos en nemátodos.

UBICACIÓN	LOCALIZACIÓN		ACCION
Endógena	Faríngea	Señales facilitadas para el epitelio subyacente; Control longitud/diámetro del filamento de quitina	Morfogénesis de la faringe
		Afecta al reconocimiento del revestimiento faríngeo por otros enzimas	Protección frente a quitinasas exógenas
	Cáscara de huevo	Altera propiedades físicas de las macromoléculas	Remodelación de las cáscara del huevo en la eclosión
	GAGS y otras hexosaminas acetiladas	Afecta a distintos contextos específicos del desarrollo funcional	Morfogénesis
Exógena	Xilanos (huéspedes vegetales)	Permite la penetración en los tejidos del huésped	Virulencia
	GAGS (huéspedes vertebrados)	Permite la penetración en los tejidos del huésped	Virulencia

Las actividades hidrolíticas necesarias para la demolición de la quitina y de los peptidoglicanos son potencialmente letales y por lo tanto muy regulados por mecanismos que permanecen en gran parte desconocida (Vollmer *et al.*, 2008b).

Cuando solo afectan a las bacterias, los enzimas se conocen como autolisinas, ya que contribuyen a la lisis celular en respuesta a varios tipos de estrés. Dos hidrolasas de peptidoglicano, la Mur-1 N-acetilmuramidase y la Mur-2 N-acetilglucosaminidasa, se han descrito en *Enterococcus hirae* ATCC9790, antes llamada *Streptococcus faecalis* o *Streptococcus faecium* (Chu *et al.*, 1992; Dolinger *et al.*, 1989;

Kawamura y Shockman, 1983; Shockman y Cheney, 1969). También, procedente de *E. faecalis* se ha caracterizado una N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa multimodular que requiere un dominio LysM peptidoglicano de unión para su plena actividad (Eckert *et al.*, 2006; Mesnage *et al.*, 2008).

Al parecer, la actividad de las N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasas se corresponde con la definición de enzimas extracelulares (ubicadas en región extracelular definida como el espacio externo a la estructura más exterior de una célula). Cuando las células carecen de estructuras externas de encapsulación o de protección, este espacio se refiere al exterior de la membrana plasmática (Mazurkiewicz-Zapałowicz y Kołodziejczyk, 2009).

En el suelo, las N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasas elevan su nivel de actividad con el incremento de CO<sub>2</sub> en el suelo (Mayr *et al.*, 1999) y su actividad se han demostrado ser más prevalente cuando está incluida en la MOP (materia orgánica particulada) en praderas de pasto (Allison y Jastrow, 2006).

Sus óptimos de pH y la temperatura, como enzima libre, se encuentran en 5,5 y 63°C, respectivamente. El tratamiento de los suelos en autoclave reduce su actividad alrededor del 58% en los suelos secados al aire y el 96% en los suelos de campo húmedo. El secado al aire de las muestras de suelo con la humedad de campo se reduce su actividad entre un 12% y un 22%.

Ni la fumigación con cloroformo, ni el pretratamiento con tolueno afectan significativamente a la actividad de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasas. Con la humectación la actividad de esta enzima aumenta un 20% tras la fumigación o tratamiento con tolueno.

Moore-Kucera *et al.*, (2010), indican que la localización geográfica, la precipitación media anual y la textura del suelo son variables importantes que explican la variabilidad de las actividades enzimáticas  $\beta$ -D-glucosidasa y N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, como consecuencia de la aplicación de diversas enmiendas al suelo.

Entre las hidrolasas también se agrupan unas proteínas enzimáticas llamadas carbohidrato estererasas, que catalizan O y N deacetilaciones de sustratos como el xilano, la quitina y algunos peptidoglicanos.

Las **polisacárido deacetilasas** (PDAs), incluyendo aquellas capaces de convertir quitina en quitosano, existen en protistas, hongos e insectos.

Se demuestra que los genes que codifican a las PDAs se distribuyen por todo el filum *Nematode*, y una de las funciones de PDA en los nematodos pueden ser la desacetilación de la quitina en la mucosa faríngea de los nematodos (Heustis *et al.*, 2012). Las hidrolasas que actúan sobre enlaces glucosídicos de compuestos N-glucosídicos en carbohidratos, glicolípidos y glicoproteínas son glicosidasas de baja especificidad, al no distinguir más que el tipo de enlace (e.g. O- o N-glucosídico) y su configuración ( $\alpha$  o  $\beta$ ).

De la misma forma, en humanos otros enzimas como la PGLYRP-1 que se expresa principalmente en los gránulos de leucocitos polimorfonucleares y las PGLYRP-3 y PGLYRP-4 que se expresan en la piel, ojos, glándulas salivales, garganta, lengua, esófago, estómago, y el intestino, son tres enzimas capaces de matar a las bacterias mediante la interacción con el peptidoglicano de la pared celular, en lugar de actuar sobre las membranas bacterianas como hacen otros péptidos antibacterianos.

Los seres vivos producen una variada gama de enzimas requeridas para el metabolismo de los lípidos. La mayoría de las enzimas lipolíticas que se encuentran en bacterias son carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) y lipasas verdaderas (EC 3.1.1.3) que se clasifican en ocho familias (I a VIII) (Arpigny y Jaeger, 1999). Estas últimas hidrolizan enlaces éster de sustratos lipídicos insolubles en agua, que tienen largas cadenas de acilo ( $> 10$  átomos de carbono), mientras que las esterasas actúan frente a enlaces éster que contienen cadenas cortas ( $<10$  átomos de carbono) (Verger, 1997).

Como enzimas edáficas ubicuas que se encuentran en animales, plantas y microorganismos, incluyendo hongos y bacterias (Lee *et al.*, 2006), el apelativo **lipasa** se refiere a carboxilesterasa, que cataliza la hidrólisis y síntesis de acilgliceroles de cadena larga, siendo los trioleoil-gliceroles su sustrato estándar (Jaeger y Eggert, 2002).

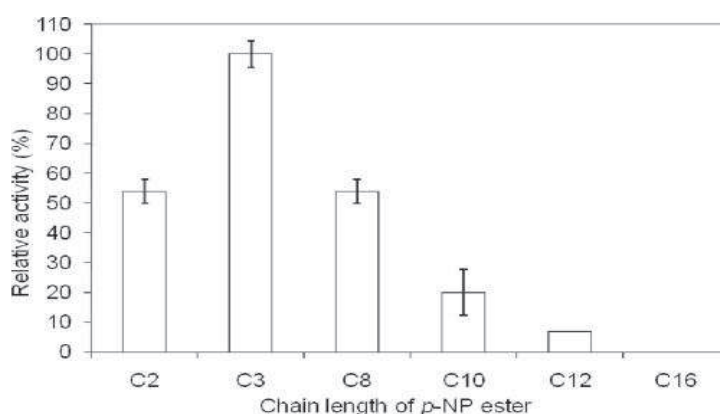
En *M. incognita* los mecanismos enzimáticos son claramente distintos que para *G. rostochiensis*. Wallace (1966, 1968) considera que la capa lipídica de la cascara del huevo puede alterarse por emulsión o por secreción de enzimas. Bird (1968), nos indica que en *M. javánica* la capa lipídica se hidroliza por enzimas que se sintetizan en las glándulas esofágicas subventrales de la forma juvenil del nematodo. La cáscara se vuelve flexible y se distorsiona en respuesta al movimiento de los juveniles.

En lodos de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), durante el proceso de lodos activados, comunidades complejas de

microorganismos utilizan tanto enzimas intra- como extra-celulares capaces de hidrolizar y en última instancia mineralizar compuestos orgánicos. Los enzimas del lodo activado se han usado como indicadores de poblaciones específicas (Hankin y Sands, 1974), para medir su biomasa activa (Teuber y Brodish, 1977; Richards *et al.*, 1984) e indicar la existencia de procesos específicos, tales como el COD y eliminación de P (Richards *et al.*, 1984; Lotter y van der Merwe, 1987).

La actividad esterásica sobre ésteres de substratos  $\alpha$ -naftol con ácidos grasos (C2-C8) se acumula en la fracción particulada, exhibiendo un alto nivel de redundancia funcional (diferentes enzimas que catalizan la misma reacción en los lodos diferentes). En la fracción extracelular (principalmente enzimas periplásmicas y/o asociadas con las superficies externas de la célula), no parecen tener actividad significativa y la encontrada está estrechamente vinculada a una floculación de partículas o material celular (Boczar *et al.*, 2001). Es la fracción particulada donde se acumula la mayor cantidad de proteína con capacidad enzimática de los lodos de EDAR.

La actividad esterásica es más alta con sustratos que tenían cadenas cortas de alquilo (C4) y disminuye a medida que la longitud de las cadenas aumenta (>C8) (Fig2.26). Las fracciones extracelulares contenían niveles muy bajos de proteína (0.1 mg/l) y no muestran ninguna actividad esterásica en cualquiera de los modelos de sustrato probados. Como consecuencia, la mayor actividad esterásica capaz de hidrolizar se asocia a los esterres del butirato (C4), que era hasta seis veces mayor que la de esterres de estearílico (C18) (Boczar *et al.*, 2001).

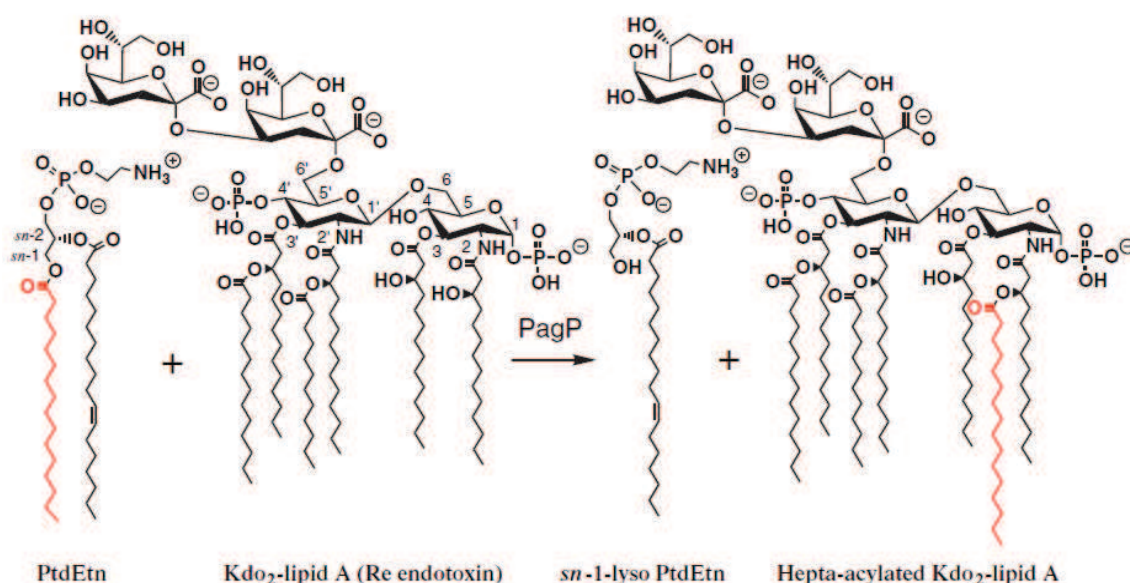


**Figura 2.26.-** Actividad de estererasas a 22°C de ésteres con diferente longitud de la cadena (acetato C<sub>2</sub>; propionato C<sub>3</sub>; octanoato C<sub>8</sub>; decanoato C<sub>10</sub>; laurato C<sub>12</sub> y palmitato C<sub>16</sub>) en desiertos fríos, libres de hielo en la Antártida (Heath *et al.*, 2009).

Este comportamiento se repite con lipasas procedentes de suelos libres de hielos de desiertos de la Antártida (temperatura del suelo: 3°C;

humedad relativa, 33%; C: 0,04% y N: 0,26%), cuyas bacterias se encuentran adaptadas a condiciones psicrófilas (Heath *et al.*, 2009).

Un aspecto que tiene gran interés sanitario es la forma con la que las lipasas actúan frente al lipo-polisacárido A, componente de membranas de bacterias anaerobias, con reconocida capacidad alérgica y acción endotóxica para el hombre.



**Figura 2.27.-.** PAgP cataliza la transferencia de una cadena de palmitato a partir de la Posición sn -1 de la fosfatidiletanolamina (PtdEtn) a la forma más simple del LPS (endotoxina Re) de la *E. coli*, que consiste en lípido A vinculada a la 6' posición con dos unidades de ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico (KDO) (Bishop, 2005).

El lípido A es un  $\beta$ -1' disacárido, 6-ligado de la glucosamina que se acila con cadenas R-3-hidroxi-miristato en las posiciones 2, 3, 2' y 3', y se fosforila en las posiciones 1 y 4'. Los vínculos con cadenas acil-ceto-acilo de laurato y miristato de la 2' y 3' posiciones, respectivamente, proporcionan la constitución de lípido A hexa-acilado, que es una potente endotoxina (Fig. 2.27).

Una proporción de lípido A regulados en *E. coli* contiene una cadena de palmitato (16:0) en la posición 2 del enlace acilcetoacilo, que produce una molécula de heptaacilada con propiedades endotóxicas atenuadas.

Las **aminopeptidasas de leucina** (LAP) conforman un conjunto enzimático de aminopeptidasas complejo. Se han caracterizado por ser enzimas celulares de mantenimiento, con un crítico papel en la rotación de los péptidos (Neurath, 1989; Ryan, 1998; Mosolov *et al.*, 2001; Lawrence y Koundal, 2002; Supuran *et al.*, 2002; Haq *et al.*, 2004;



Valueva y Mosolov, 2004; Christeller, 2005; Mosolov y Valueva, 2005; Joanitti *et al.*, 2006; Matsui *et al.*, 2006).

Se han descrito dos grupos principales de LAP: M17 y M1. Ambos son metalopeptidasas capaces de escindir residuos N-terminales de proteínas y péptidos. Sus estructuras, mecanismos enzimáticos y funciones biológicas son distintivas.

La proteómica nos indica que la **Leucina aminopeptidasa** elegida es un miembro del grupo de M17 (EC 3.4.11.1), que conforma hexámeros usando dos cationes. Es una proteína enzimática altamente conservadora en el extremo amino terminal ácido y se han identificado en bacterias, animales y plantas (Matsui *et al.*, 2006). LAP contienen un dominio catalítico que se divide en una parte C- y N-terminal, y a pesar de que llevan el nombre de leucina aminopeptidasas, tienen amplias especificidades de sustrato (Herbers *et al.*, 1994). Como monómero, las LAP poseen un tamaño de alrededor de 55 kDa, y un óptimo de pH alcalino (8,5), siendo su estructura un hexámero (Sträter *et al.*, 1999).

Las LAP neutras se han identificado y son constitutivas, en casi todos los miembros del reino vegetal. Su síntesis sólo tiene lugar a un bajo nivel que se supone es el que se requiere para el mantenimiento de las células en tejidos vegetativos y reproductivos (Tu *et al.*, 2003). Se plantea la hipótesis de que el N-terminal puede influir en la vida media de una proteína (Callis y Vierstra, 2000). Por lo tanto, una escisión por LAP\_N en la parte amino-terminal de una proteína está acompañada por una modificación de la N-terminal y puede alterar la vida media o la transformación. Se supone que es una parte normal y basal de la degradación de proteínas, dependiente de la ubiquitina (Tu *et al.*, 2003).

En la patata, la leucina aminopeptidasa (LAP) se identificó por primera vez después de la aplicación de ácido abscísico y metil jasmonato a una herida mecánica (Hildmann *et al.*, 1992; Pautot *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1996; Chao *et al.*, 1999). Esta LAP vegetal pertenece al grupo de LAP ácidas que se suponen específicas de solanáceas (Chao *et al.*, 2000) y se transcriben a un alto ritmo después de recibir una herida.

Las LAP bacterianas más conocidas pertenecen a los géneros de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Burkholderia* (Gupta *et al.*, 2004). La mayoría pertenecen a la superfamilia estructural  $\alpha/\beta$ -hidrolasas que comparten una secuencia catalítica muy conservadora (tríada Ser-Asp-His) (Arpigny y Jaeger 1999). Sin embargo, hay poca información relativa a la cantidad, actividades, especificidad de sustrato y localización celular (Nybroe *et al.*, 1992; Confer y Logan, 1998).

Recientemente, han sido aisladas del suelo nuevas LAP bacterianas, identificadas mediante aproximación metagenómica (Lee *et al.*, 2004; Elend *et al.*, 2007). En *Solanum lycopersicum* LAP-A se han caracterizado mejor. Para el conjunto de aminopeptidasas ácidas de leucina, la hipótesis es que se encuentran en una repetición en tándem y son > 99% idénticas (Chao *et al.*, 2000). En cuanto a las LAP neutras se supone que proceden de un gen de copia única (Tu *et al.*, 2003) y se relacionan con las del tomate.

La actividad L-Leucin-7-aminopeptidasa (APEase) decrece ante incrementos de CO<sub>2</sub> (Mayr *et al.*, 1999), y la liberación de leucina inhibe la síntesis de N-acetil-β-D-glucosaminidasa (Bidochka y Khachatourians, 1993).

Las LAP M17 están implicadas en la eclosión de los huevos de nematodos pero, en cada especie, de forma diferente. La cáscara de los huevos *G. rostochiensis* permanece rígida hasta el momento de iniciación del proceso. Los factores de eclosión presentes en el rizodepósito de la patata pueden unirse al ion Ca<sup>2+</sup> o reemplazarle en la capa lipídica de los huevos del quiste, causando una alteración estructural (a nivel molecular) que modifica la permeabilidad de la cáscara (Clarke *et al.*, 1978; Clarke y Perry, 1985). Desde el exterior, lo normal es observar cambios en la estructura y flexibilidad inmediatamente antes de su eclosión (Perry *et al.*, 1982).

Los inhibidores de las proteasas vegetales son pequeñas proteínas presentes generalmente en alta concentración en los tejidos de almacenamiento (hasta el 10% del contenido total de proteínas) (Ryan *et al.*, 1998). Desempeñan un potente papel defensivo contra los depredadores y agentes patógenos (Krattiger, 1997).

En la patata, estos inhibidores (PIs tipo 2) se han caracterizado primero en sus tubérculos y luego en hojas, flores, frutas y floema de otras solanáceas (Iwasaki *et al.*, 1971; Pearce *et al.*, 1993; Christeller y Lian, 2005). Su análisis molecular y genético nos muestra que están compuestos de unidades que se repiten múltiples veces (entre una y ocho) (Antcheva *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2000).

Estos inhibidores están estrechamente asociados con otros polipéptidos y les protegen contra la degradación por quimiotripsina extracelular como la proteasa, interactuando con el sistema de defensa de la planta (Valueva *et al.*, 2001; Ledoigt *et al.*, 2006). La elevada presencia de acetil derivados como componentes moleculares de estos inhibidores, hace pensar en que la actividad acetil deacetilasa es un componente enzimático capaz de alterarlas ayudando a la infectividad del nematodo.

### **Actividades enzimáticas relacionadas con la liberación de nutrientes minerales.**

Del Fosfato: las **fosfatasas-ácidas** (EC 3.1.3.2) y las **fosfatasas-alcalinas** (EC 3.1.3.1)

Desde Bernard Palissy (1510-1590) cuando destaca del suelo "*su capacidad como suministrador de sales minerales para la planta*" el P nos ha ido revelando su importancia fundamental en todos los seres vivos, por su significado **energético** (mononucleótidos trifosforilados) **metabólico** (potencial reductor, marcador metabólico, activador energético, regulador funcional de enzimas y componente de muchos sistemas transmisores de señales), **estructural** (fosfoinositósidos/ fosfolípidos de membranas) y **genético** (ácidos nucleicos) y en el propio suelo, como elemento de enlace entre moléculas orgánicas o en su capacidad para conformar compuestos organometálicos y órgano-minerales.

La actividad de las fosfatasas en el suelo han sido revisadas repetidamente (Ramírez-Martínez y Mc Laren, 1966; Speir y Ross 1978; Malcom 1983; Tabatabai 1994), porque su capacidad hidrolítica para actuar sobre enlaces éster, libera iones fosfato que adquieren plantas y microorganismos (Cosgrove, 1967; Halstead y McKercher, 1975; Quiquampoix y Mousain 2005). Presenta interés hasta el punto de ser aceptada como indicadora de la fertilidad de cada suelo. A las fosfatasas también se las atribuye el papel de puntos críticos en el ciclo biogeoquímico de P en los ecosistemas (Speir y Ross, 1978; Dick y Tabatabai 1986, 1987, 1992; Eivazi y Tabatabai, 1977; Dick *et al.*, 2000).

Las fosfatasas de los suelos abarcan no solo a las fosfomonoesterasas (que hidrolizan monoésteres de fosfatos orgánicos) y fosfodiesterasas (que hidrolizan diésteres) sino también a la pirofosfatasa (que transforma pirofosfato a ortofosfato) (Tabatabai, 1994).

A su vez el P es uno de los nutrientes limitantes para el crecimiento de la planta (Redel *et al.*, 2007) y su presencia en la solución del suelo regula la actividad de aquellas, dado que el P orgánico puede constituir entre el 20–80% del P total de la superficie del suelo (Turner y Haygarth, 2005).

Por lo general, estas actividades se relacionan con la MO (Jordan y Kremer, 1994; Tabatabai, 1994; Acosta-Martínez y Tabatabai, 2000; Aon y Colaneri, 2001) y con el pH del suelo (Eivazi y Tabatabai, 1977; Juma

y Tabatabai, 1977, 1978; Tabatabai, 1994; Acosta-Martínez y Tabatabai, 2000) y de la presencia de activadores e inhibidores (Speir y Ross, 1978). Su presencia e intensidad difieren en función de las especies de cultivo, sus variedades y las prácticas de cultivo a las que el agricultor somete el suelo (Ndakidemi, 2006; Izaguirre-Mayoral *et al.*, 2002; Turner y Haygarth, 2005), pudiéndose utilizar como herramienta para evitar el estrés por P en cultivos en crecimiento.

Las plantas terrestres han desarrollado muchas adaptaciones morfológicas, metabólicas y enzimáticas para tolerar una baja disponibilidad en fósforo. Esto incluye la micorrización, la actividad de transcripción, biosíntesis y excreción de fosfatasas ácidas, que tienden a aumentar con estrés alto de P (Tarafdar y Jungk, 1987; Nakas *et al.*, 1987; Chrost, 1991; Goldstein, 1992; Duff *et al.*, 1994; Muchhal *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997; del Pozo *et al.*, 1999; Daram *et al.*, 1999; Hayes *et al.*, 1999; Harán *et al.*, 2000; Baldwin *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Kai *et al.*, 2002; Karthikeyan *et al.*, 2002; Mudge *et al.*, 2002; Versaw y Harrison, 2002).

Si en su función las fosfomohidrolasas catalizan la hidrólisis de ésteres orgánicos derivados del ácido fosfórico, dos actividades de este grupo han acaparado la atención de esta capacidad liberadora de fósforo: las fosfatasas-ácidas (EC 3.1.3.2) y las fosfatasas-alcalinas (EC 3.1.3.1), aunque colateralmente realicen otras acciones con significado metabólico distinto.

La fosfomonoesterasa alcalina no ha sido detectada en plantas (Dick *et al.*, 1983; Juma y Tabatabai, 1988 a, b, c). Tanto bacterias como otros microorganismos saprófitos del suelo (Joner y Jakobsen, 1995) contribuyen en gran medida a la presencia de fosfomonoesterasa alcalina del suelo, fundamentalmente en la **detritosfera**.

Habitualmente, al hablar de fosfatasas se centra únicamente la atención en la liberación de fósforo como una herramienta de nutrición. Sin embargo, al centrarse en la transferencia de nutrientes orgánicos debemos de pensar que las fosfatasas actúan también formando nutrientes orgánicos eléctricamente neutros, con posibilidad de ser transferidos al interior del recinto molecular. Este es el caso de la Glucosa 6 P/glucosa, o el glicerol P/glicerina, entre otros muchos, de tal forma que las fosfatasas actúan como componentes activos de la nutrición celular, hecho que justifica de alguna forma el mantenimiento de la calidad del suelo y la resiliencia de los componentes biológicos.

Hay evidencias de que las bacterias son la principal fuente de fosfomonoesterasa alcalina en los suelos (Tabatabai, 1994; Sakurai *et*

*al.*, 2008) mientras que bacterias, hongos, hongos micorrizantes, plantas y nematodos son responsables de la síntesis de fosfomonoesterasa ácida. Junto con lo anterior, la fitasa se produce en suelos áridos por hongos (*Aspergillus*, *Emmericella* y *Penicillium*) en la **rizosfera** (Yadav y Tarafdar, 2001, 2003; Nanipieri *et al.*, 2003).

Al añadir al suelo restos de gramíneas de pasto (ryegrass), el incremento de la actividad de las fosfomonoesterasas ácida y alcalina se ha relacionada con los cambios en la composición de las comunidades bacterianas (Renella *et al.*, 2006; Sakurai *et al.*, 2008).

Durante la estimulación del crecimiento de la biomasa mediante aporte de glucosa y N inorgánico, Renella *et al.*, (2007) estima que en suelos, con un amplio rango de propiedades, la producción de fosfomonoesterasas ácida y alcalina se incrementa con el pico incremento poblacional, para declinar posteriormente, si se prolonga el tiempo de la incubación.

El valor de producción de la fosfomono-esterasa ácida fue mayor en suelos forestales y sus valores de persistencia son los más altos en suelos ácidos, mientras que no se ha encontrado relación entre la actividad de las fosfomonoesterasas alcalinas, o con las fosfodiesterasas y el pH de los suelos o su manejo (Renella *et al.*, 2007).

La cantidad de la fosfatasa ácida exudada por las raíces de las plantas varía con cada cultivo y cada variedad y sus prácticas asociadas (Patra *et al.*, 1990; Staddon *et al.*, 1997; Wright y Reddy, 2001; Izaguirre-Mayoral *et al.*, 2002; Ndakidemi, 2006). Así, las leguminosas excretan más fosfatasa ácida que los cereales (Yadav y Tarafdar, 2001), posiblemente por el mayor requerimiento de P por leguminosas en el proceso de fijación de nitrógeno simbiótico en comparación con los cereales. En sus estudios Li *et al.*, (2004), informaron de que las raíces de garbanzo también fueron capaces de secretar una mayor cantidad de fosfatasa ácida que las del maíz.

Para ejemplo, la inducibilidad de las fosfomonoesterasas y la intensidad de exudación por parte de raíces y microorganismos, se determinan por su necesidad de ortofosfato (monoácido o diácido), que está a su vez afectada por el pH del suelo (Skujins, 1976). Se prevé que las prácticas de manejo de suelo, que inducen estrés de P en la rizosfera también afectan a la excreción de estas enzimas en el ecosistema (Ndakidemi, 2006).

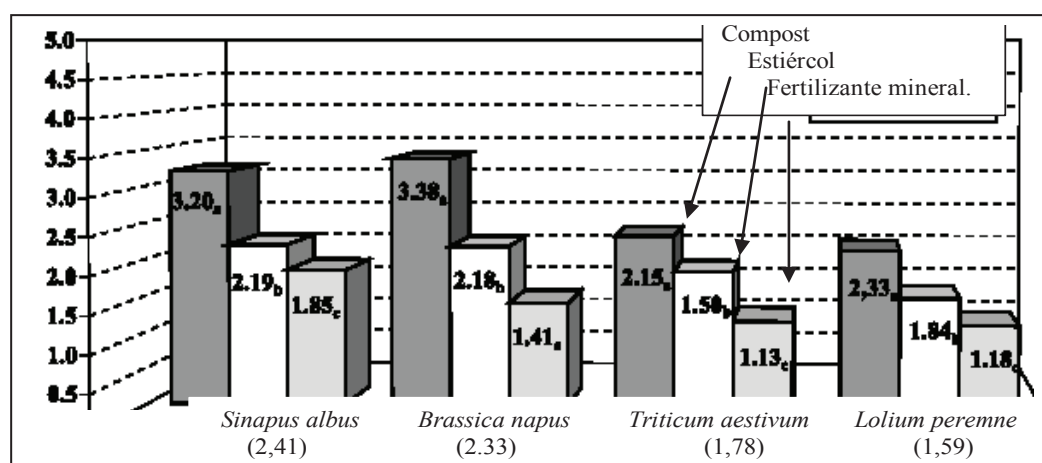
Fertilización con fosfatos inorgánicos durante más de 40 años, aumentó la proporción de los nematodos bacteriófagos, y disminuyó la de los

fungívoros. Además, los perfiles microbianos PLFA confirmó que la relación F/B disminuyó, pero la biomasa en valor de C, N y P aumentó con la fertilización de P, mientras que con la aplicación de N inorgánico aumentaron significativamente las bacterias nematófagas, disminuyendo la de los omnívoros.

### El S y la Arilsulfatasa EC 3.1.6.1 en el suelo y en el nematodo

La participación del S en aminoácidos como cisteína, cistina y metionina, permite integrar al S en múltiples proteínas, sulfolípidos de membrana, coenzimas, tioésteres (AcilCoA), lo que le convierte al S en esencial en todos los seres vivos. Y su captura depende de las arilsulfatasas (EC 3.1.6.1) posiblemente bacterianas, presentes en el suelo como fuente de sulfato, que captado por estas, es captado a su vez por el nematodo, mediante transferencia de masa (alimentación).

Su funcionalidad se deriva de su participación en la conformación de proteas estructurales, catalíticas (enzimas), etc., en el control fino del pH endocelular (glutación), en el metabolismo de los ácidos grasos, en la captura no fotosintética de CO<sub>2</sub>, en el desarrollo de sistemas defensivos frente a componentes tóxicos (fitoquelatinas, metalotioneinas para con los metales pesados; glutación en el control de los radicales libres, generados en situaciones de estrés lumínico, térmico, hídrico, por patógenos, etc...).



**Figura 2.28.-** Presencia de S en distintos vegetales cuyos suelos han sido aportados con compost, estiércol y fertilizante mineral.

Todo ello hace que la dosis mínima que deban de adquirir, sea elevada tanto en vegetales como en animales (Fig. 2.28). El suelo debe de satisfacer esta demanda y los componentes productores de los

ecosistemas deben de reducir al S, antes de ser transferido a los conjuntos de consumidores.

Las aril-sulfatasas son responsable de la hidrólisis de los ésteres de sulfato (Kertesz y Mirleau, 2004). Muy extendidas en la naturaleza (Dodgson et al., 1982) así como en suelos (Tabatabai y Bremner, 1970 a y b; Cooper, 1972; Spier y Ross, 1978; Spier *et al.*, 1980; Gupta *et al.*, 1993; Ganeshamurthy *et al.*, 1995), son secretadas por microorganismos como respuesta a la limitación de S (McGill y Colle, 1981). Se las relaciona con la biomasa microbiana y la tasa de inmovilización de S (Klose *et al.*, 1999; Klose y Tabatabai, 1999; Vong *et al.*, 2003). La arilsulfatasa fue propuesta como un indicador indirecto de la actividad fúngica (Bandick y Dick, 1999; Parham y Deng, 2000).

Este grupo de enzimas está afectado por diversos factores ambientales (Burns, 1982) como la contaminación con metales pesados (Tyler, 1981), cambios de pH en la solución del suelo, contenido y tipo de MO (Tabatabai y Bremner, 1970 a y b; Sarathchandra *et al.*, 1988; Ladd, 1985; Dalal, 1998), concentración de ésteres de  $\text{SO}_4^-$  orgánicos (Dogson *et al.*, 1982; Tyler, 1981; Acosta-Martínez y Tabatabai, 2000) y su protección por ad/absorción sobre las superficies de partículas edáficas frente a la hidrólisis enzimática (Fitzgerald, 1976; Fitzgerald y Stickland, 1987).

Grayston y Germida (1990), reconocen que en la rizosfera (más bien detritusfera) se desarrolla una enorme actividad oxidativa del S gracias a poblaciones heterótrofas muy diversas, hecho que no se repite en otros "loc" edáficos.

En el modelo conceptual de Gupta (1989) sobre el ciclo del S, participan activamente autótrofos, quimiolitotrofos y heterótrofos tanto aerobios como anaerobios (bacterias, hongos, actinomicetos, algas, protozoos y nematodos) actúan de una forma organizada en la captura y transformación y transferencia de formas de S tales como sulfuros, polisulfuros, sulfitos, tiosulfatos y S mineral, orientado su acción en la generación de moléculas orgánicas de S lábil, de bajo peso molecular y alta capacidad de translocación (Bettany *et al.*, 1973; Schoenau y Bettany, 1987) y susceptibles de hidrólisis mediante arilsulfato sulfohidrolasas EC 3.1.6.1. (conjunto enzimático de baja especificidad que cataliza la hidrólisis de ésteres de aromáticos y no aromáticos de sulfato ( $\text{R-O-SO}_3^-$ ) liberando fenoles ( $\text{R-OH}$ ) y al anión ( $\text{SO}_4^{2-}$ )) (Gupta y Germida, (1988 a,b, y 1989).

En la edafofauna (nemátodos incluidos), su entrada se realiza por transferencia de masa vegetal o animal y el reciclado de los aminoácidos

inicialmente relatados en su propio hígado. Como consecuencia la acción de enzimas que liberan  $\text{SO}_4^{2-}$  no actúan directamente como nematicidas.

Sin embargo recientemente ha aparecido un nuevo frente de conocimiento, pues la enzima lisosomal *iduronato-2-sulfatasa* (otra sulfatasa no muy conocida) cataboliza los glicosaminoglicanos (GAG) dermatan sulfato y heparan sulfato por escisión de los grupos sulfatos ligados a los oligosacáridos. Debido a la falta o a la deficiencia de *iduronato-2-sulfatasa*, los glicosaminoglicanos se acumulan progresivamente en los lisosomas celulares, lo que da lugar a almacenamiento celular, organomegalia, destrucción de tejidos y disfunción de sistemas orgánicos en humanos.

En la aplicación de enmiendas orgánicas en el suelo como fuente de nutrientes para producción de cultivos se ha encontrado su utilidad para el control de nematodos con diferentes hipótesis que puede explicar su eficacia (Alam *et al.*, 1977, 1980). Recientemente se han relatado los efectos supresores de algunos agentes microbianos sobre los nematodos en relación con el ciclo del S (Nowfer y Hasabo, 2005).

Ali (1996) y El-Sherif *et al.*, (1999), encontraron que los cultivos líquidos de algunas especies bacterianas incluyendo *Serratia marcescens* o sus filtrados, podrían inhibir la eclosión de los huevos y supervivencia de juveniles de los nematodos fitoparásitos existentes en el suelo. Bacterias como *Thiobacillus sp.* (oxidan el S a  $\text{SO}_4^{2-}$ ) y otras, capaces de reducirlo acaban formando  $\text{H}_2\text{S}$ , que es tóxico a los nematodos, (Jaco y Fortuner, 1979). Por ello el *Bacillus thuringiensis* es uno de los agentes usados para el control biológico (Osman *et al.*, 1988; Mena *et al.*, 1996; El-Nagdi y Youssef, 2004; Radwan *et al.*, 2004). En este sentido el uso de biofertilizantes que contiene una cepa de la bacteria *S. marcescens*, se ha utilizado para tratamiento nematicida del suelo (Ismail y Hasabo, 2000; El Nagdi y Youssef, 2004).

Esta Tesis Doctoral explora, con cierto detalle, algunas actividades enzimáticas de estas propiedades emergentes, como clave y componente de retroalimentación planta-suelo, que condicionan la aparición o muerte de componentes parásitos como los nematodos que afectan a la estructuración de comunidades simples de plantas.



### 3. MATERIAL, METODOS Y EXPERIENCIAS.

#### 3.1. SUELOS Y ENMIENDAS

##### 3.1.1. *Suelo empleado en las experiencias*

Para las experiencias de control de nematodos por biodesinfección se ha utilizado un *Luvisol Calcico* (FAO, 1998) localizado en el término de Cantalpino provincia de Salamanca. La muestra procede de una parcela cultivada con patata que está infectada de forma natural con el quiste *G. rostochiensis*

Parámetros	Suelo
<b>Composición textura</b>	67 % arena; 25 % limo y 8 % arcilla
<b>d (g/cm<sup>3</sup>)</b>	2,24
<b>% MO</b>	0,8
<b>pH</b>	5,84
<b>C/N</b>	4,2
<b>N<sub>t</sub></b>	0,11
<b>CE μS/cm</b>	260
<b>Corg %</b>	0,46
<b>P<sub>t</sub> ppm</b>	46
<b>Ca ppm</b>	583
<b>Mg ppm</b>	63
<b>K ppm</b>	165
<b>Na ppm</b>	69

**Tabla 3.1.-** Características de suelo utilizado en estudios de *G. rostochiensis*

##### 3.1.2. *Enmiendas orgánicas empleadas en las experiencias*

###### a) Residuos ganaderos

- **Gallinaza** (granja de Hontoria de la Cantera, Burgos).
- **Estiércol de oveja** (granja de Arenillas de Rio Pisuega, Burgos).
- **Purín líquido de cerdo.**- los purines de cerdo fueron suministrados por la explotación de ganado porcino ubicada en el término municipal de Albillos provincia de Burgos. Una vez recogidos de la balsa se mantienen a 4º C en cámara frigorífica para la experiencia.
- **Purín sólido deshidratado** (Hornillos del Eresma, Grupo GUASCOR).

**Tabla 3.2.-** Características residuos ganaderos utilizados en las experiencias.

Parámetros	Purín (s)	Gallinaza	Purín (L)	Oveja
<b>pH</b>	9.8	8,1	8,28	8,2
<b>% ms</b>	91.8	62,3	0,60	85,3
<b>CE <math>\mu\text{S/cm}</math></b>	8600	2900	4850	960
<b>%MO<sub>T</sub></b>	70.5	50,8	42	59,4
<b>%N<sub>t</sub></b>	3.6	2,6	0.093 (smf)	3
<b>%CO<sub>T</sub></b>	41	29,3	24,4	34,6
<b>C/N</b>	11.5	11,1		11,6
<b>P<sub>t</sub> % (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)</b>	1.40	3,91	2,7	0,9
<b>K<sub>t</sub> % (K<sub>2</sub>O)</b>	5.08	2,43	1,12	1,8
<b>Cd (ppm)</b>	0.5	1,21	0.01	-
<b>Cr (ppm)</b>	19.3	11,5	0.02	-
<b>Cu (ppm)</b>	774	52,6	0.75	-
<b>Ni (ppm)</b>	15.3	3,5	0.08	-
<b>Pb (ppm)</b>	Nd	52,8	0.06	-
<b>Zn (ppm)</b>	755	198	1.83	-

### b) Restos vegetales

- **Residuos de fresa** (*Fragaria vesca*) de cultivo ecológico.
- **Fragmentos de Rábano** (*Rhapanus sativus*) Semillas suministradas por la empresa ECOSEM S.L. Se siembran en cámara de cultivo en laboratorio para su recogida cuando alcanzan unos 8 cm. de altura.
- **Restos de cultivo del hongo** *Pleurotus* spp suministrado por la empresa "Biocompost riojano" de Pradejon (La Rioja).
- **Restos de cultivo de maíz** (experiencias prácticas en campo del Área de Edafología).

**Tabla 3.3.-** Características residuos ganaderos utilizados en las experiencias

	pH	%ms	%MO <sub>T</sub>	%CO <sub>T</sub>	%N <sub>t</sub>	C/N
Restos de rábano ( <i>R. sativus</i> )	4,6	6,5	91,7	53,2	2,7	19,7
Residuo Compost de Pleurotus	7,4	50,2	47,9	27,8	2,2	12,6
Restos de cultivo de fresa	4,3	4,7	93	54	2,7	20
Restos de cultivo de maíz	7,4	50,2	66,1	38,4	1,13	33,8

### c) Residuos antrópicos

- **Bioresiduo estabilizado** de la planta depuradora aguas residuales de Burgos.
- **Bioresiduo estabilizado** de la planta depuradora aguas residuales de Burgos con cal añadida hasta pH 12.
- **Bioresiduo estabilizado** procedente de la planta de tratamiento de residuos urbanos de Cortes, Burgos.

**Tabla 3.4.-** Características residuos urbanos utilizados en las experiencias

<b>Parámetros</b>	<b>Lodo bioestabilizado</b>	<b>RSU Bioestabilizado</b>
<b>pH</b>	7,5	7,6
<b>% ms</b>	82,2	92,4
<b>CE <math>\mu\text{S/cm}</math></b>	1420	2900
<b>%<math>\text{MO}_T</math></b>	37,9	52,3
<b>%<math>\text{N}_t</math></b>	2,6	1,99
<b>%<math>\text{CO}_T</math></b>	22	30,4
<b>C/N</b>	11.5	15,3
<b><math>\text{P}_{\text{asim}}</math> %</b>	2,51	0,55
<b><math>\text{K}_{\text{asim}}</math> %</b>	0,4	0,95
<b>Cd (ppm)</b>	4,2	2,1
<b>Cr (ppm)</b>	751	46
<b>Cu (ppm)</b>	246	229
<b>Ni (ppm)</b>	54	46
<b>Pb (ppm)</b>	157	187
<b>Zn (ppm)</b>	897	612

## **3.2. METODOS**

### **3.2.1. *Toma y preparación de las muestras de suelos***

Para los análisis físico-químicos, se realiza la toma de muestras con una sonda barrena EIJKELKAMP de media caña de 6 cm de diámetro, con la que muestreamos los 15-20 cm primeros de la capa arable, que será la que mejor refleje los cambios en las propiedades fisicoquímicas biológicas y bioquímicas del suelo y donde se acumulan los nematodos. En todos los muestreos iniciales de suelo se adopta un recorrido en zig-zag con un promedio de 100 tomas por hectárea.

Las muestras de suelo se homogeneizan y cuarteán en campo para la obtención final del suelo, que llevamos al laboratorio debidamente etiquetado para su procesamiento.

Se conservan en frigorífico a 4°C mientras se determinan los análisis fisicoquímicos y biológicos.

Antes de su uso, para algunos análisis físico-químicos los suelos se secan al aire durante 1 a 2 días para reducir su contenido de humedad.

Para estudio enzimático se conserva en congelador hasta su análisis, sacando las muestras a temperatura ambiente 24 horas antes de su uso para su reactivación.

Submuestras de suelo ya seco al aire, se secan en estufa durante 48 horas a 105 ° C para determinar el contenido de humedad y así referir todos los análisis al peso seco de suelo.

### **3.2.2. *Manejo residuos***

Las muestras se toman de forma aleatoria y representativa de los residuos que se utilizarán antes de hacer sus aplicaciones al suelo.

Todos los resultados se refieren a muestra en peso seco.

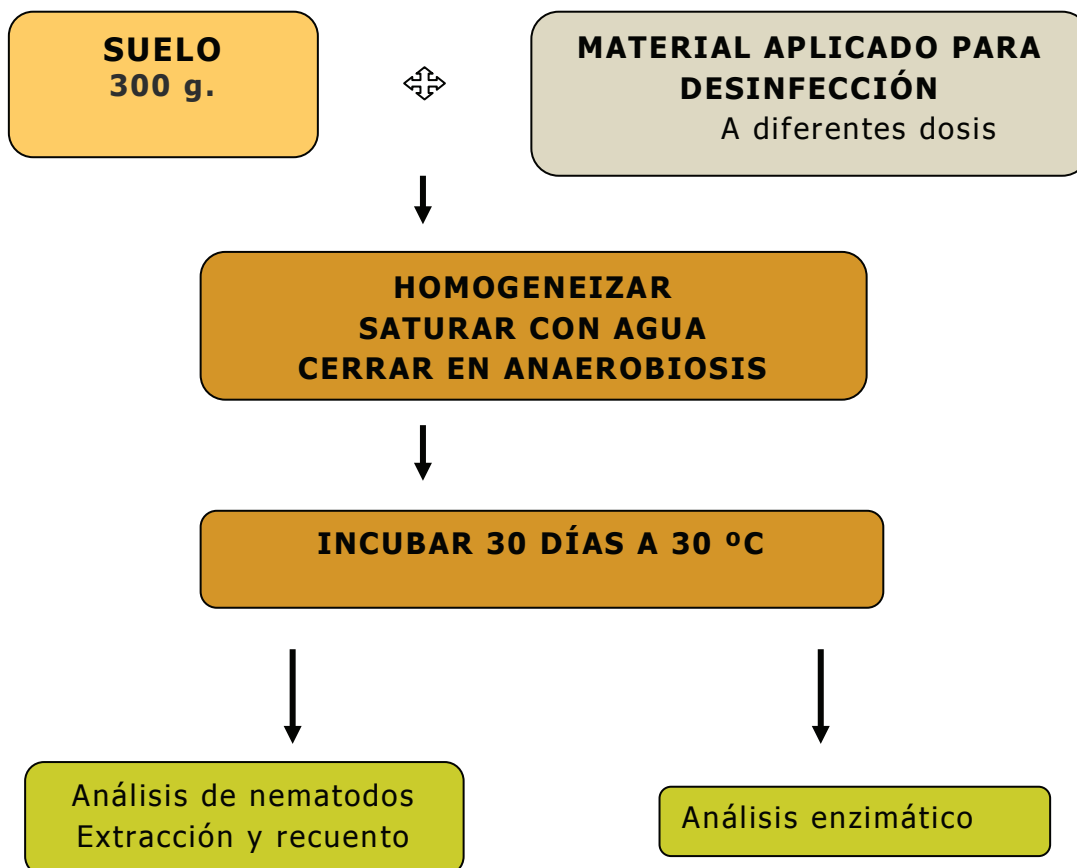
### 3.2.3. Preparación de muestra para la biodesinfección

Partimos de la muestra tamizada a 2 mm.

Aplicamos al suelo diferentes concentraciones de residuos para obtener diferentes proporciones, en relación volumen o masa de residuo / masa de suelo, según la experiencia.

Las muestras se preparan con 300 g de peso seco equivalente de suelo con la proporción de residuo establecida homogeneizándose. En recipientes herméticos de material plástico de 250 ml de volumen y añadimos agua destilada al 100% de su capacidad de campo, de tal forma que puede cerrarse perfectamente.

Para la preparación de la muestra para la biodesinfección en laboratorio se sigue el esquema siguiente (Fig.3.1):



**Figura 3.1.-** Esquema de preparación de las experiencias de biodesinfección (Bello *et al.* 2003)

La muestra testigo (T) se realiza con 300 g. de suelo y se llevan a saturación con agua destilada.

Las muestras se disponen en diseño aleatorio con las cuatro repeticiones por tratamiento y una vez mezcladas y cerradas herméticamente, se incubaron a 30 ° C en la oscuridad (Iso-Temp Incubadora de 304; Fisher Scientific Ltd. Canadá) durante 30 días.

Una vez pasados los 30 días, se encuentran listas para su análisis en laboratorio conservando la muestra a 4 °C.

#### **3.2.4. Muestras para actividades enzimáticas**

Las muestras incubadas, para los análisis enzimáticos se conservan en congelador a la Tª de -20°C. Antes de comenzar la analítica se sacan del congelador y se mantienen en frigorífico 48 h. Después se pasan a temperatura ambiente durante otras 24 h, para que se produzca la reactivación de la mezcla.

#### **3.2.5. Métodos físico y químicos para suelos y residuos**

Seguimos el protocolo de Métodos Oficiales de Análisis de Suelos, MAPA (1994).

##### **a) pH.-medida de pH en agua**

En todas las muestras de suelo se realiza la determinación del pH en la relación 10:25 con agua, siguiendo el método oficial. Se agita intermitentemente durante 30 minutos y se lee con pH-metro CRISON micro pH 2001 con compensación automática de temperatura.

##### **b) Conductividad eléctrica (CE)**

En cada muestra para el control del suelo biofumigado se procede a la medida de la conductividad eléctrica en extracto acuoso 10:50 después de 30 minutos de agitación (C 25 Incubator Shaker Classic series) y posterior centrifugación (Kubota 6900) a 9000g durante 20 min a temperatura ambiente. La medida se realiza con conductivímetro CRISON micro CM 2201.

### **c) Nitrógeno total (Nt)**

La concentración de nitrógeno total se determinó siguiendo el método Kjeldahl, con una digestión de la muestra con ácido sulfúrico concentrado. El nitrógeno orgánico se mineraliza, pasando a forma amoniacal, que junto con el amonio ya existente en el suelo se valora por colorimetría (Hinds y Lowe, 1980).

Se introducen 5 g de suelo seco y tamizado en un matraz Kjeldahl de 250 ml, y se añaden 20 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (que contiene H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 3%), 5 g de KHSO<sub>4</sub> y 0,2 g de CuSO<sub>4</sub>.

Se agita circularmente y se coloca en el digestor Digest-20 de Selecta a 450 °C (5 horas) hasta que la mezcla se vea clarificada.

Se deja enfriar y se diluye con 75 ml de agua destilada. El matraz se conecta al destilador (2100 Kjeltex Foss Tecator) que dosifica automáticamente suficiente cantidad de NaOH al 40% para desplazar todo el NH<sub>3</sub> y se recoge el destilado en un matraz de 100 ml sobre una solución de ácido bórico (25 ml) con mezcla de indicadores (verde de bromocresol y rojo de metilo); se valora con HCl 0,05 N. observando el viraje de verde a rosa violeta.

### **d) N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> mediante equipo analítico automatizado de flujo continuo SKALAR**

Determinación automática de nitratos-nitritos basado en el método de reducción de Cadmio (modificado por MacKereth *et al.*, 1978).

La muestra de extracto se tampona a pH 8.2 y se pasa a través de la columna que contiene cadmio-cobre que reducirá el nitrato a nitrito y que se determina colorimétricamente por reacción con sulfanilamida y complejo coloreado con N-(1-Naphthyl) - etilen-diamino-dihydrochloride, a 540 nm.

#### **Reactivos:**

Solución tampón: 50 g Cloruro amónico en 800 ml de agua se ajusta a pH 8.2 con hidróxido amónico y se enrasa a 1 l. Se añaden 3 ml de Brij 35 (30%).

Solución tampón con EDTA: de igual forma que la primera solución tampón una vez preparada se añaden 4 g de EDTA.

Reactivo de color: 150 ml de ácido fosfórico (85%) se mezclan con 10 g de sulfanilamida (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S) y 0.5 g N-(1-Naphthyl) ethylene-diamine-dihydrochloride (C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>). Se lleva a 1l.

Se prepara solución standard de 100 ppm. de N a partir de  $\text{NaNO}_3$  y se hace curva patrón de 5, 4, 3, 2, 1 y 0 ppm de N.

### Metodología:

Con las muestras de suelo de trabajo, se realiza una extracción con agua desionizada en proporción 1:5. Se agita orbitalmente 1 h (C 25 Incubator Shaker Classic series) y se filtra.

Los cálculos se realizan teniendo en cuenta la extracción realizada, la humedad del suelo y la dilución de la muestra si se queda excesivamente concentrada.

Las muestras son analizadas según el diagrama de flujo (Fig.3.2).

#### FLOW DIAGRAM

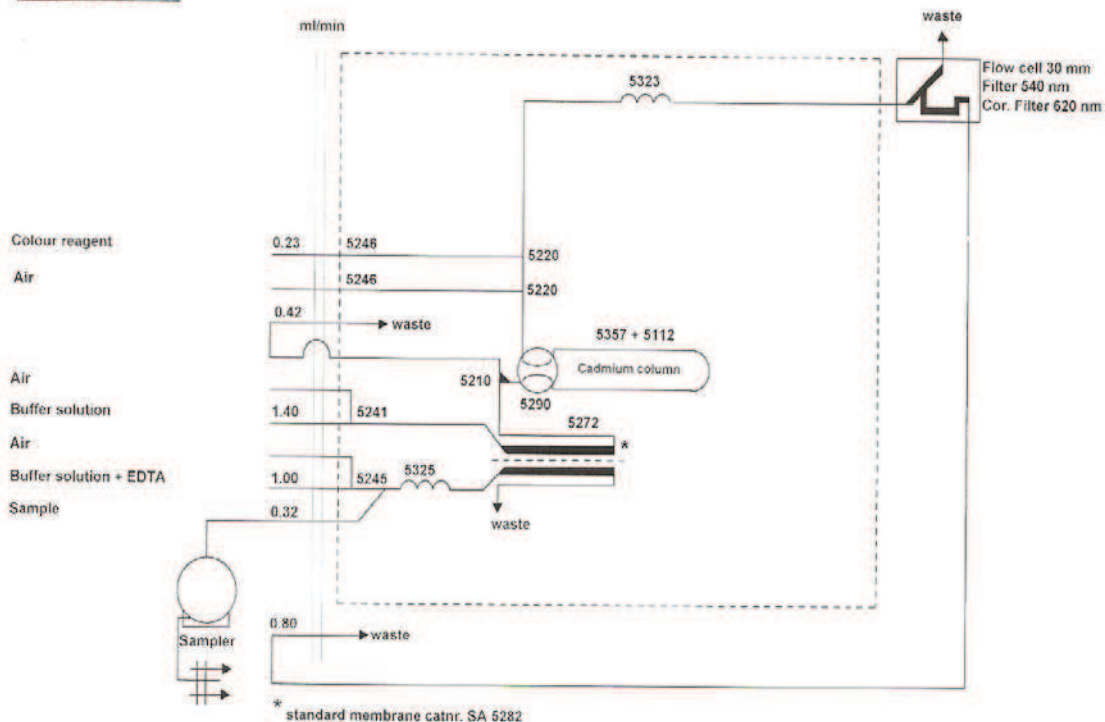


Figura 3.2.- Diagrama de flujo del equipo Skalar

### e) Fósforo total ( $P_t$ )

Muestras de 1 g de suelo (< 2 mm), previamente calcinadas a  $550^\circ\text{C}$  (mufla Select Horn) durante 1 hora, se agitan 17 horas con ácido sulfúrico 1N en frascos de plástico. Seguidamente, se filtran y en las soluciones se determina colorimétricamente el contenido en fósforo. Esta medida, se hace a partir del color azul originado en la reducción selectiva del complejo fosfomolibdico, formado por el ácido ortofosfórico



y el ácido molíbdico con lectura espectrofotométrica a 880nm de longitud de onda. (Spectronic Genesis 2).

Los resultados se expresan % de  $P_t$  sobre suelo seco.

#### **f) Fósforo asimilable ( $P_{asim}$ )**

Para la determinación del fósforo en suelos básicos seguimos el método de Olsen-Watanabe (1954), y para muestras de suelos ácidos el Método Bray-Kurz (1945) Éste extrae el fósforo soluble en ácido clorhídrico y fluoruro amónico diluidos, concretamente el fosfato de calcio y parte de los fosfatos de Al y Fe.

#### **Extracción del P-asimilable, para muestras básicas**

Se parte de 5 g de muestra con 100 ml de extractante (bicarbonato sódico 0.5M a pH 8.5) en bote inerte al fósforo de 200 ml de capacidad. Se agita durante 30 min. Se filtra la suspensión, y como en el fósforo total la determinación se realiza midiendo a 880 nm. frente a una curva patrón. Los resultados se expresan en ppm.

#### **Extracción del P-asimilable para muestras ácidas**

A partir de 1 g de muestra en un bote inerte al fósforo de 100 ml de capacidad, con 20 ml de la solución extractante (preparada a partir de 1,112 g de  $NH_4F$  en un vaso de precipitado de 200 ml. Se añade agua desmineralizada y 8 ml de HCl concentrado y se enrasa a 1 litro). Se agita durante 20 min. Se filtra la suspensión Y se mide en este caso a una longitud de onda de 681 nm. frente a curva patrón. Los resultados se expresan en ppm.

#### **g) Materia orgánica (MO) Carbono orgánico total (COT)**

#### **Materia orgánica en muestras de suelo**

Se utiliza el método de oxidación con dicromato por vía húmeda. El valor de la MO del suelo, se obtiene a partir del contenido en carbono orgánico multiplicado por el factor 1,724 (coeficiente de Waskman). El método más utilizado es el de Walkley y Black (1934), cuyo fundamento es la determinación del carbono orgánico que se oxida con  $K_2Cr_2O_7$  en presencia de  $H_2SO_4$ ; el exceso de oxidante se valora con sulfato ferroso amónico (sal de Mohr) y la cantidad de  $C_{org}$  oxidado se calcula a partir de la cantidad de dicromato reducido. (M.A.P.A., 1994).

### **Materia orgánica en muestras de residuos**

Para muestras de residuos con elevado contenido en  $C_{org}$  se utiliza la oxidación por vía seca, basado en la medida del  $CO_2$  desprendido en una combustión. Su precisión es mayor que la de otros métodos.

Se parte de muestra seca en estufa a 105 °C, se deja en mufla durante 6 h a 550 °C y posterior enfriamiento en desecador. La materia orgánica se calcula por diferencia de pesada.

#### **h) Materia seca (ms)**

Para suelos y para residuos, la humedad se ha calculado por diferencia de pesada a 105°C hasta pesada constante, en estufa de secado Selecta y paso posterior a enfriar en desecador para realizar la pesada en balanza de precisión Sartorius mod. Laboratory.

#### **i) Macroelementos asimilables**

Se determinan a partir de los extractos de suelo con acetato amónico 1M a pH 7. Se agita 10 min y se filtra. Se realizan las medidas con espectrofotómetro de emisión Perkin-Elmer 3100.

#### **j) Microelementos**

Se realiza la digestión en medio  $HNO_3$ . Se digieren 0.5 g de muestra y se añade 10 ml de  $HNO_3$  en microondas (ETHOS 1 Milestone). Los elementos totales se miden por emisión en espectrofotómetro Perkin-Elmer 3100.

### **3.2.6. Análisis nematológico**

Se ha realizado con la muestra inicial de suelo y con las muestras biodesinfectadas después de aplicar los diferentes residuos e incubar a 30 °C durante 30 días en recipiente cerrado y suelo saturado de agua.

Caracterizados los nematodos del suelo inicial se considerarán como referencia frente a los diferentes tratamientos de biodesinfección.

### **a) Extracción de quistes de *G. rostochiensis***

#### Material usado

Aparato de Fenwick  
Embudo  
Tamiz de 100µm de luz  
Trípode donde sujetar el tamiz de recogida  
Acetona para análisis (reutilizable)  
Matraz de 250 ml.

Las condiciones ambientales no tienen influencia en el método. Las muestras secas al aire en bandeja, se tamizan a 2 mm para facilitar la extracción de los quistes, que se realiza por flotación recogiendo por arrastre con agua con la jarra de Fenwick, según Fig. 3.3.

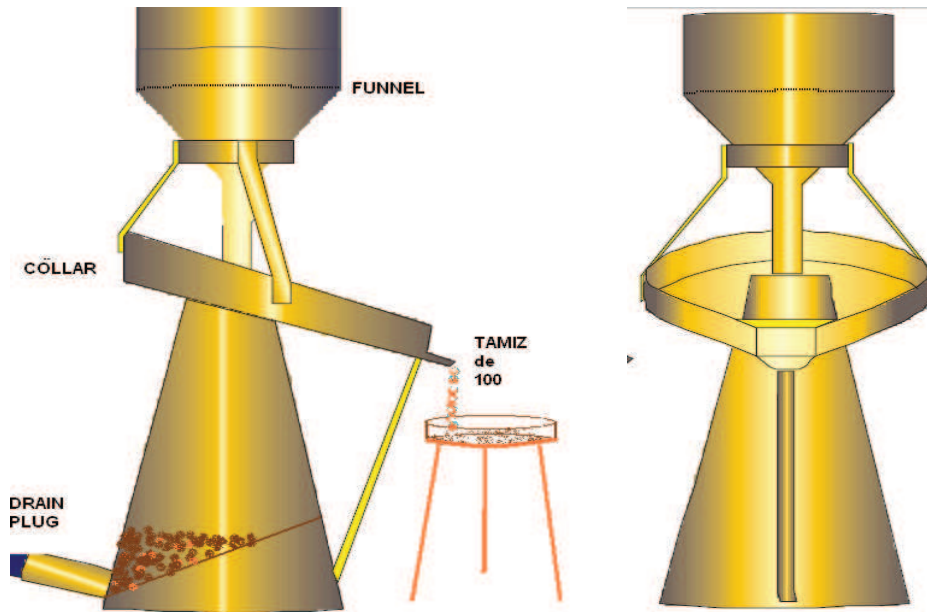
Se usaron 100 g de suelo para cada muestra, pasando agua según el sistema ideado por Fenwick (1940).

Se llena el embudo de Fenwick con agua y se coloca el tamiz de recogida. Se regula la intensidad de la corriente de agua de lavado según el tipo de suelo.

El agua va pasando por el suelo que se encuentra en el tamiz superior que separa las arenas gruesas, pasando a través de él las fracciones finas, limos, arcillas y MO, junto con los quistes. Favorecida por la inclinación existente en el interior de la jarra, caen dentro los limos y arcillas.

Mediante flotación sobrepasan la boca de la jarra, las partículas de menor tamaño junto con los quistes. Este material se recoge a la salida de la jarra mediante un tamiz de 150µm de luz de malla en donde quedarán retenidos los restos de MO y los quistes.

Se lava el tamiz de recogida de quistes y restos orgánicos y se cierra el grifo de llenado del Fenwick. Se recoge suavemente en un trozo de gasa, ayudando con un poco de agua para separar los quistes de restos de otros componentes del suelo. Así en la tela de gasa quedan adheridos quistes y MO (Fig. 3.3).



**Figura 3.3.-** Esquema de la jarra de Fenwick y fotografía de la utilizada en laboratorio.

Si el suelo tiene mucha MO los quistes se separan con dificultad, razón por la que se usa la flotación en acetona que facilita la separación (Seinhorst y Den Ouden, 1966). Se pasan los quistes a un matraz aforado llenándolo de acetona con lo que los quistes quedan flotando en la boca del matraz. De aquí se recogen en placa Petri y se sigue con extracción de quistes lo que permite el contaje.

No se debe utilizar esta técnica de la acetona si queremos seguir con ensayos en los que las larvas deban seguir activas. En este caso usaremos una lupa y una aguja enmangada. Una vez recogidos los quistes en un tul fino o papel de filtro procedemos a la observación microscópica y a su conteo.

### **b) Conteo de huevos y juveniles de segundo estadio (J2)**

En cada uno de los ensayos se estimó la relación entre la población final y población inicial (Pf/Pi) (diferenciando viables y no viables), lo que permitirá ver la efectividad de los diferentes ensayos de biodesinfección con los distintos residuos, pues para esto se necesita estimar la cantidad de huevos y juveniles de segundo estadio (H+J2).

Una vez recogidos los nematodos encontrados en 100 g de suelo, según el procedimiento descrito anteriormente, introducimos los quistes en un homogeneizador de tejidos de Eppendorf con 5 ml de agua y machacamos para que todos los quistes se abran y liberen su contenido.

Pasados estos quistes abiertos a un vaso, añadimos agua hasta lavar bien y recogerlos todos. Se agita, homogeneiza y pipetea alícuotas de 10 ml. Se pasan a una placa cuadrículada y se cuentan larvas y huevos, (H) y (J2), del nematodo *G. rostochiensis* mediante el microscopio Leica DLMB.

Para determinar el porcentaje de viabilidad de los huevos enteros, su suspensión se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Los huevos se volvieron a suspender en 400  $\mu$ l 0,05% (w/v) de azul acuoso de Meldola (Shepherd, 1962) y se incubó durante 5 días a 20°C. La solución se retiró por centrifugación y los huevos se resuspendieron en 400  $\mu$ l de agua durante 24 h.

El porcentaje de huevos no viables se calculó mediante la eliminación de una parte alícuota (20  $\mu$ l de volumen) de cada muestra y conteo del número de huevos y juveniles de segundo estadio (J2) teñidos (no viables) y no teñidos (viable). Sólo los huevos o J2 completamente teñidos de color azul oscuro se consideraron no viables (Devine y Jones, 2001).

Los datos se expresaron en H+J2/100g obteniendo de esta forma el cociente de población final frente a población inicial.

### **3.3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DEL SUELO**

#### **3.3.1. Preparación de la muestra de suelo para medidas enzimáticas**

Los suelos analizados provienen de las experiencias de biodesinfección que se han realizado con los diferentes residuos.

El suelo usado para la determinación enzimática se descongela en frigorífico 48 horas antes de su utilización y se deja a temperatura ambiente para su reactivación, 24 horas antes de analizarlo.

Se utilizan microplacas negras de 96 celdas de fondo plano para medidas de actividades por fluorescencia (Marx *et al.*, 2001).

La proporción óptima de suelo para la suspensión es de 1:100 con lo que por facilidad de pipeteo con la pipeta multicanal, se han usado 2 g de suelo seco, una vez considerada su humedad, en 200 ml de agua ultrapura.

Se sónica, para romper la estructura del suelo durante dos minutos a potencia 50J/s (sonicador modelo Vibra MCell VC100). Además de proporcionar la suspensión de suelo más homogénea, tiene la ventaja de liberar enzimas extracelulares, rompe los macroagregados, pero sin alterar las partículas más pequeñas (de Cesare *et al.*, 2000)

La recuperación media de la biomasa microbiana después de esta sonicación puede llegar al 97% (Kandeler *et al.*, 1999).

Sobre esta suspensión de suelo preparada, manteniéndola en agitación, se pipetea la muestra para la reacción enzimática en microplacas. Se lleva a incubación a 30°C con agitador termostatzado Heidolph Titramax1000- Inkubator 1000 y pasado el tiempo de incubación se lee la fluorescencia en lector de placas Tecan Genius.

#### **a) Reactivos**

##### **a.1) Sustratos**

Todos son de calidad Sigma Aldrich Co. Ltd. en forma cristalina

- 4-MUB  $\beta$ -D-glucuronido
- 4-MUB  $\beta$ -D-glucosido
- 4-MUB  $\beta$ -D-galactosido
- 4-MUB  $\beta$ -D-cellobiosido
- 4-MUB-7-  $\beta$ -D-xylosido

- 4-MUB –Nacetyl- $\beta$ -D-glucosaminido
- 4-MUB-phosphato
- 4-MUB-sulphato
- 4-MUB-acetato
- Leucina-7-AMC
- Palmitato-7-AMC

### a.2) Solución tampón

Usamos la solución tampón THAM 0,05 M

Tris- 6,05g/l

Acido Maléico 5,8 g/l

Acido Cítrico 9,6 g/l

Acido Bórico 3,15 g/l

NaOH 10 g/l

Ajustado a pH 5,5, 8 y 10 para las diferentes actividades

## 3.4. MÉTODO DE MICROPLACAS

### 3.4.1. Preparación del sustrato

Los sustratos se disolvieron en 10 ml de agua ultrapura con un ml de etilenglicol monometil éter en solución 1mM para todos excepto 4-MUB- $\beta$ -D-glucuronido 4-MUB-phosphato Leucina-7-AMC que solo se añade agua. (Marx *et al.*, 2001)

Seguidamente se llevaron a 100 ml solución 1mM con tampón a pH óptimo según la tabla siguiente:

#### Tampón ácido- pH - 5.5

- |  |           |
|--|-----------|
| ▪ 4-MUB $\beta$ -D-glucuronido             | 0,03523 g |
| ▪ 4-MUB $\beta$ -D-glucosido               | 0,03383 g |
| ▪ 4-MUB $\beta$ -D-galactosido             | 0,03383 g |
| ▪ 4-MUB $\beta$ -D-celobiosido             | 0,05005 g |
| ▪ 4-MUB-7- $\beta$ -D-xilosido             | 0,03084 g |
| ▪ 4-MUB-fosfato                            | 0,03000 g |
| ▪ 4-MUB-sulfato                            | 0,02182 g |
| ▪ 4-MUB-acetato                            | 0,02944 g |
| ▪ 4-MUB-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminido | 0,03794 g |

#### Tampón básico- pH -10

- |                 |           |
|-----------------|-----------|
| ▪ 4-MUB-fosfato | 0,03000 g |
|-----------------|-----------|

### Tampón básico- pH – 8

- Leucina-7-AMC 0,04146 g
- Palmitato-7-AMC 0,03248 g

### 3.4.2. Protocolo de medida

Dependiendo de si se trabaja con un sustrato o con otro se utilizó MUB o AMC para la curva patrón:

- MUB - 10 mM 0,1762 g en 100 ml de metanol
- AMC - 10 mM 0,1752 g en 100 ml de metanol

Se llevó a concentración 1mM con tampón al pH de trabajo 5'5, 8 ó 10.

Dado que las señales obtenidas eran muy variables y las curvas patrón usadas fueron de concentraciones 1, 2'5 y 5 µM.

El diseño de la placa que se ha usado para la medida de actividad enzimática ha sido:

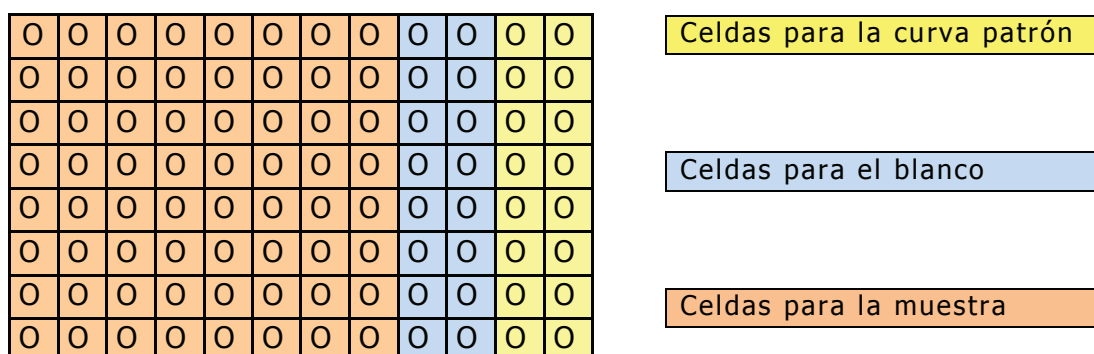


Figura 3.4.- Diagrama de diseño de placas para la medida enzimática

Las proporciones que se usaron fueron:

#### Muestra de suelo

- 75 µl de tampón
- 100 µl de sustrato
- 25 µl de suspensión de suelo

#### Blanco

- 75 µl de tampón
- 100 µl de sustrato



Se incubó a 30°C durante 3h con agitación y se añadió la suspensión de suelo inmediatamente antes de parar la reacción con solución Tris 0.5M a pH 12. Así se añaden después de incubar

- 25 µl de suspensión de suelo

### Curva patrón de trabajo

**Tabla 3.5.-** Curva patrón para la medida enzimática

µl MUB	µl suelo	µl Tampón	MUB 1µM final µmol/l	MUB 5µM final µmol/l
0	25	175	0	0
25	25	150	0,100	0,50
50	25	125	0,200	1,00
75	25	100	0,300	1,50
100	25	75	0,400	2,00
125	25	50	0,500	2,50
150	25	25	0,600	3,00
175	25	0	0,700	3,50

Según el sustrato se utilizaron curvas de referencia de MUB o AMC, al pH correspondiente.

Realizada la incubación, la reacción se paró con 50 µl de solución TRIS 0.5 M a pH 12, llevando el volumen final a 250 µl, lo que se tuvo en cuenta para el cálculo de actividad final, tanto para la muestra de suelo, el blanco, como para la curva patrón.

La actividad se calcula según la lectura de la concentración de la curva patrón µmol /l

$$\frac{\mu\text{mol}}{\text{l}} \times \frac{1\text{l}}{10^6} \times \frac{250\mu\text{l}}{25\mu\text{l}} \times \frac{200\text{ml}}{2\text{g}} \times \frac{100}{\%ms} \times \frac{1000\mu\text{l}}{1\text{ml}} \times \frac{1}{180\text{min}} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{g}_{ss} \cdot \text{min}}$$

Se expresaron los resultados en µmol g<sup>-1</sup> de suelo seco min<sup>-1</sup>

### 3.4.3. *Actividades enzimáticas según medida tradicional (para estudio comparado de métodos)*

El estudio de comparación de los métodos clásicos de medida enzimática (con sustratos derivados del p-Nitrofenol) y del de medida por fluorescencia en microplacas se realizó sobre tres actividades enzimáticas.

Se llevó a cabo sobre 57 suelos aportados por el Grupo Español de Enzimología de Suelos, con un rango de pH entre 4 y 8,5 y un contenido en MO y propiedades físicas y químicas muy variados.

***a) Actividad Fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2)***

Su determinación se basó en la incubación del suelo con p-nitrofenil fosfato (PNF) en medio ácido (pH 6,0) y posterior medición colorimétrica del p-nitrofenol (PNP) liberado, que en medio básico desarrolla color amarillo (Tabatabai, 1994, modificado en García *et al.*, 2003).

La actividad fosfatasa acida se expresa en  $\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

***b) Actividad Fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1)***

De igual manera que con la fosfatasa ácida con el tampón preparado a pH 12 (con el suelo el pH final está entre 9,5 - 10).

La actividad fosfatasa se expresó en  $\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

***c) Actividad  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21.)***

Se utilizó el método propuesto por Tabatabai (1994) basado en la evaluación colorimétrica del p-nitrofenol (PNP) liberado en presencia de p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (PNG) como sustrato, de forma análoga a la determinación descrita para la actividad fosfatasa.

El tampón también es el THAM 0,1M a pH 3 (la mezcla suelo tampón queda entre 6-6.5).

La actividad  $\beta$ -glucosidasa se expresó en  $\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

### **3.5. PUESTA A PUNTO DEL NUEVO MÉTODO DE MEDIDA SIMULTÁNEA DE ENZIMAS**

#### **3.5.1. Elección de los enzimas**

Numerosos estudios que abordan el perfil enzimático del suelo, muestran entre ocho y diez actividades enzimáticas como las más indicativas por su papel relevante en el control de las interrelaciones edafo-biológicas, su relación directa con la degradación de la MO y la disponibilidad de nutrientes.

En numerosos trabajos (Saiya-Cork *et al.*, 2002; Marx *et al.*, 2005; Sinsabaugh *et al.*, 2005) se señalan como las más significativas para estudios en suelos a la ureasa por su papel en la hidrólisis de urea, la fenoloxidasa y la peroxidasa, por estar relacionadas con la síntesis de sustancias húmicas y la degradación de lignina, la fosfatasa ácida, dada su contribución a la hidrólisis de P orgánico en suelos forestales, la celobiohidrolasa y la  $\beta$ -D-glucosidasa, como responsables de la degradación de celulosas, la  $\beta$ -glucosidasa, implicada en la degradación de almidón, la  $\beta$ -D-xilosidasa por su papel en la degradación de hemicelulosas, la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa como uno de los enzimas relacionados con la degradación de quitina y la leucin-aminopeptidasa como uno de los muchos tipos de peptidasas y proteasas que es posible determinar en el suelo. Conjunto enzimático que puede aumentarse notablemente dadas las posibilidades de encontrar una amplia variedad de sustratos derivados del MUB o la AMC, pero cuya información puede ser redundante con la que nos da este conjunto de actividades.

De todas ellas, las tres primeras, si bien se pueden determinar colorimétricamente en un formato de microplaca, no es posible generalizarlas a todo tipo de suelos dada la interferencia que produce la suspensión del suelo y el no existir alternativas a su medida mediante sustratos fluorescentes. En este trabajo de Tesis Doctoral se ha optado por eliminar su determinación.

Ha parecido conveniente incorporar la determinación de otras actividades enzimáticas complementarias como la  $\beta$ -glucuronidasa, dado su papel en la degradación de las paredes celulares bacterianas y como enzima clave como herramienta nematocida; la fosfatasa alcalina, puesto que los suelos del trabajo son suelos agrícolas, donde aparece una contribución importante de esta actividad a la hidrólisis de P-orgánico; la arilsulfatasa por su conexión con el metabolismo de S y dada la abundancia de compuestos azufrados que tienen determinados residuos vegetales introducidos en los ensayos de biofumigación; también se han analizado dos enzimas hidrolasas: la acetato-deacetilasa (que afecta a

un gran número de polímeros acetilados) y la palmitato-esterasa, (que recicla o transfiere ácidos grasos) y la  $\beta$ -galactosidasa.

La acetato-deacetilasa, de localización intracelular, es una esterasa de amplio espectro y está relacionada con la actividad microbiana global del suelo de una forma similar a la fluoresceín-diacetato (FDA) hidrolasa y que ha sido muy utilizada para monitorizar en el suelo el control de fitopatógenos, mediante mecanismos de competencia, hecho que también puede hacerse extensivo a la  $\beta$ -galactosidasa; la palmitato-esterasa de ellas, bastante menos estudiada, si bien puede tener su importancia cuando al suelo se adicionan residuos orgánicos donde pueden existir fracciones lipídicas.

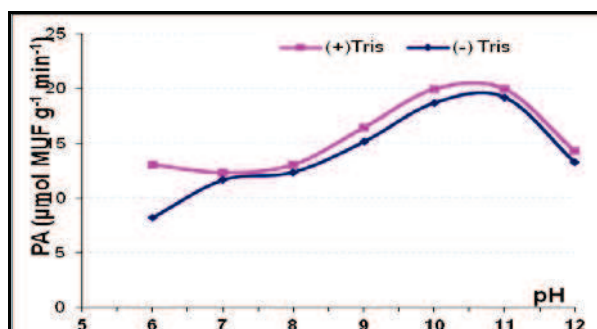
### 3.5.2. Optimización de parámetros

#### Almacenamiento de muestras

Sabemos que hay una gran variabilidad de los resultados enzimáticos según la manipulación y conservación de las muestras (Gianfreda y Ruggiero, 2006; Lee *et al.*, 2007; DeForest, 2009). Ante la imposibilidad de realizar los ensayos con las muestras frescas debido al elevado número de determinaciones a realizar, se decidió congelar las muestras a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  sacando para descongelar en frigorífico durante 48 horas y posteriormente a temperatura ambiente durante 24 horas, para asegurar la reactivación de la muestra. De esa forma podemos determinarlas de forma programada por nosotros y en igualdad de condiciones de trabajo para todas ellas.

#### Determinación del pH

Se hizo un barrido de la actividad enzimática para conocer su pH óptimo y que en cada caso permita una señal máxima de fluorescencia para la muestra de suelo enmendado, que no tiene porque ser el referido en métodos diferentes publicados (Turner, 2010) (Fig. 3.5).

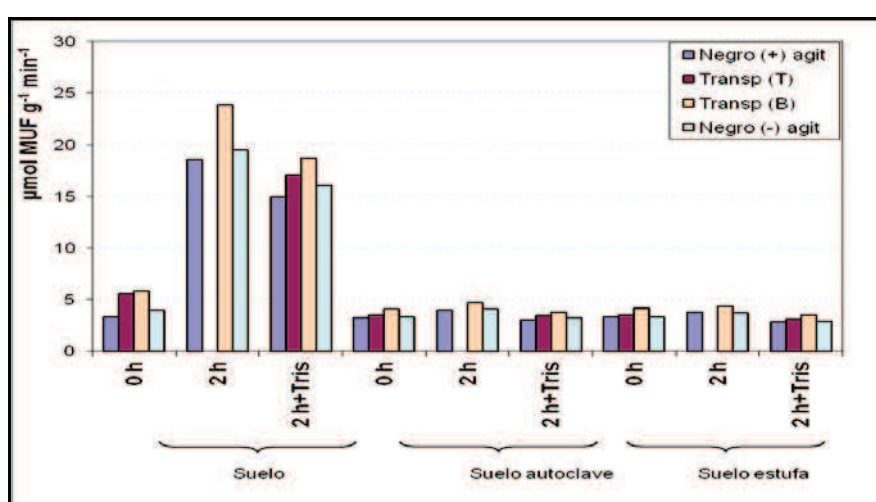


**Figura 3.5.**-Barrido de pH para la determinación óptima de la fosfatasa ácida

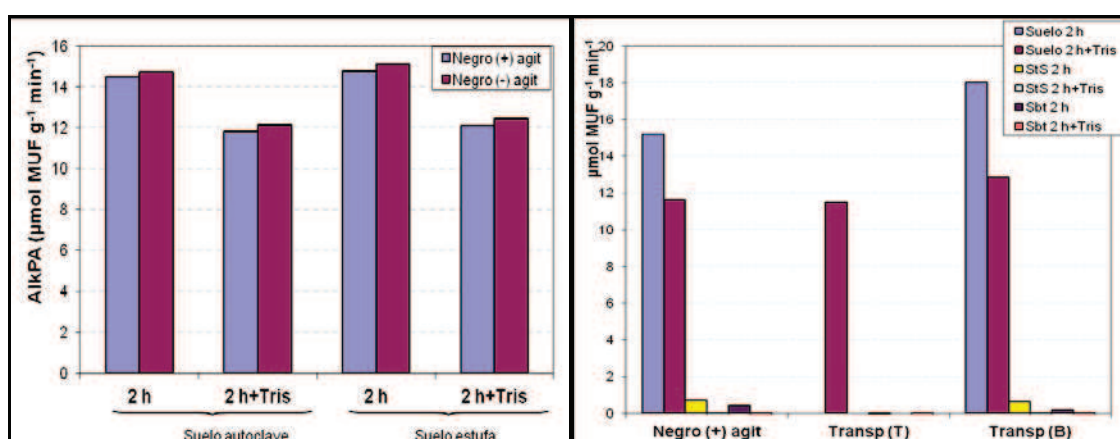
Una vez elegido el pH óptimo de cada actividad enzimática se mantiene mediante el uso de tampón THAM 0,05M ya definido anteriormente en material y métodos.

### Prueba de placa transparente y placa negra opaca. Elección del blanco y curva patrón

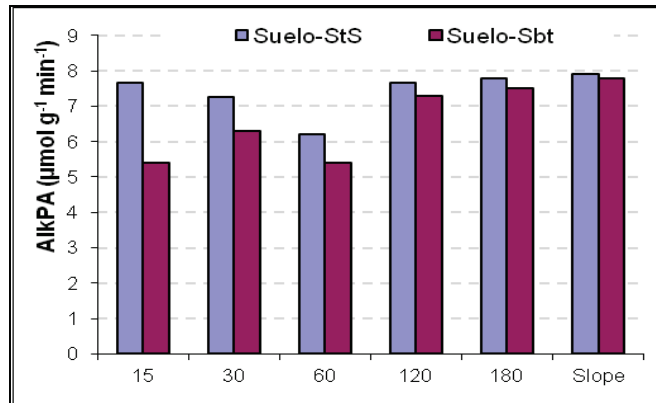
Se hacen pruebas con el uso de suelo estéril ya sea en vía húmeda (en autoclave) o seca (en estufa), teniéndolo también presente para la curva patrón ya que se debe contabilizar el efecto "quenching" o apagado en las curvas patrón y en los blancos usados, (Wallenstein *et al.*, 2009) (Figs. 3.6, 3.7 y 3.8).



**Figura 3.6.-** Pruebas de fluorescencia para fosfatasa alcalina, en placas transparentes y placas negras opacas, con suelo natural, suelo estéril por vía húmeda y vía seca.

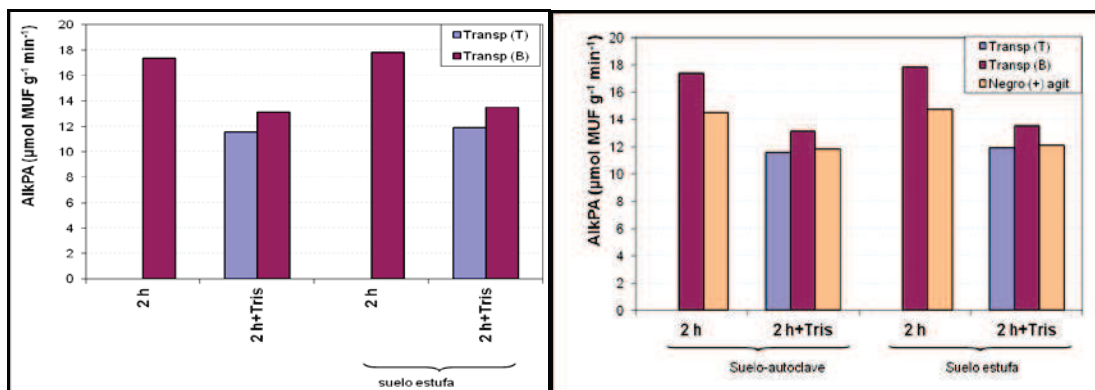


**Figura 3.7.-** Pruebas de fluorescencia para fosfatasa alcalina, en placas negras opacas, con suelo natural, suelo estéril por vía húmeda (StS) y vía seca (Sbt), añadiendo o no agitación(+agit)

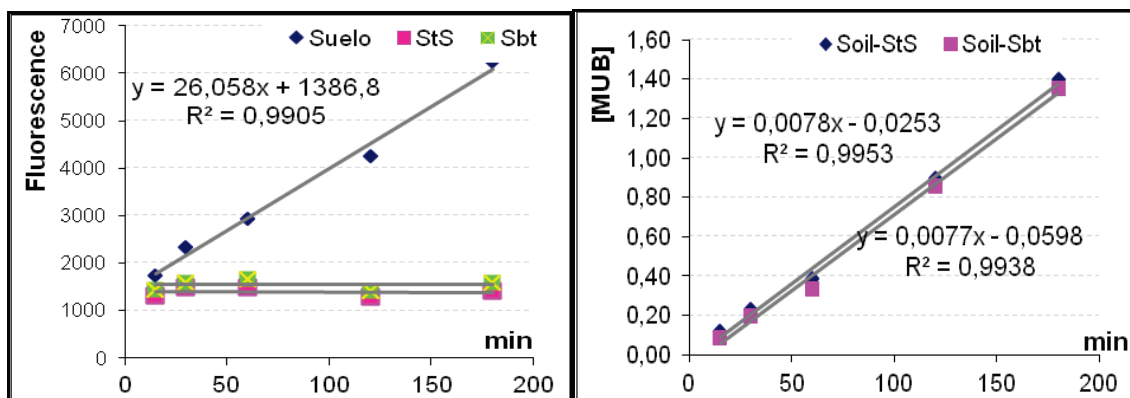


**Figura 3.8.-** Pruebas de fluorescencia de fosfatasa alcalina en placas negras opacas, con la diferencia entre suelo natural y suelo estéril por vía húmeda y vía seca, en función del tiempo de incubación.

No se aprecia diferencia significativa entre la fluorescencia en los suelos esterilizados por ambas vías, cuando la incubación alcanza las 3 h. (Fig.3.9). Tampoco entre las pendientes de ambas rectas (Fig.3.10).



**Figura 3.9.-** Pruebas de fluorescencia de fosfatasa alcalina en placas transparentes y negras opacas, con la diferencia entre suelo natural y suelo estéril por vía húmeda y vía seca, una vez incubado y parado con Tris 0,5M a pH 12

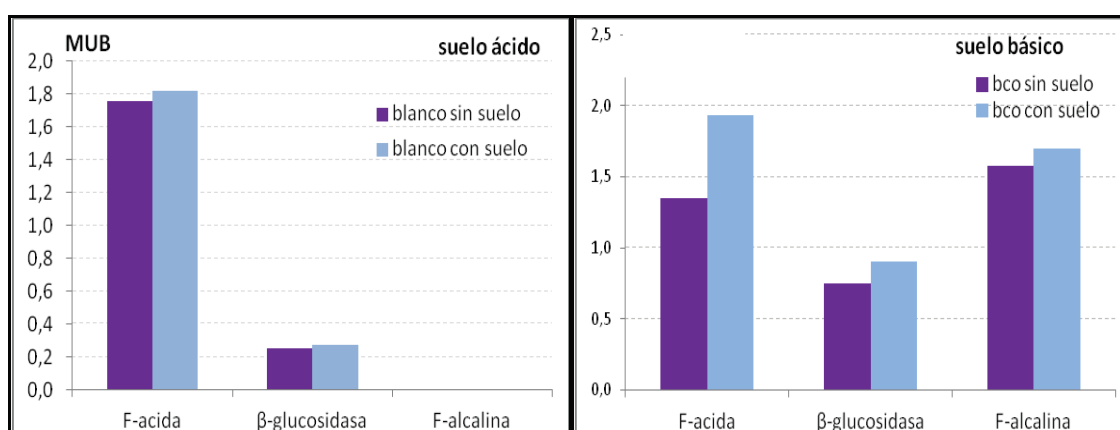


**Figura 3.10.-** Pruebas de fluorescencia de fosfatasa alcalina diferencia entre suelo natural y suelo estéril por vía húmeda y vía seca, en función del tiempo de incubación.

Posteriormente, se utilizó la lectura de fluorescencia con diferentes blancos con y sin suelo para tres actividades enzimáticas: fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y  $\beta$ -D-glucosidasa y para dos suelos con valor de pH diferente.

En todos los casos, el suelo para los blancos, se incorporó una vez realizada la incubación con agitación a 30 °C, e inmediatamente se paró la reacción con 50  $\mu$ l de Tris 0,5M a pH 12.

Según las gráficas que se ven a continuación en el suelo ácido no encontramos diferencias apreciables entre ambos valores de blancos, mientras que en el suelo básico se aprecia diferencia entre ambos blancos para la medida de la fosfatasa alcalina lo que no resulta interesante ya que los valores de actividad en un suelo básico para la fosfatasa ácida no son significativos. Se debe destacar que aun cuando los valores no se diferencien estadísticamente, si se observa que son ligeramente superiores en el caso del blanco con suelo (Fig. 3.11).



**Figura 3.11.** - Lectura de MUB en la actividad de la fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y de la  $\beta$ -glucosidasa frente a los diferentes blancos para dos tipos de suelo, ácido y alcalino.

### Parada de reacción con NaOH y TRIS a pH 12

Como con el método de fluorescencia debemos llevarlo a cabo a pH >9, algunos autores optan por usar NaOH para elevar el pH inmediatamente antes de leer la fluorescencia (DeForest, 2009; Saiya-Cork *et al.*, 2002) para las actividades con pH óptimo menor de 9, pero no siendo necesario en el caso de ensayos en medios alcalinos, como la fosfatasa ácida que realizamos a pH 10.

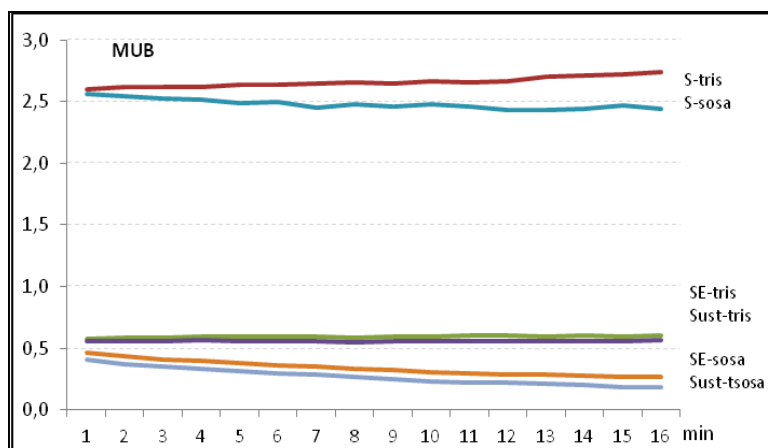
En nuestro caso, salvo la actividad anteriormente citada, todas las restantes se efectúan a pH menores por lo que se usó TRIS 0.5M a pH 12 para incrementar el pH y realizar la lectura inmediatamente después

de la adición, optando por TRIS ante la NaOH puesto que se observaba que la fluorescencia de MUB y de AMC variaba con el tiempo al añadir la solución de NaOH (DeForest, 2009).

Para evitar esas variaciones, se recomienda la lectura de la fluorescencia inmediatamente a la adición de TRIS, y por ello se aplicó la adición en el caso de la fosfatasa alcalina para mantener el mismo protocolo de medida en todas las actividades estudiadas.

Se utilizó una lectura de fluorescencia variando el blanco con suelo original y suelo estéril autoclavado y también se usaron dos soluciones básicas para leer la placa, Tris 0,5 M pH 12 y NaOH 0.2 M (Fig. 3.12).

La experiencia se realizó con suelo estéril añadiéndolo al comienzo de la incubación y con suelo original añadiéndolo posteriormente, justo antes de la adición de Tris y de NaOH para leer la fluorescencia.



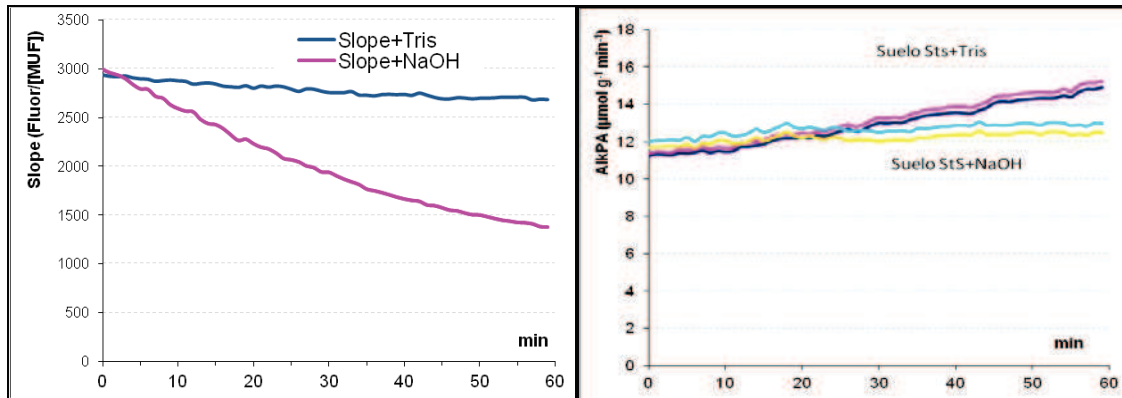
**Figura 3.12.-** Lectura de fluorescencia (MUB) para diferentes experiencias de parada con tris o con NaOH.

En la parte superior de la Fig.3.12. aparece representada la fluorescencia para el suelo parado con Tris y con NaOH y se observa que parando con NaOH, la señal disminuye ligeramente mientras que con Tris aumenta ligeramente.

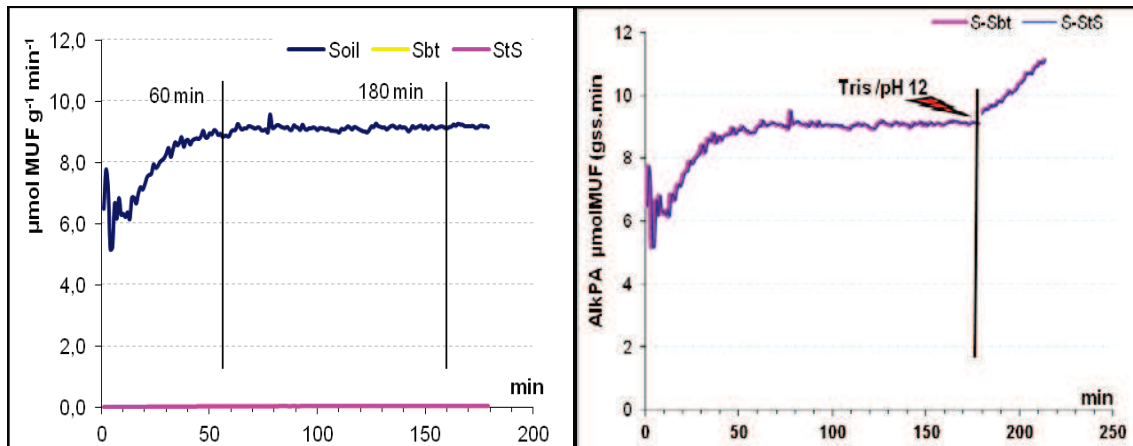
Para el sustrato y el suelo estéril, parado con tampón TRIS, prácticamente no se diferencia la señal a lo largo del tiempo y en el caso del sustrato y el suelo estéril al pararlo con NaOH se aprecia una disminución de la señal en función del tiempo (Fig. 3.13)

Como se aprecia hidrólisis de alguno de los sustratos al usar NaOH, se optó por parar la reacción con la solución de Tris 0.5M a pH 12 (Fig.3.14).





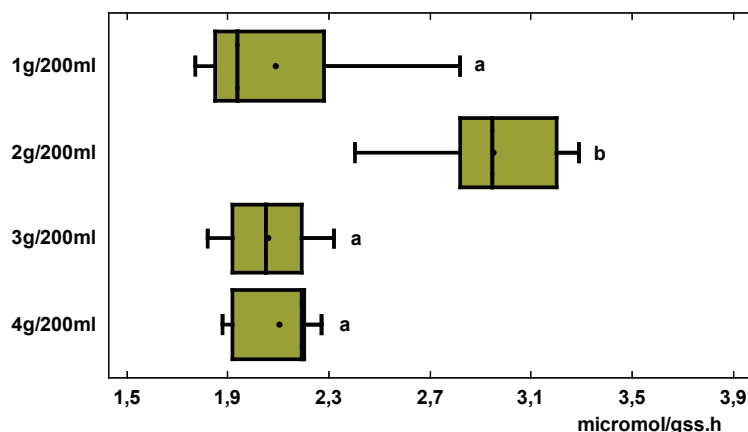
**Figura 3.13.-** Pendiente de la lectura de fluorescencia para diferentes reacciones paradas con Tris o NaOH. La gráfica de la derecha parada con tris y con sosa de la reacción catalizada con fosfatasa alcalina



**Figura 3.14.-** Actividad fosfatasa alcalina antes y después de parar la reacción con Tris 0,5M pH12

### Proporción optimizada suelo-agua para la suspensión de suelo

Se realizan las medidas de actividad para diferentes suspensiones de suelo: 1g, 2g 3g y 4g en 200 ml de agua. Partimos de 200 ml en vez de 100 debido a que es más fácil la agitación, homogeneización y pipeteo con este volumen. Es importante homogeneizar la suspensión de suelo, pero también ejecutarla justo antes de comenzar el ensayo (German *et al.*, 2011). Al mismo tiempo debe evitarse excederse si queremos eliminar errores por alteraciones de los enzimas, o por liberación de enzimas intracelulares (German *et al.*, 2011).



**Figura 3.15.-** Actividad enzimática de la B-glucosidasa frente a los diferentes proporciones de suelos. Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas.

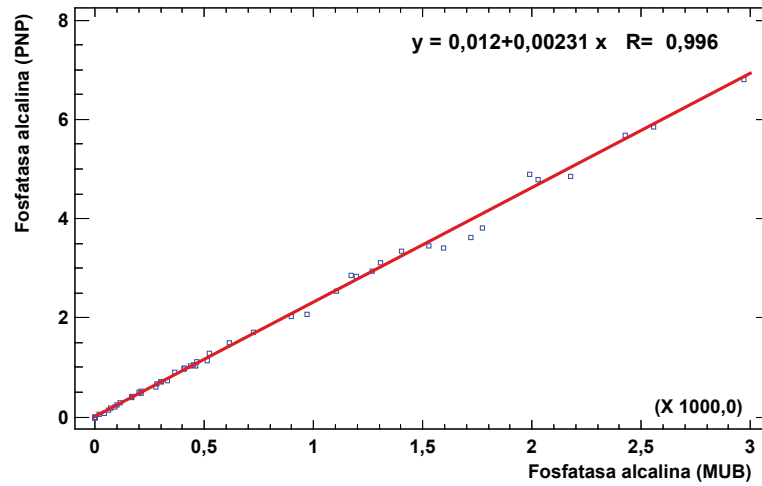
Por ello, la proporción elegida corresponde a 2 g de suelo en 200ml de agua obteniéndose una diferencia significativa con los restantes valores ensayados, y no variando la señal para las otras proporciones de suelo agua (Fig 3.15).

### 3.5.3. Comparación entre metodología tradicional y medida con microplacas

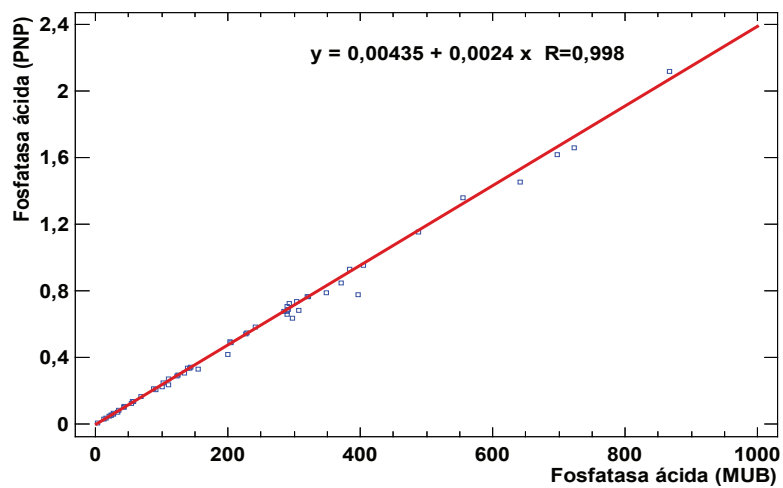
Para establecer una comparación entre la medida de actividad por el método tradicional con sustratos derivados del p-nitrofenol y por fluorescencia con microplacas, usamos 57 suelos de grupo de enzimología de suelos de Barcelona, Burgos, Madrid, Murcia y Valencia con pH diferentes desde 4 a 8.4 y características físico químicas también distintas.

Comparamos los valores obtenidos para las actividades fosfatasa alcalina y ácida y la  $\beta$ -D-glucosidasa, con ambos métodos que permiten alcanzar para las tres actividades medidas, altas correlaciones entre el método tradicional y el de lectura de fluorescencia, lo que confirma la aplicación de esta técnica de medida enzimática, para este trabajo.

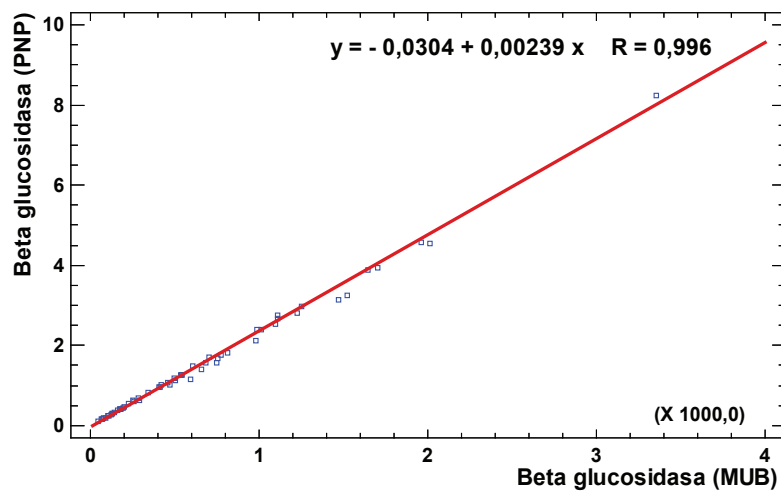
En los tres casos estudiados se incluye la ecuación de correlación entre los valores obtenidos y el coeficiente de correlación, que en los tres casos alcanza valores de 0,998 y 0,996 (Figs. 3.16, 3.17 y 3.18).



**Figura 3.16.-** Correlación entre valores de fosfatasa alcalina por ambos métodos



**Figura 3.17.-** Correlación entre valores de fosfatasa ácida por ambos métodos



**Figura 3.18.-** Correlación entre valores de  $\beta$ -glucosidasa por ambos métodos

### **3.6. PROTOCOLO DE EXPERIENCIAS REALIZADAS**

#### **3.6.1. EXPERIENCIA I.**

##### *Suelo sin y con saturación de agua y aportes orgánicos (purín líquido y fragmentos de rábano)*

Las muestras de suelo se prepararon añadiendo 300 g de suelo de peso seco equivalente, en recipientes potencialmente herméticos de 250 ml de volumen de material plástico, sin añadir o añadiendo el aporte orgánico y agua destilada al 100% de su capacidad de campo. De forma alternativa, se trabaja en el envase abierto (que permita intercambio de oxígeno) y cerrado herméticamente (con baja tensión de O<sub>2</sub> disponible).

Los 300 g de suelo se mezclaron con 10 cm<sup>3</sup> de purín, para tener una relación equivalente a 87.000 l de purín por ha (80 kg de N/ha), se llevaron a capacidad de campo con agua y se cerraron herméticamente. La misma experiencia se realizó con la misma dosis a saturación pero en abierto.

El rábano (germinado en cámara), una vez alcanzados unos 8-10 cm de altura, se troceó a un tamaño aproximado de 0,5 cm y se mezcló de forma homogénea con el suelo. De la misma forma que anteriormente se trató el suelo con una dosis de 8 g de rábano fresco equivalente a 70 T/ha (120 Kg de N/ha).

En cada caso las diferentes pruebas se identificaron con las siglas:

**C.-** Suelo original sin incubar

**Aa.-** Agua en abierto en 300 g. suelo saturado

**Ac.-** Agua en cerrado en 300 g. de suelo saturado

**Pa.-** Purín abierto 10 ml de purín (equivale a 0,0031g de N /100g suelo)

**Pc.-** Purín cerrado 10 ml de purín

**Ra.-** Rábano abierto – 8 g en 300g suelo

**Rc.-** Rábano cerrado – 8 g (equivale a 0,00468g de N/100g suelo)

Las muestras fueron dispuestas en un diseño completamente aleatorio con las cuatro repeticiones por tratamiento y, una vez mezcladas y cerradas herméticamente, para mantener una limitación de O<sub>2</sub>, se incubaron a 30 ° C en la oscuridad (Iso-Temp Incubadora de 304; Fisher Scientific Ltd. Canadá) durante 30 días. Pasados los 30 días se sacaron las muestras para proceder a su análisis. Se realizaron medidas de parámetros físico-químicos (pH conductividad eléctrica, y N-nitratos solubles) y los análisis nematológico y enzimáticos correspondientes.

### 3.6.2. EXPERIENCIA II.

#### *Aporte de purín líquido y fragmentos de rábano a diferentes dosis*

Se usaron para esta experiencia el suelo, purín líquido y rábano ya descritos en la experiencia anterior. Se procedió como en el caso anterior, partiendo de 300 g de suelo de peso seco equivalente, y llevándolo a recipientes herméticos de 250 ml, de material plástico y añadiendo agua destilada al 100% de su capacidad de campo.

Se aportaron al suelo purín líquido en volúmenes de 1, 5, 10 y 15 cm<sup>3</sup> para obtener una relación final de 8, 40, 80 y 120 kg de N/ha. En cuanto a la aplicación de rábano, las dosis usadas fueron de 4 y 10g equivalentes a 35 y 108 T/ha o lo que es lo mismo 60 y 150 kg de N/ha. La muestra testigo se realiza con 300 g de suelo y se lleva a saturación con agua destilada.

**T.-** Testigo – suelo saturado de agua

**P1.-** Purín Dosis A – 1 cm<sup>3</sup> de purín equivale a 0,00031 g N /100 g suelo

**P2.-** Purín Dosis B – 5 cm<sup>3</sup> de purín equivale a 0,0015 g N/100 g suelo

**P3.-** Purín Dosis C – 10 cm<sup>3</sup> de purín equivale a 0,0031 g N /100 g suelo

**P4.-** Purín Dosis D – 15 cm<sup>3</sup> de purín equivale a 0,0046 g N/100 g suelo

**R1.-** Rábano Dosis A – 4 g equivalente a 0,00234 g N /100g suelo

**R2.-** Rábano Dosis B – 10 g equivalente a 0,00585 g N /100g suelo

Como anteriormente (experiencia I), las muestras fueron dispuestas en un diseño aleatorio con las cuatro repeticiones por tratamiento y una vez mezcladas y cerradas herméticamente para mantener el control de gases se incubaron a 30 ° C en la oscuridad durante 30 días. Pasado ese tiempo se sacaron las muestras para su análisis.

Se realizan medidas de parámetros físico-químicos (pH conductividad eléctrica, y N-nitratos solubles) análisis nematológico y análisis enzimático.

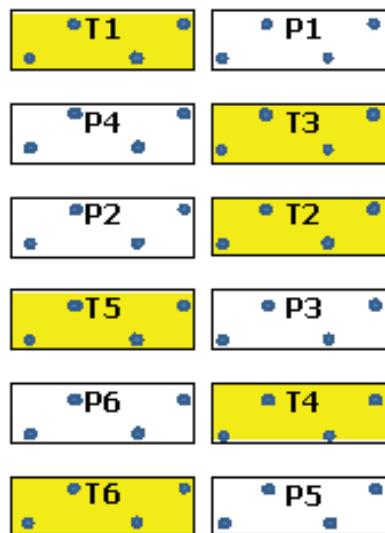
### 3.6.3. EXPERIENCIA III.

#### *Aplicación de purín sólido en campo en dosis única*

La experiencia se realizó en la misma finca de donde se obtuvo el suelo para todas las experiencias en laboratorio de control de *G.rostochiensis*.

Para el diseño del experimento se establecieron sub-parcelas de 20 x 50 m, según esquema en (Fig.13.19), donde se aplicó el purín deshidratado en dosis de 4 T/ha. Si se tiene en cuenta que contiene un 3,56 % de N<sub>t</sub> esto es equivalente a una dosis de nitrógeno de 0,00547 g de N /100 g de suelo. Para mezclarlo bien, se realizó un pase de fresadora y rotovator, y posteriormente un riego intenso para llegar a capacidad de campo. Se selló con pasada de rodillo.

Se hizo un primer muestreo inicial por cuadruplicado y otro a los 30 días. Se muestreó al azar en cada sub-parcela según la Fig. 3.19 y para cada una de las muestras recogidas se realizaron 4 réplicas.



**Figura 3.19.-**Croquis de la parcela experimental para la aplicación de purín a una única dosis

**T1...T6** - Suelo testigo sin aplicación de purín

**P1...P6** - Suelo con aplicación de purín.

Se realizaron medidas de parámetros físico-químicos (pH conductividad eléctrica, y N-nitratos solubles) análisis nematológico y enzimáticos.

**3.6.4. EXPERIENCIA IV.*****Aplicación en laboratorio de purín deshidratado, con dosis de 5, 10, y 20 g en 500 g suelo***

Se partió de muestras de 500 g de suelo aportado con 5, 10, y 20 g de purín sólido deshidratado respectivamente. Se mezclaron intensamente, saturaron con agua destilada y sometieron a incubación durante 30 días a 30°C, según se ha descrito en las experiencias anteriores. Las muestras se dispusieron de forma aleatoria y realizaron cuatro réplicas por experiencia.

Pasados los 30 días de incubación las muestras se sacaron y se realizó la medida de las actividades enzimáticas. Ahora se midieron estas antes y después de la incubación. La nomenclatura de las muestras será como sigue:

Testigo suelo saturado con agua e incubado	<b>(T)</b>
Residuo 5g en los 500g de suelo inicial (sin incubar)	<b>(P5 i)</b>
Residuo 10g en los 500g de suelo inicial (sin incubar)	<b>(P10 i)</b>
Residuo 20g en los 500g de suelo inicial (sin incubar)	<b>(P20 i)</b>
Residuo dosis 5g en los 500g de suelo incubado	<b>(P 5)</b>
Residuo dosis 10g en los 500g de suelo incubado	<b>(P10)</b>
Residuo dosis 20g en los 500g de suelo incubado	<b>(P20)</b>

**3.6.5. EXPERIENCIA V.*****Aplicación, en laboratorio, de aporte de estiércol de oveja a dosis 5, 10, y 20 g en 500 g suelo***

Las muestras se dispusieron de forma aleatoria realizándose cuatro réplicas por experiencia.

Se mezclaron 5, 10, y 20 g de estiércol de oveja con réplicas de 500 g de suelo y se dispusieron, como en casos anteriores, a incubar, tras la saturación de agua, durante 30 días a 30 °C. Pasado ese tiempo se sacaron las muestras y se realizó la medida de control de nematodos y de las actividades enzimáticas antes y después de la incubación

La nomenclatura empleada fue como sigue:

Testigo suelo saturado con agua e incubado	<b>(T)</b>
Residuo 5g en los 500g de suelo inicial (sin incubar)	<b>(O 5 i)</b>
Residuo 10g en los 500g de suelo inicial (sin incubar)	<b>(O10 i)</b>
Residuo 20g en los 500g de suelo inicial (sin incubar)	<b>(O20 i)</b>
Residuo dosis 5g en los 500g de suelo incubado	<b>(O 5)</b>
Residuo dosis 10g en los 500g de suelo incubado	<b>(O10)</b>
Residuo dosis 20g en los 500g de suelo incubado	<b>(O20)</b>



### **3.6.6. EXPERIENCIA VI.**

#### ***Aplicación en laboratorio de estiércol de gallina en dosis de 5, 10 y 20 g en 500 g suelo***

Se aportaron a 500 g de suelo las dosis de gallinaza de tal forma que se mezclaron intensamente, con adición de agua hasta saturación, para posteriormente incubar según se ha especificado en apartados anteriores.

Las muestras se nombrarán según la letra G para la aplicación de estiércol de gallina.

Testigo suelo saturado con agua e incubado	<b>(T)</b>
Residuo dosis 5g en los 500g de suelo sin incubar	<b>(G-5i)</b>
Residuo dosis 10g en los 500g de suelo sin incubar	<b>(G-10i)</b>
Residuo dosis 20g en los 500g de suelo sin incubar	<b>(G-20i)</b>
Residuo dosis 5g en los 500g de suelo incubado	<b>(G-5)</b>
Residuo dosis 10g en los 500g de suelo incubado	<b>(G-10)</b>
Residuo dosis 20g en los 500g de suelo incubado	<b>(G-20)</b>

Los análisis efectuados son el nematológico y enzimáticos anterior y posterior a la incubación.

**3.6.7. EXPERIENCIA VII.*****Experiencia, en laboratorio, con diferentes dosis de restos de planta de fresa de 5, 10 y 20 g en 500 g de suelo***

Los restos de fresa procedieron de plantas de vivero (Salamanca).

A muestras de 500 g de suelo se le aplicaron dosis de restos de fresa de 5, 10 y 20 g. troceadas finamente, homogeneizaron y saturaron con agua destilada. Se incubaron en laboratorio durante 30 días a 30 °C.

Las muestras se dispusieron de forma aleatoria y se trabajó con cuatro réplicas por experiencia. Pasados 30 días de incubación, se tomaron las muestras y se realizó el análisis de quistes *Globodera rostochiensis* y la medida de las actividades enzimáticas, antes y después de la incubación.

La nomenclatura de las muestras será como sigue:

Testigo suelo saturado con agua e incubado	<b>(T)</b>
Residuo dosis 5g en los 500g de suelo sin incubar	<b>(F5 i)</b>
Residuo dosis 10g en los 500g de suelo sin incubar	<b>(F10 i)</b>
Residuo dosis 20g en los 500g de suelo sin incubar	<b>(F20 i)</b>
Residuo dosis 5g en los 500g de suelo incubado	<b>(F 5)</b>
Residuo dosis 10g en los 500g de suelo incubado	<b>(F10)</b>
Residuo dosis 20g en los 500g de suelo incubado	<b>(F20)</b>

### 3.6.8. EXPERIENCIA VIII.

#### *Aplicación en laboratorio de residuos del cultivo de setas (*Pleurotus ostreatus*) en dosis de 5, 10 y 20 g en 500 g de suelo*

A 500 g de suelo se aplicaron dosis crecientes de 5, 10 y 20 g de restos de cultivo de *Pleurotus ostreatus*, homogeneizando y saturando de agua, para incubar posteriormente.

Las muestras se nombrarán según la sigla CH para la aplicación de residuos de cultivo de champiñón (*Pleurotus ostreatus*)

Testigo suelo saturado con agua e incubado	<b>(T)</b>
Residuo dosis 5g en los 500g de suelo sin incubar	<b>(CH-5i)</b>
Residuo dosis 10g en los 500g de suelo sin incubar	<b>(CH-10i)</b>
Residuo dosis 20g en los 500g de suelo sin incubar	<b>(CH-20i)</b>
Residuo dosis 5g en los 500g de suelo incubado	<b>(CH-5)</b>
Residuo dosis 10g en los 500g de suelo incubado	<b>(C-10)</b>
Residuo dosis 20g en los 500g de suelo incubado	<b>(CH-20)</b>

Los análisis efectuados son el análisis nematológico y enzimático anterior y posterior a la incubación.

### **3.5.9. EXPERIENCIA IX.**

#### ***Aplicación en laboratorio de restos de cosecha de maíz con urea, en dosis de 5, 10 y 20 g en 500 g de suelo***

Tres muestras de 500 g del mismo suelo, infectado de forma natural con *G rostochiensis*, se mezclaron con 0, 5, 10 y 20 g de residuos de restos de cosecha de maíz, previamente secado a 60 ° C durante 72 horas, finamente picado y tamizado a 2 mm de malla, en botellas de cristal de 1 litro.

Las mezclas se humedecieron con agua destilada o diferentes soluciones de urea para obtener las dos mezclas, en el 100% de la capacidad de retención de agua en el suelo y para ajustar la relación C / N de los residuos a 10, con el fin de obtener una acción nematicida sin llegar fitotóxica.

#### **Preparación de las muestras**

**Control (C)** - 500 g suelo original sin incubación con 140 ml de agua destilada.

**Testigo (T)** – 500 g suelo original se incubaba con 140 ml de agua destilada.

**(M5)** - suelo con 5 g de maíz y 2,077 g/l de urea en 140 ml de agua destilada y otra cantidad adicional de agua destilada para absorber los residuos (5 ml /g de residuo).

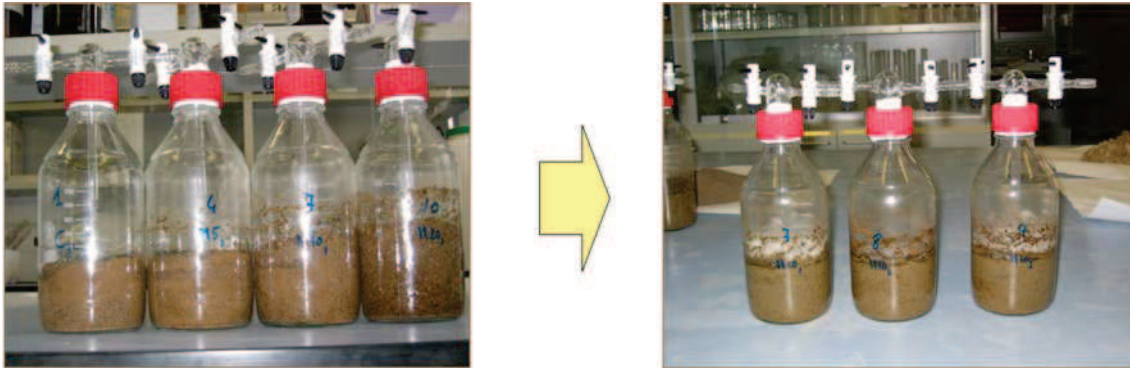
**(M10)** - suelo con 10 g de maíz y 4,154 g/l de urea en 140 ml de agua destilada y otra cantidad adicional de agua destilada para absorber los residuos (5 ml /g de residuo).

**(M20)** - suelo con 20 g de maíz y 8,307 g/l de urea en 140 ml de agua destilada y otra cantidad adicional de agua destilada para absorber los residuos (5 ml /g de residuo).

Se incubaron en botellas de vidrio selladas con teflón y cerradas con un tapón de rosca en cuyo centro se inserta un dispositivo con dos llaves, una para llenar la cabeza de muestreo y la atmósfera del espacio y la otra para insertar un medidor de presión positiva (Fig. 3.20).

Después, el control y las muestras fueron aspirados a -25 pulgadas de mercurio, rellenas de N<sub>2</sub> hasta alcanzar una presión de 1 bar y se incubaron durante 30 días a 30 ° C.

El control (C) se mantiene congelado a -20 ° C hasta realizar el análisis del suelo.



**Figura 3.20.-** Incubación en botellas selladas con válvula de apertura y cierre

**3.6.10. EXPERIENCIA X.*****Aplicación en laboratorio de bioresiduo estabilizado de lodo de depuradora y de lodo con cal en dosis de 5, 10 y 20 g en 500 g de suelo***

Se utilizaron dosis crecientes (5, 10 y 20 g) de biosólido estabilizado de lodo y en otra experiencia paralela dosis iguales de biosólido más cal hasta alcanzar pH 12.

Se procedió a incorporar a 500 g de suelo las dosis de biosólido estabilizado de lodo, homogeneizando y saturando de agua, para incubar posteriormente.

Las muestras se nombraran según la letra **L** para la aplicación de compost de lodo de depuradora.

Testigo suelo saturado con agua e incubado	<b>(T)</b>
Residuo dosis 5g en los 500g de suelo sin incubar	<b>(L-5i)</b>
Residuo dosis 10g en los 500g de suelo sin incubar	<b>(L-10i)</b>
Residuo dosis 20g en los 500g de suelo sin incubar	<b>(L-20i)</b>
Residuo dosis 5g en los 500g de suelo incubado	<b>(L-5)</b>
Residuo dosis 10g en los 500g de suelo incubado	<b>(L-10)</b>
Residuo dosis 20g en los 500g de suelo incubado	<b>(L-20)</b>

Para la experiencia de lodo con cal, las dosis usadas son las mismas que las anteriores pero se añade cal para ajustar el pH a 12. Así mezclamos 0.2, 0.4, y 0.6 g de cal para las dosis de lodo de 5, 10 y 20 respectivamente.

Las muestras se han representado con las letras **L+C** :

Testigo suelo saturado con agua e incubado	<b>(T)</b>
Residuo dosis 5g en los 500g de suelo sin incubar	<b>(L+C-5i)</b>
Residuo dosis 10g en los 500g de suelo sin incubar	<b>(L+C-10i)</b>
Residuo dosis 20g en los 500g de suelo sin incubar	<b>(L+C-20i)</b>
Residuo dosis 5g en los 500g de suelo incubado	<b>(L+C-5)</b>
Residuo dosis 10g en los 500g de suelo incubado	<b>(L+C-10)</b>
Residuo dosis 20g en los 500g de suelo incubado	<b>(L+C-20)</b>

Los análisis efectuados son nematológico y enzimáticos.

### **3.6.11. EXPERIENCIA XI**

#### ***Aplicación en laboratorio de residuo sólido urbano bioestabilizado en dosis de 5, 10 y 20 g en 500 g de suelo***

A 500 g de suelo se incorporaron dosis crecientes de 5, 10 y 20 g de bioresiduo sólido urbano homogeneizado y se saturaron con agua e incubaron posteriormente a 30 °C durante 30 días.

Las muestras se nombrarán según la letra RSU para la aplicación, y se han realizado análisis nematológico y enzimático.

Testigo suelo saturado con agua e incubado	<b>(T)</b>
Residuo dosis 5g en los 500g de suelo sin incubar	<b>(RSU-5i)</b>
Residuo dosis 10g en los 500g de suelo sin incubar	<b>(RSU-10i)</b>
Residuo dosis 20g en los 500g de suelo sin incubar	<b>(RSU-20i)</b>
Residuo dosis 5g en los 500g de suelo incubado	<b>(RSU-5)</b>
Residuo dosis 10g en los 500g de suelo incubado	<b>(RSU-10)</b>
Residuo dosis 20g en los 500g de suelo incubado	<b>(RSU-20)</b>

### 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos se han realizado utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS CENTURION XVI.I

Para ello los resultados experimentales obtenidos se analizaron mediante las técnicas del **Análisis de la Varianza**, con un nivel de confianza del 95% para la diferenciación entre los tratamientos con una significación de 0,05 ( $p < 0,05$ ). Para determinar la significación de las diferencias entre las medias de los diferentes grupos o niveles establecidos, se usó el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD “Least Significance Difference”) de Fisher. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma letra a,b,c.

Las **Matrices de Correlación** se obtuvieron utilizando las correlaciones de Pearson, entre cada par de variables. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, indicando el signo la correlación negativa o positiva entre las variables y nos mide la fuerza de la relación lineal entre ellas. Entre paréntesis, se indicó el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. El tercer número en cada bloque de la tabla es un valor-P que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas. Valores-P menores de 0,05 indican correlaciones con un nivel de confianza del 95,0%, y representaremos con \*  $p < 0,05$  , \*\*  $p < 0,01$  y por último \*\*\* si  $p < 0,001$ .

Solo se consideran los valores mayores de 0,5 para el estudio de las correlaciones entre mortalidad y las variables estudiadas.

Para todas las variables estudiadas, se realizó además un **Análisis de Componentes Principales (ACP)**, con la finalidad de determinar las variables con mayor peso o variabilidad en las componentes según los tratamientos estudiados.

El Análisis de Componentes Principales, permite reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos y la obtención de representaciones gráficas bi- o tridimensionales de las medidas numéricas de varias variables. De esta manera se pueden reconocer directamente, y con una pérdida de información mínima, relaciones que permanecían ocultas en dimensiones superiores.

Por medio del ACP se calcula, a partir de una matriz original de datos, un pequeño número de combinaciones lineales (ejes factoriales, factores o componentes), aprovechando las correlaciones entre las variables originales (información redundante), y recalculando un nuevo sistema



de coordenadas para el conjunto original de muestras. Estos nuevos ejes de referencia (combinaciones lineales de las variables originales) son independientes, es decir, ya no están correlacionados entre sí, y los dos o tres primeros ejes calculados pueden llegar a explicar un alto valor del total de la varianza del sistema.

Al representar las muestras en forma de diagrama de dispersión, utilizando los ejes o componentes calculados por este procedimiento, es posible agrupar muestras con características similares. Además, examinando los signos y valores de los factores de carga calculados para las variables originales sobre cada uno de los ejes, es posible saber las características que se encuentran más acentuadas en las muestras que se sitúan en las distintas zonas del espacio factorial y, en cierta forma, reconocer grupos de variables que aportan información en el mismo sentido.

Se realiza un **análisis de conglomerados o dendograma**. Los conglomerados son grupos de observaciones con características similares. Para formar los conglomerados, el procedimiento comienza con cada observación en grupos separados. Después, combina las dos observaciones que fueron las más cercanas para formar un nuevo grupo. Después de recalcular la distancia entre grupos, se combinan los dos grupos ahora más cercanos. Este proceso se repite hasta que queda 1 solo grupo.

Por último hacemos un **gráfico de estrella (sun ray)** que representa en cada radio la magnitud de cada variable lo que nos permitirá comparar de forma visual las actividades en los diferentes tratamientos aplicados.

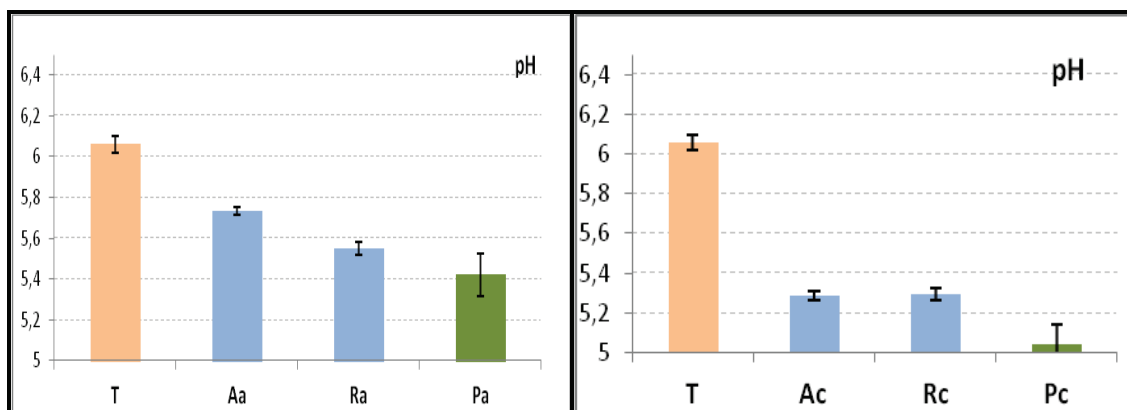
#### 4. ANALISIS DE RESULTADOS DE LAS MODIFICACIONES DEL PERFIL ENZIMATICO DE UN SUELO CON APORTES ORGÁNICOS Y SU POTENCIAL NEMATICIDA

##### 4.1 EXPERIENCIA I: ANALISIS DE RESULTADOS EN LA EXPERIENCIA DE APORTES ORGÁNICOS CON Y SIN DEFICIENCIA DE OXIGENO. ESTUDIO CONJUNTO DE LOS APORTES ORGÁNICOS

###### 4.1.1 *Modificación de algunos parámetros químicos durante el proceso*

Como paso previo a la descripción de resultados evaluados, asociados al comportamiento bioquímico de las experiencias realizadas en este trabajo de Tesis Doctoral, se pasa a relacionar la evolución de algunas de las propiedades químicas a las que Oka (2010), denomina cambios físicos en el suelo que pueden manifestar capacidad nematicida y ser a la vez independientes de actividades químicas, bioquímicas y biológicas, asociadas a la mortalidad de nematodos (Abid *et al.*, 1997).

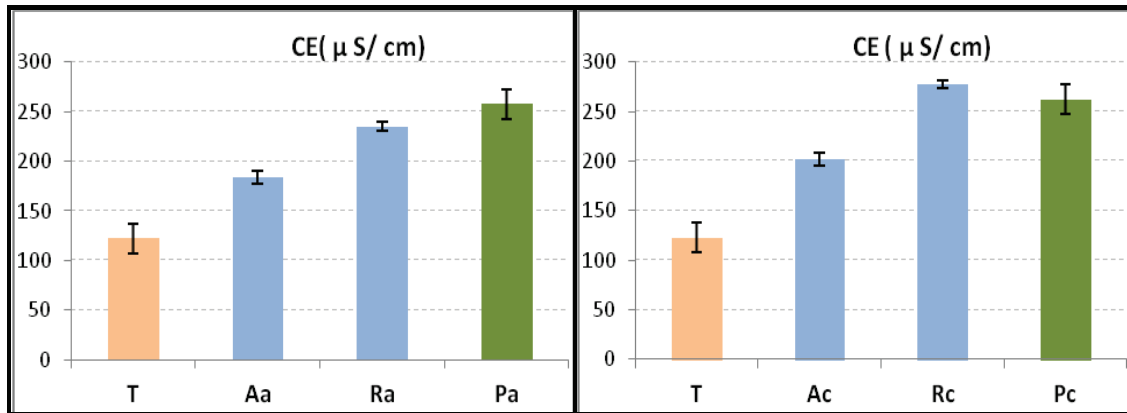
El seguimiento de pH, conductividad, concentración de  $\text{N-NO}_3^-$  y mortalidad de nematodos se hace teniendo en cuenta los procesos aplicados que se han realizado en este apartado.



**Figura 4.1** .-Variación de pH. Efectos de los diferentes tratamientos

En el análisis de la evolución comparada de pH que realizamos en el suelo original con aportaciones de agua, rábano y purín en procesos de saturación de agua con relación  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  variable (atmósfera abierta o cerrada), nos encontramos con que el suelo ejerce una eficaz actividad reguladora del pH, dado que los aportes y los procesos no consiguen modificar mas allá de una unidad el valor del pH (de 6 a 5).

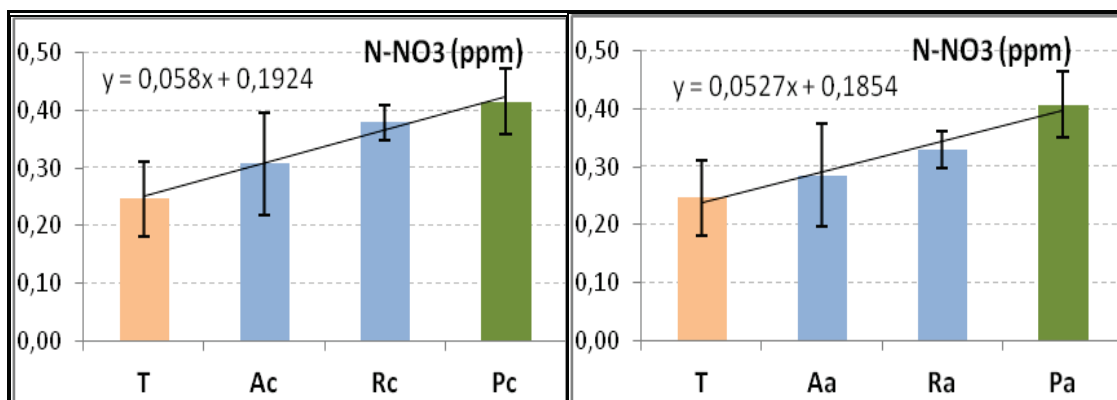
En todo, caso los descensos de pH están más amortiguados en atmósfera abierta donde la posibilidad de renovación de gases es libre (Fig. 4.1).



**Figura 4.2** .-Variación de la conductividad. Efectos de los diferentes tratamientos

Los valores de la conductividad de la solución del suelo, sufren claras variaciones de acuerdo con la naturaleza del aporte (agua, rábano y purín) que se acentúa en la medida que desciende la relación  $O_2/CO_2$  motivada por un incremento de la actividad biológica y liberación de iones. Estos valores con punto de partida de  $122 \mu S/cm$  se elevan simplemente con la adición de agua y posterior incubación durante los 30 días a  $30^\circ C$ , siendo un índice claro de que el suelo presenta un déficit de agua con precipitación parcial de sales solubles (Fig. 4.2).

Estos cambios pueden estar asociados a las propias variaciones de pH que al descender incrementan la solubilidad de determinados componentes salinos. Este incremento de la conductividad se ve todavía más claro cuando se aporta un determinado tipo de materia orgánica como es el rábano, y contrasta con la variación de conductividad del purín que en forma líquida, no aporta más compuestos iónicos de los que lleva su solución.



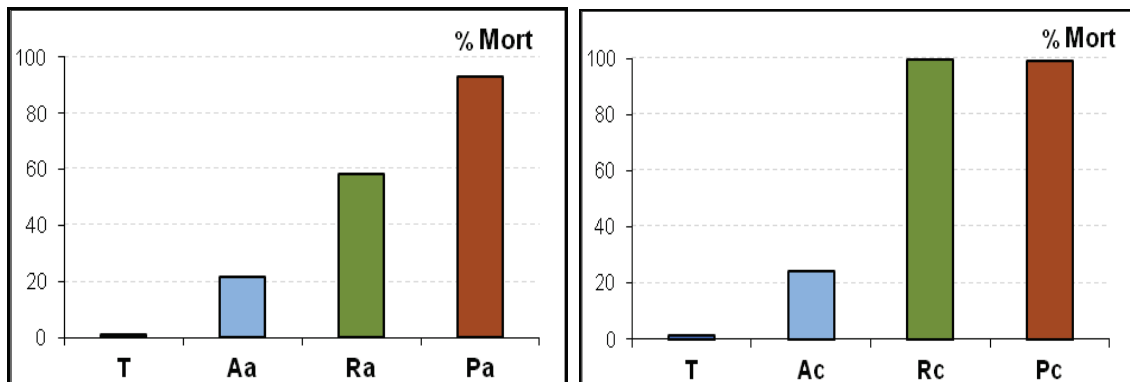
**Figura 4.3** .-Variación del contenido en  $N-NO_3^-$ . Efectos de los diferentes tratamientos

Respecto a los valores medios de  $\text{N-NO}_3^-$  oscilan entre 0,25 a 0,40 ppm que siendo una variación significativa, es importante conocerla a efectos prácticos, dado que los nitratos son sumamente lixiviables cuando el medio edáfico está saturado de agua (Fig. 4.3). Este comportamiento puede tener claras repercusiones sobre la saturación de determinados nichos en los que el nematodo pretende alcanzar protección, ante las modificaciones y reorganización de la estructura agregacional derivada de la aplicación.

#### 4.1.2. *Mortalidad de los nematodos asociada a la aplicación de agua y diferentes enmiendas*

La relación de mortalidad, reflejo de la diferencia entre las poblaciones final e inicial de los tratamientos aplicados, nos permite evaluar la capacidad nematicida del proceso.

Ahora se muestra una doble acción, la aplicación de agua y de aportes orgánicos en planta fragmentada y de residuo líquido al suelo, y en todos los casos con y sin limitación de la renovación de gases. La saturación del suelo con agua nos va a permitir evaluar la capacidad nematicida residual del suelo, que se cifra en torno a un 20% de la mortalidad de *G. rostochiensis* (Fig. 4.4). Posiblemente esta propiedad se deba a efectos indirectos tales como el incremento de  $\text{NO}_3^-$  y la elevación de la conductividad tal como se veía en la Fig. 4.3.

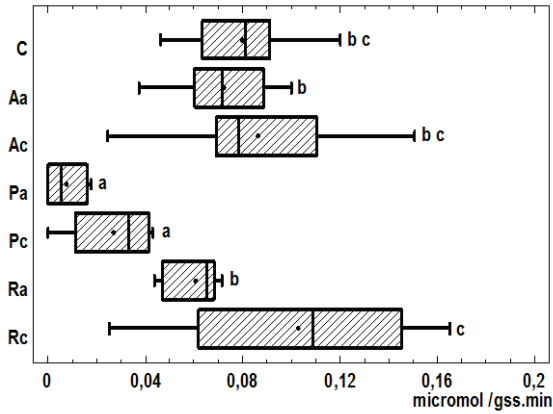


**Figura 4.4** .-Porcentaje de mortalidad de *Globodera*. Efectos de los diferentes tratamientos

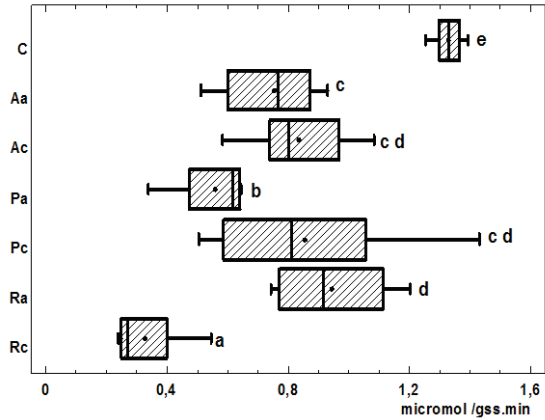
La aplicación de rábano finamente troceado y de purín líquido, nos incrementa la mortalidad significativamente, posiblemente debido en el primer caso a la reorganización espacial de la evolución del material orgánico capaz de alterar la estructura agregacional del suelo modificando sus nichos o bien, por la presencia de amoníaco en el purín como consecuencia de la degradación de la urea, en los ámbitos donde el quiste se localice.

**4.1.3. Expresión gráfica de las actividades enzimáticas estudiadas**

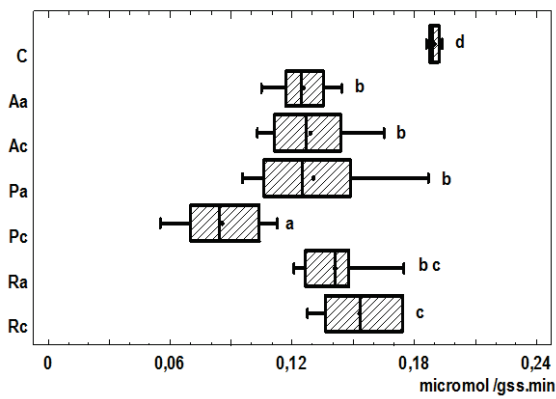
**$\beta$ -celobiosidasa**



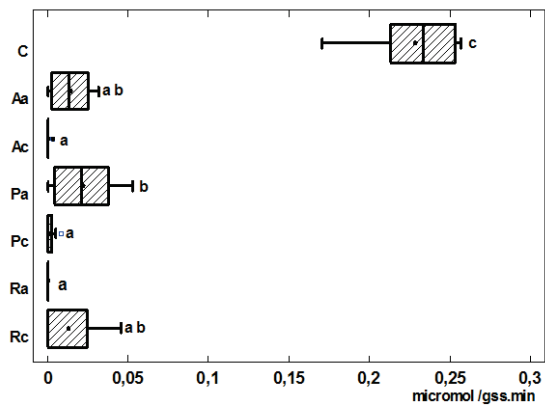
**$\beta$ -glucosidasa**



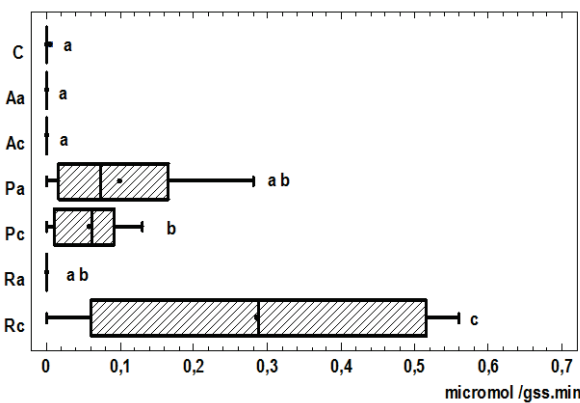
**$\beta$ -xilosidasa**



**$\beta$ -galactosidasa**



**Leucina aminopeptidasa**

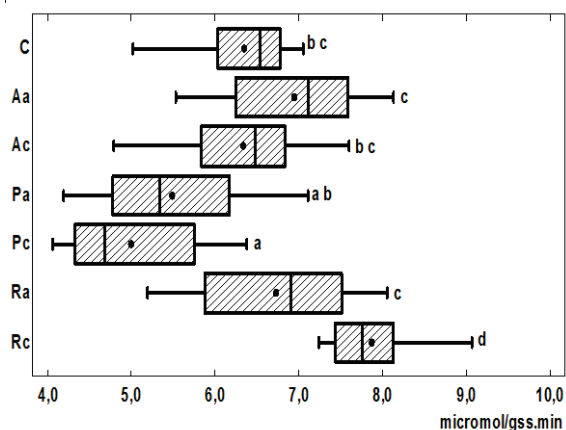


**$\beta$ -glucuronidasa**

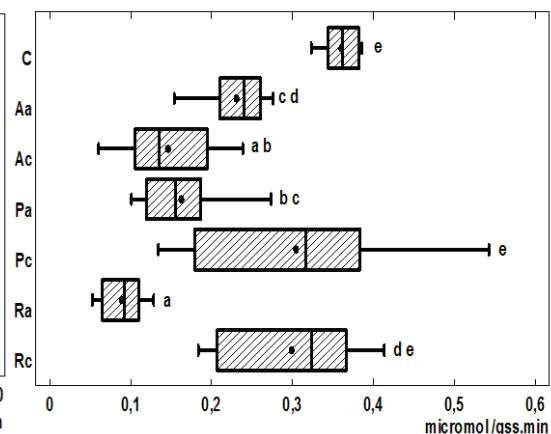
No se detecta actividad apreciable

**Figura 4.5.-**Actividades enzimáticas. Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas

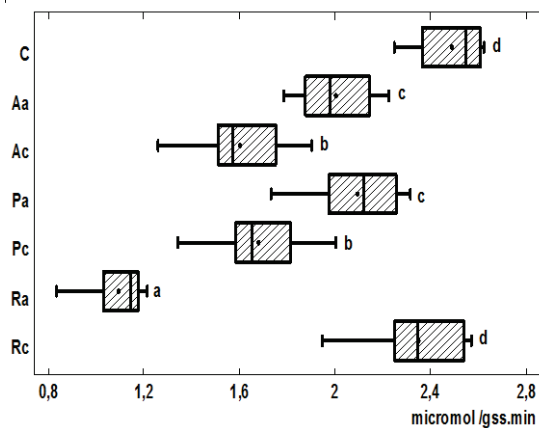
### Acetato deacetilasa



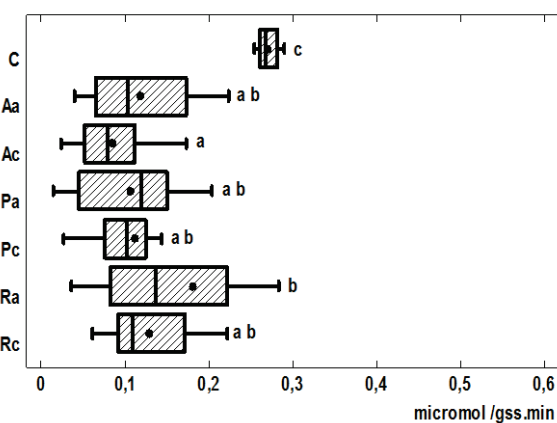
### Palmitato esterasa



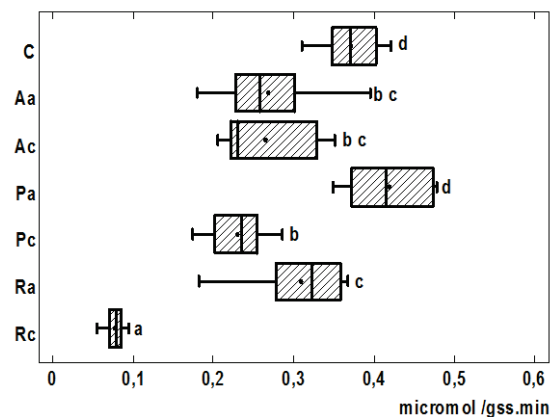
### Fosfatasa ácida



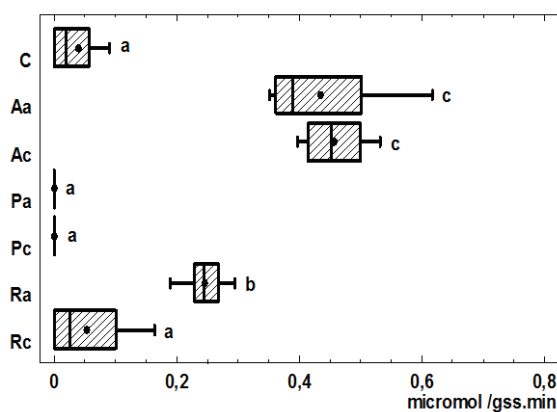
### Fosfatasa alcalina



### Arilsulfatasa



### N-Acetil-β-D-glucosaminidasa



**Figura 4.6.-** Actividades enzimáticas. Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas

#### 4.1.4. *Análisis de resultados enzimáticos*

**Tabla 4.1** .- Resultados enzimáticos medios de las experiencias

Trat	bCel	bG	bXil	bGal	Ace	PaIE	Leu	AcP	AIKP	Sulf	NAcGln
<b>C</b>	0,084	1,307	0,197	0,247	6,471	0,345	nsd	2,472	0,271	0,369	0,029
<b>Aa</b>	0,072	0,826	0,125	0,008	7,042	0,231	nsd	2,002	0,118	0,269	0,434
<b>Ac</b>	0,086	0,836	0,129	nsd	6,432	0,146	nsd	1,602	0,085	0,265	0,457
<b>Ra</b>	0,065	0,944	0,141	nsd	6,826	0,089	nsd	1,094	0,181	0,309	0,246
<b>Rc</b>	0,103	0,327	0,163	0,022	7,969	0,299	0,239	2,348	0,128	0,129	0,025
<b>Pa</b>	nsd	0,609	0,130	0,021	5,586	0,163	0,080	2,094	0,105	0,419	nsd
<b>Pc</b>	0,023	0,856	0,085	0,017	5,093	0,304	0,033	1,681	0,111	0,230	nsd

##### *a) Enzimas relacionadas con el metabolismo glucídico*

Ante la aplicación al suelo de aportes como el agua o purines con un contenido inferior al 1% en materia seca observamos que el impacto reflejado sobre el grupo de actividades enzimáticas relacionadas con los carbohidratos, es nulo o depresivo, agudizándose esta depresión al observar el comportamiento de la  $\beta$ -galactosidasa.

La aplicación de fragmentos de rábano finamente triturado, no garantiza la iniciación del proceso de degradación de la celulosa ni de otros carbohidratos complejos, a pesar de que las plantas estuvieran en sus primeras fases de desarrollo.

Es verdad que la aplicación que sufre un proceso anaeróbico devuelve a los valores de suelo la actividad  $\beta$ -celobiosidasa aunque no así en la citada  $\beta$ -galactosidasa.

En cuanto a la actividad N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, si muestra un incremento importante con la hidratación, lo que pudiera ser indicador del estímulo fúngico que aparece cuando el suelo se hidrata y acidifica.

##### *b) Enzimas relacionadas con el metabolismo proteico.*

La actividad proteolítica de la leucina apenas detectable en el suelo de referencia o hidratado eleva su nivel de actividad al añadir purín sobre el suelo, indicador de una ligera presencia de proteínas ricas en leucina.

La aplicación de rábano solo muestra una actividad significativamente más alta cuando sometemos al conjunto suelo-aporte a unas condiciones de hipoxia. Esto puede ser reflejo de que, una tensión descendente de

la relación  $O_2/CO_2$  estimula procesos específicos en los que este enzima participe, pues otra de sus funciones es la de reciclar los aminoácidos.

### *c) Enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico*

Con un efecto menos reducido en cuanto a las actividades enzimáticas del suelo, se ve un comportamiento errático de ambas actividades enzimáticas acetato deacetilasa y palmitato esterasa, que en ningún caso superan su referencia edáfica original.

La palmitato esterasa solo se activa ligeramente en la mezcla agua-suelo y atmósfera abierta, y la acetato deacetilasa, en la aplicación de rábano en sus dos formas de proceso.

### *d) Metabolismos terminales: P y S*

#### **del Fosfato**

Conocido el distinto origen, localización y comportamiento de las fosfatasa ácida (exocelular) y alcalina (asociada a estructuras membranosas), vemos que frente a la sensible variabilidad de la primera, la fosfatasa alcalina mantiene en todas las experiencias un nivel de actividad que si bien es inferior al del suelo, es prácticamente similar entre todas ellas.

Esta reducción, que es casi un 50% respecto a la actividad inicial de referencia, puede deberse a que bien en el suelo o en el seno de los aportes, existe una cantidad de fosfato disponible para los seres vivos suficiente para satisfacer sus necesidades nutricionales, o el consumo de fosfato se ha reducido considerablemente.

La fosfatasa libre, ácida, también desciende su nivel de actividad y se deprime específicamente con la hipoxia en los aportes líquidos (agua o purín), sin embargo el comportamiento de la aportación del rábano hace que en medios hipóxicos se recupere el nivel inicial del suelo de referencia (no hay que olvidar que en las pruebas de laboratorio no hay aportación de este tipo de fosfatasa de origen vegetal).

#### **del sulfato**

Sin apenas tener variación en el caso del aporte de agua, la aril-sulfatasa, liberadora de sulfato, reduce suavemente su actividad con la incubación en ambos aportes.



#### 4.1.5. Análisis estadístico

##### *a) Comportamiento del suelo como valor de referencia en la actividad nematocida*

Como consecuencia de los resultados de actividades obtenidos, se ha creído conveniente aislar los derivados únicamente por la acción de saturación del suelo con agua (con y sin oxígeno presente) para determinar la capacidad nematocida resiliente del suelo y su posible activación natural durante los periodos de lluvia intensa.

Conviene recordar que las muestras de suelo fueron convenientemente tamizadas eliminando las partículas de tamaño > de 2mm, por lo que una parte activa se pierde.

Denominaremos:

Suelo de partida con la relación  $O_2 / CO_2$  natural (**C - Control**)

Suelo saturado de agua e incubado a 30°C durante 30 días, presenta reducida la relación  $O_2 / CO_2$  (**T - Testigo**)

##### *b) Resultados de las actividades estudiadas, parámetros químicos y mortalidad asociada*

**Tabla 4.2.-** Resultados medios de los parámetros estudiados

	<b>C</b> Control sin incubar	<b>T</b> Testigo incubado
$\beta$ -glucosidasa	1.328 $\pm$ 0.046	0.836 $\pm$ 0.163
$\beta$ -galactosidasa	0.228 $\pm$ 0.029	nsd
$\beta$ -celobiosidasa	0.079 $\pm$ 0.023	0.086 $\pm$ 0.039
$\beta$ -xilosidasa	0.187 $\pm$ 0.027	0.129 $\pm$ 0.022
Fosfatasa Ácida	2.489 $\pm$ 1.602	0.148 $\pm$ 0.211
Acetato deacetilasa	6.446 $\pm$ 0.661	6.432 $\pm$ 0.855
Arilsulfatasa	0.371 $\pm$ 0.038	0.265 $\pm$ 0.061
N-acetil- $\beta$ -Dglucosaminidasa	nsd	0.457 $\pm$ 0.050
Fosfatasa alcalina	0.271 $\pm$ 0.013	0.085 $\pm$ 0.048
Palmitato esterasa	0.361 $\pm$ 0.023	0.146 $\pm$ 0.061
pH	5.95 $\pm$ 0.33	5.28 $\pm$ 0.03
Conductividad	168 $\pm$ 23	201 $\pm$ 4
N- $NO_3^-$	0.246 $\pm$ 0.060	0.308 $\pm$ 0.029
Mortalidad	1 %	24 %

c) *Matriz de correlaciones.*- solo se consideran valores > 0,5

Tabla 4.3.-Correlaciones de Pearson, entre cada par de variables, suelo control y testigo

	bGal	bXil	AcP	AIKP	PaIE	Sulf	NAcGln	pH	CE	N-NO <sub>3</sub>	Mort
<b>bG A</b>	0,892 -16 ***	0,794 -16 ***	0,878 -16 ***	0,939 -16 ***	0,803 -16 ***	0,85 -16 ***	-0,871 -16 ***	0,73 -16 **	-0,85 -16 ***		-0,903 -16 ***
<b>bGal A</b>		0,743 -16 ***	0,928 -16 ***	0,896 -16 ***	0,894 -16 ***	0,689 -16 **	-0,954 -16 ***	0,83 -16 ***	-0,926 -16 ***	-0,614 -16 *	-0,975 -16 ***
<b>bXil A</b>			0,842 -16 ***	0,771 -16 ***	0,768 -16 ***	0,868 -16 ***	-0,737 -16 **	0,629 -16 **	-0,766 -16 ***	-0,649 -16 **	-0,777 -16 ***
<b>AcP A</b>				0,872 -16 ***	0,816 -16 ***	0,785 -16 ***	-0,907 -16 ***	0,751 -16 ***	-0,839 -16 ***	-0,611 -16 *	-0,933 -16 ***
<b>Sulf A</b>				0,798 -16 ***	0,761 -16 ***		-0,689 -16 **	0,658 -16 **	-0,689 -16 **	-0,5 -16 *	-0,735 -16 **
<b>NacGIA</b>				-0,93 -16 ***	-0,896 -16 ***			-0,80 -16 ***	0,942 -16 ***	0,512 -16 *	0,972 -16 ***
<b>AIKP A</b>					0,862 -16 ***			0,765 -16 ***	-0,857 -16 ***		-0,939 -16 ***
<b>PaIE A</b>								0,825 -16 ***	-0,89 -16 ***	-0,537 -16 *	-0,924 -16 ***
<b>pH</b>									-0,791 -16 ***	-0,68 -16 *	-0,828 -16 ***
<b>CE</b>										0,633 -16 **	0,918 -16 ***
<b>N-NO<sub>3</sub></b>											0,575 -16 *

Se muestra entre paréntesis el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. Valores de P menores de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%. \* p<0.05 \*\* p<0.01 \*\*\* p<0.001. Se somborean de amarillo las correlaciones positivas

En la tabla 4.3 podemos establecer las correlaciones de la mortalidad con los diferentes parámetros, observándose una elevada correlación positiva con la actividad N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, con la conductividad y con la concentración de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. El resto de los valores obtenidos para la correlación con la mortalidad son elevados, pero negativos con las actividades estudiadas. De ello se hablará en el apartado de discusión.

Otras actividades degradativas propias del metabolismo glucídico ( $\beta$ -D-glucosidasa  $\beta$ -D-galactosidasa y  $\beta$ -D-xilosidohidrolasa), del lipídico (palmitoil-esterasa), del metabolismo del azufre (arilsulfatasa) y del fósforo (fosfatasa ácida y alcalina) se asocian positivamente entre si, con correlaciones elevadas, y negativamente a efectos de la actuación nematocida (todas con valores de correlación negativa mayores de 0.7 y

con  $p < 0.001$ ) hecho que permite, de alguna forma, salvaguardar la supervivencia de *G.rostochiensis*. Además debemos tener en cuenta que la fosfatasa ácida es claramente superior a la alcalina, y que dentro del metabolismo glucídico la actividad  $\beta$ -glucosidasa predomina sobre la actividad  $\beta$ -celobiosidasa y que la  $\beta$ -xilosidasa permanece muy estable.

A su vez, esta esterasa se correlaciona negativamente con la actividad N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa y destacamos aquí, que esta actividad, manifiesta una correlación negativa con todas las actividades enzimáticas evaluadas con rango significativo  $> 0,5$ . No así con la concentración de  $N-NO_3^-$  y siendo aquella la única actividad enzimática que se relaciona positivamente con la mortalidad. Destacamos que la modificación del pH afecta a la totalidad del metabolismo estudiado, salvo a la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa.

#### *d) Análisis de componentes principales*

El análisis de componentes permite obtener dos ejes de variación que explicarían más de un 80 % de la varianza total (Tabla 4.4).

**Tabla 4.4.-** Análisis de componentes principales

Numero componente	Eigenvalor	Porcentaje de varianza	Porcentaje acumulado
1	9,7700	66,79	66,79
2	1,7048	12,18	81,96

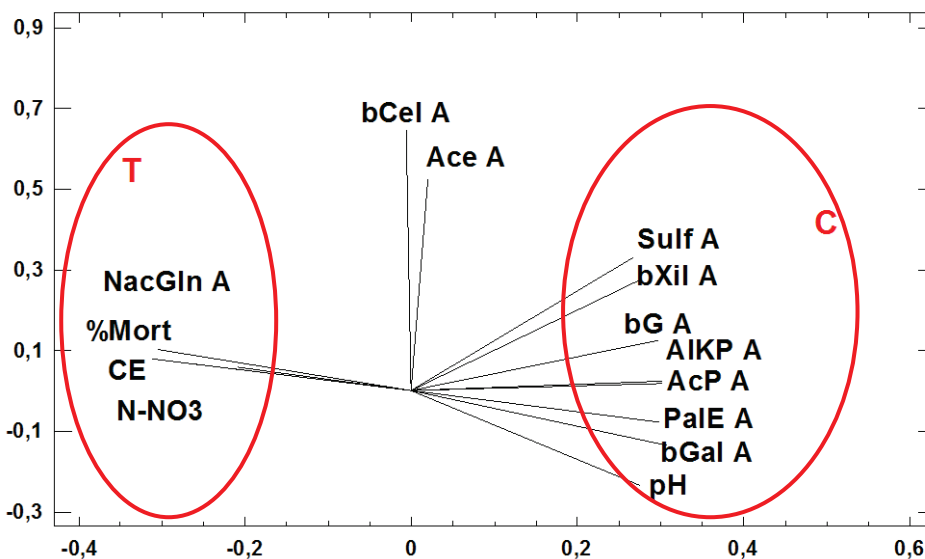
lo que indica una distribución de dos componentes según la tabla 4.5

**Tabla 4.5.-** Análisis de componentes principales. Peso de los componentes

	Componente 1	Componente 2
$\beta$ -glucosidasa	0,2974	0,1243
$\beta$ -galactosidasa	0,3076	-0,1353
$\beta$ -celobiosidasa	-0,0056	0,6479
$\beta$ -xilosidasa	0,2760	0,2747
Fosfatasa Ácida	0,3016	0,0174
Acetato deacetilasa	0,0193	0,5231
Arilsulfatasa	0,2670	0,3310
N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa	-0,3047	0,1019
Fosfatasa alcalina	0,3010	0,0243
Palmitato esterasa	0,2970	-0,0766
pH	0,2742	-0,2340
Conductividad	-0,3002	0,0773
$N-NO_3$	-0,2092	0,0586
%Mortalidad	-0,3121	0,0804
% varianza explicada	<b>69,8</b>	<b>12,2</b>
% varianza acumulada	<b>69,8</b>	<b>81,9</b>

El primer componente con casi un 70 % de la varianza está determinado de forma similar por las actividades  $\beta$ -galactosidasa, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, conductividad y la mortalidad (Tabla 4.5). El segundo componente explica un 12 % de varianza y con un 82% de la varianza acumulada va relacionado con  $\beta$ -celobiosidasa, acetato deacetilasa y arilsulfatasa.

La representación gráfica de los componentes nos permitirá interpretar mejor los resultados obtenidos (Fig. 4.7.)



**Figura 4.7.-** Representación de componentes C2 frente a C1 con las variables analizadas con para el suelo control y el suelo testigo, este último incubado

Su análisis pone de manifiesto que únicamente la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, como enzima, se asocia con la mortalidad (su correlación era elevada 0.97  $p < 0.001$ ), junto a la conductividad y contenido en nitratos, en las muestras incubadas (T). El resto de las actividades ensayadas tanto del metabolismo glucídico ( $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -xilosidasa) como del lipídico (palmitato esterasa), metabolismo del azufre (aril-sulfatasa) y del fósforo (fosfatasas ácida y alcalina) junto con pH se asocian a la muestra control (C) del suelo sin incubación (Fig. 4.7).

Únicamente  $\beta$ -celobiosidasa y acetato deacetilasa aparecen separados de ambas agrupaciones, conformando una unidad independiente.

#### 4.1.6. Estudio aislado del comportamiento del aporte de rabano, en aplicación con y sin intercambio atmosférico de gases

Dado que la experiencia fue conjunta, y a la vista de los resultados obtenidos en el estudio de la aplicación de agua, analizamos separadamente cada uno de los aportes para diferenciar si rábano y purín aportan una actividad diferenciada con actores diferentes a efectos de la mortalidad. De los datos de las actividades enzimáticas ya estudiadas con anterioridad obtenemos las correlaciones siguientes.

##### a) Correlaciones establecidas en la aplicación de fragmentos de rábano

Tabla 4.6.- Correlaciones de Pearson,  $r$ , en la aplicación de rábano

	bGal	bGlc	PaIE	AcP	AIKP	Sulf A	NACGln	pH	CE	N.NO <sub>3</sub>	%Mort
<b>bG A</b>	0,529 -40 ***	0,654 -40 ***				0,751 -40 ***		0,703 -20 ***	-0,714 -20 ***		-0,743 -20 ***
<b>bXil A</b>	0,538 -40 ***		0,539 -40 ***		0,492 -40 **		-0,540 -40 ***				
<b>bGal A</b>			0,671 -40 ***	0,668 -40 ***	0,500 -40 ***		-0,553 -40 ***	0,745 -20 ***	-0,763 -20 ***		-0,587 -20 **
<b>bGlc</b>						0,592 -40 ***		0,744 -20 ***	-0,717 -20 ***		-0,817 -20 ***
<b>Leu A</b>						-0,510 -40 0,0008					
<b>Ace A</b>											0,551 -20 **
<b>PaIE A</b>				0,841 -40 ***			-0,586 -40 ***	0,560 -20 **			
<b>AcP A</b>							-0,507 -40 ***				
<b>AIKP A</b>								0,644 -20 **	-0,519 -20 *		
<b>Sulf A</b>									-0,603 -20 **	-0,654 -20 **	-0,602 -20 **
<b>pH</b>									-0,794 -20 ***		-0,683 -20 ***
<b>CE</b>										0,562 -20 *	0,929 -20 ***
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>											0,539 -20 *

Se muestra entre paréntesis el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. Valores de P menores de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$ . Se somborean de amarillo las correlaciones positivas

### *b) Estudio de los componentes principales*

El análisis permite obtener 3 ejes de variación que explican el 96,22 % de la varianza total total (Tabla 4.7).

**Tabla 4.7.-** Análisis de componentes principales

Componente		Porcentaje de	Porcentaje
Número	Eigenvalor	Varianza	Acumulado
1	7,95984	53,07	53,07
2	5,14092	34,27	87,34
3	1,33246	8,88	96,22

Calculando el peso de cada componente para las variables estudiadas obtenemos la tabla 4.8:

**Tabla 4.8.-** Análisis de componentes principales. Peso de los componentes

	Comp 1	Comp 2	Comp 3
$\beta$ -celobiosidasa	0,169	0,307	-0,300
$\beta$ -glucosidasa	-0,346	-0,045	0,141
$\beta$ -xilosidasa	-0,138	0,382	0,226
$\beta$ -galactosidasa	-0,262	0,291	0,047
Acetato deacetilasa	0,287	0,196	0,025
Palmitato esterasa	-0,069	0,401	-0,296
Leucina aminopeptidasa	0,279	0,273	0,008
Fosfatasa ácida	-0,042	0,383	-0,408
Fosfatasa alcalina	-0,246	0,230	0,427
Arilsulfatasa	-0,337	-0,096	0,187
N-acetil- $\beta$ -Dglucosaminidasa	-0,006	-0,395	-0,384
pH	-0,307	0,145	0,008
CE	0,336	-0,038	0,266
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,335	0,068	0,228
MORT	0,322	0,091	0,307
% varianza explicada	<b>53,1</b>	<b>34,3</b>	<b>8,9</b>
% varianza acumulada	<b>53,1</b>	<b>87,4</b>	<b>96,3</b>

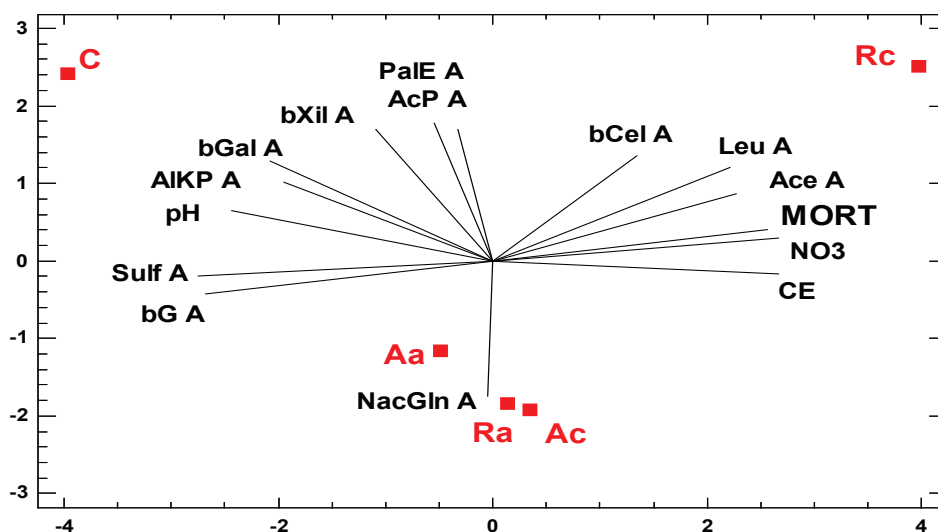
Considerando los valores mayores de 0,3 de los componentes para cada parámetro en estudio se deriva que el primer componente absorbe un 53,1 % de la varianza y viene determinado por  $\beta$ -glucosidasa, aril-sulfatasa, pH, CE, concentración de nitrato y la mortalidad; el segundo componente, que absorbe un 34,3% con un 87,4 % de varianza acumulada, se relaciona con  $\beta$ -celobiosidasa,  $\beta$ -xilosidasa, palmitato esterasa, fosfatasa ácida y N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa y en el tercero, que explica ya el 96 % de la varianza acumulada, se incluye a la  $\beta$ -celobiosidasa, fosfatasa ácida y alcalina, y a la mortalidad.

Llevado el peso de cada componente a cada muestra de trabajo (Tabla 4.9)

**Tabla 4.9.-** Análisis de componentes principales. Peso de los componentes

Muestra	Componente 1	Componente 2	Componente 3
<b>Control</b>	-3,964	2,418	0,141
<b>A a</b>	-0,489	-1,155	-1,098
<b>A c</b>	0,348	-1,925	-0,884
<b>Rábano a</b>	0,138	-1,843	1,822
<b>Rábano c</b>	3,968	2,506	0,019

La representación del componente 2 frente a componente 1 nos permite estudiar la distribución gráfica que ayuda en la interpretación de la relación entre actividades estudiadas y muestras de trabajo (Tabla 4.9)

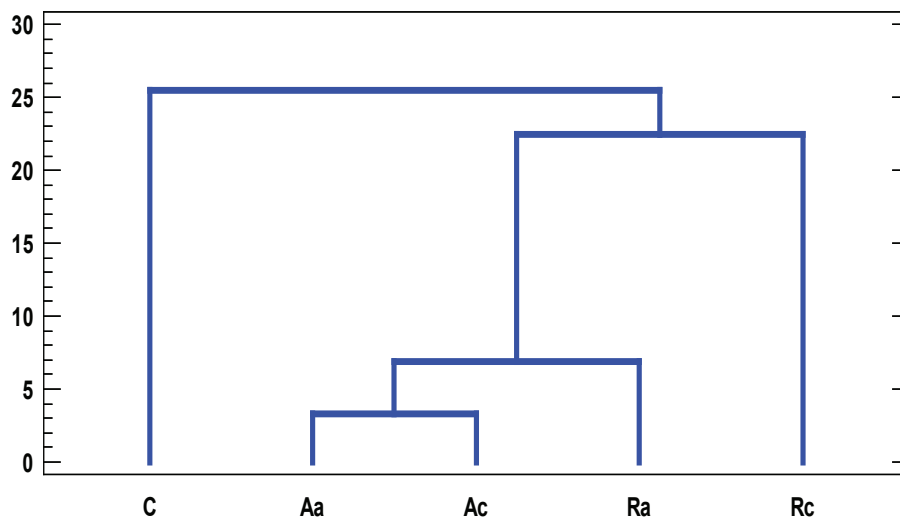


**Figura 4.8.-** Representación de componentes C2 frente a C1 con las variables analizadas con para el suelo control y la aplicación de agua y rábano

Como se ve (Fig. 4.8), en el análisis de componentes y en las correlaciones, la mortalidad va asociada a la aplicación de rábano en ausencia de oxígeno con las actividades  $\beta$ -celobiosidasa, leucina aminopeptidasa y acetato deacetilasa, junto con los parámetros químicos conductividad eléctrica y contenido en  $N-NO_3^-$  (fig. 4.8). Con las aplicaciones de agua con y sin aporte de  $O_2$  y de rábano en abierto, solo se asocia con la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, estando el resto de actividades asociadas a la muestra control.

También podemos visualizar asociaciones mediante el dendograma (Fig. 4.9) que organiza los resultados obtenidos en grupos llamados también conglomerados o cluster de forma que el grado de asociación o similitud entre miembros del mismo sea más fuerte que el grado de asociación o similitud entre miembros de diferentes conglomerados.

Así la asociación se establece entre muestras tratadas con agua en ausencia o no de intercambio de gases con el aporte de rábano en abierto dejando separado de estas el aporte de rábano en anaerobiosis.



**Figura 4.9.-** Dendograma para la asociación de aporte de rábano y agua con y sin intercambio de gases

Del análisis de correlación entre enzimas con repercusión edafobiológica cabe entender la existencia de comportamientos asociativos claramente diferenciados como se observa en la figura 4.9.



#### 4.1.7. Estudio aislado del comportamiento del aporte de purín, en aplicación, con y sin intercambio atmosférico de gases

##### a) Correlaciones establecidas con el aporte de purín líquido

**Tabla 4.10.-** Correlaciones de Pearson entre cada par de variables para el aporte de purín

	bGal	bGlc	PaE	AcP	AIKP	Sulf	NAcGln	pH	CE	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Mort
<b>bCel A</b>		0,528 -40 ***					0,593 -40 ***		-0,544 -20 *	-0,667 -20 **	-0,676 -20 **
<b>bG A</b>	0,660 -40 ***		0,579 -40 ***		0,572 -40 ***						
<b>bXil A</b>	0,662 -40 ***			0,682 -40 ***	0,557 -40 ***	0,575 -40 ***		0,733 -20 ***	-0,711 -20 ***	-0,666 -20 **	-0,680 -20 **
<b>bGal A</b>			0,608 -40 ***	0,731 -40 ***	0,798 -40 ***			0,684 -20 ***	-0,702 -20 ***		
<b>Leu A</b>							-0,575 -40 ***			0,571 -20 **	0,575 -20 **
<b>Ace A</b>							0,523 -40 ***			-0,503 -20 *	
<b>PaE A</b>					0,614 -40 ***						
<b>AcP A</b>					0,592 -40 ***	0,579 -40 ***		0,729 -20 ***	-0,501 -20 *		
<b>AIKP A</b>								0,515 -20 *			
<b>NAcGln</b>											-0,523 -20 *
<b>pH</b>									-0,843 -20 ***	-0,586 -20 **	-0,747 -20 ***
<b>CE</b>										0,766 -20 ***	0,920 -20 ***
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>											0,790 -20 ***

Se muestra entre paréntesis el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. Valores de  $p < 0.05$  indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95%. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$  Se separan con sombreado amarillo las correlaciones positivas.

En la mortalidad, (Tabla 4.10) generada por la aplicación de purín líquido (rico en N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) aparecen como protagonistas la Leucina aminopeptidasa junto con la CE y el contenido en NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, desapareciendo la correlación establecida con la actividad nematocida fúngica expresada como la actividad de la N-acetil-β-D-glucosaminidasa.

Las actividades  $\beta$ -celobiosidasa y  $\beta$ -xilosidasa se correlacionan negativamente con la mortalidad, pero sus valores no muy elevados.

La observación de los restantes valores de correlación nos permite ver a la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa asociada con la  $\beta$ -celobiosidasa y la acetato deacetilasa. La palmitato esterasa se asocia con la  $\beta$ -galactosidasa en los tres casos estudiados.

### *b) Análisis de componentes principales*

El análisis de componentes permite encontrar tres componentes que alcanzan un porcentaje de varianza de un 97,49 % (Tabla 4.11).

**Tabla 4.11.-** Análisis de componentes principales

Componente		Porcentaje de	Porcentaje
Número	Eigenvalor	Varianza	Acumulado
1	8,75616	58,37	58,37
2	4,07261	27,15	85,53
3	1,79448	11,96	97,49

**Tabla 4.12.-** Análisis de componentes principales. Peso de los componentes

	Componente 1	Componente 2	Componente 3
pH	0,305	0,097	-0,215
CE	-0,336	0,048	0,005
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-0,307	0,198	0,086
%Mortalidad	-0,306	0,199	0,080
$\beta$ -Celobiosidasa	0,265	-0,290	0,084
$\beta$ -Glucosidasa	0,293	0,092	0,328
$\beta$ -Xilosidasa	0,299	0,148	-0,214
$\beta$ -Galactosidasa	0,277	0,264	0,115
Acetato deacetilasa	0,240	-0,278	-0,268
Palmitato esterasa	0,165	0,222	0,522
Leucina aminopeptidasa	-0,235	0,308	-0,271
Fosfatasa ácida	0,236	0,308	-0,207
Fosfatasa alcalina	0,284	0,253	0,135
Arilsulfatasa	0,068	0,344	-0,508
NAcetil $\beta$ -DGlucosaminidasa	0,052	-0,476	-0,170
% varianza explicada	<b>58,4</b>	<b>27,1</b>	<b>11,9</b>
% varianza acumulada	<b>58,4</b>	<b>85,5</b>	<b>97,5</b>

Considerando el valor mayor de 0,3 de los componentes en la tabla anterior (Tabla 4.12), indica: el primer componente que absorbe un 58% de la varianza se asocia a pH, conductividad, nitratos y mortalidad. El segundo componente con un 27% de varianza y más de un 85 % de varianza acumulada, se relaciona con fosfatasa ácida y arilsulfatasa.

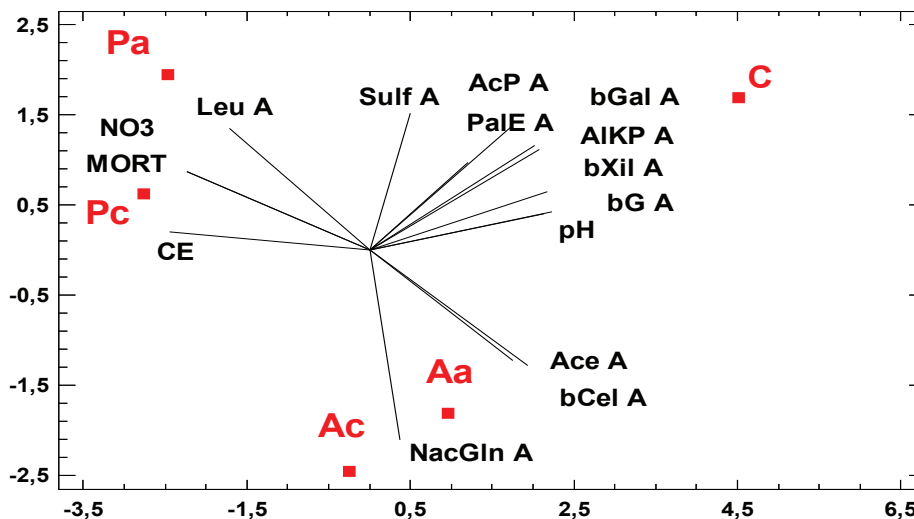
El tercer componente que alcanza más de un 97,5 % de la varianza acumulada se asocia a  $\beta$ -glucosidasa, palmitato esterasa y arilsulfatasa.

Si lo referimos a las muestras de trabajo (Tabla 4.13)

**Tabla 4.13.-** Análisis de componentes principales. Peso de los componentes

Muestra	Componente 1	Componente 2	Componente 3
<b>C</b>	4,514	1,689	0,375
<b>A a</b>	0,960	-1,804	-0,435
<b>A c</b>	-0,253	-2,453	-0,248
<b>P a</b>	-2,465	1,944	-1,681
<b>P c</b>	-2,755	0,624	1,990

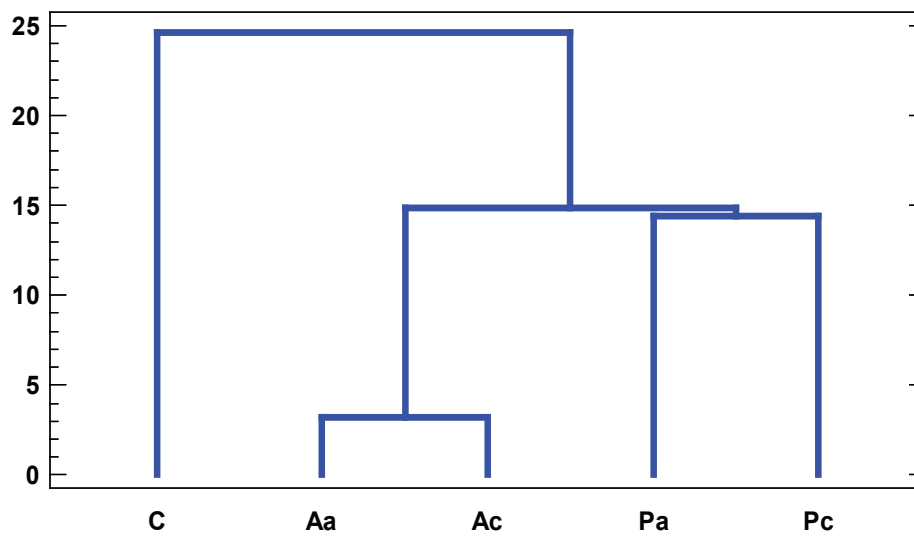
Podemos representar los componentes obtenidos C2 frente C1



**Figura 4.10.-** Representación gráfica de C2 frente a C1

Aparecen agrupados los tratamientos de purín, con y sin renovación de gases, con mortalidad, la actividad leucina aminopeptidasa y la concentración de nitratos, (Fig. 4.10) quedando para la aplicación de agua las actividades de la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, junto con acetato deacetilasa y  $\beta$ -celobiosidasa (Fig. 4.10). Queda fuera de esta agrupación el resto de actividades que se asocian al suelo control (C).

Si establecemos las agrupaciones separadas para ambos aportes en forma de dendograma se aprecia grupos afines en aplicación de purín y se diferencian de las aplicaciones de agua (Fig. 4.11).



**Figura 4.11.-** Dendrograma para la aplicación de purín y agua

Agrupaciones esperadas según su comportamiento enzimático.

## 4.2. EXPERIENCIA II.- APOORTE DE PURÍN Y RÁBANO A DIFERENTES DOSIS

### 4.2.1. *Modificación de algunos parámetros químicos*

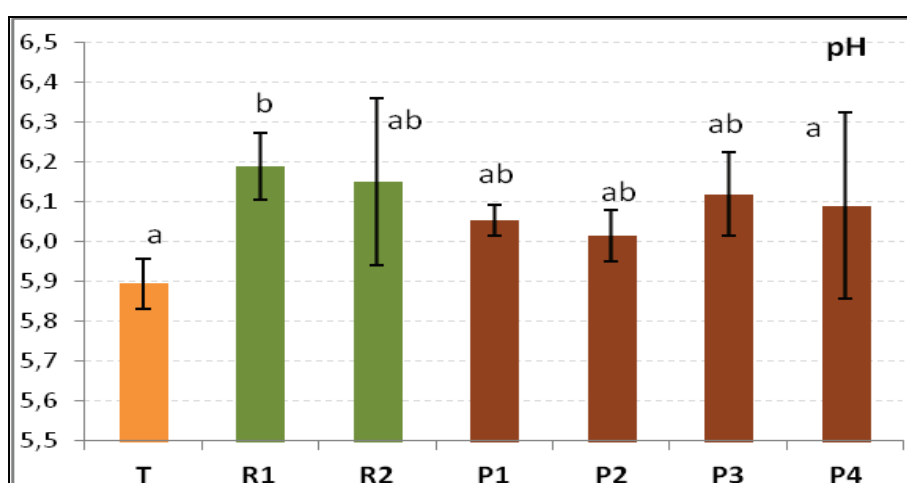
Como en esta experiencia modificamos las dosis aplicadas de ambos residuos se calculan las dosis de N aportadas en cada experiencia (Tabla 4.14) para poder obtener información que nos permita interpretar los resultados obtenidos tanto en parámetros químicos como en los resultados de mortalidad.

**Tabla 4.14.**-valores de N aplicados con los aportes en g de N por cada 100 g de suelo

Aplicación	g de N/100 g suelo
<b>P1</b>	0.00031
<b>P2</b>	0.00155
<b>P3</b>	0.00310
<b>P4</b>	0.00465
<b>R1</b>	0.00234
<b>R2</b>	0.00585

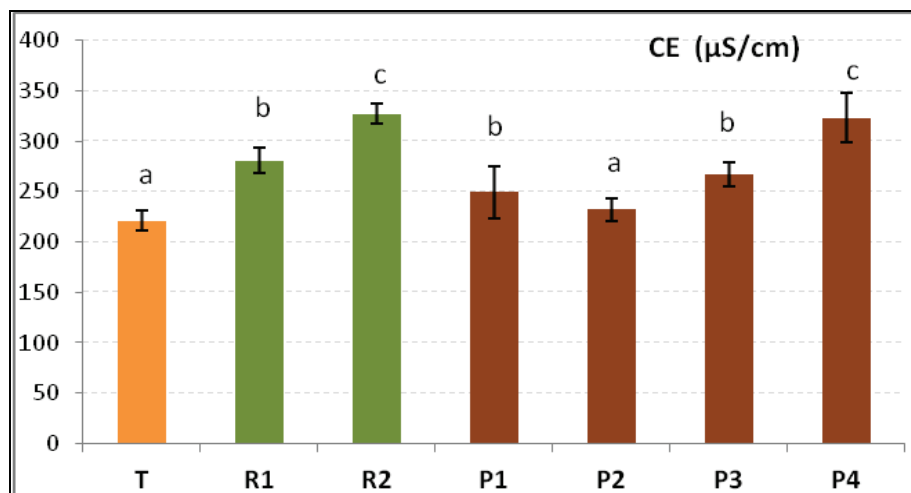
En esta ocasión partimos del suelo original control al que se le aplicó un tratamiento previo al objeto de incrementar el número de quistes de *G. rostochiensis*, para lo cual se cultivó patata en laboratorio. Esto justifica las ligeras modificaciones que ha sufrido el suelo en su contenido en materia orgánica y en N.

Este testigo presenta un pH inicial de 5,9 y las respuestas observadas con la aplicación tanto de rábano como en purines a diferentes dosis difieren de lo presentado en el apartado anterior (Fig. 4.12), y el aporte



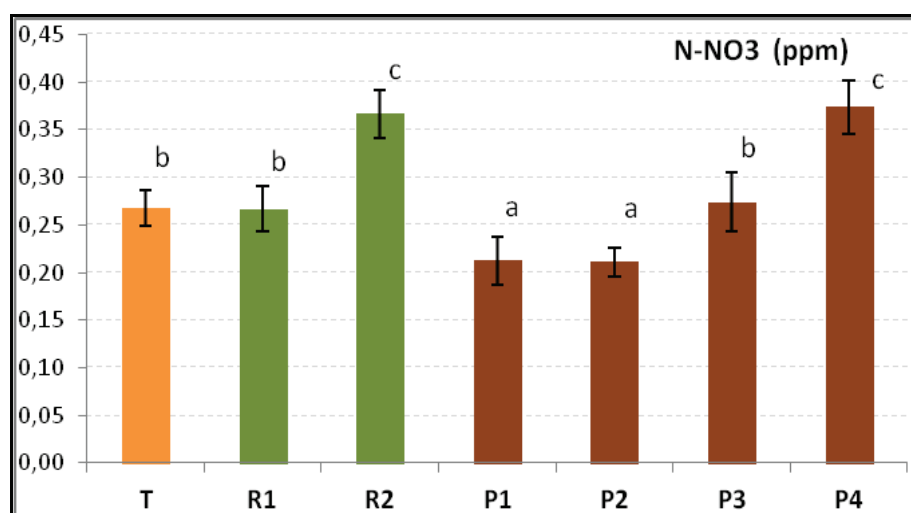
**Figura 4.12.**- Variación de pH para los tratamientos efectuados

de rábano en diferentes dosis incrementa ligeramente el pH (2 décimas) y la aportación de purines en 1 décima.



**Figura 4.13.-** Variación de la conductividad para los tratamientos efectuados.

Este hecho también está asociado a la conductividad siendo el rábano responsable de un incremento significativo de casi 100 unidades, y con resultados algo menores de incremento en conductividad con el purín (Fig. 4.13), pero siempre proporcionales a la dosis aportada.

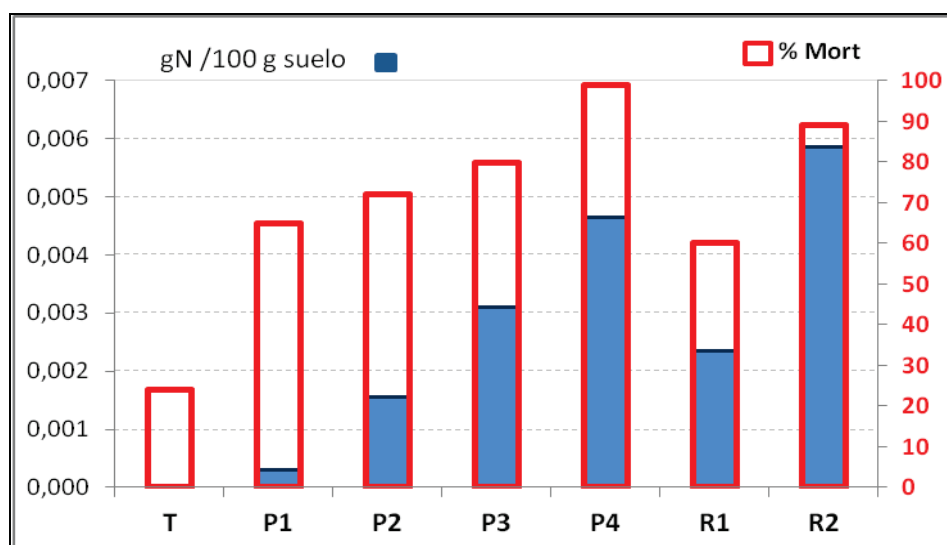


**Figura 4.14.-** Variación de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> para los tratamientos efectuados.

La evaluación de los resultados respecto a la concentración en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> si marca una diferencia asociada al contenido en MO y a la cantidad de purín añadida, como consecuencia de la actividad metabólica desarrollada durante el proceso de la incubación (Fig. 4.14).

#### 4.2.2. Mortalidad de los nematodos según la cantidad y tipo de enmienda aplicada

Al establecer una relación gráfica en la que se incluye el N aportado en cada enmienda y su efecto sobre la mortalidad (Fig. 4.15), se aprecia un incremento de la mortalidad asociado al incremento de la dosis de N, pero también, el hecho de que la eficiencia nematicida disminuye cuando la cantidad de N aportado se incrementa (Fig. 4.15).



**Figura 4.15.-** Porcentaje de mortalidad de *G.rostochiensis* en rojo para los tratamientos efectuados frente a la cantidad de N aportada en azul.

En cuanto a la diferencia de aportes, la mortalidad es mayor para el purín que en el rábano aún comparando la dosis de N aportada en cada caso.

#### 4.2.3. Resultados de actividades enzimáticas

##### a) valores de actividad

**Tabla 4.15.-** Resultados de valores enzimáticos medios para la experiencia realizada

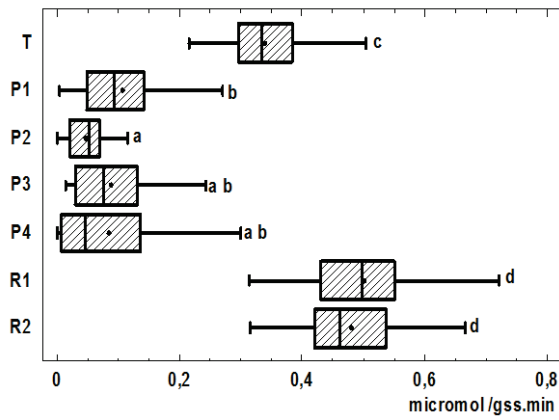
Trat	bCel	bG	bXil	bGal	Leu	bGlc	Ace	PaIE	AcP	AIKP	SulF	NACG
<b>T</b>	0,340	1,342	0,218	0,382	0,299	12,54	0,767	0,546	2,797	0,019	0,068	1,046
<b>P1</b>	0,141	2,279	0,528	0,068	0,003	8,567	0,576	0,850	5,139	0,187	0,882	0,973
<b>P2</b>	0,061	1,466	0,427	nsd	0,038	6,934	0,590	0,786	4,019	0,415	0,622	0,808
<b>P3</b>	0,139	1,647	0,259	0,343	0,063	13,93	0,439	0,690	3,936	0,763	0,218	1,030
<b>P4</b>	0,053	1,803	0,218	0,347	0,053	6,901	0,367	0,280	4,319	0,716	0,398	1,035
<b>R1</b>	0,516	1,371	0,368	0,359	0,160	0,117	11,04	nsd	9,109	nsd	0,407	0,675
<b>R2</b>	0,489	1,026	0,317	0,392	0,407	0,154	9,530	0,096	4,001	nsd	0,616	0,716



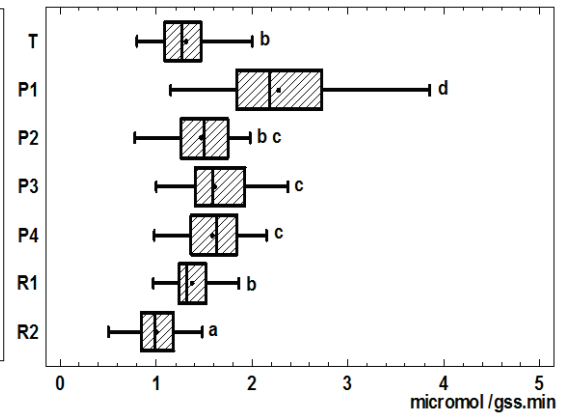


*b) Representación gráfica de actividades enzimáticas*

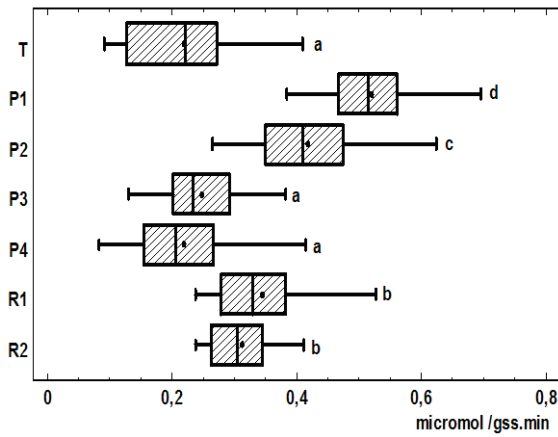
**$\beta$ -celobiosidasa**



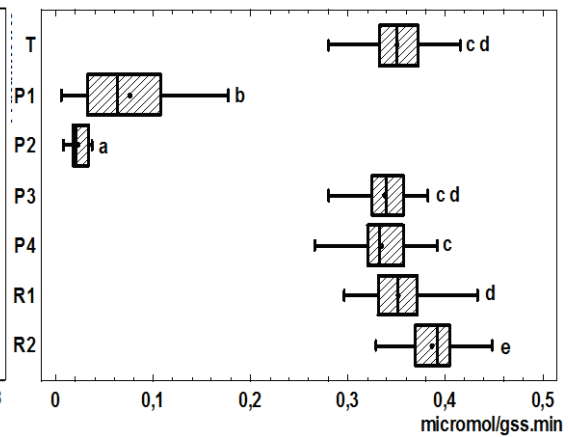
**$\beta$ -glucosidasa**



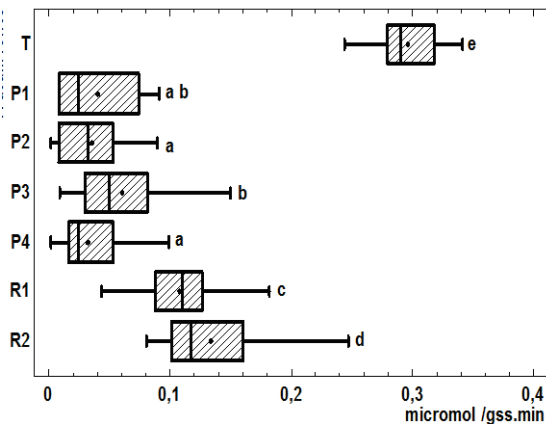
**$\beta$ -xilosidasa**



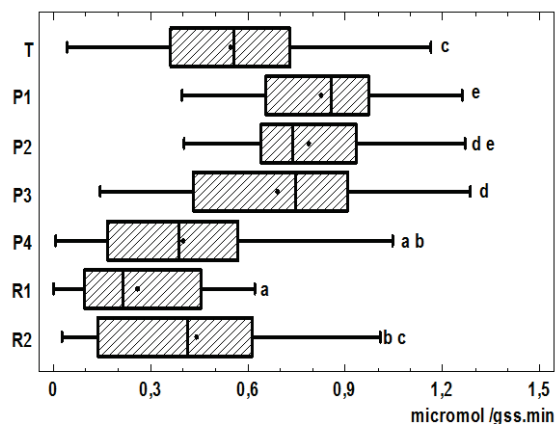
**$\beta$ -galactosidasa**



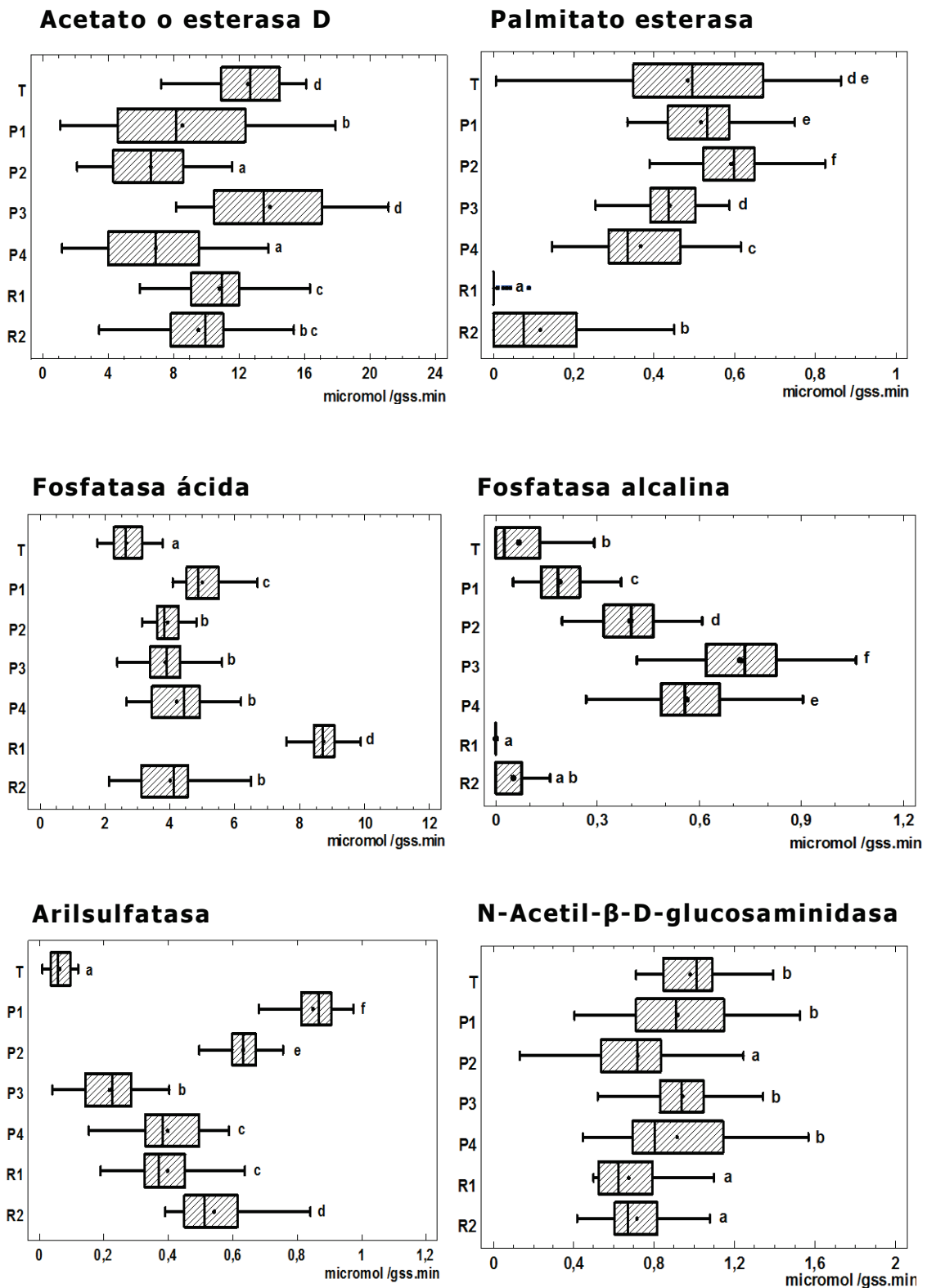
**$\beta$ - glucuronidasa**



**Leucina aminopeptidasa**



**Figura 4.16.-** Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas



**Figura 4.17.-**Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas

#### **4.2.4. *Análisis de los resultados enzimáticos***

##### ***a) Enzimas relacionadas con el metabolismo glucídico***

En el apartado 4.2.1.3. ya se indicó que la aplicación de purín generaba un efecto inhibitor de los enzimas que se agudiza más en la medida en la que la dosis se eleva. Recordamos que todas las experiencias se han realizado en medio saturado con agua y sellado, con lo que es aceptable una situación de hipoxia después de 30 días de incubación cuando el aporte es pobre en carbohidratos.

Llama la atención el efecto estimulante que sufre la  $\beta$ -galactosidasa a dosis altas de purín, al recuperar este enzima los niveles iniciales del suelo.

La aplicación de fragmentos de rábano, finamente divididos, ricos en MO joven, incrementa claramente la  $\beta$ -celobiosidasa, la  $\beta$ -xilosidasa y la  $\beta$ -galactosidasa. Quizás estos tres enzimas estén relacionados con la acción nematocida que manifiesta este aporte. El primero de ellos como indicador de un consumo elevado de glucosa, ahora disponible, para todo el conjunto biológico del suelo y la  $\beta$ -xilosidasa y  $\beta$ -galactosidasa por su capacidad para degradar macroestructuras de carbohidratos entre las cuales se encuentran las que conforman las paredes de los quistes de nematodos o la membrana externa del nematodo libre.

En cuanto a la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, los aportes tanto de purín como de rábano, prácticamente no afectarían a esta actividad, ya de por sí elevada, por la hidratación del suelo con lo que esta actividad nematocida resiliente atribuida a hongos con capacidad letal no se afecta, de manera significativa por estos aportes.

##### ***b) Enzimas relacionadas con el metabolismo proteico***

La elevada presencia de glicoproteínas en las estructuras biológicas de los microorganismos, bacterias y hongos y nematodos, purín y rábano, hace de la  $\beta$ -glucuronidasa un enzima estratégico cuya inhibición por los aportes usados explica de alguna manera indirecta el incremento del número de microorganismos y en consecuencia, el impulso multiplicador, que explica el denominado incremento de la actividad biológica del suelo.

En cuanto a la actividad leucina aminopeptidasa las variaciones enzimáticas encontradas tras la aplicación de ambos aportes no

presentan tendencia, posiblemente porque se precise depurar el método (dados los amplios rangos de variación del valor obtenido).

### ***c) Enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico***

Si la actividad de la acetato deacetilasa muestra un ligero descenso respecto al testigo, que no tiene una clara significación tanto en la aplicación del aporte sólido como líquido, la palmitato esterasa por el contrario nos muestra una clara variación del ámbito metabólico de actuación ya que con la aplicación de purín mantiene la capacidad de liberación de los ácidos grasos mientras que con la aplicación de restos de rábano se limita la presencia y uso posterior de aquellos.

Esto puede tener una posible relación con la capacidad nematicida en la que el purín de cerdo actuaría sobre el ámbito lipídico mientras que la aplicación del rábano estaría centrada mas sobre el ámbito glucídico.

### ***d) Metabolismos terminales: P y S***

#### ***del Fosfato***

Se observa un ligero incremento de la fosfatasa ácida que se asocia a un consumo mayor de fosfatos libres disponibles para los microorganismos del suelo.

En contraposición se observa un comportamiento diferenciado de la aportación de purín que incrementa claramente la fosfatasa alcalina asociada a estructuras membranosas activas, (por la contaminación rápida y elevada que sufre) con lo cual este enzima puede ser buen indicador de que el purín líquido o el proceso de sellado conlleva un claro incremento de renovación de los conjuntos bacterianos y fúngicos ubicados en el seno edáfico.

Es posible que entre estos componentes aparezcan bacterias y hongos con capacidad nematicida asociada al purín, de la misma manera que el purín aporte algún inductor de la multiplicación biológica citada ayudando de esta forma al proceso metabólico general.

Por el contrario sorprende la reducción de actividad que conlleva el aporte sólido de rábano que en principio y como MO sólida fresca debiera impulsar la actividad microbiológica del suelo.

---

*del sulfato*

Sorprendentemente, la aplicación en bajas dosis estimula extraordinariamente la actividad arilsulfatásica, liberadora de sulfatos, hecho que se amortigua cuando la dosis se eleva.

Ello podría asociarse a una aportación de sustratos presentes en el purín, capaces de estimular a la microbiota edáfica. Sin embargo el nivel de consumo, teóricamente reducido, de este ión sulfato podría generar un efecto de retroinhibición por exceso de sustrato del proceso liberador al cabo del 30 días. Esto ya fue observado por Portal Diez al aportar lodo de depuradora industrial a suelos procedentes de horizontes B con muy baja actividad biológica (Portal Diez, 1987).

Como contrapartida, la aplicación de rábano nos muestra también un incremento tanto mayor cuanto más dosis se aporta y no es de extrañar porque estamos hablando una especie perteneciente al género de crucíferas cuyo metabolismo en el área del S es muy intensa y reconocida como responsable de la capacidad nematicida.

Para el estudio de las aplicaciones de rábano y purín repetimos el planteamiento del apartado anterior ya que si las aplicaciones se han realizado independientemente se deberán estudiar sus correlaciones separadamente. Así pues comenzamos por la aplicación de rábano a dos dosis y proseguimos con la de purín a cuatro dosis.

#### 4.2.5. Análisis diferenciado de los aportes independientes

##### 4.2.5.1. Análisis estadístico de aplicación de rábano

###### a) Correlaciones del Rábano a diferentes dosis, con suelo testigo

La tabla (4.16) de correlaciones de la aplicación del rábano a diferentes dosis entre enzimas y la mortalidad, nos muestra una asociación de la actividad aril-sulfatasa elevada (0,88,  $p < 0.001$ ) junto con la conductividad eléctrica (0,97  $p < 0,001$ ) y ligeramente menor la concentración de  $N-NO_3^-$ .

**Tabla 4.16.-** Correlaciones de Pearson, entre cada par de variables en la aplicación de rábano

	bCel	bXil A	AcP A	PaIE A	Sulfa	NAcGln	CE	N.NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Mortal
<b>bG A</b>								-0,5143 -94 ***	
<b>bCel A</b>		0,494 -90 ***	0,581 -82 ***	-0,554 -87 ***	0,602 -87 ***				
<b>bXil A</b>			0,527 -83 ***		0,515 -87 ***				
<b>bGlc A</b>	-0,575 -87 ***			0,825 -83 ***		0,659 -87 ***	-0,669 -89 ***		-0,756 -12 **
<b>Ace A</b>									-0,820 -12 **
<b>PaIE A</b>							-0,551 -89 ***		
<b>AcP A</b>				-0,651 -78 ***					
<b>Sulfa</b>				-0,632 -84 ***		-0,507 -88 ***	0,851 -90 ***	0,521 -90 ***	0,888 -11 ***
<b>NAcGln A</b>				0,580 -87 ***					
<b>CE</b>								0,722 -96 ***	0,973 -12 ***
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>									0,725 -12 **

Se muestra, entre paréntesis, el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. Valores de P menores de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$   
En sombreado amarillo las correlaciones positivas

La separación de datos nos permite encontrar asociaciones entre el metabolismo glucídico de la  $\beta$ -celobiosidasa,  $\beta$ -xilosidasa y la fosfatasa ácida, relacionándose los carbohidratos a su vez entre sí.

Respecto del metabolismo lipídico, la palmitato esterasa se asocia con la  $\beta$ -glucuronidasa y con la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa estando estas dos relacionadas también positivamente, entre si.

La aril-sulfatasa se encuentra correlacionada con la  $\beta$ -celobiosidasa y  $\beta$ -xilosidasa y fuertemente con la conductividad y con la concentración de nitratos.

### *b) Análisis de componentes principales*

Este análisis permite obtener 4 ejes de variación que explican el 81,85 % de la varianza total (Tabla 4.17 y 4.18).

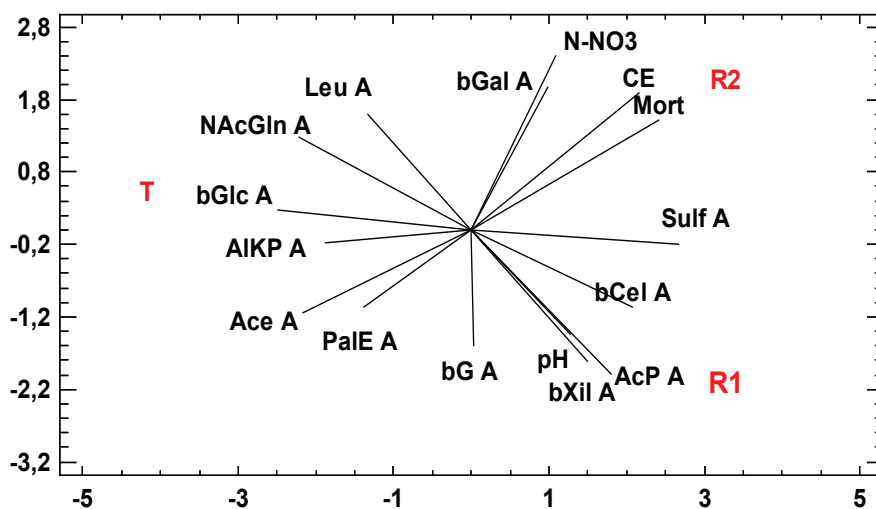
**Tabla 4.17.-** Análisis de pesos de los componentes.

Componente		Porcentaje de	Porcentaje
Número	Eigenvalor	Varianza	Acumulado
1	6,93834	43,37	43,37
2	3,55487	22,21	65,58
3	1,44269	9,02	74,60
4	1,15986	7,25	81,85

**Tabla 4.18.-** Análisis de componentes principales. Peso de los componentes. Se considera el valor mayor para cada parámetro (solo > 0,3).

	Comp 1	Comp 2	Comp 3	Comp 4
$\beta$ -celobiosidasa	0,281	-0,179	0,187	0,032
$\beta$ -glucosidasa	0,005	-0,270	-0,436	-0,161
$\beta$ -xilosidasa	0,203	-0,306	0,207	0,240
$\beta$ -galactosidasa	0,134	0,333	-0,163	0,438
$\beta$ -glucuronidasa	-0,339	0,048	0,055	-0,076
Leucina aminopeptidasa	-0,181	0,270	0,359	0,233
Acetato deacetilasa	-0,295	-0,193	0,151	0,306
Palmitato esterasa	-0,188	-0,178	-0,246	0,625
Fosfatasa ácida	0,243	-0,335	0,148	0,047
Fosfatasa alcalina	-0,254	-0,031	-0,300	0,281
Arilsulfatasa	0,362	-0,033	-0,046	0,224
N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa	-0,302	0,216	-0,198	-0,107
pH	0,173	-0,243	-0,510	-0,051
CE	0,293	0,317	-0,010	0,146
N-NO3	0,148	0,403	-0,277	-0,067
Mort	0,329	0,255	-0,034	0,096
% varianza explicada	<b>43,4</b>	<b>22,2</b>	<b>9</b>	<b>7,3</b>
% varianza acumulada	<b>43,4</b>	<b>65,6</b>	<b>74,6</b>	<b>81,9</b>

El primer componente que absorbe un 43,37 % de la varianza y viene determinado por la mortalidad,  $\beta$ -glucuronidasa, aril-sulfatasa y N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa. El segundo componente con un 22,21 % de varianza y un 65,58% de varianza acumulada se asocia a  $\beta$ -xilosidasa, fosfatasa ácida, CE y concentración de nitratos. El tercer componente con un 9,02% de varianza y un 74,80 % de varianza acumulada se relaciona con  $\beta$ -glucosidasa y leucina aminopeptidasa, fosfatasa alcalina y pH. Y por último el cuarto componente explica un 7,25% de varianza y un 81,85 % de varianza acumulada y se relaciona con  $\beta$ -galactosidasa, acetato deacetilasa y palmitato.



**Figura 4.18.-** Representación de componentes C2 frente a C1 con las variables analizadas con para el suelo testigo (T) y aporte de rábano a dosis R1 y R2.

En la representación de componentes C2 frente a C1, podemos observar la agrupación que conforman la mortalidad nitratos y arilsulfatasa asociadas a los aportes de rábano, diferenciando la dosis R1 y R2 y quedando fuera de tal agrupación el suelo testigo que a su vez se asocia a las actividades  $\beta$ -glucuronidasa, fosfatasa alcalina, y N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa entre otras (Fig. 4.18).

#### 4.2.5.2. Análisis estadístico de aplicación de purín

##### a) correlaciones del purín a diferentes dosis con el suelo testigo

En la tabla 4.19 de correlaciones del purín aplicado en diferentes dosis, desaparece el efecto de la concentración de  $\text{NO}_3^-$  y CE anterior (aplicación de rábano) quedando como actividad única relacionada positivamente con la mortalidad, la CE y la actividad fosfatasa alcalina.



**Tabla 4.19.-** Correlaciones de Pearson, entre cada par de variables en aporte de purín

	bCel A	bXil A	AcP A	AIKP A	SulfA	CE	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Mortal
<b>bG A</b>			0,506 -146 ***					
<b>bGal A</b>		-0,794 -115 ***			-0,804 -107 ***		0,639 -116 ***	
<b>bCel A</b>				-0,561 -120 ***	-0,504 -119 ***			-0,902 -17 ***
<b>bXil A</b>			0,502 -151 ***		0,726 -145 ***		-0,618 -157 ***	
<b>bGlc A</b>	0,872 -99 ***		-0,628 -107 ***	-0,678 -109 ***	-0,651 -104 ***	-0,532 -113 ***		-0,894 -11 ***
<b>Ace A</b>								-0,503 -20 *
<b>AcP A</b>					0,618 -141 ***			
<b>AIKP A</b>						0,546 -148 ***		0,785 -19 ***
<b>CE</b>							0,732 -160 ***	0,734 -20 ***

Se muestra, entre paréntesis, el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. Valores de P menores de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%. \* p<0.05 \*\* p<0.01 \*\*\* p<0.001. En sombreado amarillo se destacan las correlaciones positivas

Estudiando las actividades enzimáticas se puede apreciar que fosfatasa ácida y alcalina no se encuentran correlacionadas ligándose en procesos edafológicos, a la  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilosidasa. La actividad arilsulfatasa se relaciona con  $\beta$ -xilosidasa y fosfatasa ácida. Como se ha referido antes, la única actividad enzimática que se correlaciona con la mortalidad es la fosfatasa alcalina.

### ***b) Análisis de los componentes principales***

El análisis de componentes permite obtener 4 ejes de variación que explican el 91,3 % de la varianza. (Tabla 4.20)

**Tabla 4.20.-** Análisis de componentes principales

Componente		Porcentaje de	Porcentaje
Número	Eigenvalor	Varianza	Acumulado
1	7,11043	44,4	44,4
2	3,565	22,3	66,7
3	2,368	14,8	81,5
4	1,569	9,8	91,3

Obtenemos así la tabla de pesos de los componentes (Tabla 4.21)

**Tabla 4.21.**– Análisis de componentes principales. Peso de los componentes

	Comp 1	Comp 2	Comp 3	Comp 4
$\beta$ -celobiosidasa	0,350	0,136	-0,080	-0,092
$\beta$ -glucosidasa	-0,276	-0,112	-0,140	-0,369
$\beta$ -xilosidasa	-0,162	0,327	0,229	0,390
$\beta$ -galactosidasa	0,277	-0,294	0,222	0,053
$\beta$ -glucuronidasa	-0,306	0,029	-0,227	-0,236
Leucina aminopeptidasa	0,351	0,129	-0,138	-0,099
Acetato deacetilasa	0,041	-0,055	0,527	-0,232
Palmitato esterasa	-0,086	0,416	0,342	0,181
Fosfatasa ácida	-0,298	-0,058	-0,142	0,219
Fosfatasa alcalina	-0,258	-0,187	0,365	-0,056
Arilsulfatasa	-0,314	0,240	-0,107	-0,167
N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa	0,107	0,398	0,277	-0,015
pH	0,008	-0,169	-0,248	0,666
CE	-0,149	-0,420	0,254	0,024
Nitrato	0,257	-0,323	0,130	0,057
Mortal	-0,345	-0,134	0,153	0,146
% varianza explicada	<b>44,4</b>	<b>22,3</b>	<b>14,8</b>	<b>9,8</b>
% varianza acumulada	<b>44,4</b>	<b>66,7</b>	<b>81,5</b>	<b>91,3</b>

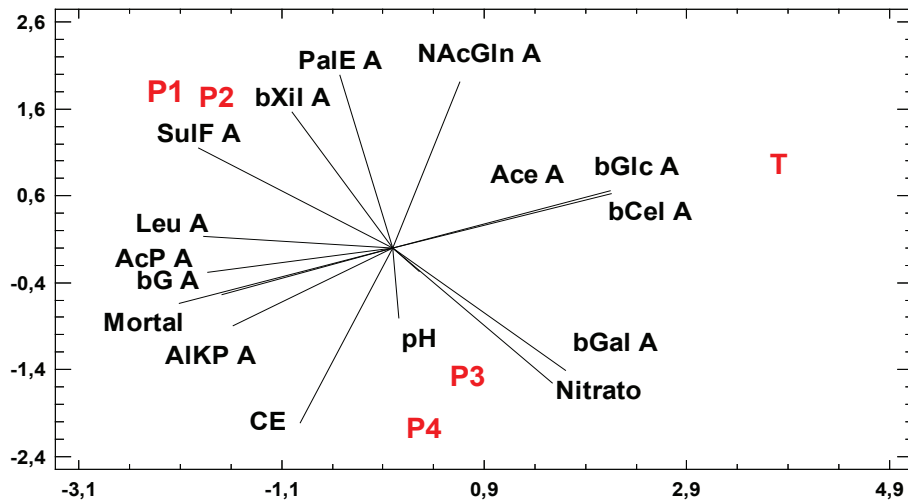
Si se considera los valores  $> 0,3$  se observa que el primer componente que absorbe un 44,4% de la varianza esta determinado por las actividades  $\beta$ -celobiosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa, leucina aminopeptidasa, arilsulfatasa y la mortalidad. El segundo componente que absorbe un 22,3 % de varianza con un casi 66,7 % de varianza acumulada se asocia a  $\beta$ -xilosidasa, palmitato esterasa, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, CE y concentración de nitratos. El tercer componente que absorbe un 14,8 % de varianza con un 81,5 % de varianza acumulada se asocia a acetato deacetilasa y a fosfatasa alcalina. El cuarto componente con un 9,8 % de varianza y un 91,3 % de varianza acumulada se relaciona con  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilosidasa.

Si llevamos cada componente a las muestras de trabajo de las dosis de purines obtenemos la tabla 4.22:

**Tabla 4.22.**- Componentes principales para cada experiencia.

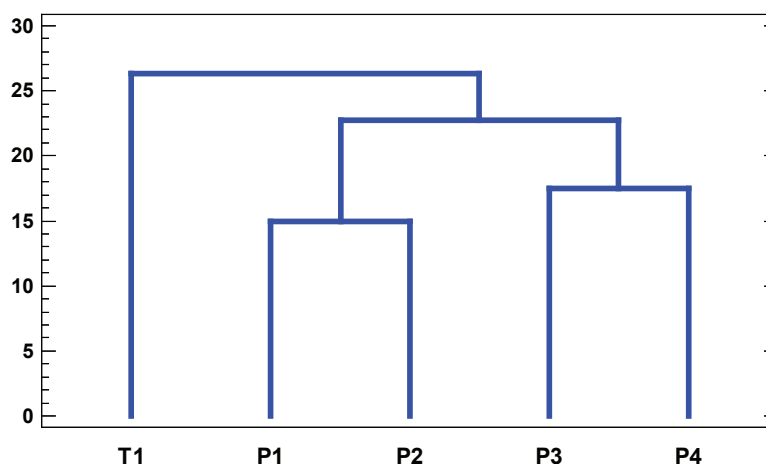
	Comp 1	Comp 2	Comp 3	Comp 4
<b>T1</b>	4,444	0,504	0,130	-0,586
<b>P1</b>	-1,930	2,436	-1,557	-0,692
<b>P2</b>	-1,352	1,852	2,046	0,455
<b>P3</b>	0,329	-1,199	-0,956	1,710
<b>P4</b>	-1,491	-3,593	0,336	-0,887

Ya obtenidos los componentes para cada aporte de purín representamos en la Fig. 4.19 de componentes principales:



**Figura 4.19.-** Representación de C2 frente a C1 para las diferentes dosis de purín

En la gráfica de representación de componentes (Fig.4.19) aparece asociada la mortalidad con las actividades fosfatasa alcalina y ácida, la  $\beta$ -D-glucosidasa y la CE mientras que, con correlación negativa y asociándose al testigo aparecen la acetato deacetilasa,  $\beta$ -glucuronidasa y  $\beta$ -celobiosidasa. En el dendograma se establecen asociaciones, por las que se aprecian grupos establecidos entre las menores dosis de purín y más cercanos al testigo (T) y las dosis mayores (Fig.4.20).



**Figura 4.20.-** Dendograma de asociación para aplicación de purín a diferentes dosis

### 4.3. EXPERIENCIA III.- APLICACIÓN DE PURÍN SÓLIDO EN CAMPO

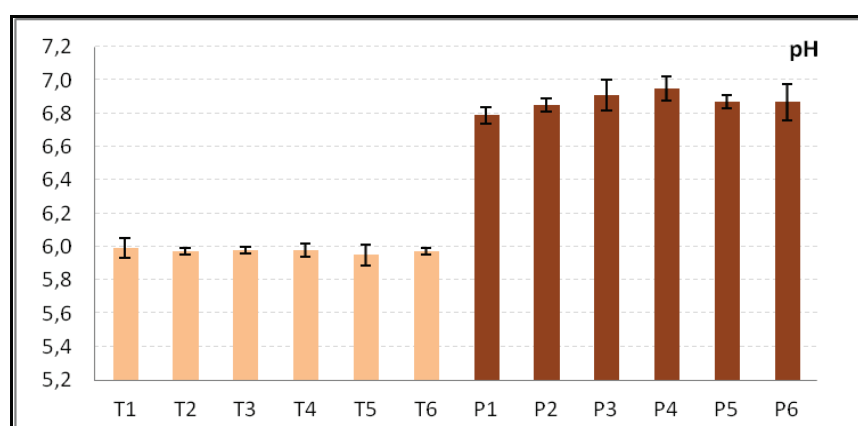
A efectos de poder establecer las oportunas equivalencias en la aplicación de purín sólido en dosis de 4 T/ha, (0.00547 g de N /100 g de suelo) con las experiencias anteriores de laboratorio, recordamos los valores de N aportado en cada caso (Tabla 4.23).

**Tabla 4.23.**-Dosis de nitrógeno en g de N por cada 100 g de suelo aplicados con los aportes en laboratorio y en sólido en campo objeto de este estudio

Aplicación	g de N/100 g suelo
P1	0.00031
P2	0.00155
P3	0.0031
P4	0.00465
Purín sólido en campo	0.00547

#### 4.3.1. Modificación de algunos parámetros químicos durante el proceso.-efecto sobre el pH, CE y $NO_3^-$

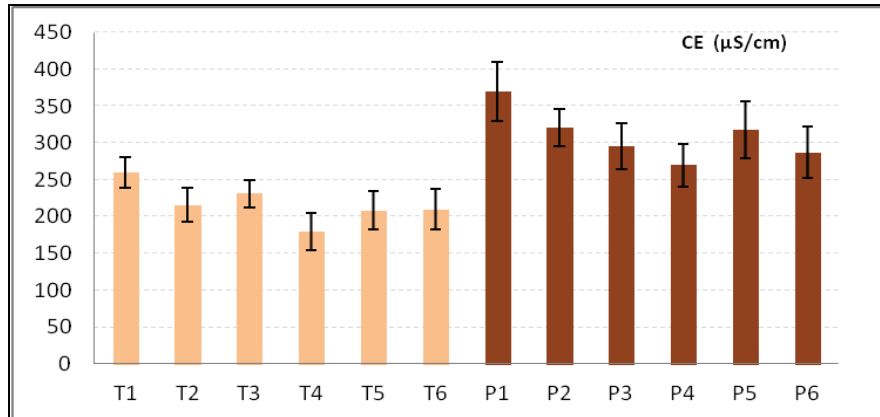
Tal y como se ha descrito en el apartado de material y métodos la aplicación al suelo a partir de un pH inicial próximo a 6, sufre por aplicación de una dosis de purín sólido de 4T/Ha equivalente con un pH de 9,8 el efecto tampón de este suelo de textura arenosa (un 67% de arenas) lo que permitirá elevar el pH hasta valores entre 6.8 y 6.9 (Fig.4.21)



**Figura 4.21.**-Variación de pH antes y después de la aplicación de purín en campo

En cuanto a la CE y a pesar del intento de homogeneización de las muestras referido en material y métodos, el suelo no muestra un

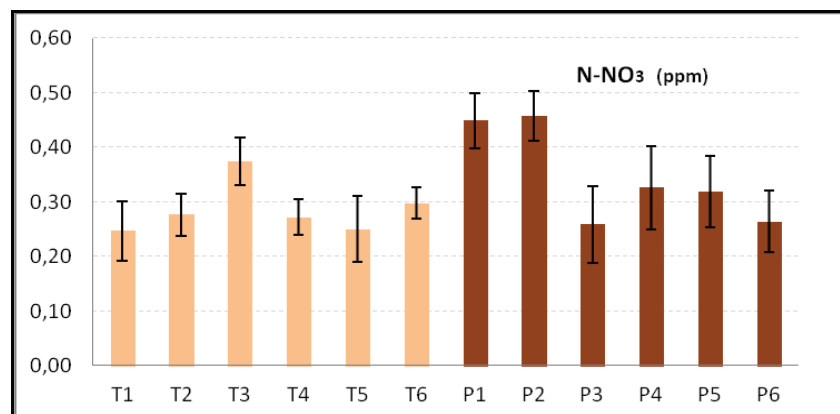
comportamiento homogéneo pues su conductividad varía de 200 a 250  $\mu\text{S}/\text{cm}$  según la parcela muestreada (Fig. 4.22). Este efecto de no homogeneización se manifiesta en incrementos CE que varían de 270 a 355  $\mu\text{S}/\text{cm}$  en las parcelas aportadas con purín deshidratado.



**Figura 4.22.**-Variación de conductividad antes y después de la aplicación de purín en campo

El hecho es indicador de que el suelo permite, una vez realizado el sellado, la lixiviación intensa (derivada de la aportación de agua) debido a la existencia de una gran cantidad y concentración de iones tales como K, Na, Ca, Mg Fe Zn y otros, además de la posible generación de iones nitrato durante el tiempo de la experiencia.

Esta afirmación referente a los  $\text{NO}_3^-$  hace que en parcelas cuya concentración oscile entre 25 y 37 manifiesten una percolación intensa de los mismos, que oscila entre 25 y 44, como consecuencia de, por un lado, la textura arenosa, y por otro, de la reducción de la disponibilidad del  $\text{O}_2$  necesaria para el desarrollo del proceso de nitrificación, como consecuencia de la compactación aplicada a las parcelas para su sellado (Fig 4.23).



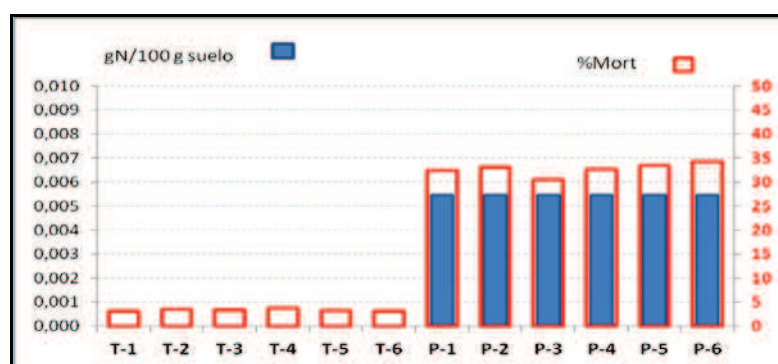
**Figura 4.23.**- Variación de N-NO<sub>3</sub> antes y después de la aplicación de purín en campo

### 4.3.2. Mortalidad de *G.rostochiensis* con la aplicación de purín deshidratado (sólido) en campo

La relación entre la población final y la inicial nos permite calcular la eficacia del tratamiento que expresaremos en porcentaje de mortalidad.

**Tabla 4.24.-** Resultados de mortalidad para la aplicación de purín a una sola dosis con seis réplicas efectuadas.

TRATAMIENTO	MORTALIDAD	g N/100 g suelo
TESTIGO	3,4 +/- 0.2	0
PURÍN	32,8 +/- 1.2	0,00547



**Figura 4.24.-** Porcentaje de mortalidad de *G.rostochiensis*. Efecto del tratamiento efectuado para las seis réplicas

El hecho es que la aplicación de esta forma de purín deshidratado eleva de manera sistemática la mortalidad de quistes y juveniles del nematodo *G.rostochiensis* en más de un 29 %, pero muy por debajo de la obtenida en laboratorio con purín líquido, aun teniendo en cuenta, que la cantidad de N aportada es ligeramente superior a las experiencias de laboratorio (Tabla 4.24 y Fig.4.24).

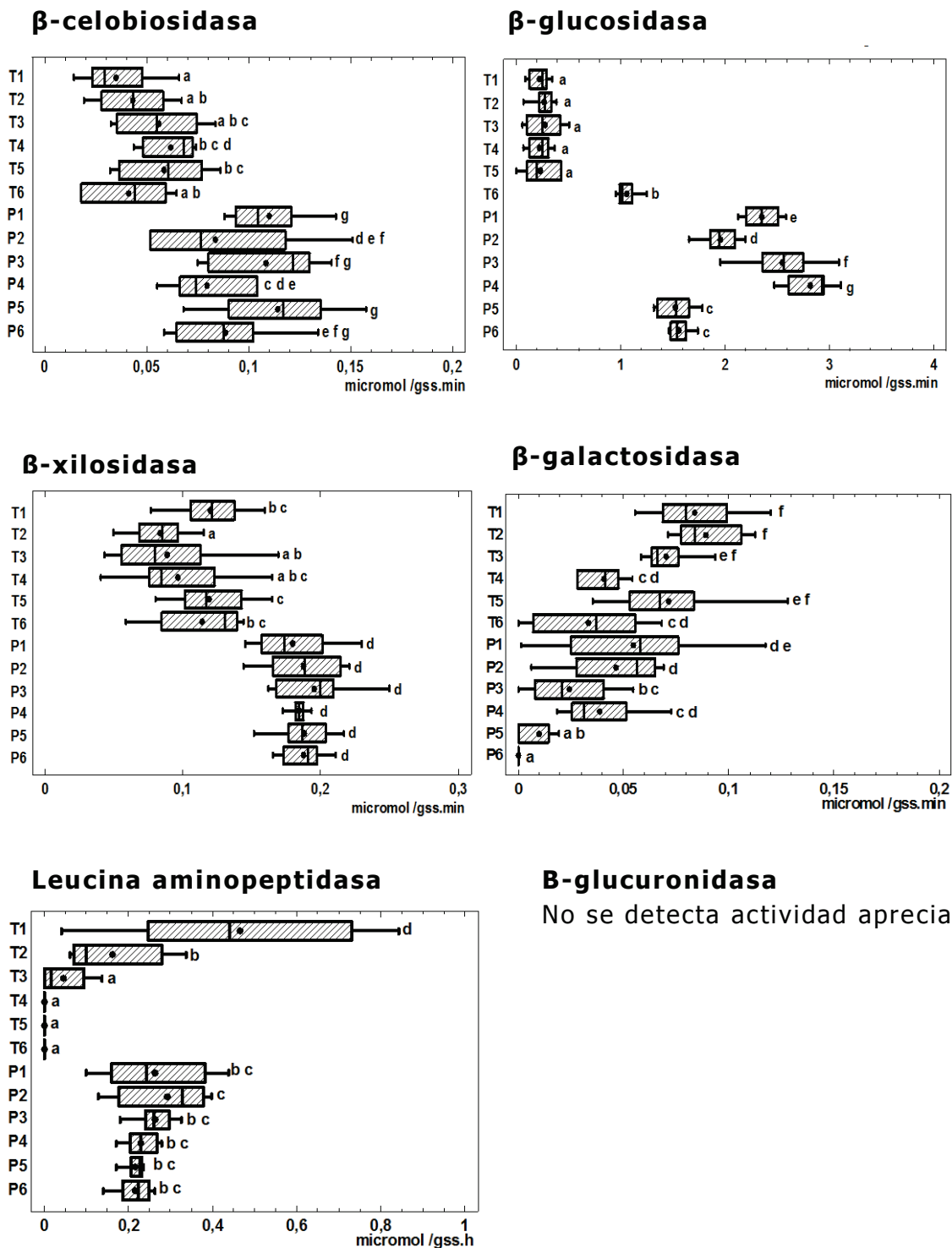
### 4.3.3. Resultados de actividades enzimáticas

#### a) valores de actividad

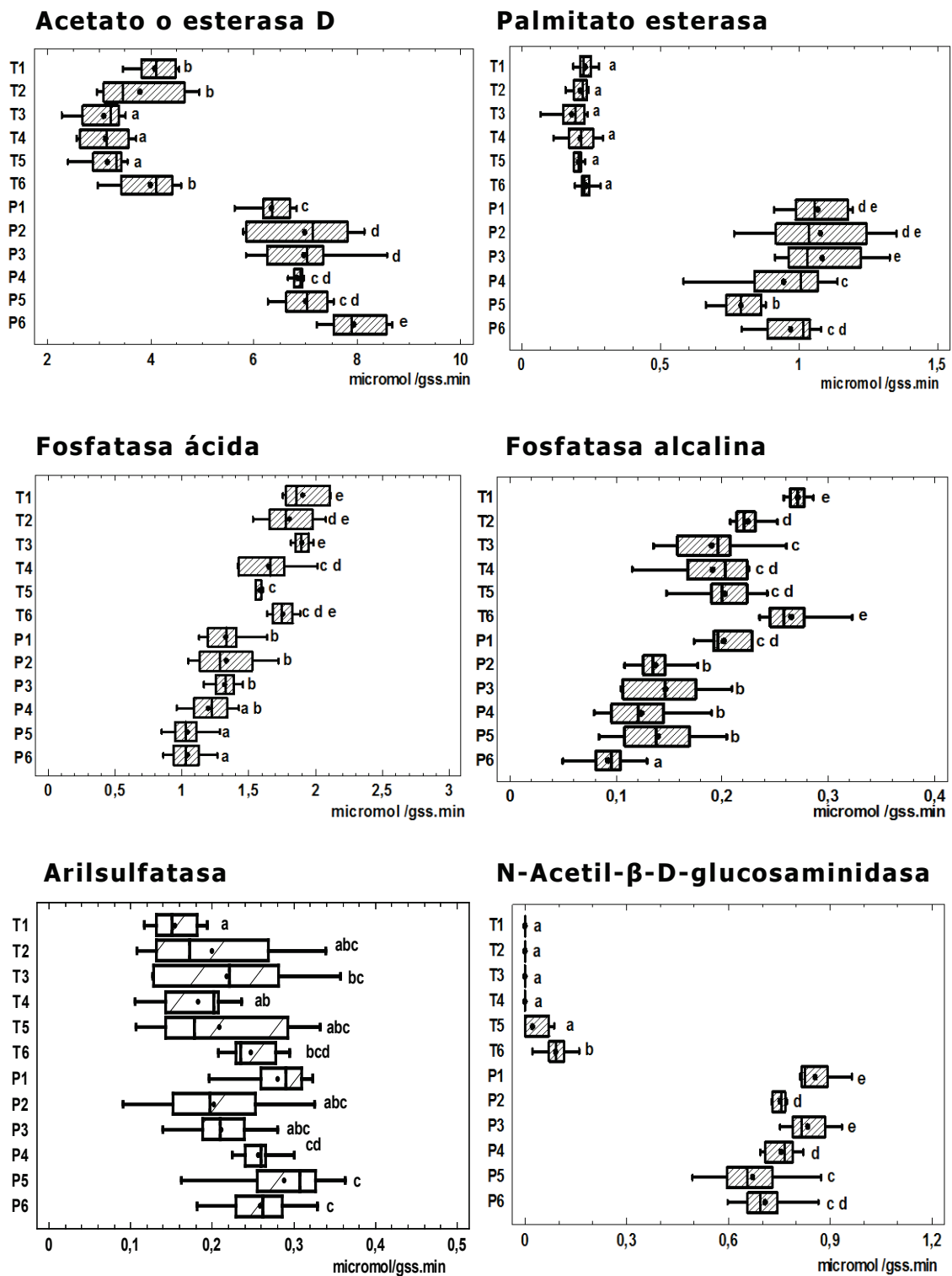
**Tabla 4.25.-** Actividades enzimáticas medias de la experiencia de campo

M	bCel	bG A	bXil	bGal	Leu	Ace	PaIE	AcP	AIKP	Sulf	NACIn
T1	0,035	0,223	0,163	0,084	0,465	4,082	0,228	1,902	0,271	0,154	0,000
T2	0,043	0,267	0,083	0,089	0,162	3,786	0,209	1,803	0,224	0,199	0,000
T3	0,074	0,226	0,088	0,070	0,000	3,090	0,179	1,879	0,190	0,218	0,000
T4	0,062	0,227	0,097	0,041	0,000	3,122	0,210	1,690	0,191	0,182	0,324
T5	0,058	0,204	0,130	0,072	0,000	3,157	0,202	1,602	0,202	0,209	0,000
T6	0,034	1,058	0,114	0,030	0,000	4,136	0,229	1,715	0,265	0,248	0,092
P1	0,110	2,359	0,180	0,055	0,294	6,326	1,068	1,330	0,202	0,280	0,855
P2	0,079	1,958	0,188	0,047	0,314	6,975	1,076	1,270	0,137	0,202	0,752
P3	0,108	2,553	0,196	0,022	0,263	6,954	1,083	1,320	0,146	0,211	0,833
P4	0,079	2,822	0,184	0,039	0,287	7,071	0,942	1,162	0,124	0,256	0,755
P5	0,134	1,523	0,188	0,000	0,216	6,948	0,789	1,040	0,140	0,288	0,671
P6	0,094	1,561	0,187	0,000	0,215	8,037	0,949	1,040	0,098	0,261	0,703

*b) Representación grafica de las actividades enzimáticas*



**Figura 4.25.-** Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas



**Figura 4.26.-**Actividades enzimáticas..Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas



### ***c) análisis de resultados enzimáticos***

#### ***c.1) Enzimas relacionadas con el metabolismo glucídico***

Aparece un incremento claro de las actividades  $\beta$ -celobiosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilosidasa mientras que la  $\beta$ -galactosidasa se inhibe.

Llama la atención el incremento extraordinario de la actividad de la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, que desde valores edáficos muy bajos, multiplica por 10 su valor, incremento posiblemente asociado al aumento espectacular del componente fúngico edáfico y con ello, a la alta capacidad nematicida de la enmienda.

#### ***c.2) Enzimas relacionadas con el metabolismo proteico***

La leucina aminopeptidasa muestra un incremento significativo de su capacidad catalítica al aplicar los purines deshidratados (no así de la  $\beta$ -glucuronidasa).

#### ***c.3) Enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico***

Palmitato esterasa y acetato deacetilasa también sufren un incremento importante y paralelo de su actividad, triplicando la capacidad enzimática del suelo testigo.

#### ***c.4) Enzimas relacionadas al metabolismo del P y S***

Es curioso observar como las fosfatasas alcalina y ácida reducen a la mitad su nivel de actividad. Debemos recordar que aquí la aportación de P al suelo es de un 1.4%, y la aplicación de este ión inorgánico ejerce un efecto de inhibición por retrocontrol de ambas actividades enzimáticas cuando se aporta fosfato en exceso. Este resultado concuerda con lo expresado en las aplicaciones de rábano y purín en este mismo suelo en las experiencias de laboratorio.

Para el metabolismo de S no hay variación de comportamiento. La arilsulfatasa responde incrementando algo su actividad, posiblemente acompañada al incremento del ritmo metabólico del propio suelo.

### 4.3.4. Análisis estadístico

#### a) Matriz de correlaciones

Considerando solo correlaciones con valores mayores de 0.5

**Tabla 4.26.-** Correlaciones de Pearson, entre cada par de variables para la experiencia de campo con purín sólido.

	bCel	bXil	Ace	PalE	AcP A	AIKP	NAcGln	pH	CE	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Mort
<b>bG A</b>	0,596 -82 ***	0,759 -89 ***	0,809 -81 ***	0,895 -92 ***	-0,644 -77 ***	-0,513 -89 ***	0,892 -83 ***	0,900 -12 ***	0,709 -12 ***		0,874 -93 ***
<b>bGal A</b>			-0,54 -81 ***		0,605 -76 ***	0,523 -89 ***					-0,531 -93 ***
<b>bCel A</b>		0,613 -80 ***	0,581 -76 ***	0,684 -83 ***	-0,531 -68 ***		0,697 -75 ***				0,690 -85 ***
<b>bXil A</b>			0,802 -79 ***	0,806 -89 ***	-0,692 -75 ***	-0,521 -87 ***	0,804 -81 ***	0,802 -11 ***	0,633 -11 *		0,819 -91 ***
<b>Leu A</b>								0,909 -12 ***	0,909 -12 ***	0,648 -12 *	
<b>Ace A</b>				0,877 -82 ***		-0,635 -80 ***	0,899 -74 ***	0,946 -9 ***	0,776 -9 *		0,927 -84 ***
<b>PalE A</b>								0,960 -12 ***	0,851 -12 ***	0,576 -12 *	0,945 -94 ***
<b>AcP A</b>			-0,76 -68 ***	-0,762 -77 ***		0,693 -75 ***	-0,744 -70 ***	-0,894 -12 ***	-0,66 -12 *		-0,832 -79 ***
<b>AIKP A</b>				-0,621 -90 ***				-0,636 -12 *			-0,705 -92 ***
<b>Sulf A</b>								0,651 -11 *			
<b>NAcGln</b>				0,935 -84 ***		-0,612 -83 ***		0,913 -11 ***	0,757 -11 **		0,950 -86 ***
<b>pH</b>									0,824 -12 ***		0,994 -12 ***
<b>CE</b>										0,646 -12 *	0,851 -12 ***

Se muestra entre paréntesis el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. Valores de P menores de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%. \* p<0.05 \*\* p<0.01 \*\*\* p<0.001. Sombreado en amarillo las correlaciones positivas que se establecen

La mortalidad está fuerte y positivamente relacionada con la CE (0,851) y el pH (0,994) además de con las actividades  $\beta$ -glucosidasa (0,874),  $\beta$ -celobiosidasa (0,689),  $\beta$ -xilosidasa (0,819), acetato deacetilasa (0,927), N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (0,95), y palmitato esterasa (0,945) mientras que se relaciona negativamente con  $\beta$ -galactosidasa (-0,53) y fosfatasas ácida (-0,83) y alcalina (-0,704). Sin embargo todas las relacionadas no muestran correlación con el metabolismo del S, aril-sulfatasa ni con la leucina aminopeptidasa (Tabla 4.26).

Aparecen correlaciones más amplias que en muestras trabajadas en laboratorio, así  $\beta$ -glucosidasa se correlaciona con  $\beta$ -celobiosidasa y  $\beta$ -xilosidasa, correlacionadas a su vez entre sí. La acetato deacetilasa se relaciona positivamente con todas las glucídicas salvo la  $\beta$ -galactosidasa, con la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, y con la palmitato esterasa siendo la correlación entre estas últimas también alta y positiva.

### *b) Análisis de Componentes principales*

El análisis permite obtener 3 ejes de variación que pueden explicar más de un 89,68 % de la varianza total (Tabla 4.27).

**Tabla 4.27.-** Análisis de componentes principales

Componente		Porcentaje de Varianza	Porcentaje Acumulado
Número	Eigenvalor		
1	10,694	71,29	71,29
2	1,652	11,01	82,30
3	1,106	7,38	89,68

Se aquí obtenemos la tabla 4.28 con el peso de cada componente

**Tabla 4.28.-** Análisis de componentes principales. Peso de los componentes.

	Comp 1	Comp 2	Comp 3
$\beta$ -glucosidasa	0,276	0,073	0,042
$\beta$ -galactosidasa	-0,210	0,445	0,213
$\beta$ -celobiosidasa	0,256	-0,181	0,139
B-Xilosidasa	0,270	0,200	-0,247
Fosfatasa ácida	-0,287	0,193	0,114
Acetato deacetilasa	0,295	0,027	-0,164
Arilsulfatasa	0,200	-0,351	0,371
N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa	0,291	0,017	0,005
Fosfatasa alcalina	-0,238	0,270	0,172
Palmitato esterasa	0,297	0,107	0,002
Leucina aminopeptidasa	0,158	0,599	-0,265
pH	0,304	0,021	-0,062
Conductividad	0,262	0,288	0,230
N-NO <sub>3</sub>	0,156	0,186	0,734
Mortalidad	0,305	0,015	-0,012
% de varianza explicada	<b>71,3</b>	<b>11,0</b>	<b>7,4</b>
% de varianza acumulada	<b>71,3</b>	<b>82,3</b>	<b>89,7</b>

Considerando valores mayores de 0.3 para cada parámetro y tomando el valor mayor de cada uno podemos decir que el primer componente que absorbe un 71,3% viene determinado por pH y mortalidad con valores pequeños y de similar cuantía. El segundo componente que explica un 11% con un 82,3% acumulado aparece relacionado con la  $\beta$ -galactosidasa, arilsulfatasa, y leucina aminopeptidasa.

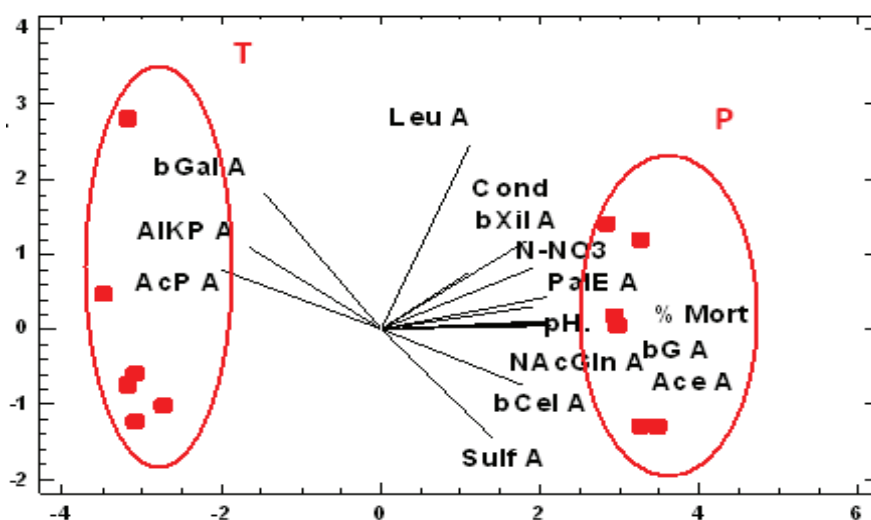
El tercer componente que explica un 7,4% de varianza y con una varianza acumulada de un 89,7% aparece relacionado con  $\text{N-NO}_3^-$  y en menor medida con la arilsulfatasa (Tabla 4.28.).

Si referimos las componentes a cada uno de las muestras de trabajo quedaría la tabla 4.29:

**Tabla 4.29.-** Tabla de los componentes para cada uno de los valores

	Comp 1	Comp 2	Comp 3
<b>T1</b>	-3,183	2,803	-1,334
<b>T2</b>	-3,479	0,473	0,070
<b>T3</b>	-3,082	-0,592	1,473
<b>T4</b>	-3,082	-1,213	-0,418
<b>T5</b>	-3,175	-0,735	-0,259
<b>T6</b>	-2,737	-1,006	0,566
<b>P1</b>	3,264	1,192	2,051
<b>P2</b>	2,831	1,412	0,563
<b>P3</b>	2,923	0,174	-1,190
<b>P4</b>	2,977	0,046	-0,400
<b>P5</b>	3,480	-1,277	0,119
<b>P6</b>	3,264	-1,278	-1,242

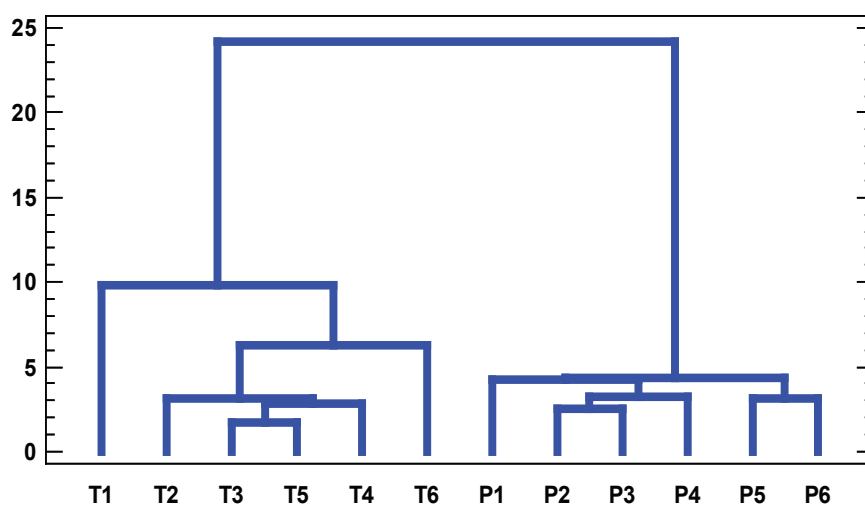
Al representar el componente 2 frente al componente 1 aparecen agrupadas las muestras de testigo y las de aplicación de Purín como era previsible, asociando mortalidad con las muestras de purín aplicado y con las actividades como  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -celobiosidasa,  $\beta$ -xilosidasa, esterasas y N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa. Separadas de estas aparece las actividades fosfatásicas, ácida y alcalina y la  $\beta$ -galactosidasa (Fig. 4.27).



**Figura 4.27.-** Representación de C2 frente C1 para la aplicación de purín sólido en campo.

La representación de los datos estadísticos en dendograma los agrupa en dos bloques, separando claramente los suelos testigos (T) sin

aplicación de aporte de aquellos con aplicaciones de aportes de purín (P) (Fig.4.28).



**Figura 4.28.-** Dendrograma agrupando según características similares

#### 4.4. EXPERIENCIA IV.- APLICACIÓN DE PURÍN SÓLIDO EN LABORATORIO A DIFERENTES DOSIS

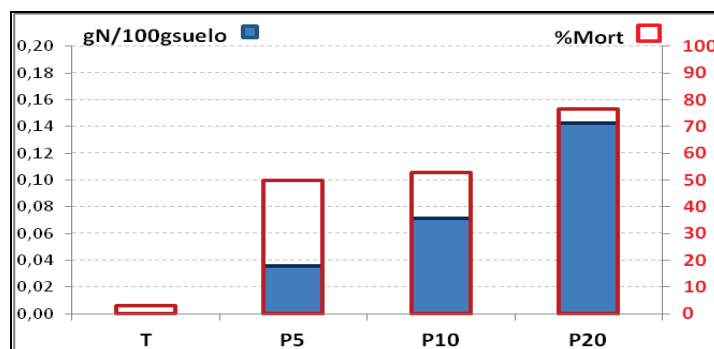
##### 4.4.1. Resultados del análisis nematológico

Calculamos la dosis de N aportada en cada muestra para su análisis e interpretación de resultados (Tabla 4.30).

**Tabla 4.30.-** Mortalidad y contenido en Nitrógeno de los aportes empleados en la experiencia

		gN / 100 g suelo	% Mortalidad
Suelo testigo	<b>C</b>	0.137	3,2 ± 0,6
Purín 5 g.	<b>P5</b>	0.0356	49,9 ± 0,8
Purin 10 g.	<b>P10</b>	0.0712	52,7 ± 0,3
Purin 20 g.	<b>P20</b>	0.1424	76,6 ± 0,3

Representamos con la mortalidad el contenido el N que se realiza con estos aportes (Fig. 4.29).



**Figura 4.29.-** Mortalidad de *G.rostochiensis* y contenido en N aportado en g/100 g suelo para suelo testigo (T) incubado y suelo con aportes de purín (P) en dosis de 5, 10 y 20g

La aplicación de purín (Fig. 4.29) eleva la mortalidad del nematodo desde un 3.4%, del suelo testigo hasta un valor medio de 50 % con dosis 5 y 10 y llegando al 77% cuando se añade la dosis máxima.

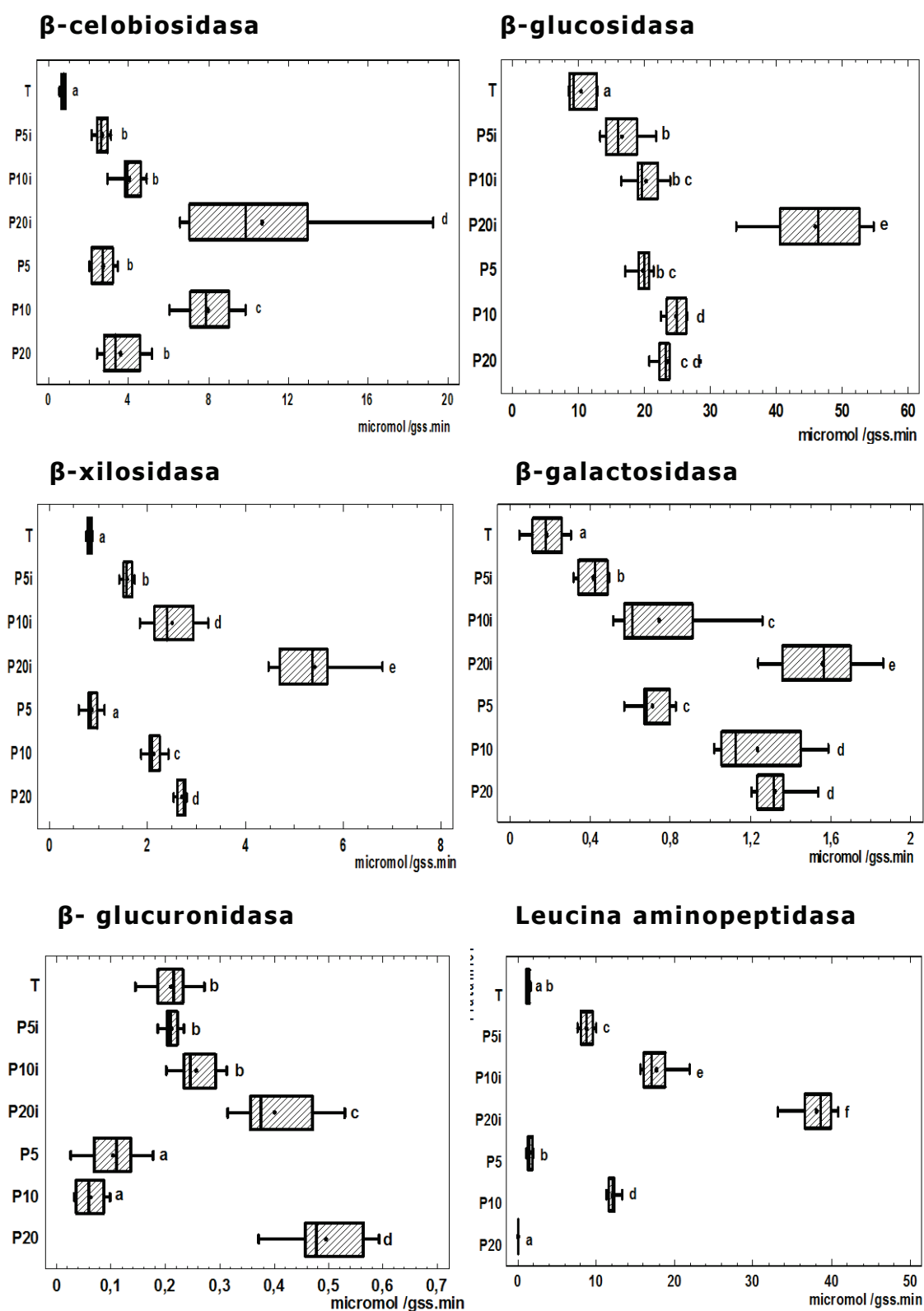
##### 4.4.2. Resultados de actividades enzimáticas

###### a) Valores de actividad

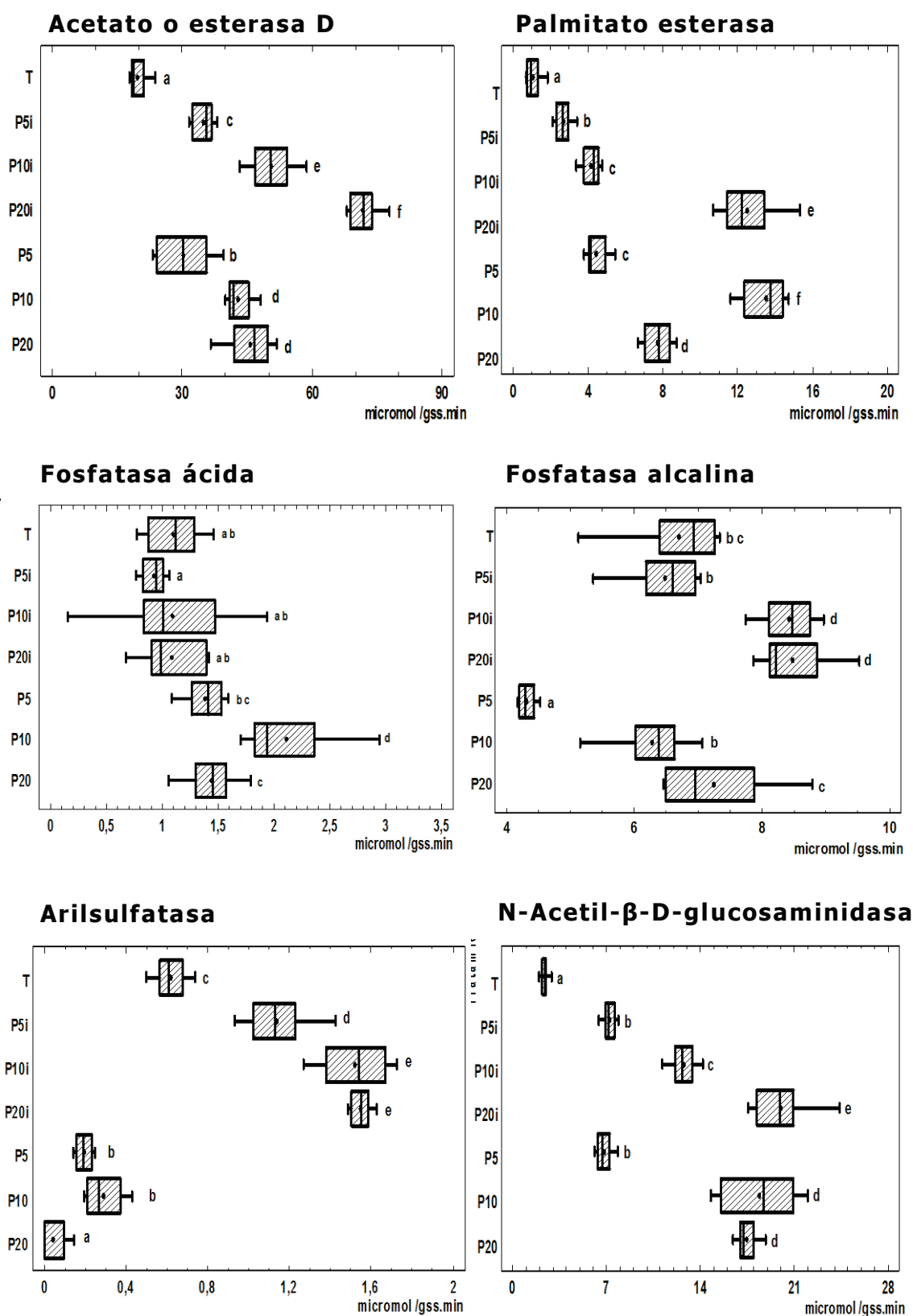
**Tabla 4.31.-** Actividades enzimáticas medias de la experiencia de purín en laboratorio

M	bCel	bG A	bXil	bGal	Leu A	bGlc	AceA	PalE A	AcP A	AIKP A	Sulf A	NAcGln
T	0,805	10,357	0,794	0,182	1,303	0,210	19,748	1,069	1,100	6,705	0,616	2,388
P 5 i	2,656	16,631	1,593	0,415	8,788	0,218	36,397	2,662	0,989	6,489	1,138	7,215
P 10 i	4,037	20,200	2,509	0,745	17,696	0,257	50,636	4,177	1,089	8,422	1,521	13,205
P 20 i	10,69	46,026	5,067	1,946	38,080	0,442	73,945	12,519	1,339	8,474	1,549	20,006
P 5	2,691	20,302	0,870	0,713	1,570	0,104	30,371	4,451	1,385	4,265	0,191	6,817
P 10	7,970	26,013	1,947	1,234	12,063	0,062	42,999	12,884	2,112	6,287	0,289	18,413
P 20	3,606	24,884	2,813	1,322	nsd	0,495	45,666	7,714	1,437	7,239	0,041	17,930

## b) expresión gráfica de las actividades enzimáticas



**Figura 4.30.- Actividades enzimáticas.** Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ .) Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas



**Figura 4.31.-** Actividades enzimáticas. Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas



### ***C) Análisis de resultados enzimáticos***

Dado que en este caso los controles de actividad se realizan en dos momentos diferentes, antes de la incubación al añadir el purín y una vez finalizados los 30 días de la incubación se utilizan, los subíndices i para las muestras iniciales antes de incubar (Tabla 4.31).

#### ***c.1) Enzimas relacionadas con el metabolismo glucídico***

En este ámbito los enzimas elegidos como indicadores muestran una actividad inicial que generalmente es proporcional a la dosis aportada. Sin embargo, durante el periodo de incubación se reduce la actividad de  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -celobiosidasa  $\beta$ -xilosidasa de forma no siempre proporcional a la dosis aplicada y tiene un comportamiento conservador de la actividad  $\beta$ -galactosidasa que mantiene niveles de actividad más elevados. Esto podría ser indicador de que esta área metabólica se encuentra afectada por cambios en la disposición del O<sub>2</sub> en la misma medida que afecta al proceso y que se manifiesta por la reducción de las actividades enzimáticas excepto en lo referente a la degradación de galactosil-derivados.

Que el purín sólido es portador de especies fúngicas activas nos lo muestra el incremento proporcional de la actividad de la N-acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidasa. El proceso de incubación no parece afectar en negativo a este enzima y si se estimula cuando la dosis aplicada es la de 10g (P10).

#### ***c.2) Enzimas relacionadas con el metabolismo proteico***

El catabolismo proteico, en sentido estricto, afecta muy clara y negativamente a la leucín esterasa. En lo que se refiere a la  $\beta$ -glucuronidasa, enzima que interviene en la demolición de glicoproteínas la inhibición es manifiesta, a bajas dosis incluso por debajo de los momentos iniciales de la incubación mostrando un comportamiento inverso al aplicar la dosis más alta (P20).

#### ***c.3) Enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico***

Como en el caso anterior los enzimas crecen en su actividad en función de la aportación de purín, aplicado en el momento inicial de la experiencia. El proceso de incubación sobre la muestra suelo-purín muestra un comportamiento diferencial de la palmitato esterasa ya que le afecta a esta actividad mucho cuando la dosis aplicada es menor y una exacerbación de la misma a dosis intermedia.

Por el contrario la reducción de esta actividad es mas homogénea y conservadora en el caso de la acetato deacetilasa.

#### *c.4) Metabolismos terminales del P y S*

**Del Fosfato** Con respecto a la fosfatasa ácida (enzima exocelular), su actividad es prácticamente independiente de la dosis y del proceso de incubación desarrollado. Respecto a la fosfatasa alcalina (enzima de membrana de seres vivos activos) no tiene una respuesta que se corresponda con el comportamiento general de los enzimas del purín.

**Del sulfato** La aril-sulfatasa también sufre una reducción muy importante cuando se desarrolla el proceso de incubación disminuyendo ligeramente con el incremento de dosis aplicada.

#### **4.4.3. Análisis estadístico**

##### *a) Matriz de correlaciones*

**Tabla 4.32.**-Se muestran las correlaciones de Pearson, entre cada par de variables en aplicación de purín sólido en laboratorio

	bGalA	bCel A	b xil A	Leu A	PalE A	Ace A	AIKPA	Sulf A	NacGIA	Mort
<b>bG A</b>	0,800 -52 ***	0,820 -49 ***	0,862 -49 ***	0,816 -53 ***	0,779 -52 ***	0,860 -51 ***			0,745 -51 ***	
<b>bGal A</b>		0,69 -51 ***	0,764 -52 ***		0,844 -54 ***	0,723 -53 ***			0,907 -53 ***	
<b>bCel A</b>			0,752 -48 ***	0,770 -52 ***	0,823 -51 ***	0,784 -50 ***			0,727 -51 ***	
<b>bXil A</b>				0,858 -52 ***	0,700 -51 ***	0,902 -50 ***	0,665 -51 ***		0,774 -51 ***	
<b>bGlc A</b>			0,542 -50 ***				0,580 -53 ***			
<b>Ace A</b>				0,826 -54 ***	0,685 -53 ***		0,597 -53 ***	0,506 -54 ***	0,804 -52 ***	
<b>PalE A</b>				0,563 -55 ***						
<b>AcP A</b>										0,541 -54 ***
<b>AIKP A</b>				0,604 -55 ***						
<b>Sulf A</b>				0,760 -56 ***			0,649 -55 ***			-0,850 -56 ***
<b>NacGIA</b>				0,585 -54 ***	0,873 -53 ***					

También se muestra, entre paréntesis, el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. Valores de P menores de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%. \* p<0.05 \*\* p<0.01 \*\*\* p<0.001. Sombreado en amarillo las correlaciones positivas.

Considerando solo valores mayores de 0.5 (Tabla 4.32), únicamente nos aparece una clara correlación de la mortalidad, positiva con la fosfatasa ácida y negativa con la arilsulfatasa.

Las actividades relacionadas con metabolismo glucídico presentan alta correlación entre ellas, y la  $\beta$ -xilosidasa, además con la  $\beta$ -glucuronidasa. La leucin aminopeptidasa presenta correlación con un elevado n° de actividades, pues además de las anteriores, lo hace con las dos esterases, con la fosfatasa alcalina, aril-sulfatasa y la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa. Las esterases a su vez lo hacen con las primeras además de entre ellas y con la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa. Por último esta se correlaciona con todo el metabolismo de carbohidratos.

### *b) Análisis de Componentes Principales*

El análisis permite obtener 3 ejes de variación que nos permiten explicar más de un 95% de la varianza total (tabla 4.33).

**Tabla 4.33.**-Análisis de componentes principales

Componente Número	Eigenvalor	Porcentaje de Varianza	Porcentaje Acumulado
1	7,7964	59,98	59,98
2	3,3551	25,81	85,78
3	1,2748	9,81	95,59

Podemos calcular desde la tabla 4.32 de pesos de los componentes y considerando el valor mayor para cada una de las actividades >de 0,3

**Tabla 4.34.**- Análisis de los componentes principales. Peso de los componentes.

	Comp 1	Comp 2	Comp 3
$\beta$ -glucuronidasa	0,1972	-0,1442	-0,6898
$\beta$ -glucosidasa	0,3421	0,0490	0,0355
$\beta$ -galactosidasa	0,3361	0,1628	-0,0953
$\beta$ -celobiosidasa	0,3334	0,0938	0,2775
$\beta$ -xilosidasa	0,3463	-0,0968	-0,1504
Fosfatasa ácida	0,1110	0,4739	0,2667
Acetato deacetilasa	0,3487	-0,0759	-0,0279
ArilSulfatasa	0,1560	-0,4622	0,2357
N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa	0,3195	0,1896	-0,1080
Fosfatasa alcalina	0,2346	-0,2982	-0,2078
Palmitato esterasa	0,2997	0,2761	0,1603
Leucina aminopeptidasa	0,3078	-0,2057	0,2946
% mortalidad	-0,0098	0,4948	-0,3455
% de varianza explicada	<b>58.98</b>	<b>26.8</b>	<b>9.81</b>
% de varianza acumulada	<b>58.98</b>	<b>85.78</b>	<b>95.59</b>

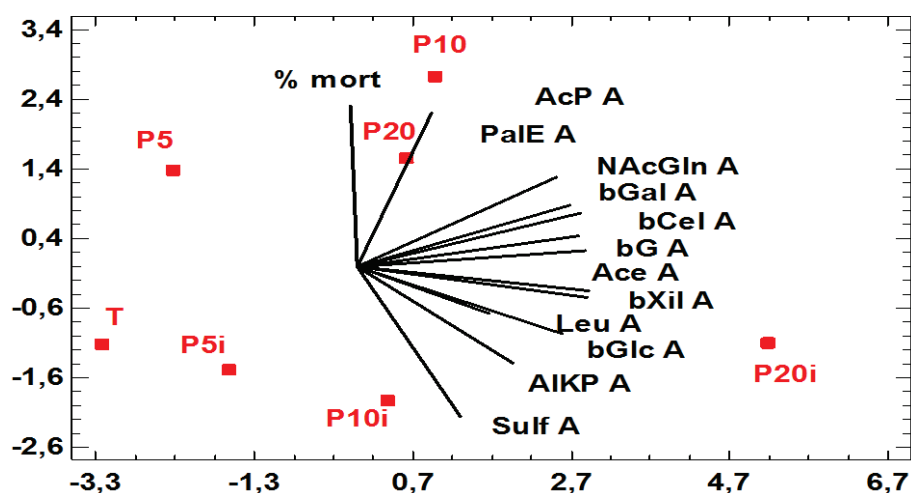
Considerando los valores mayores de 0,3 para cada actividad enzimática, el primer componente que absorbe un 59 % viene determinado por la  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -celobiosasa, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa  $\beta$ -xilosidasa, acetato deacetilasa, y leucina aminopeptidasa con un peso similar todas ellas (Tabla 4.34). Para el segundo componente que explica el 26.8 % de la varianza y un 85.8 % de la varianza acumulada se relaciona con fosfatasa ácida, arilsulfatasa, y con la mortalidad. Por último el tercer componente que explica un 9.8% de varianza y un 95.6 % de varianza acumulada se relaciona con la  $\beta$ -glucuronidasa, y la mortalidad.

Si lo trasladamos a la tabla 4.35 de componentes principales

**Tabla 4.35.-** Componentes principales para cada muestra de trabajo

	Comp 1	Comp 2	Comp 3
<b>T</b>	-3,214	-1,127	-0,046
<b>P 5i</b>	-1,621	-1,482	0,230
<b>P 10i</b>	0,377	-1,934	0,102
<b>P 20i</b>	5,184	-1,104	0,241
<b>P 5</b>	-2,335	1,380	0,416
<b>P 10</b>	0,984	2,723	1,387
<b>P 20</b>	0,626	1,544	-2,330

La representación de los componentes C2 frente a C1 (Fig. 4.32) se representa la relación entre las actividades con la mortalidad del nematodo según las diferentes dosis aplicadas.

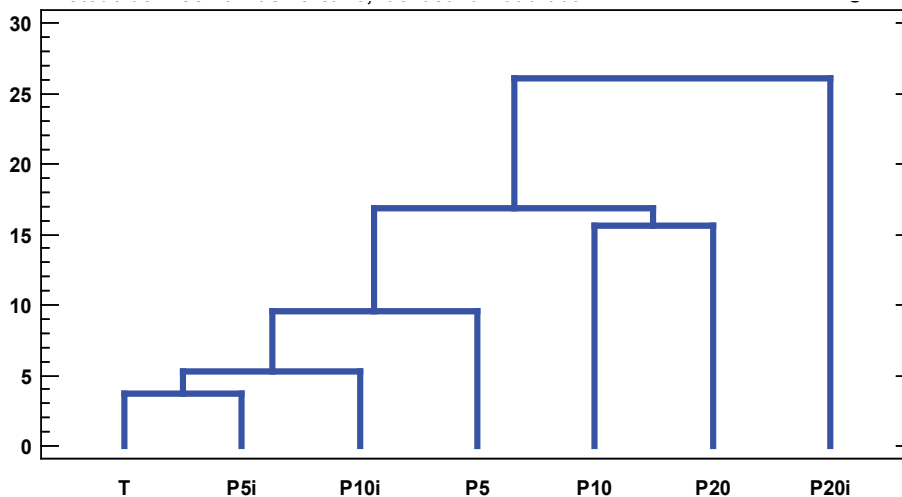


**Figura 4.32 .-** Representación de los componentes c2 frente a c1

Vemos asociado en el gráfico la muestra testigo con las concentraciones de purín iniciales y la gran mayoría de las actividades enzimáticas.

En otro bloque nos encontramos las muestras incubadas que están asociadas a la mortalidad junto con palmitato fosfatasa ácida y N-acetil  $\beta$ -D-glucosaminidasa (Fig. 4.32).

Ligeramente más alejados están  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -celobiosidasa. Además como en los demás apartados podemos utilizar el dendograma para intentar agrupar los casos semejantes o de comportamiento similar (Fig. 4.33).



**Figura 4.33.**-Dendograma agrupando según características similares

Agrupados en conglomerados según las diferencias mínimas, establece una primera asociación entre el testigo y el purin a dosis menores sin incubar.

Aquí sorprende que esa asociación deje fuera de ella a la aplicación sin incubar de la dosis máxima. La dosis 5 incubada estaría más cerca de las propiedades iniciales y la de 10 y 20 formarían la última agrupación diferente de las anteriores.

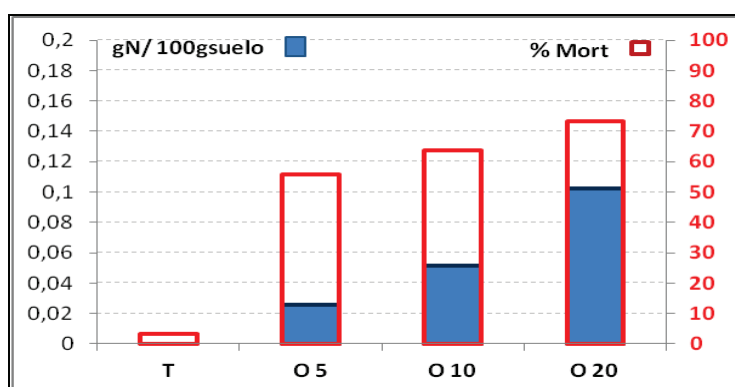
## 4.5. EXPERIENCIA V.- APLICACIÓN DE ESTIÉRCOL DE OVEJA A DIFERENTES DOSIS

### 4.5.1. Resultados del análisis nematológico

Representamos en la gráfica la capacidad nematicida junto con el aporte de N referido a g N / 100g de suelo para poder establecer las oportunas comparaciones teniendo en cuenta el aporte de N realizado con los diferentes residuos (Tabla 4.36).

**Tabla 4.36.-** Contenido en N de cada muestra y su relación con la mortalidad

	aporte g N / 100 g suelo	% mortal
T	0	3,2
O 5	0,02559	55,9
O 10	0,05118	63,68
O 20	0,10236	73,34



**Figura 4.34.-** Mortalidad de *G.rostochiensis* y contenido en N aportado en g/100 g suelo para suelo Testigo (T) y suelo con aportes de oveja en dosis de 5, 10 y 20g (O5,O10,O20)

Las dosis de N aportadas conllevan un incremento de la mortalidad y cuya eficacia nematicida disminuye con respecto a la dosis aplicada de N (Fig. 4.34).

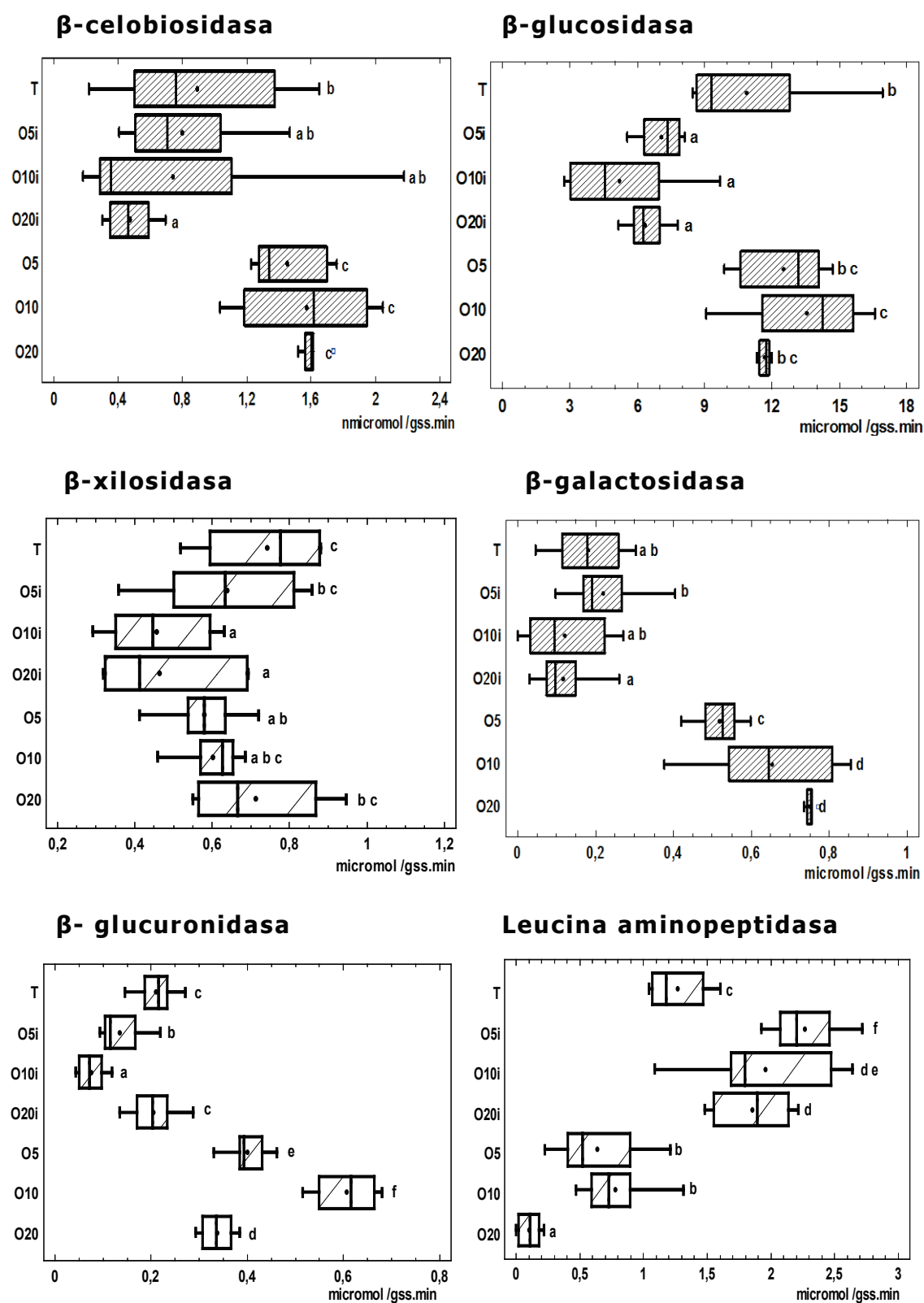
### 4.5.2. Resultados de actividades enzimáticas

#### a) valor de las actividades

**Tabla 4.37.-** Actividades enzimáticas medias en la aplicación de estiércol de oveja.

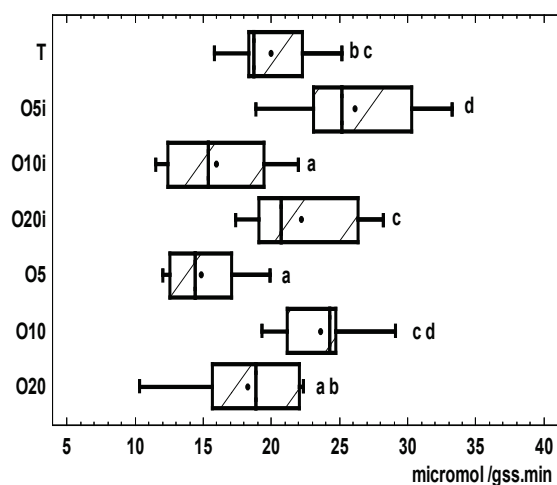
Trat	bCel	bG A	bXil A	bGalA	LeuA	bGlcA	Ace A	PalE A	AcP A	AIKPA	SulFA	NACGlNA
T	0,805	10,357	0,794	0,182	1,303	0,210	19,748	1,069	1,100	6,705	0,616	2,388
O- 5i	0,797	7,103	0,638	0,220	2,263	0,135	26,150	1,025	0,498	6,800	0,509	1,515
O-10i	0,718	5,198	0,522	0,122	1,956	0,109	15,991	1,152	0,165	4,133	0,300	1,441
O-20i	0,475	6,014	0,672	0,116	1,855	0,205	22,221	1,087	0,381	4,390	0,438	2,440
O- 5	1,450	12,532	0,579	0,519	0,636	0,401	15,187	1,114	0,258	5,485	0,141	3,817
O-10	1,572	13,566	0,651	0,653	0,777	0,607	23,587	1,709	0,668	5,450	0,190	5,155
O-20	1,372	12,110	0,712	0,744	0,103	0,337	18,242	1,435	0,918	3,880	0,218	3,632

*b) Expresión gráfica de los valores enzimáticos en la aplicación de estiércol de oveja*

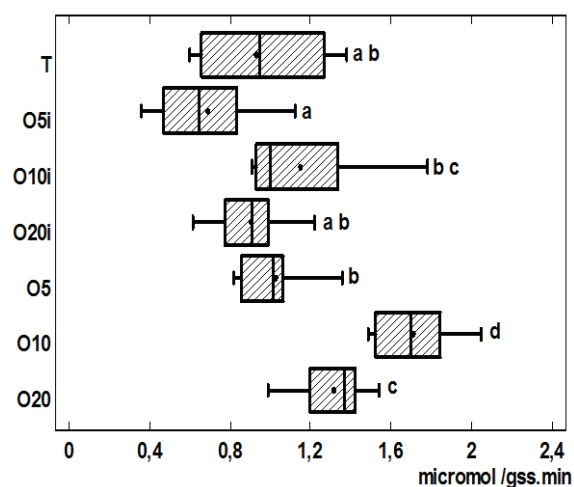


**Figura 4.35.-**Actividades enzimáticas. Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas

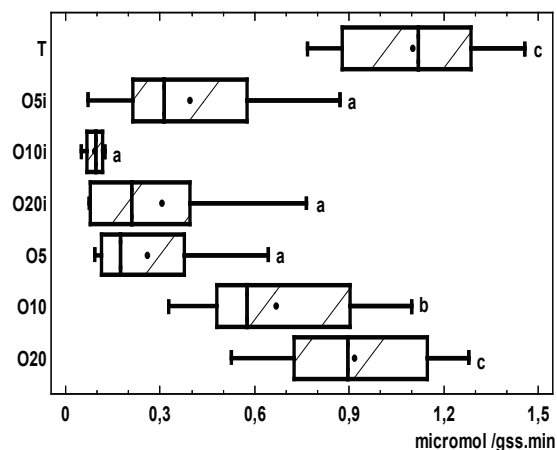
**Acetato o esterasa D**



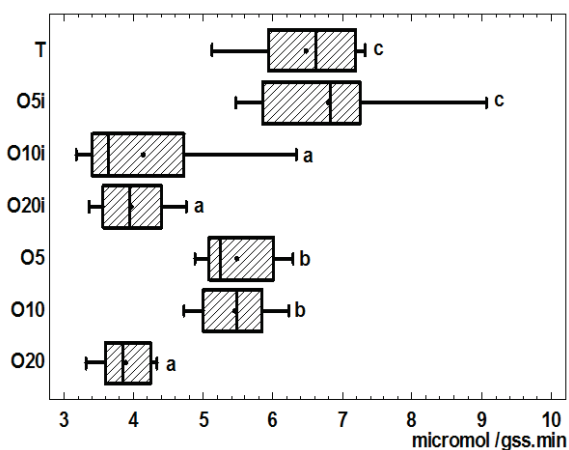
**Palmitato esterasa**



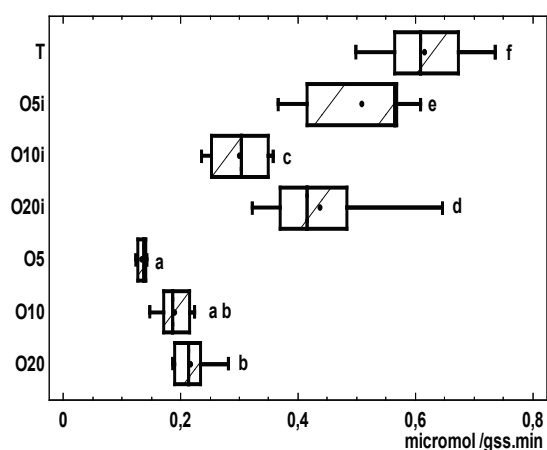
**Fosfatasa ácida**



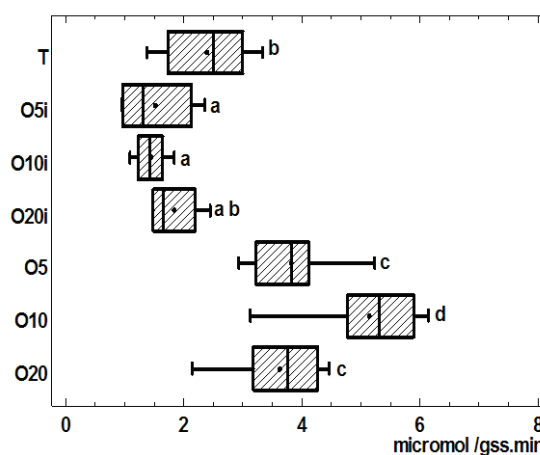
**Fosfatasa alcalina**



**Arilsulfatasa**



**N-Acetil-β-D-glucosaminidasa**



**Figura 4.36.-** Actividades enzimáticas. Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas.



### ***c) Interpretación de resultados enzimáticos.***

Antes de introducirnos en el ámbito metabólico debemos indicar a la vista del conjunto de las gráficas anteriores varios hechos (Fig.4.35, 4.36 y 4,37).

El primero de ellos se relaciona con la dosis en la cual la aplicación de dosis 10 (aporte de 10 g de estiércol de oveja en 500 g de suelo) genera un efecto de inhibición generalizado en las actividades enzimáticas.

En segundo lugar se observa que tras los 30 días de aplicación del proceso en general esta misma dosis incrementa la actividad sobre las otras dosis anterior y posterior (5 y 20 g de aporte de oveja).

En tercer lugar el proceso de anaerobiosis devuelve o supera los niveles de actividad enzimática que presenta el testigo, con excepción de la leucina aminopeptidasa y la arilsulfatasa.

### ***d) Enzimas relacionadas con el metabolismo glucídico***

El cambio de comportamiento que se aprecia tras 30 días de incubación y desde posiciones de actividad inferiores a las que ostenta el testigo en las actividades  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -celobiosidasa  $\beta$ - galactosidasa, ofrece como hecho relevante un comportamiento degradativo que opera durante los 30 días de incubación y que debe de estar relacionado de alguna manera, solo o en cooperación con otras áreas metabólicas con la capacidad nematicida que muestra este residuo.

La actividad  $\beta$ -xilosidasa, no parece intervenir en este proceso posiblemente atribuible al tipo de alimentación que ha consumido el animal y no tanto al efecto interactivo del residuo.

Por el contrario la reconocida eficacia nematicida de la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa hace que en la experiencia duplique su actividad y muestra como consecuencia una correlación elevada (0.81  $p < 0.001$ ) con la actividad anterior referenciada.

### ***e) Enzimas relacionadas con el metabolismo proteico***

La actividad proteásica medida en la leucina es de entre todos el único enzima al que el proceso de incubación inhibe tanto más cuanto mayor es la dosis aplicada, careciendo esta situación de intervención aparente en la mortalidad del nematodo *G.rostochiensis*.

Por el contrario la  $\beta$ -glucuronidasa incrementa de forma potente, (hasta 6 veces en la dosis 10) su capacidad para fracturar glicoproteínas hecho que ya se ha referenciado en apartados anteriores a efectos de la eficacia nematocida del aporte en condiciones del laboratorio.

### ***c.3) Enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico***

La exacerbación de las dos actividades estudiadas acetato deacetilasa y palmitato esterasa muestran una respuesta paralela tras los 30 días de incubación superando al testigo con la aplicación de dosis 10 claramente.

Es de resaltar que mientras la acetato deacetilasa no parece afectar a la mortalidad, si lo hace de forma positiva la palmitato esterasa con una correlación de 0.53,  $p < 0.001$  (no demasiado alta).

### ***c.4) Metabolismos del S y P***

#### ***del fosfato***

La fosfatasa ácida cuando se aporta al suelo este estiércol de oveja, da muestras de una gran inhibición por el fosfato libre que le acompaña. Evidentemente el proceso de incubación consume esta reserva de fosfato con lo cual a dosis altas el enzima recupera los valores propios del suelo.

La fosfatasa alcalina, por el contrario no acaba de mostrar esa recuperación posiblemente asociada la limitación del proceso de multiplicación celular (propio de la anaerobiosis).

Como en casos anteriores, ninguno de estos dos enzimas se correlaciona directamente con la mortalidad de *G.rostochiensis*.

#### ***del sulfato***

Este proceso de incubación muestra un impacto negativo en los niveles de actividad aril-sulfatásica hasta en un 60%, no participando como componente letal del nematodo.

### 4.5.3. Análisis estadístico

#### a) Matriz de correlaciones

Se consideran solo correlaciones con los valores mayores de 0,5. Se encuentran correlaciones negativas elevadas entre la mortalidad y la aril-sulfatasa y leucina aminopeptidasa, mientras que son positivas con  $\beta$ -glucuronidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -celobiosidasa y N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa y palmitato esterasa (tabla 4.38).

**Tabla 4.38.-** Correlaciones de Pearson, entre cada par de variables en la aplicación de oveja

	bG A	bGal A	bCel A	Leu A	PalE A	AcP A	AlKP A	Sulf A	NAcGIA	Mort
bG A		0,7061 -53 ***	0,6829 -53 ***	-0,6233 -54 ***					0,7627 -53 ***	0,7328 -54 ***
bGal A			0,784 -54 ***	-0,7758 -55 ***				-0,6805 -54 ***	0,7455 -54 ***	0,9269 -55 ***
bCel A				-0,5467 -55 ***				-0,5918 -54 ***	0,613 -54 ***	0,7617 -55 ***
bXil A						0,5827 -54 ***				
Leu A										-0,8532 -56 ***
bGlc A	0,78 -53 ***	0,7465 -54 ***	0,6057 -54 ***	-0,6662 -55 ***	0,6147 -51 ***			-0,5959 -54 ***	0,8838 -54 ***	0,8072 -55 ***
PalE A										0,5309 -52 ***
Sulf A				0,6004 -55 ***			0,5422 -54 ***		-0,5513 -54 ***	-0,7606 -55 ***
NAcGlnA				-0,6847 -55 ***	0,582 -51 ***					0,8123 -55 ***

Se indica, entre paréntesis, el número de pares de datos usado para calcular cada coeficiente. Valores de p menores de 0.05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%. \* P < 0,05 \*\* p<0,01 \*\*\* p<0,001.

#### b) Análisis de componentes principales

**Tabla 4.39.-** Análisis de los componentes principales.

Componente	Eigenvlor	Porcentaje de varianza	Porcentaje acumulado
Número			
1	7,633	58,72	58,72
2	2,854	21,96	80,68
3	1,208	9,3	89,98

Vemos que con 3 componentes es suficiente para explicar la varianza con Eigenvlor superior a 1 (Tabla 4.39).

Trabajando con la tabla (tabla 4.38) de pesos de los componentes y considerando como en las demás casos los valores  $>0,3$  y el mayor para cada uno.

**Tabla 4.40.-** Pesos de los componentes principales.

	Comp 1	Comp 2	Comp 3
B-glucuronidasa	0,332	0,050	0,270
B-glucosidasa	0,331	0,178	-0,021
B-galactosidasa	0,349	0,016	-0,015
B-celobiosidasa	0,345	-0,015	0,102
B-xilosidasa	0,030	0,539	-0,311
Fosfatasa ácida	0,100	0,512	-0,325
Acetato deacetilasa	-0,072	0,336	0,627
Arilsulfatasa	-0,278	0,376	-0,066
NAcetil B-Dglucosaminidasa	0,341	0,054	0,155
Fosfatasa alcalina	-0,084	0,388	0,350
Palmitato esterasa	0,298	0,024	0,215
Leucina aminopeptidasa	-0,332	-0,036	0,348
Mortalidad	0,353	-0,056	-0,045
% de varianza explicada	<b>58,72</b>	<b>21,96</b>	<b>9,3</b>
% de varianza acumulada	<b>58,72</b>	<b>80,68</b>	<b>89,98</b>

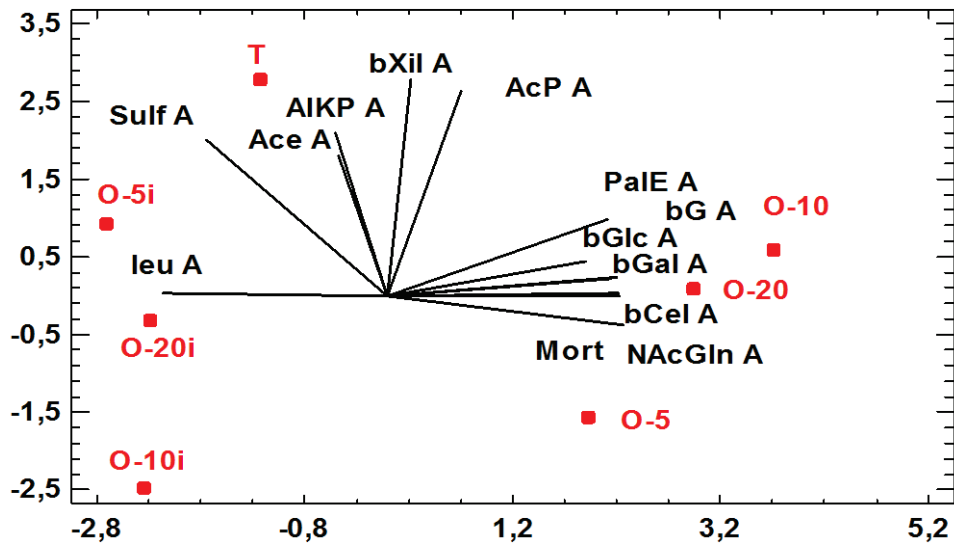
El primer componente absorbe un 58,7% y viene determinado por las actividades  $\beta$ -glucuronidasa,  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -celobiosidasa, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa y mortalidad (Tabla 4.40). El segundo componente que explica casi un 22% de la varianza con más de 80 % de la varianza acumulada nos aparece relacionado con  $\beta$ -xilosidasa, fosfatasa ácida, arilsulfatasa, y fosfatasa alcalina. El tercer componente explica un 9% de la varianza con cerca de un 90% de la varianza acumulada se relaciona con acetato deacetilasa, y leucina aminopeptidasa.

Si calculamos los valores para cada dosis aportada se obtiene la tabla de componentes principales (Tabla 4.41).

**Tabla 4.41.** Componentes principales para cada una de las muestras de trabajo

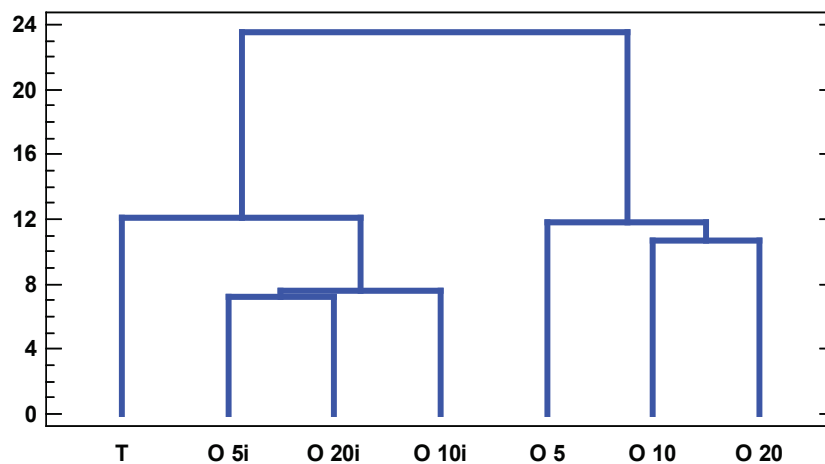
	Comp 1	Comp 2	Comp 3
<b>T</b>	-1,410	2,682	-1,048
<b>O 5i</b>	-2,679	0,904	1,315
<b>O 10i</b>	-2,292	-2,542	-0,326
<b>O 20i</b>	-2,245	-0,301	0,036
<b>O 5</b>	1,962	-1,488	-0,137
<b>O 10</b>	3,714	0,557	1,543
<b>O 20</b>	2,950	0,188	-1,384

Y representando las dos componentes C2 frente C1 podemos relacionar los tratamientos y agrupar las actividades (Fig. 4.37)



**Figura 4.37.-** Representación gráfica de componente c2 frente a c1

Se observa que testigo y muestras sin incubar se agrupan y se relacionan con arilsulfatasa, leucina aminopeptidasa, fosfatasa alcalina y  $\beta$ -xilosidasa mientras que las muestras incubadas se asocian con las actividades,  $\beta$ -celobiosidasa,  $\beta$ -galactosidasa, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa,  $\beta$ -glucosidasa, palmitato esterasa y  $\beta$ -glucuronidasa, todas ellas correlacionadas positivamente con la mortalidad.



**Figura 4.38.-** Dendrograma para la aplicación de residuos de oveja

Si utilizamos el dendrograma (Fig. 4.38) podemos apreciar que las agrupaciones, según afinidades son según lo esperado, una similitud entre comportamiento del testigo con las muestras sin incubar y separando estas de las incubaciones realizadas, agrupándose estas según dosis creciente.

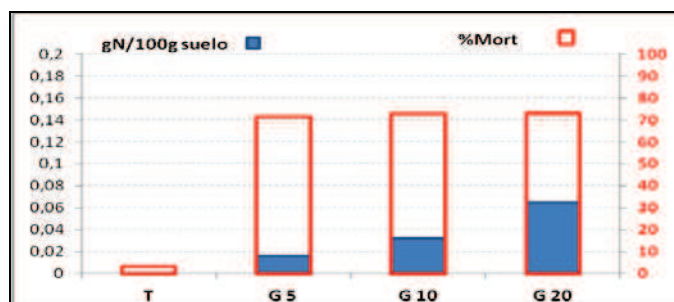
## 4.6. EXPERIENCIA VI.- APLICACIÓN DE RESIDUOS DE ESTIÉRCOL DE GALLINA CON DIFERENTES DOSIS

### 4.6.1. Resultados del análisis nematológico

En la figura 4.42 se representa la capacidad nematocida y el aporte de N (g N/100 g suelo) para establecer las comparaciones oportunas, entre los diferentes residuos (Tabla 4.40).

**Tabla 4.42.-**Contenido en N de cada muestra y su relación con la mortalidad

	aporte g N / 100 g suelo	% mortal
T	0	3,2
G 5	0,016198	71,6
G 10	0,032396	72,89
G 20	0,064792	73,06



**Figura 4.39.-**Mortalidad de *G.rostochiensis* y contenido en N aportado en g/100 g suelo para suelo Testigo (T) y suelo con aportes de gallinaza en dosis de 5, 10 y 20g (G5,G10,G20)

Como nos ocurría con el aporte de estiércol de oveja, ahora al aplicar la gallinaza nos encontramos que alcanzamos una mortalidad similar a las tres dosis usadas independientemente de la cantidad de nitrógeno suministrado con la aplicación lo que quiere decir que es suficiente a efectos de capacidad nematocida con la menor de las dosis elegidas.

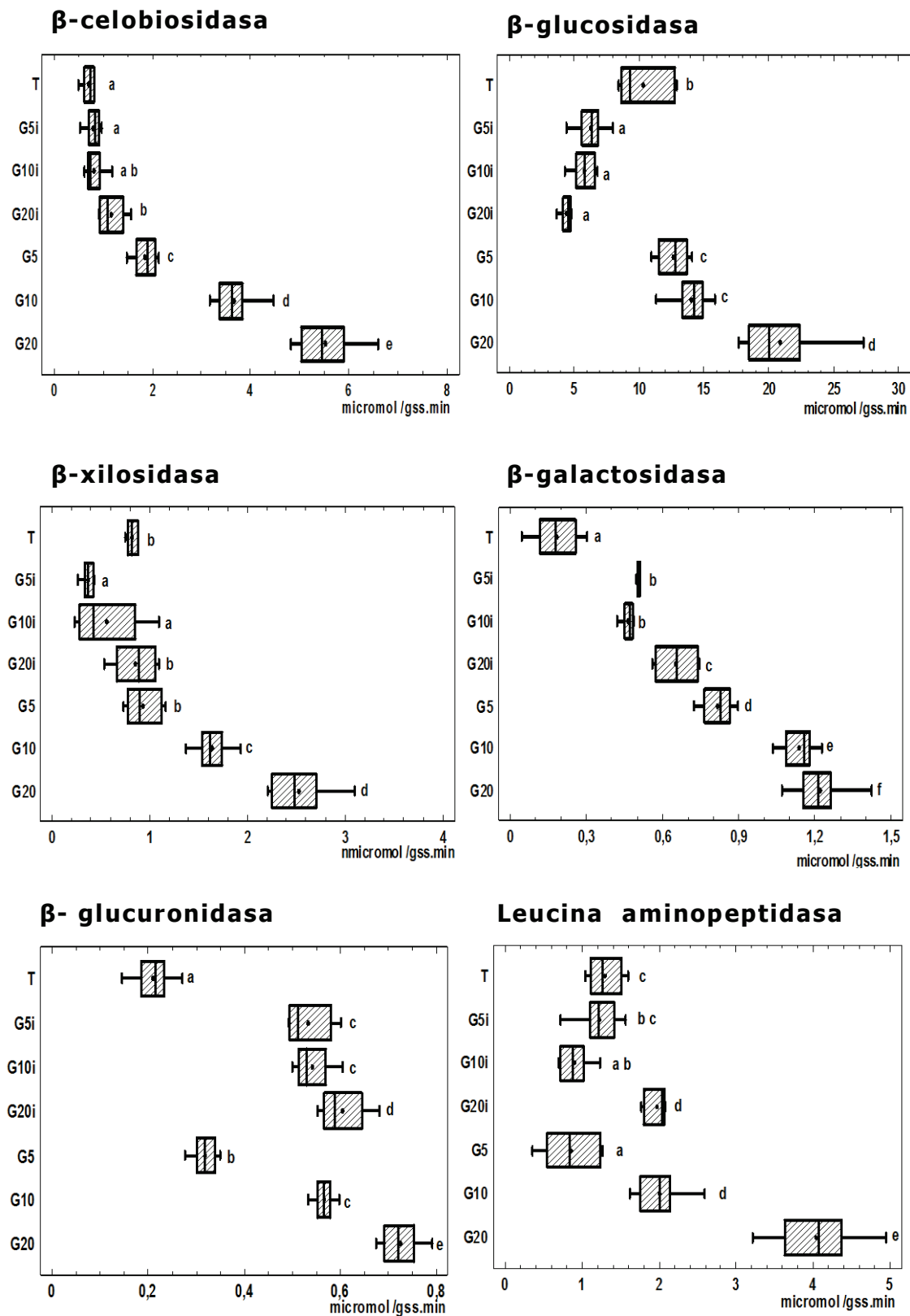
### 4.6.2. Resultados de actividades enzimáticas

#### a) Valores de actividad

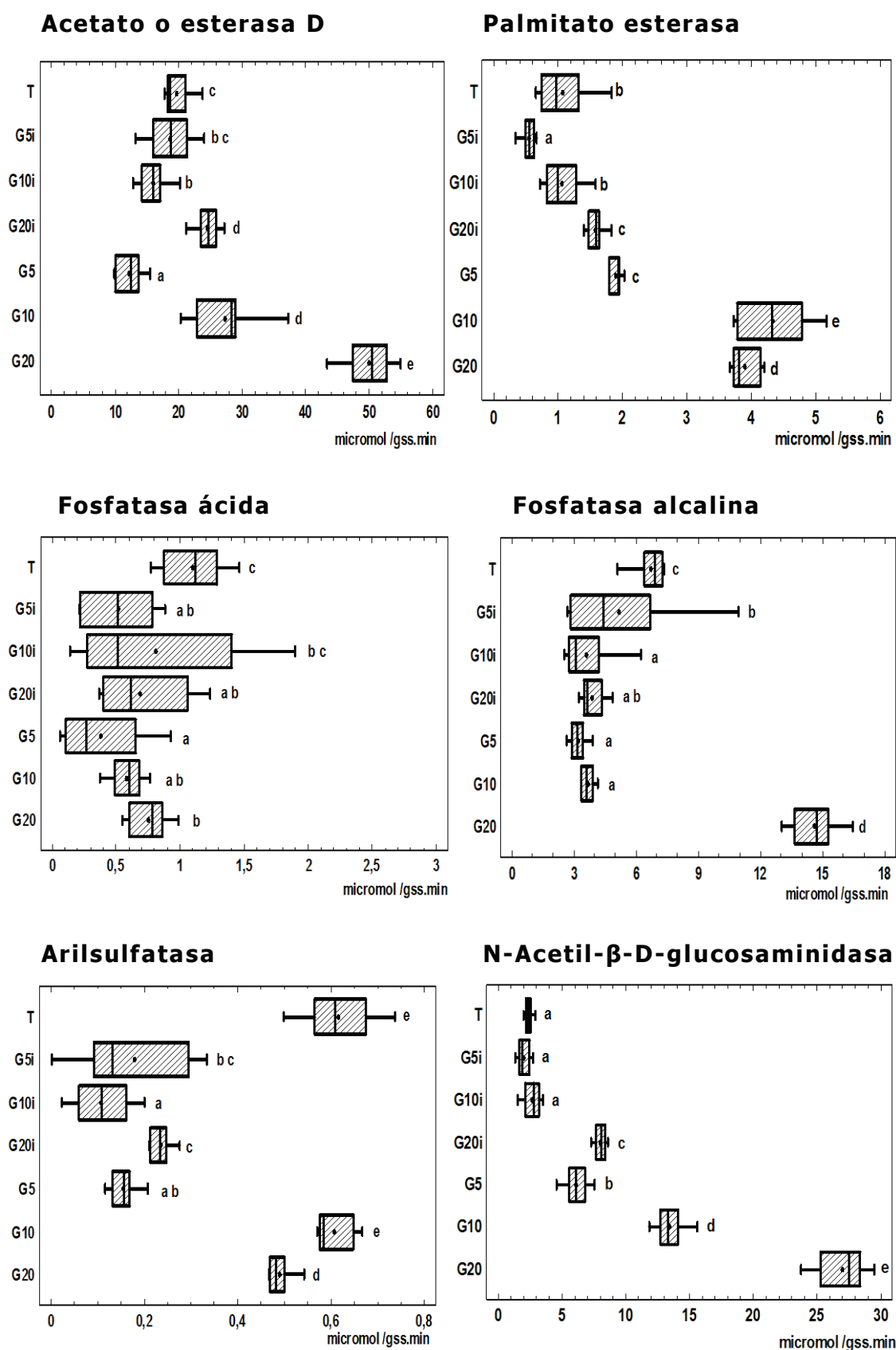
**Tabla 4.43.-** Actividades enzimáticas medias antes y después de la incubación

Trat	bCelA	bG A	bXil A	bGalA	Leu A	bGlcA	Ace A	PalE A	AcP A	AIKPA	SulFA	NACGlnA
T	0,805	10,357	0,794	0,182	1,303	0,210	19,748	1,069	1,100	6,705	0,616	2,388
G 5 i	0,802	6,770	0,490	0,536	1,220	0,534	18,760	0,586	0,519	5,196	0,179	1,975
G 10 i	0,818	5,795	0,557	0,462	1,022	0,542	17,303	1,061	0,810	3,614	0,108	2,643
G 20 i	1,168	4,596	0,856	0,653	2,028	0,605	24,576	1,584	0,689	3,892	0,296	8,012
G 5	1,857	12,634	0,935	0,816	0,855	0,318	12,238	1,829	0,381	3,200	0,155	6,104
G 10	3,660	14,022	1,637	1,138	2,002	0,566	27,297	4,333	0,584	3,672	0,607	13,449
G 20	5,517	20,850	2,523	1,220	4,034	0,725	49,981	3,900	0,754	14,595	0,489	26,952

*b) Expresión gráfica de las actividades enzimáticas tras la aplicación de gallinaza*



**Figura 4.40.-** Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas



**Figura 4.41.**-Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas.



### ***c) Análisis de resultados enzimáticos***

Antes de realizar la interpretación de los resultados debemos recordar que las heces avícolas contienen una cantidad elevada de calcio y fosfatos que endurece el producto y enclaustra de manera especial a la MO (incluidos los componentes enzimáticos y bacterianos que posea). Además se les implementa en la alimentación metionina para acelerar la síntesis protéica (producción de carne).

Dada la dificultad que tiene la disolución de este tipo de sales no es de extrañar que, observando en general las actividades enzimáticas evaluadas, muestren en principio una inmovilización de los enzimas en un valor muy próximo a la actividad enzimática del suelo testigo, y que los 30 días de incubación fomenten su liberación de manera acorde a las dosis aportadas.

En consecuencia nos referiremos fundamentalmente a la medida final de la experiencia realizada tras la incubación.

#### ***c.1) Enzimas relacionadas con el metabolismo glucídico***

Como en el caso del aporte de oveja las actividades  $\beta$ -celobiosidasa,  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -xilosidasa y  $\beta$ -galactosidasa incrementan su eficacia de manera espectacular a la par que su asociación a la actividad nematocida sobre *G.rostochiensis*. Estos incrementos nos indican que la intensidad metabólica puede llegar a crecer en conjunto hasta 4 veces su eficacia. El comportamiento de la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (actividad propia de los hongos) es un buen ejemplo de cómo se colonizan los residuos de este tipo primariamente con hongos y también como este aporte debe de poseer una importante acumulación de componentes ricos en glucosamina susceptibles de liberar amoniaco. Esto se refleja en su asociación a la capacidad nematocida (coeficiente de correlación 0,70  $p < 0,001$ ).

#### ***c.2) Enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico***

Como en el área de los carbohidratos, ambos enzimas lipídicos muestran una intensificación de la actividad pero únicamente la palmitato esterasa se correlaciona con la eficacia nematocida del aporte

#### ***c.3) Enzimas relacionadas con el metabolismo proteico***

Se evidencia un aumento de las actividades enzimáticas asociado a la dosis, pero sin aportar información sobre la actividad nematocida.

#### c.4) Metabolismos terminales del P y S

##### del Fosfato

Las actividades fosfatásicas alcalina y ácida manifiestan un componente claramente diferente de otras áreas metabólicas teniendo en cuenta las interferencias que pueden relacionarse con la lenta disolución del fosfato de calcio, estabilizador de este residuo.

##### de los sulfatos

La arilsulfatasa muestra, con la salvedad del aporte de la dosis 10, un nivel reducido de actividad, muy por debajo del valor inicial del testigo.

#### 4.6.3. Análisis estadístico

##### a) Matriz de Correlaciones

Se consideran solo correlaciones con valores mayores a 0,5

**Tabla 4.44.-** Correlaciones de Pearson, entre cada par de variables en aporte de gallinaza

	bGal A	bCel A	bXil A	Leu A	PaIE A	Ace A	AIKP A	Sulf A	NACGlnA	Mort
<b>bG A</b>	0,692 -49 ***	0,887 -50 ***	0,883 -51 ***	0,713 -51 ***	0,754 -51 ***	0,704 -50 ***	0,685 -53 ***	0,517 -50 ***	0,812 -53 ***	0,803 -53 ***
<b>bGal A</b>		0,891 -48 ***	0,798 -49 ***	0,654 -49 ***	0,879 -49 ***	0,624 -49 ***			0,832 -51 ***	0,857 -51 ***
<b>bCel A</b>			0,928 -50 ***	0,831 -51 ***	0,888 -51 ***	0,834 -50 ***	0,676 -53 ***		0,951 -53 ***	0,804 -53 ***
<b>bXil A</b>				0,861 -51 ***	0,855 -51 ***	0,863 -51 ***	0,714 -53 ***	0,576 -49 ***	0,934 -53 ***	0,720 -53 ***
<b>bGlc A</b>	0,664 -51 ***	0,570 -53 ***	0,538 -53 ***	0,655 -54 ***		0,677 -53 ***			0,634 -56 ***	
<b>Ace A</b>				0,926 -51 ***	0,681 -52 ***		0,824 -53 ***		0,911 -53 ***	
<b>PaIE A</b>				0,668 -52 ***						0,835 -54 ***
<b>AIKP a</b>				0,791 -54 ***						
<b>Sulf A</b>					0,552 -50 ***					
<b>NACGlnA</b>				0,910 -54 ***	0,832 -54 ***		0,733 -56 ***			0,701 -56 ***

Se indica, entre paréntesis, el número de pares de datos usado para calcular cada coeficiente. Valores de p menores de 0.05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%. \* P < 0,05 \*\* p<0,01 \*\*\* p<0,001  
Sombreado en amarillo las correlaciones positivas

En la matriz de correlaciones encontramos valores elevados y positivos entre mortalidad y las actividades  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -celobiosidasa,  $\beta$ -xilosidasa, palmitato esterasa y N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (Tabla 4.44).

Del metabolismo glucídico podemos decir que todas sus enzimas se encuentran correlacionadas entre si y con la actividad  $\beta$ -glucuronidasa. La proteasa leucina aminopeptidasa establece correlaciones positivas con todas las actividades enzimáticas estudiadas salvo la arilsulfatasa. Esta enzima se relaciona solo con  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -xilosidasa y la palmitato esterasa. Las esterasas se correlacionan positivamente con las propias del metabolismo de los carbohidratos, con aril-sulfatasa, N-acetil  $\beta$ -D-glucosaminidasa y entre las dos esterasas.

En cuanto las enzimas ligadas al metabolismo del P solo nos aparece la fosfatasa alcalina que está relacionada con todos los ciclos estudiados salvo con el azufre y con la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa.

### ***b) Análisis de Componentes Principales***

El análisis de componentes principales (Tabla 4.45) permite obtener 3 ejes de variación que explican el 94,02 % de la varianza total.

**Tabla 4.45.-** Análisis de componentes principales

Componente Número	Eigenvalor	Porcentaje de Varianza	Porcentaje Acumulado
1	8,8927	68,40	68,40
2	2,0294	15,62	84,02
3	1,3003	10,00	94,02

Se calcula la tabla 4.46 de pesos de los componentes, considerando el componente mayor de 0,3 de mayor peso para cada una de las actividades, vemos que el primer componente absorbe un 68,4 % de la varianza y viene determinado por  $\beta$ -celobiosidasa,  $\beta$ -xilosidasa, acetato deacetilasa, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, palmitato esterasa y leucina aminopeptidasa. El segundo componente que absorbe un 15,6 % de la varianza con un 84 % de la varianza acumulada se relaciona con  $\beta$ -galactosidasa, fosfatasa ácida y alcalina, y arilsulfatasa (Fig.4.46).

Por último el tercer componente con un 10% de la varianza explicada y un 94,02% de la varianza acumulada, va relacionado con la  $\beta$ -glucuronidasa, arilsulfatasa, y en menor cantidad con la mortalidad.

**Tabla 4.46.-** Tabla de pesos de los componentes

	Comp 1	Comp 2	Comp 3
$\beta$ -glucuronidasa	0,201	-0,175	0,616
$\beta$ -glucosidasa	0,298	0,027	-0,297
$\beta$ -galactosidasa	0,291	-0,340	-0,025
$\beta$ -celobiosidasa	0,333	-0,059	-0,058
$\beta$ -xilosidasa	0,334	0,038	-0,055
Fosfatasa ácida	-0,020	0,676	0,012
Acetato deacetilasa	0,307	0,184	0,260
Arilsulfatasa	0,175	0,400	-0,416
N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa	0,331	-0,002	0,093
Fosfatasa alcalina	0,255	0,309	0,209
Palmitato esterasa	0,301	-0,114	-0,228
Leucina aminopeptidasa	0,308	0,154	0,263
% Mortalidad	0,280	-0,257	-0,334
% de varianza explicada	<b>68,40</b>	<b>15,62</b>	<b>10,0</b>
% de varianza acumulada	<b>68,40</b>	<b>84,02</b>	<b>94,02</b>

Si referimos los coeficientes a las muestras estudiadas nos aparecen los coeficientes en la tabla (4.47) de los componentes principales

**Tabla 4.47.-** Tabla de los componentes principales para cada muestra de trabajo

	Comp 1	Comp 2	Comp 3
<b>T</b>	-1,820	2,691	-1,197
<b>G 5 i</b>	-2,061	-0,587	0,879
<b>G 10 i</b>	-2,279	-0,018	0,881
<b>G 20 i</b>	-0,970	-0,034	1,136
<b>G 5</b>	-0,930	-1,866	-1,239
<b>G 10</b>	2,252	-0,832	-1,203
<b>G 20</b>	5,808	0,646	0,741

La representación de estos componentes nos aporta información de comportamiento que nos permite analizar.

El testigo está asociado o agrupado con las experiencias iniciales y con la experiencia de dosis 5 incubada (G5). Las restantes muestras incubadas se relacionan entre sí con todas las actividades ya que se ha visto que todas ellas correlacionaban con valores positivos con la mortalidad, asociada a las dosis mayores de gallinaza (Fig. 4.42).

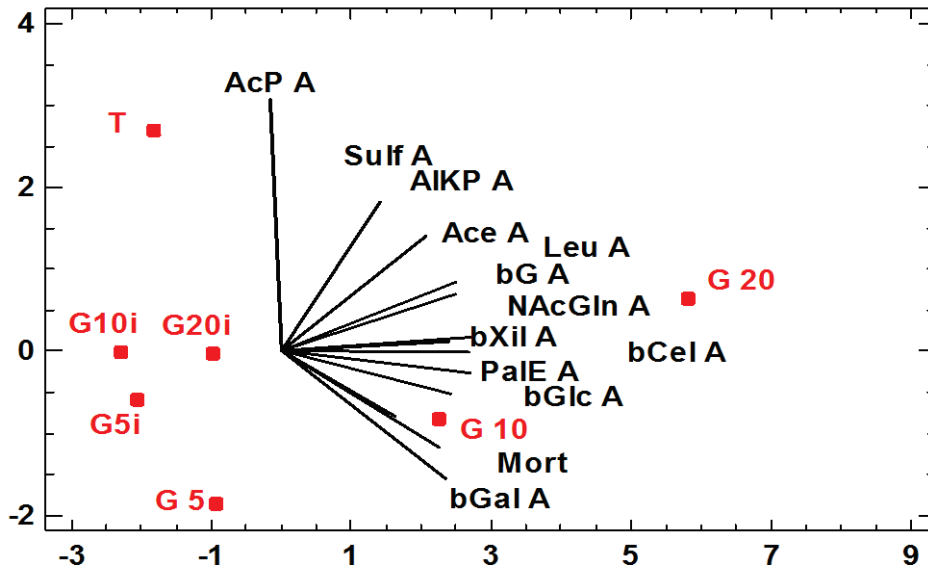


Figura 4.42.- Representación del componente C2 frente a C1

Si representamos el dendograma se puede apreciar más fácilmente estas agrupaciones (Fig. 4.43):

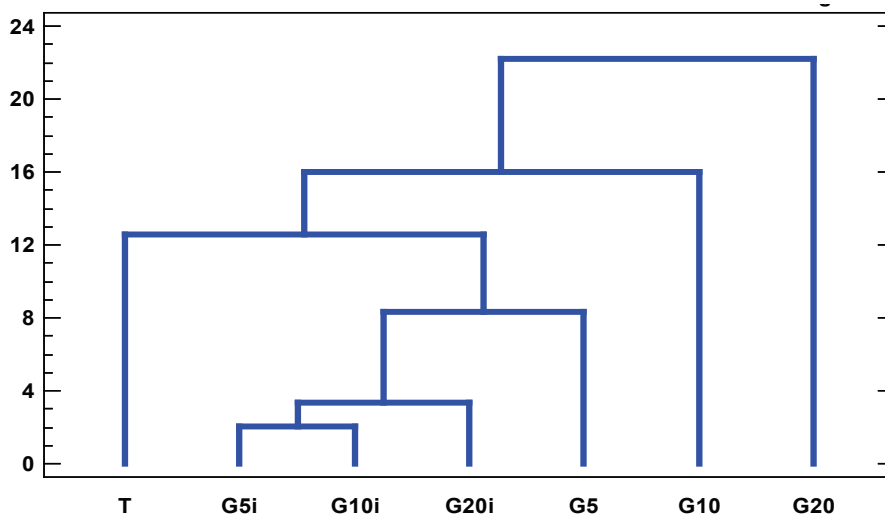


Figura 4.43.- Dendograma que agrupa características similares

Las asociaciones por semejanza se hacen como hemos observado en la grafica anterior un primer grupo de las dosis inferiores y sin incubación, para ir asociando progresivamente con orden creciente de aporte.

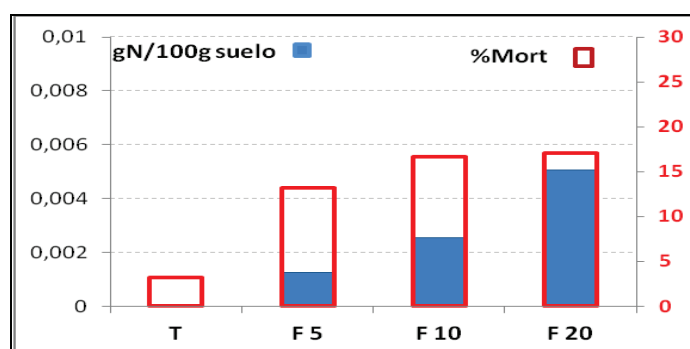
## 4.7. EXPERIENCIA VII.- APLICACIÓN EN LABORATORIO DE DIFERENTES DOSIS DE RESTOS DE PLANTA DE FRESA

### 4.7.1. Resultados del análisis nematológico

**Tabla 4.48.-** Contenido en N y mortalidad alcanzada en la experiencia con aporte de Fresa

	g N/ 100 suelo	% Mortalidad
<b>T</b>	0	3,2
<b>F 5</b>	0,001269	13,2
<b>F 10</b>	0,002538	16,63
<b>F 20</b>	0,005076	17,05

La mortalidad se asocia con el contenido de N que se realiza Fig. 4.44



**Figura 4.44 .-**Mortalidad de *G.rostochiensis* y contenido en N aportado en g/100 g suelo para suelo testigo (T) y suelo con aportes de restos de fresa en dosis de 5, 10 y 20g (F5, F10, F20)

La aplicación de restos de fresa en función de la cantidad de N aportado y la mortalidad muestra como la aplicación incrementa la mortalidad del nematodo desde un 3.4% (alcanzado solo en el suelo testigo) hasta un valor medio de 17 % a la dosis máxima, siendo unos de los menores valores de mortalidad de *G. rostochiensis*, alcanzados en la experiencia de biodesinfección. Hay que destacar que el incremento de aporte en N de la dosis 10 a 20 no ocasiona una mortalidad claramente superior.

### 4.7.2. Resultados de actividades enzimáticas

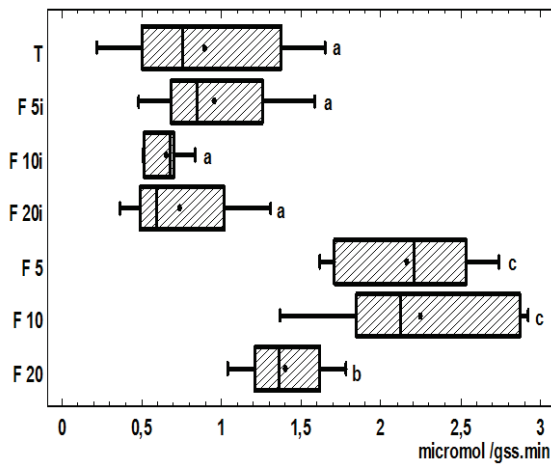
#### a) Valores de actividad

**Tabla 4.49.-** Actividades enzimáticas medias para las aplicaciones de fresa

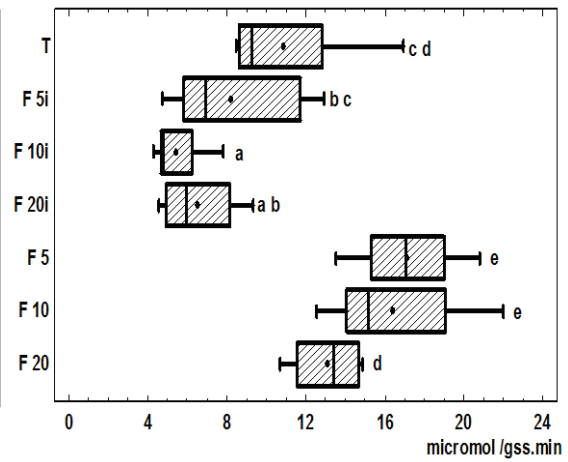
Trat	bCel	bG	bXil	bGa	Leu	bGlc	Ace	PalE	AcP	AIKP	SulF	NAcGln
<b>T</b>	0,805	10,36	0,794	0,182	1,303	0,210	19,75	1,069	1,100	6,705	0,616	2,388
<b>F5i</b>	0,955	6,134	0,973	0,505	1,649	0,594	31,71	0,907	0,539	5,943	0,384	1,898
<b>F10i</b>	0,667	5,440	0,698	0,407	1,058	0,575	25,64	0,701	0,616	4,028	0,199	1,805
<b>F20i</b>	0,735	6,497	0,710	0,463	1,536	0,563	23,72	0,684	0,570	4,300	0,173	1,480
<b>F5</b>	2,159	17,127	1,227	0,958	0,692	0,167	27,29	0,894	1,193	5,049	0,389	4,889
<b>F10</b>	2,245	16,401	1,256	1,016	1,145	0,219	31,12	0,670	0,955	4,344	0,465	3,939
<b>F20</b>	1,400	13,106	1,090	0,730	1,058	0,841	20,69	0,802	2,486	4,440	0,398	4,836

b) *Expresión gráfica de resultados enzimáticos*

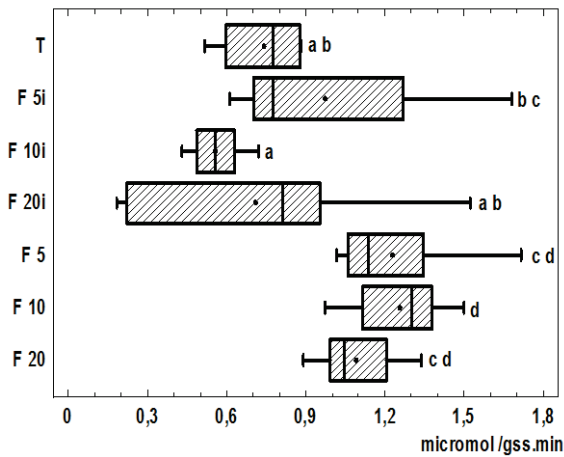
**β-celobiosidasa**



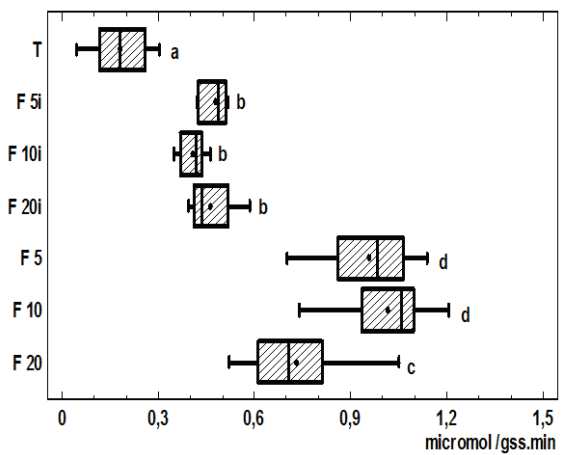
**β-glucosidasa**



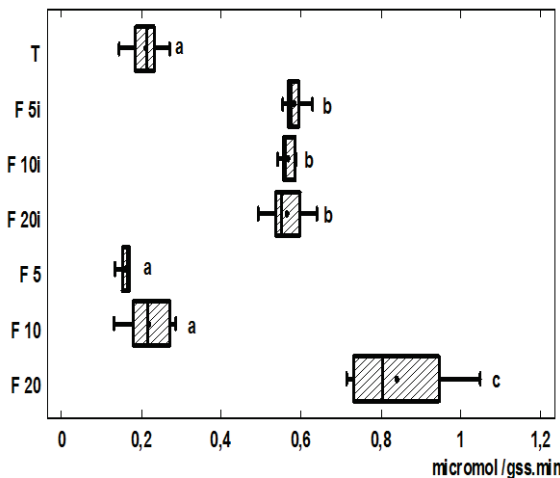
**β-xilosidasa**



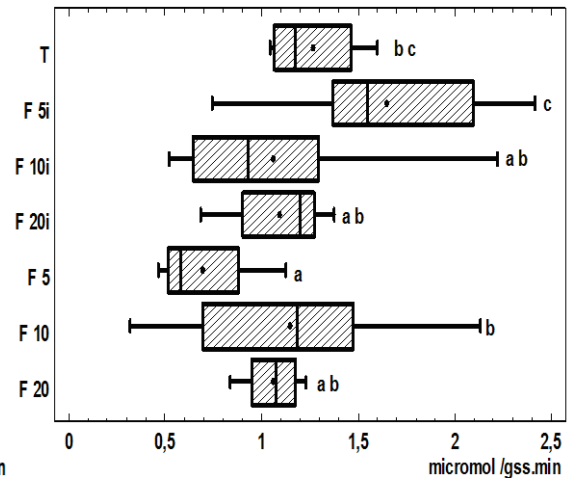
**β-galactosidasa**



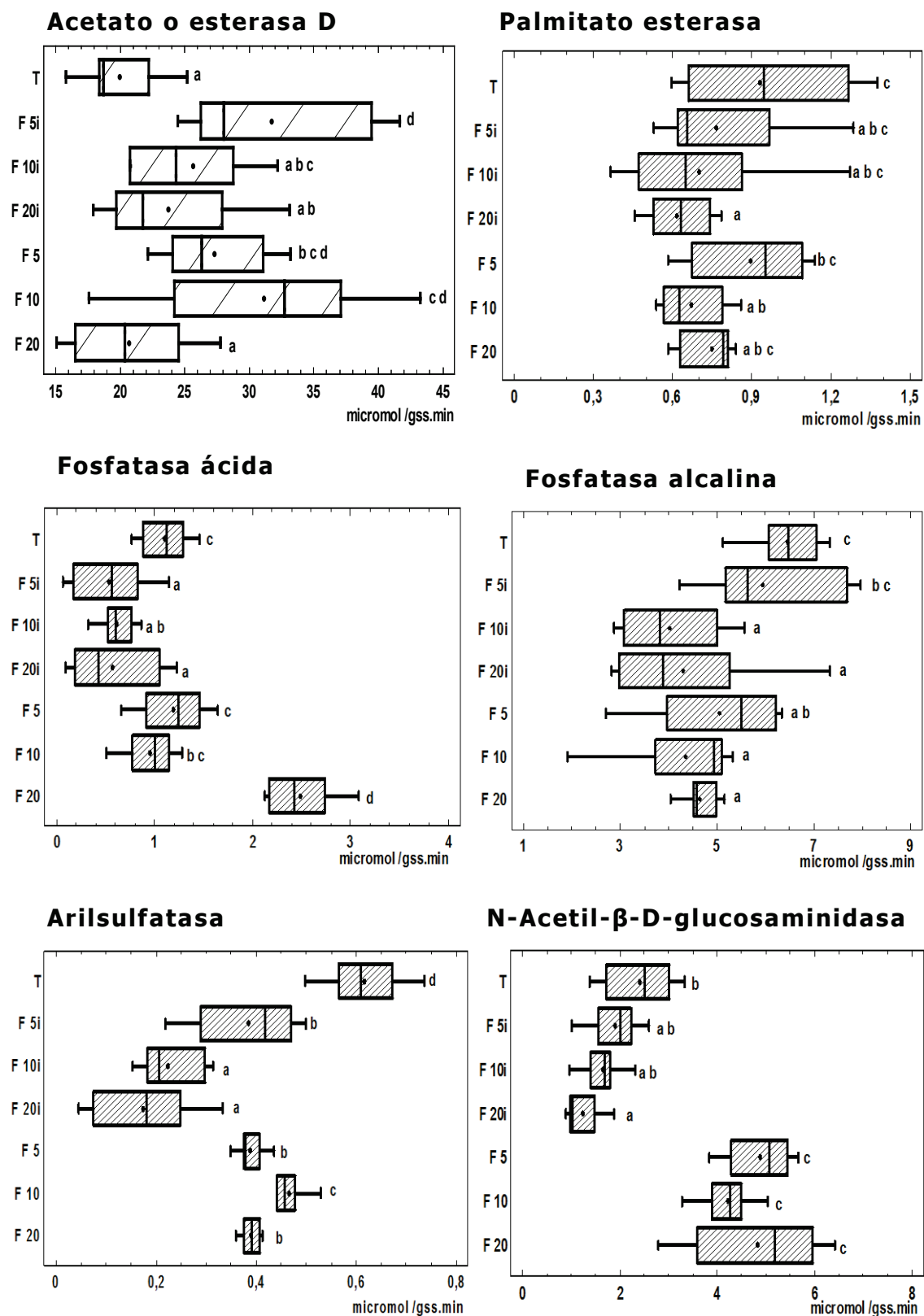
**β- glucuronidasa**



**Leucina aminopeptidasa**



**Figura 4.45.-** Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas



**Figura 4.46.-**Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas



### ***c) Análisis de resultados enzimáticos***

#### ***c.1) Enzimas relacionadas con el metabolismo glucídico***

La aplicación de restos de fresa realizada tras una trituración efectiva de las mismas, muestra como al inicio de la experiencia se mantienen los niveles de  $\beta$ -celobiosidasa  $\beta$ -xilosidasa propias del suelo mientras que la  $\beta$ -glucosidasa reduce ligeramente su nivel de liberación de glucosa respecto a la actividad edáfica y la  $\beta$ -galactosidasa incrementa su actividad.

El proceso de incubación a 30°C durante 30 días genera en los cuatro enzimas estudiados un incremento de actividad a pesar de que el contenido en O<sub>2</sub> no se ha renovado (experiencia en anaerobiosis). Si conviene resaltar que el hecho de que la mayor dosis de aplicación reduce claramente la actividad para los cuatro enzimas, mostrando un retrocontrol por exceso de producto que se supone no consumido por el sistema cuando el nivel de O<sub>2</sub> disponible desciende.

La N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa duplica su actividad durante el proceso de incubación.

#### ***c.2) Enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico***

La aportación de esterases implicada en la liberación de ácidos orgánicos de carácter lipídico no muestra cambios significativos cuando se observa la posible liberación de palmitato y una difícil interpretación de los resultados (oscilante) de la acetato deacetilasa que en general supera a la medida del testigo de referencia no siendo capaces de discernir una variación clara de esta área metabólica únicamente con los resultados enzimáticos.

#### ***c.3) Enzimas relacionadas con el metabolismo proteico***

Es interesante observar el comportamiento de la  $\beta$ -glucuronidasa contenida en el extracto vegetal propio, con una elevada presencia de glicoproteínas que desaparece durante el proceso de incubación en las dosis pequeñas, F5 y F10 recuperando el nivel del suelo pero altamente eficaz en la dosis F20, pues multiplica por 4 su actividad inicial respecto del testigo.

Con respecto al enzima del área proteica, leucina amino-peptidasa, no se distingue una modificación clara del comportamiento.

### *c.4) Metabolismos terminales del P y S*

#### *del Fósforo*

Da la impresión de que la liberación de P generada por la fosfatasa ácida (enzima exocelular) ni la adquisición de fosfato por los seres vivos mediante la fosfatasa alcalina (enzima de membrana) muestran un incremento significativo de actividad, mas bien un mantenimiento de estatus edáfico lo cual puede ser indicador de una suficiencia de P, a pesar de la intensidad de la actividad del metabolismo glucídico.

#### *de los sulfatos*

Como en otros casos la arilsulfatasa no parece activarse respecto al suelo testigo.

### **4.7.3. Análisis estadístico**

#### *a) Matriz de Correlaciones*

Considerando solo correlaciones con valores mayores de 0,5

**Tabla 4.50.-**Correlaciones de Pearson, entre cada par de variables para el aporte de fresa

	<b>bGal A</b>	<b>bCel A</b>	<b>bXil A</b>	<b>AIKP A</b>	<b>Sulf A</b>	<b>NAcGln A</b>	<b>Mort</b>
<b>bG A</b>	0,689 -54 ***	0,6816 -52 ***	0,5965 -52 ***		0,5322 -53 ***	0,7139 -51 ***	0,7262 -54 ***
<b>bGal A</b>		0,7287 -53 ***	0,6368 -53 ***			0,6918 -52 ***	0,8133 -55 ***
<b>bCel A</b>						0,5888 -51 ***	0,7188 -54 ***
<b>bXil A</b>						0,6266 -51 ***	0,5875 -54 ***
<b>AcP A</b>						0,6444 -50 ***	0,5974 -52 ***
<b>Sulf A</b>				0,5371 -53 ***			
<b>NAcGln A</b>							0,8389 -53 ***

Se indica, entre paréntesis, el número de pares de datos usado para calcular cada coeficiente. Valores de p menores de 0.05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%. \* P < 0,05 \*\* p<0,01 \*\*\* p<0,001 Sombreado en amarillo se encuentran las correlaciones positivas, para facilitar su análisis

Las correlaciones son todas positivas entre la capacidad nematicida y  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -celobiosidasa,  $\beta$ -xilosidasa, fosfatasa ácida mostrando una clara implicación de los cuatro enzimas del área

de metabolismo glucídico, y por encima de ellos la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (correlación 0,84  $p < 0,001$ ) que implica a la actividad fúngica como responsable de la capacidad nematocida de la mezcla.

En el resto de las actividades enzimáticas las correlaciones no llevan valores elevados y podemos destacar que en el metabolismo glucídico la correlación se establece entre ellos pero no así con la  $\beta$ -celobiosidasa y  $\beta$ -xilosidasa (Tabla 4.50).

Respecto al fósforo la actividad fosfatasa alcalina solo establece correlación con la arilsulfatasa, mientras que la fosfatasa ácida lo hace con la actividad N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa. Esta actividad establece correlaciones positivas con el metabolismo glucídico y del fósforo.

### ***b) Análisis de Componentes Principales***

El análisis permite obtener 3 ejes de variación para explicar más de un 90% de la varianza total, como vemos en la tabla 4.51

**Tabla 4.51.-** Análisis de componentes principales

Componente Número	Eigenvalor	Porcentaje de Varianza	Porcentaje Acumulado
1	6,53	50,25	50,25
2	3,16	24,29	74,54
3	2,06	15,86	90,40

Calculando los componentes para cada variable estudiada (Tabla 4.52):

**Tabla 4.52.-** Análisis de los componentes principales. Pesos de los componentes

	Comp 1	Comp 2	Comp 3
B-glucuronidasa	0,125	0,278	0,439
B-glucosa	-0,371	-0,140	-0,025
B-galactosa	-0,352	0,193	-0,158
B-celobiosa	-0,375	-0,015	-0,194
B-xilosa	-0,367	-0,043	-0,137
Fosfatasa acida	-0,222	-0,077	0,552
Acetato deacetilasa	-0,080	0,173	-0,577
Arilsulfatasa	-0,138	-0,495	-0,021
N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa	-0,373	-0,049	0,182
Fosfatasa alcalina	0,092	-0,525	-0,096
Palmitato esterasa	0,053	-0,540	0,063
Leucina aminopeptidasa	0,291	-0,093	-0,111
% mortalidad	-0,371	0,070	0,170
% de varianza explicada	<b>50,25</b>	<b>24,29</b>	<b>15,86</b>
% de varianza acumulada	<b>50,25</b>	<b>74,54</b>	<b>90,40</b>

Considerando valores mayores de 0.3, el primer componente que absorbe un 50,25 % de la varianza viene determinado en una cuantía

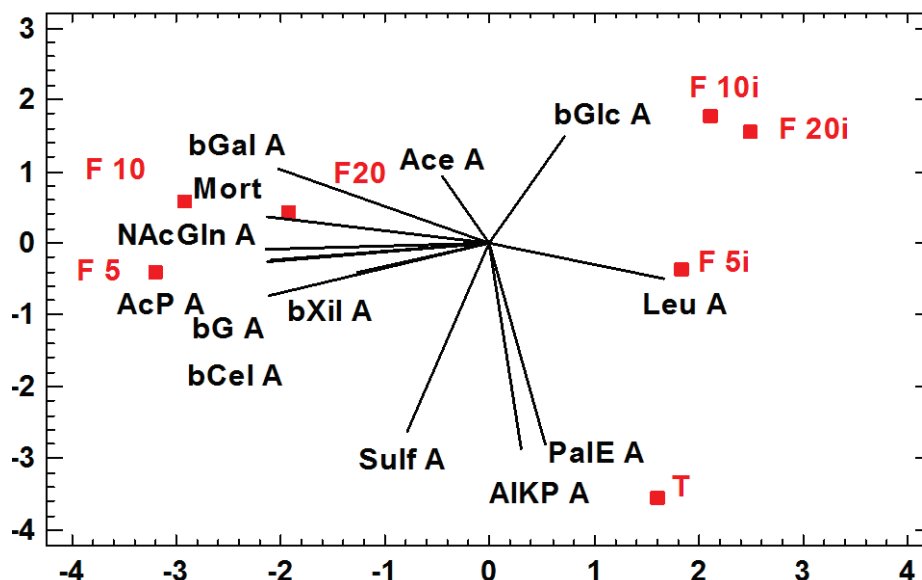
similar por  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -celobiosidasa,  $\beta$ -xilosidasa, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, y la mortalidad (tabla 4.52). El segundo componente que explica un 24,29 % con un 74,54 % de varianza acumulada se relaciona con arilsulfatasa, fosfatasa alcalina y palmitato esterasa. Por último el tercer componente que explica cerca de un 16 % de la varianza con más de un 90 % de varianza acumulada se relaciona con  $\beta$ -glucuronidasa, fosfatasa ácida y acetato deacetilasa.

Para cada muestra los valores de los tres componentes son (tabla 4.54).

La representación gráfica de los componentes C2 frente a C1 ordena las actividades ante las aplicaciones efectuadas dejando en zonas separadas las aplicaciones incubadas o sin incubarse, asociando mortalidad con las incubaciones y a su vez con las actividades ya definidas en la matriz de correlaciones que se relacionaban positivamente con la mortalidad (Fig.4.47).

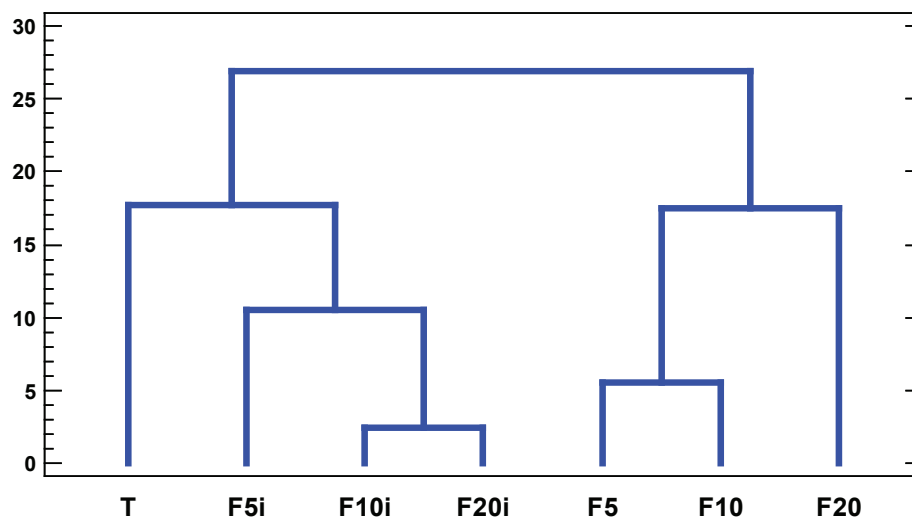
**Tabla 4.53.-** Componentes principales para cada una de las muestras de trabajo

	Comp 1	Comp 2	Comp 3
<b>T</b>	1,611	-3,549	0,396
<b>F5i</b>	1,841	-0,368	-1,233
<b>F10i</b>	2,110	1,762	0,161
<b>F20i</b>	2,494	1,557	0,054
<b>F5</b>	-3,204	-0,411	-0,642
<b>F10</b>	-2,924	0,577	-1,542
<b>F20</b>	-1,928	0,432	2,806



**Figura 4.47.-** Representación de componente para las aplicaciones de restos de producción de fresa

Se pueden asociar grupos semejantes de comportamiento con el dendograma que vemos seguidamente (Fig. 4.48).



**Figura 4.48.-** Dendrograma agrupando según características similares

El dendrograma nos justifica un comportamiento específico del aporte de fresa claramente separado del comportamiento testigo cuando sufre el proceso de incubación. Agrupa las muestras sin incubar con el testigo y separadas de ellas las muestras incubadas asociando las dosis en ellas según semejanzas en comportamiento.

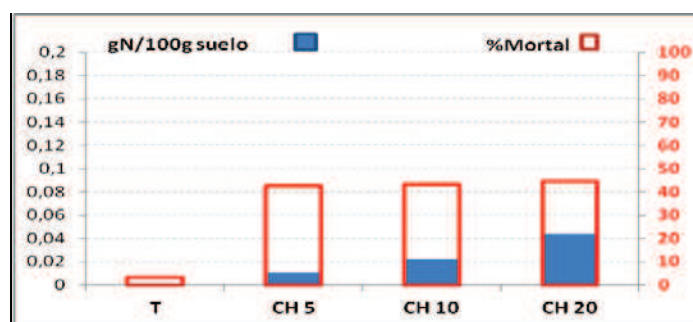
## 4.8. EXPERIENCIA VIII.- APLICACIÓN DE RESTOS DEL CULTIVO DE SETAS (PLEUROTUS OSTREATUS)

### 4.8.1. Resultados del análisis nematológico

Representamos en la gráfica la capacidad nematocida en función con el aporte de N referido a g N / 100g de suelo para poder establecer las oportunas comparaciones teniendo en cuenta el aporte de N realizado con los diferentes residuos (Tabla 4.54).

**Tabla 4.54.-** Contenido en N de cada muestra y su relación con la mortalidad

	aporte g N / 100 g suelo	% Mortalidad
T	0	3,2
CH 5	0,011	42,5
CH 10	0,022	43,28
CH 20	0,044	44,68



**Figura 4.49.-** Mortalidad de *G.rostochiensis* y contenido en N aportado en g/100 g suelo para suelo Testigo (T) y aportes de restos de cultivo champiñón en dosis de 5, 10 y 20g

Al aplicar estos restos de producción se alcanza una mortalidad similar con las tres dosis usadas, independientemente de la cantidad de N suministrado, con un límite alcanzado en un 45 %. Esto conduce a pensar que es suficiente a efectos de capacidad nematocida con la primera dosis aplicada (CH 5) (Fig. 4.49).

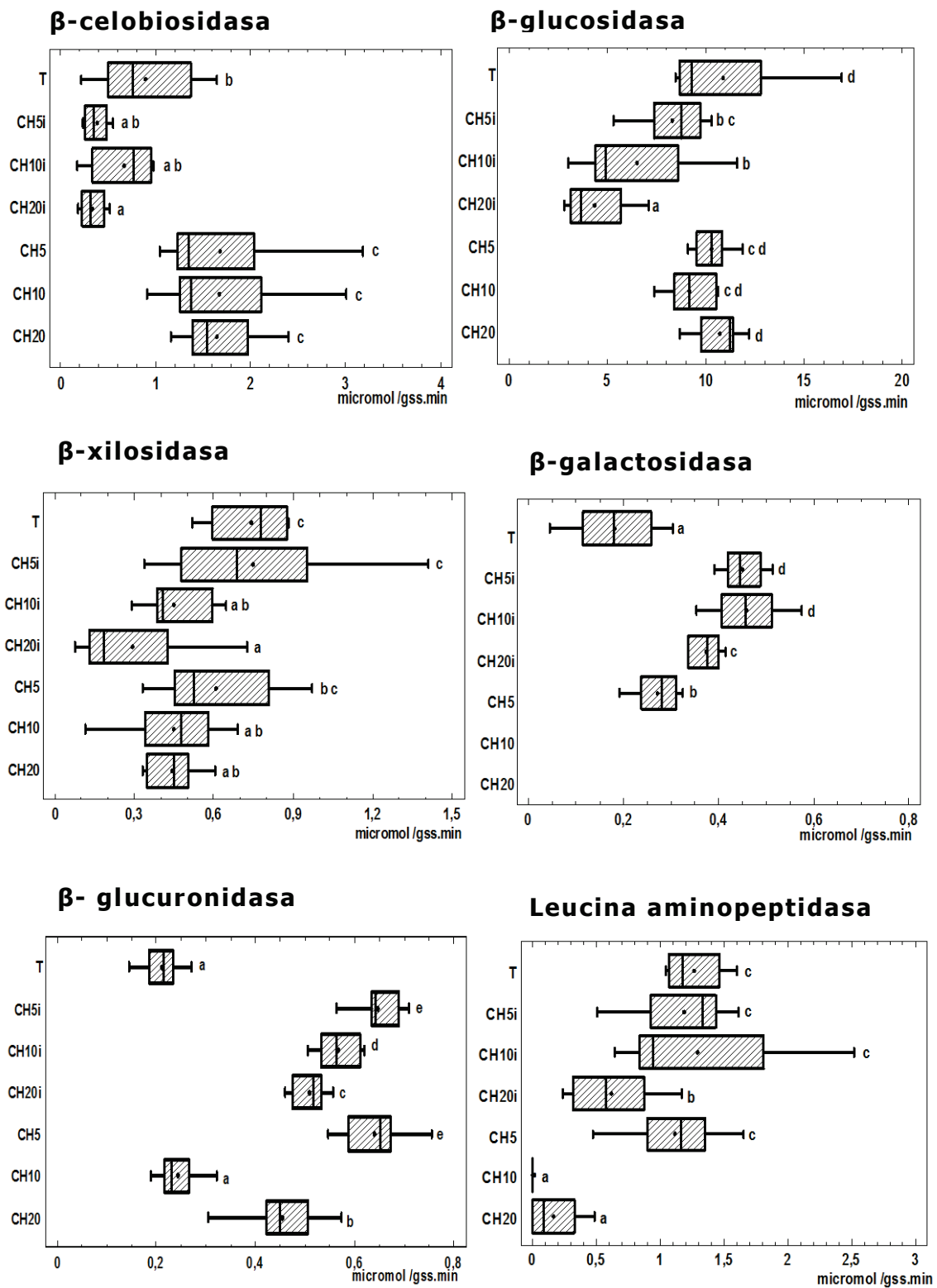
### 4.8.2. Resultado actividades enzimáticas

#### a) Valores de actividad

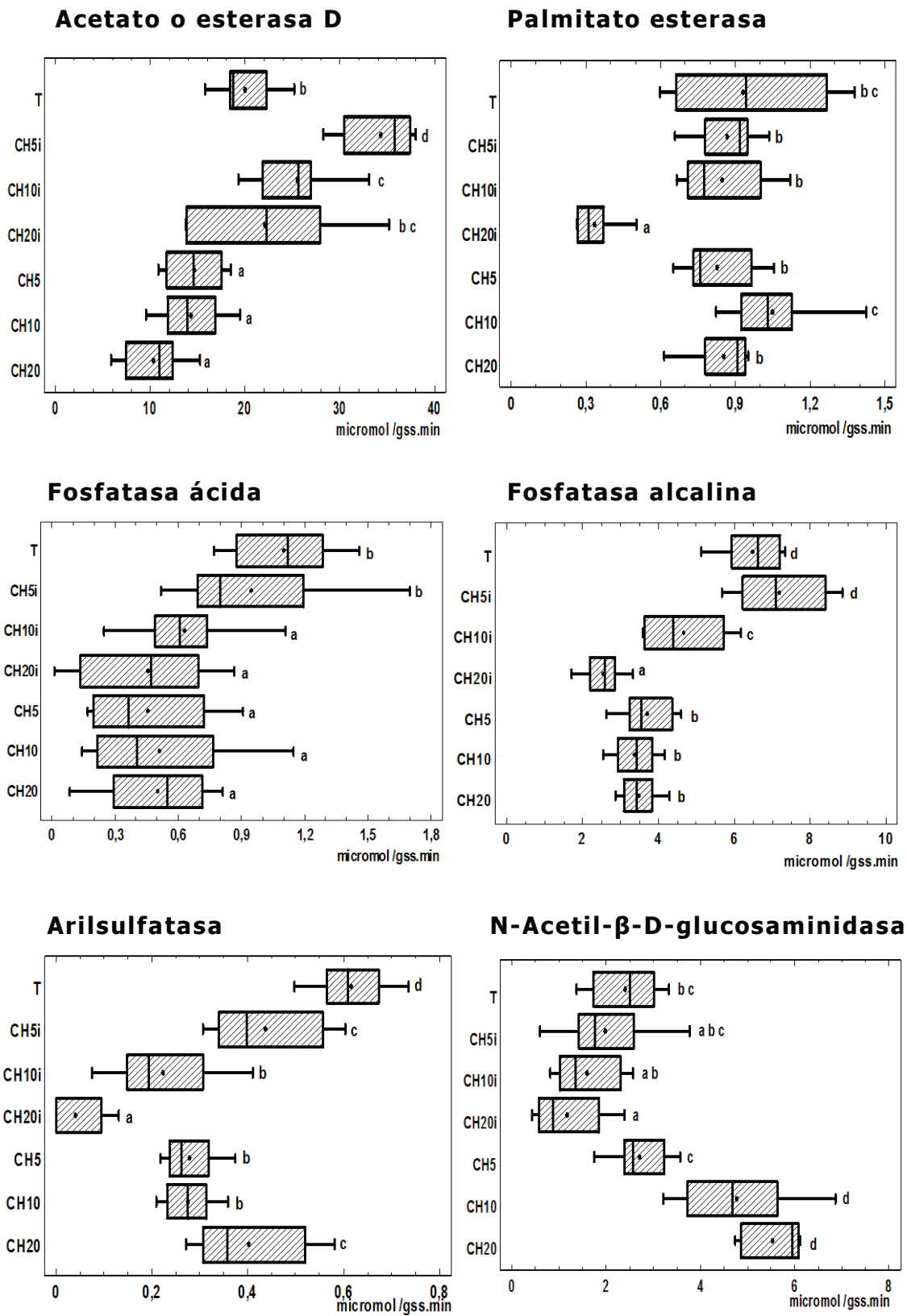
**Tabla 4.55.-** Actividades enzimáticas medias para la aplicación de restos de cultivo de setas

Trat	bCelA	bG A	bXilA	bGalA	Leu A	bGlcA	Ace A	PalEA	AcPA	AIKPA	SulFA	NAcGln
T	0,805	10,36	0,794	0,182	1,303	0,210	19,75	1,069	1,100	6,705	0,616	2,388
Ch5i	0,387	8,314	0,748	0,451	1,189	0,678	35,890	1,069	0,948	6,288	0,437	1,987
Ch10i	0,665	6,499	0,523	0,459	1,293	0,567	25,531	1,124	0,629	4,656	0,222	1,592
Ch20i	0,332	4,332	0,407	0,425	0,616	0,508	22,118	0,499	0,457	2,537	0,040	1,174
Ch5	1,683	10,297	0,610	0,271	1,118	0,640	14,623	0,828	0,455	3,690	0,278	2,711
Ch10	1,674	9,842	0,451	-	-	0,267	15,168	1,051	0,509	3,377	0,276	4,771
Ch20	1,952	10,708	0,442	-	0,130	0,454	10,328	0,853	0,501	3,475	0,402	5,855

*b) Expresión gráfica de resultados enzimáticos*



**Figura 4.50.-**Actividades enzimáticas. Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas



**Figura 4.51.- Actividades enzimáticas.** Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas



### ***c) Interpretación del análisis enzimático***

#### ***c.1) Enzimas relacionadas con el metabolismo glucídico***

De los cuatro enzimas estudiados y salvando el concepto de que la  $\beta$ -xilosidasa nos muestra un incremento de la actividad respecto del suelo testigo, cuando se desarrolla el proceso de incubación, llama la atención que en la medida que se incrementa la dosis aplicada la  $\beta$ -galactosidasa reduce drásticamente su nivel de actividad hasta tal punto que no es detectable.

La N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa muestra un incremento sustancial en la misma medida en que la dosis aplicada es mayor, exponente de que este residuo estimula el desarrollo fúngico.

#### ***c.2) Enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico***

Ambos enzimas conservan o reducen el nivel de actividad a lo largo del proceso.

#### ***c.3) Enzimas relacionadas con el metabolismo protéico***

La  $\beta$ -glucuronidasa enzima que afecta a la estabilización de las glicoproteínas es activo a niveles muy superiores a los que muestra el suelo, valores que se reducen con el incremento del aporte de residuo.

Este mismo hecho se repite con la leucina aminopeptidasa.

#### ***c.4) Metabolismos terminales del P y S***

##### ***del fosfato***

Ambos enzimas reducen su actividad posiblemente por la cantidad de fosfato suministrado por la enmienda utilizada.

##### ***del sulfato***

La arilsulfatasa nos muestra que cuanto más alta es la concentración del aporte menor es la capacidad de expresión catalítica tiene este enzima. Este hecho se corrige y estabiliza en el proceso de incubación aunque su nivel de actividad mostrado alcance la mitad del valor inicial evaluado en el testigo.

### 4.8.3. Análisis estadístico

#### a) Matriz de Correlaciones

Considerando solo correlaciones con valores mayores de 0,5, aparece correlación positiva entre la mortalidad,  $\beta$ -celobiosidasa y N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (ambas aproximadamente 0.74  $p < 0.001$ ), lo que sugiere una alta relación de éstas enzimas y el porcentaje de muerte de los patógenos (Tabla 4.56). La correlación entre la mortalidad y la  $\beta$ -galactosidasa, acetato deacetilasa y leucina amino-peptidasa, es negativa.

**Tabla 4.56.-** Correlaciones de Pearson, entre cada par de variables para el aporte de restos *Pleurotus*.

	bCel A	bGal A	Leu A	Ace A	PaIE A	AIKP a	Sulf A	NACGln A	Mortal
bCel A				-0,507 -50 ***				0,564 -50 ***	0,737 -51 ***
bG A					0,596 -51 ***		0,685 -53 ***		
bXil A						0,530 -51 ***			
bGal A	-0,618 -50 ***		0,631 -52 ***	0,707 -53 ***				-0,784 -54 ***	-0,735 -55 ***
Leu A									-0,514 -53 ***
bGlc A		0,629 -53 ***							
Ace A						0,532 -52 ***		-0,501 -53 ***	-0,717 -54 ***
AcP A						0,578 -53 ***	0,568 -55 ***		
AIKP A			0,566 -51 ***						
Sulf A					0,526 -54 ***	0,721 -54 ***			
NACGln A			-0,553 -52 ***						0,739 -55 ***

Se indica, entre paréntesis, el número de pares de datos usado para calcular cada coeficiente. Valores de p menores de 0.05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%. \* P < 0,05 \*\* p<0,01 \*\*\* p<0,001  
Se sombrea en color amarillo las correlaciones positivas

Para las actividades restantes se observa que sus correlaciones en el caso de las actividades de los carbohidratos son mínimas, ya que solo se da entre la  $\beta$ -galactosidasa y la  $\beta$ -celobiosidasa y con valor negativo.

Para las enzimas del metabolismo proteico la correlación se da con la  $\beta$ -glucuronidasa y leucina aminopeptidasa con la  $\beta$ -galactosidasa no estando las dos proteasas relacionadas entre sí. A su vez la leucina aminopeptidasa se correlaciona positivamente con valores no elevados con la fosfatasa alcalina y negativamente con la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa.

Las esterasas se relacionan con  $\beta$ -galactosidasa (con la acetato deacetilasa) y la  $\beta$ -glucosidasa (con la palmitato esterasa) y arilsulfatasa y fosfatasa alcalina con valores positivos próximos a 0,6. En el metabolismo del P se correlaciona entre si la dos fosfatasas (ácida y alcalina) y ambas también con la arilsulfatasa. Se establece también correlación entre la fosfatasa alcalina y la  $\beta$ -xilosidasa.

### *b) Análisis de Componentes Principales*

El análisis permite obtener 3 ejes de variación que permiten explicar más de un 90,62 % de la varianza total (Tabla 4.57).

**Tabla 4.57** .- Análisis de componentes principales

Componente Número	Eigenvalor	Porcentaje de Varianza	Porcentaje Acumulado
1	6,345	48,81	48,81
2	4,281	32,93	81,74
3	1,154	8,88	<b>90,62</b>

Si estos componentes los relacionamos con las variables estudiadas tenemos la tabla 4.58 de los pesos para cada una de las actividades.

**Tabla 4.58**.-Análisis de los componentes principales. Pesos de los componentes.

	Comp 1	Comp 2	Comp 3
$\beta$ -glucuronidasa	0,142	-0,217	0,719
$\beta$ -glucosidasa	-0,199	0,388	0,236
$\beta$ -galactosidasa	0,338	-0,230	0,198
$\beta$ -celobiosidasa	-0,356	0,152	0,235
$\beta$ -xilosidasa	0,249	0,346	0,055
Fosfatasa acida	0,260	0,341	-0,219
Acetato deacetilasa	0,349	-0,045	0,167
Arilsulfatasa	0,048	0,468	-0,041
N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa	-0,348	0,180	0,087
Fosfatasa alcalina	0,259	0,365	-0,010
Palmitato esterasa	0,067	0,303	0,365
Leucina aminopeptidasa	0,339	0,088	0,181
Mortalidad	-0,373	0,064	0,280
% de varianza explicada	<b>48,81</b>	<b>32,93</b>	<b>8,88</b>
% de varianza acumulada	<b>48,81</b>	<b>81,74</b>	<b>90,62</b>

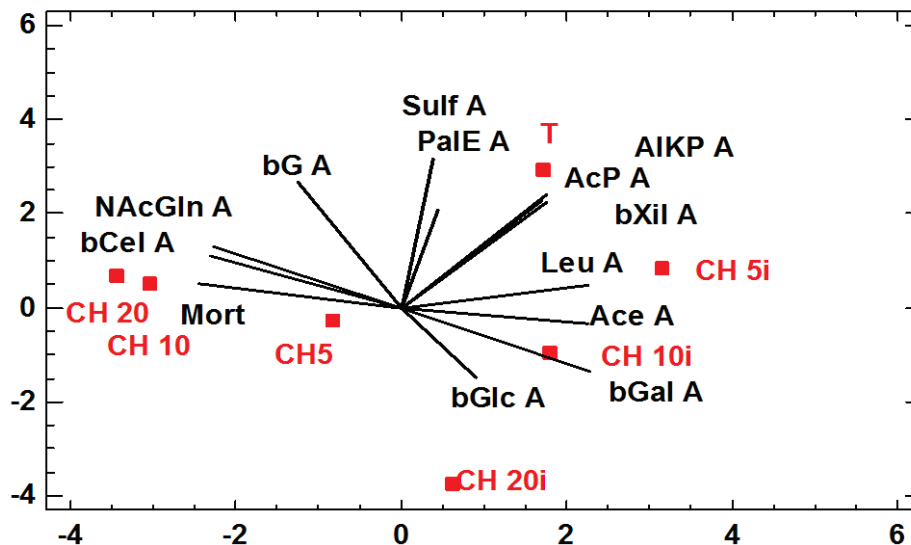
Con lo que se puede expresar cada uno de las muestras con los tres componentes según la tabla 4.59 y considerando valores mayores de

0,3, el primer componente, que absorbe un 48.8 % de la varianza, viene determinado en una cuantía similar de  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -celobiosidasa, acetato deacetilasa, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, leucina amino-peptidasa y la mortalidad. El segundo componente que explica un 32.9 % con un 81.7 % de varianza acumulada que se relaciona con  $\beta$ -glucosidasa  $\beta$ -xilosidasa fosfatasa ácida, arilsulfatasa, y fosfatasa alcalina. El tercer componente que explica el 8.9 % de la varianza con más del 90 % de varianza acumulada se relaciona con  $\beta$ -glucuronidasa y palmitato esterasa.

**Tabla 4.59.-** Componentes principales para cada una de las muestras de trabajo.

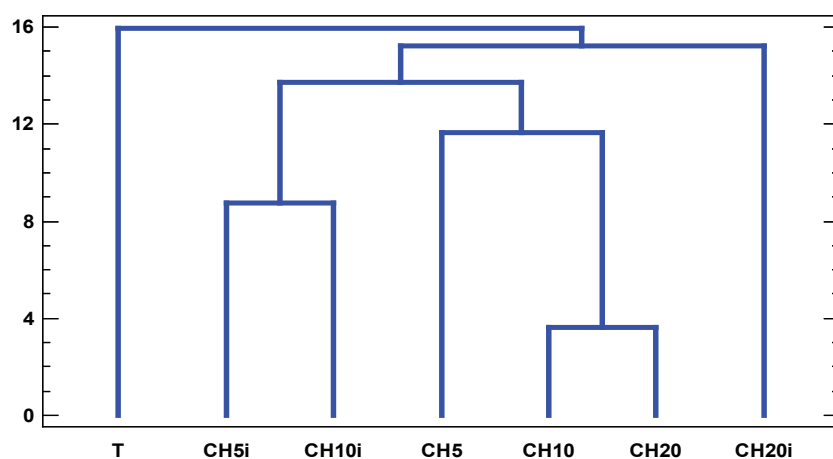
	Comp 1	Comp 2	Comp 3
<b>T</b>	1,611	-3,549	0,396
<b>CH 5i</b>	1,841	-0,368	-1,233
<b>CH 10i</b>	2,110	1,762	0,161
<b>CH 20i</b>	2,494	1,557	0,054
<b>CH 5</b>	-3,204	-0,411	-0,642
<b>CH 10</b>	-2,924	0,577	-1,542
<b>CH 20</b>	-1,928	0,432	2,806

Representando gráficamente (Fig. 4.52) los componentes nos agrupa las muestras de forma que la mortalidad aparece próxima a las aplicaciones de residuo con incubación y con las actividades relacionada positivamente según la matriz de correlaciones, lo que nos confirma la experiencia.



**Figura 4.52.-** Representación de los componentes C2 frente a C1 para la aplicación y posterior incubación de restos del cultivo de setas

Con el dendograma agrupamos las muestras según las características de comportamientos similares (Fig. 4.53).



**Figura 4.53.-** Dendrograma agrupando según características similares

Queda fuera de las asociaciones iniciales la aplicación de restos de setas a dosis máxima mientras que para las incubadas el comportamiento se corresponde con lo previsto en grupos afines.

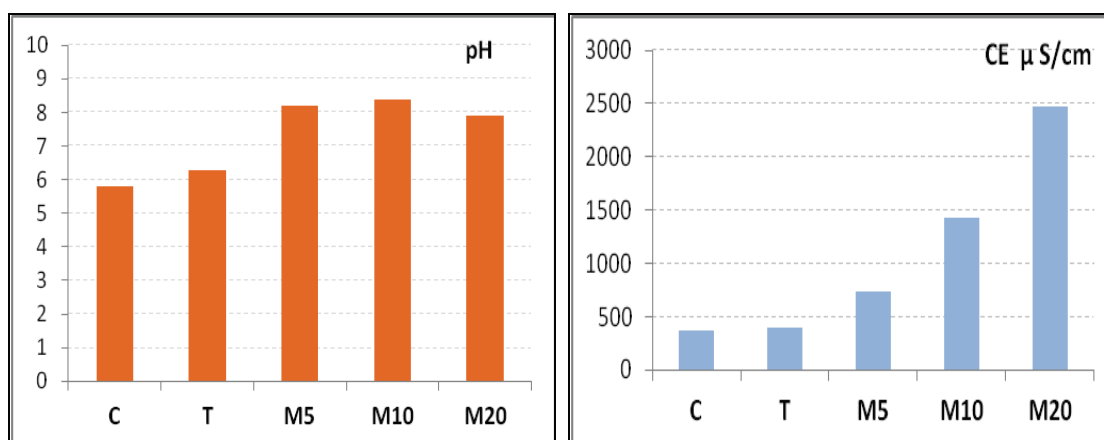
## 4.9. EXPERIENCIA IX.- APLICACIÓN DE RESTOS DE COSECHA DE MAÍZ CON UREA A DIFERENTES DOSIS.

### 4.9.1. *Modificación de pH y CE*

Aquí también, la sola mezcla del suelo con agua disminuye ligeramente el pH de 5,8 a 6,2 (Fig. 4.54). Cuando aplicamos urea asociada al resto de maíz, se produce su hidrólisis en presencia de ureasa, presente en el suelo, que se transforma en  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  inestable, y que al descomponerse, libera ión  $\text{NH}_4^+$ .

Este ión eleva rápidamente el pH hasta valores próximos a 8 como sucede en la experiencia actual, incluso con un suelo cuyo pH de partida sea ligeramente ácido. (Posteriormente la nitrificación oxida el amonio hasta nitratos, con lo que el pH vuelve a reducirse al nivel inicial del suelo de partida).

La conductividad se incrementa según el contenido en sales. Aumenta con la dosis aplicada, como es previsible.



**Figura 4.54.-** Variación de pH y de conductividad en la aplicación de maíz con urea

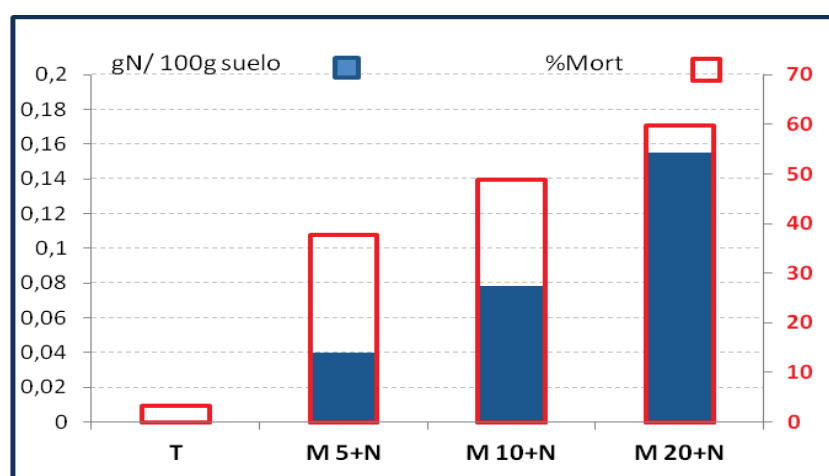
### 4.9.2. *Resultados del análisis nematológico*

La cantidad de N se calcula para la dosis de maíz más el incremento suministrado por la urea sin tener en cuenta las posibles pérdidas en forma de  $\text{NH}_3$ , ya que se realizó la experiencia en cerrado.

**Tabla 4.60.-** Contenido en N de los aportes empleados y mortalidad en la experiencia

muestra	g N / 100 g suelo	g N / 100 g suelo	% Mortal
<b>T</b>	0	0	3,2
<b>M 5+N</b>	0,0113	0,03844	37,6
<b>M 10+N</b>	0,0226	0,07688	48,82
<b>M 20+N</b>	0,0452	0,15376	59,68
	solo maíz	con urea	

La relación entre la cantidad de N aportado en la mezcla y la capacidad nematocida de la misma no es asociable ya que la diferencia entre las mortalidades no justifica el incremento excesivo del aporte de N.

**Figura 4.55.-** Mortalidad de *G.rostochiensis* con la aplicación de residuos de maíz en función de la cantidad de nitrógeno aportada

### 4.9.3. Resultados de actividades enzimáticas.

#### a) Valores de actividad

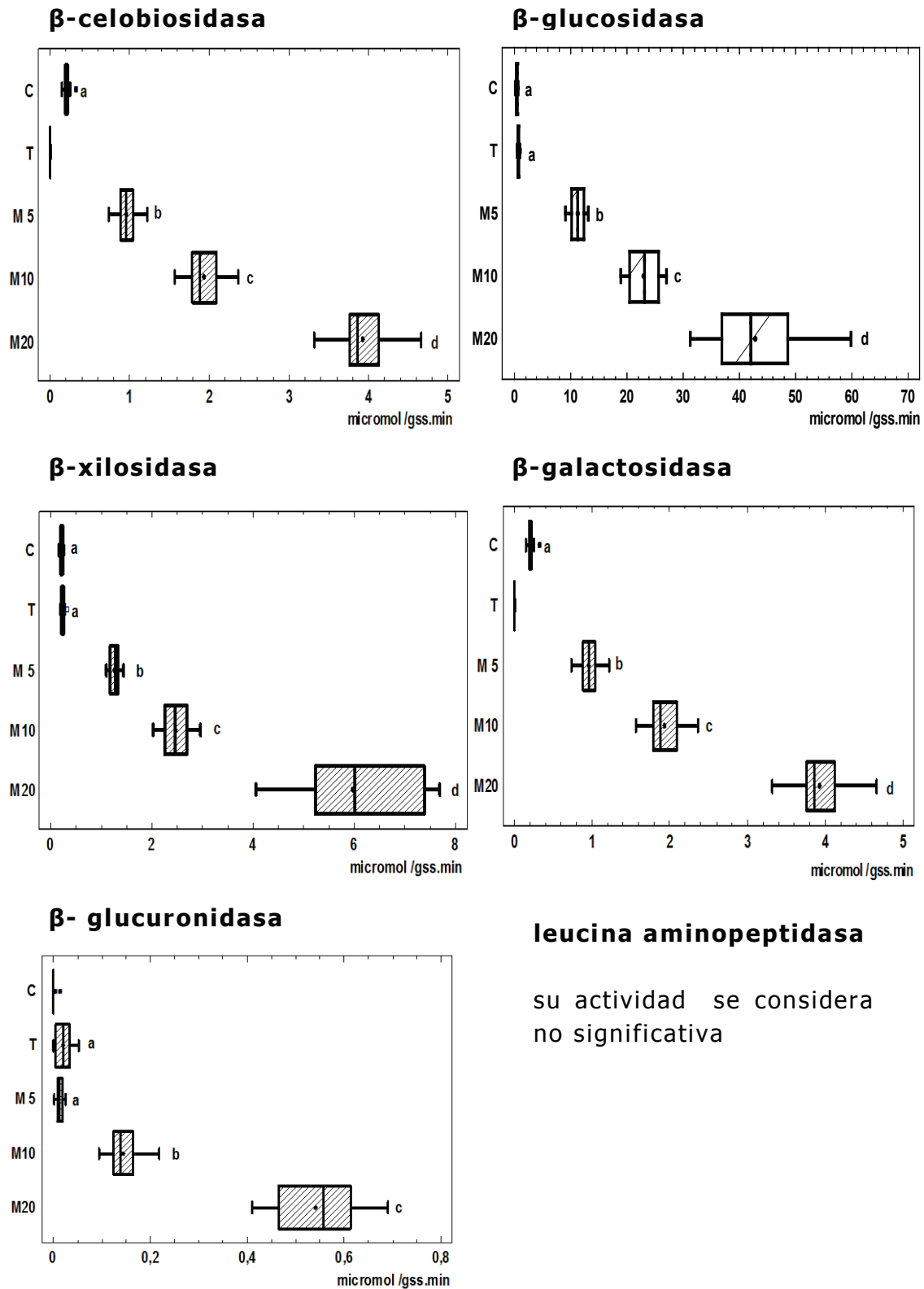
**Tabla 4.61.-** valores de actividades para la aplicación de maíz con urea

Trat	$\beta$ CeIA	$\beta$ G A	$\beta$ XilA	$\beta$ GalA	Leu A	bGlcA	Ace A	PalEA	AcPA	AIKPA	SulFA	NAcGln
<b>C</b>	0,051	0,727	0,229	0,000	3,510	0,387	0,000	0,019	1,483	0,000	0,450	0,212
<b>T</b>	0,237	0,459	0,206	0,213	3,044	0,746	0,000	0,000	1,356	0,000	0,419	0,179
<b>M 5</b>	0,878	11,320	1,264	0,961	4,043	0,345	0,012	0,012	1,860	0,000	1,276	3,017
<b>M 10</b>	1,909	23,716	2,539	1,963	8,430	0,416	0,215	0,146	3,898	0,035	1,683	4,998
<b>M 20</b>	4,055	42,831	5,900	3,969	14,748	0,655	0,264	0,516	8,157	0,397	2,343	7,846



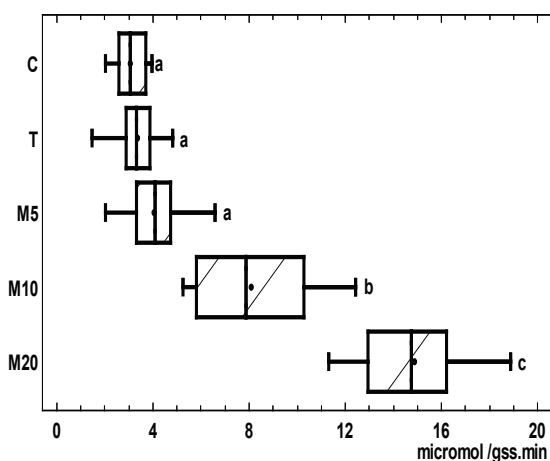


*b) Expresión gráfica de las actividades enzimáticas en la aplicación de restos de maíz*

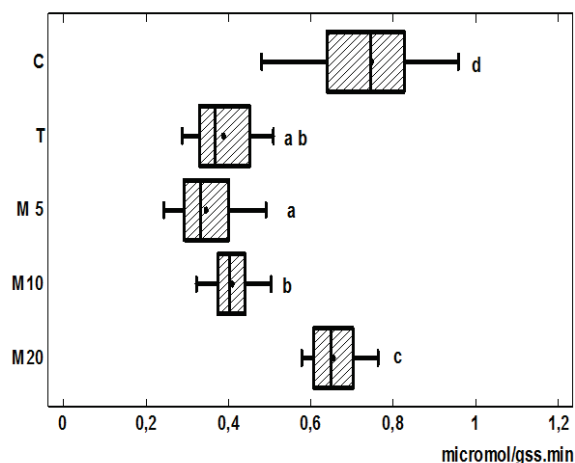


**Figura 4.56.-** Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas

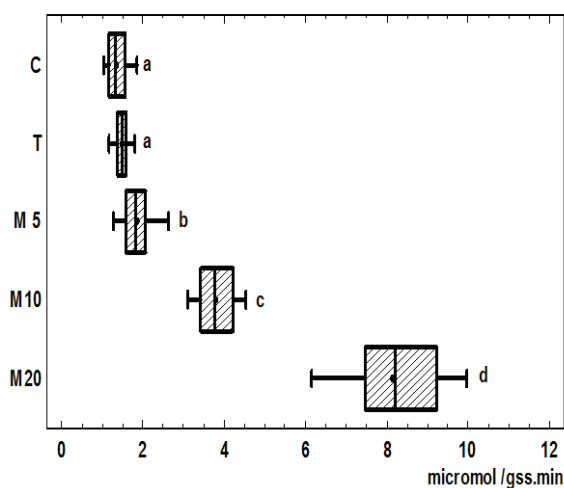
**Acetato o esterasa D**



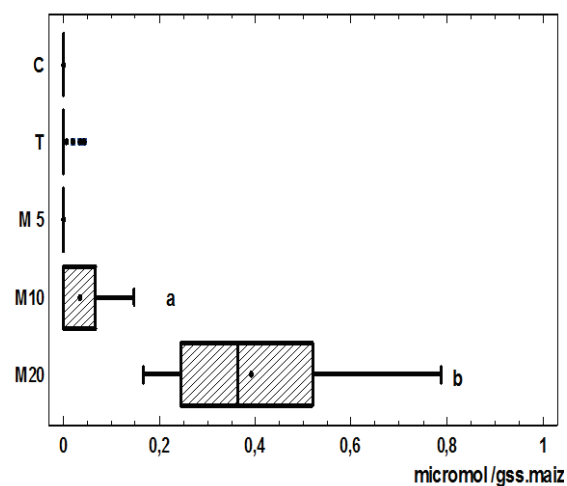
**Palmitato esterasa**



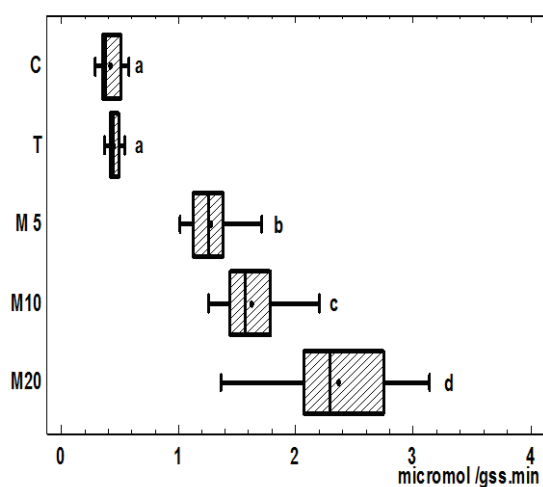
**Fosfatasa ácida**



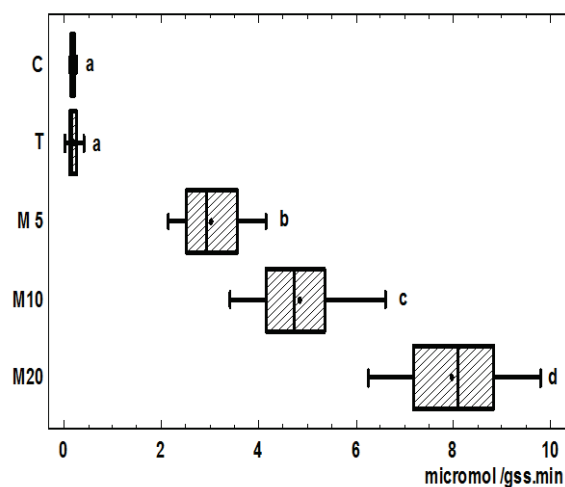
**Fosfatasa alcalina**



**Arilsulfatasa**



**N-Acetil-β-D-glucosaminidasa**



**Figura 4.57.**-Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas

### C) Análisis de resultados enzimáticos

Aun saliéndonos de la norma de separar los enzimas por áreas metabólicas observamos que la mezcla de maíz con urea estimula la expresión catalítica de todos los enzimas estudiados tanto mayor cuanto la dosis aplicada es más elevada.

Apreciamos dos excepciones, la recicladora de aminoácidos (leucina aminopeptidasa) que no se considera significativa y la palmitato esterasa, que incrementa algo su actividad respecto al testigo.

#### 4.9.4. Análisis estadístico

##### a) Matriz de Correlaciones

Considerando solo correlaciones con valores mayores de 0,5 (Tabla 4.62).

**Tabla 4.62.-** Muestra las correlaciones de Pearson, entre cada par de variables en la aplicación de maíz

	bG A	bXil A	bGalA	bGlcA	Ace A	AcP A	AIKP A	Sulf A	NacGln A	Mort
<b>bCel A</b>	0,973 -108 ***	0,977 -102 ***	0,984 -105 ***	0,938 -102 ***	0,949 -95 ***	0,967 -104 ***	0,785 -106 ***	0,914 -105 ***	0,948 -93 ***	0,913 -10 ***
<b>bG A</b>		0,974 -104 ***	0,977 -106 ***	0,903 -106 ***	0,949 -100 ***	0,937 -104 ***	0,815 -110 ***	0,962 -109 ***	0,972 -99 ***	0,937 -12 ***
<b>bXil A</b>			0,983 -100 ***	0,930 -100 ***	0,941 -93 ***	0,961 -98 ***	0,839 -105 ***	0,928 -101 ***	0,930 -89 ***	0,838 -10 **
<b>bGal A</b>				0,916 -102 ***	0,936 -93 ***	0,956 -102 ***	0,761 -104 ***	0,922 -103 ***	0,959 -90 ***	0,993 -8 ***
<b>bGlc A</b>					0,926 -95 ***	0,953 -101 ***	0,858 -104 ***	0,829 -104 ***	0,882 -92 ***	0,810 -12 **
<b>Ace A</b>						0,951 -93 ***	0,846 -96 ***	0,905 -96 ***	0,917 -87 ***	0,879 -9 **
<b>AcP A</b>							0,838 -102 ***	0,856 -100 ***	0,886 -89 ***	0,814 -9 **
<b>AIKP A</b>								0,735 -106 ***	0,745 -94 ***	0,741 -10 *
<b>Sulf A</b>									0,960 -94 ***	0,942 -12 ***
<b>NacGlnA</b>										0,932 -12 ***

Se indica, entre paréntesis, el número de pares de datos usado para calcular cada coeficiente. Valores de p menores de 0.05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%. \* P < 0,05 \*\* p<0,01 \*\*\* p<0,001. Sombreamos en amarillo para diferenciar las correlaciones positivas

La correlación de la mortalidad con las actividades enzimáticas de los aportes realizados nos muestra que prácticamente todas las actividades enzimáticas se correlacionan positivamente con la mortalidad con valores de coeficientes de correlación muy elevados. No aparece correlación alguna con la actividad palmitato esterasa.

Observando las correlaciones existentes entre las diferentes actividades, se puede resumir que todos los ciclos metabólicos están correlacionados entre sí, con la excepción de la actividad palmitato esterasa y la leucina aminopeptidasa que no da actividad significativa.

### *b) Análisis de Componentes Principales*

El análisis permite obtener 2 ejes de variación que explican más de un 94% de la varianza total (Tabla 4.63).

**Tabla 4.63.-** Análisis de componentes principales

Componente Número	Eigenvalor	Porcentaje de Varianza	Porcentaje Acumulado
1	10,729	82,53	82,53
2	1,542	11,86	94,39

Si referimos los componentes a cada una de las actividades estudiadas

**Tabla 4.64.-** Análisis de los componentes principales. Pesos de los componentes

	Comp 1	Comp 2
B glucuronidasa	0,295	0,170
B glucosidasa	0,304	-0,065
B galactosidasa	0,301	0,099
B celobiosidasa	0,305	0,027
B xilosidasa	0,304	0,045
Fosfatasa acida	0,301	0,098
Acetato deacetilasa	0,303	0,054
Arilsulfatasa	0,295	-0,174
N-acetil-B-D-glucosaminidasa	0,299	-0,139
Fosfatasa alcalina	0,277	0,304
Palmitato esterasa	0,073	0,680
% de varianza explicada	<b>82,53</b>	<b>11,86</b>
% de varianza acumulada	<b>82,53</b>	<b>94,39</b>

Con lo que se puede expresar cada uno de las muestras con los dos componentes según la tabla 4.64 y considerando valores mayores de 0.3, el primer componente absorbe un 82,53 % de la varianza y viene determinado en una cuantía similar por  $\beta$ -glucosidasa  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -celobiosidasa,  $\beta$ -xilosidasa, fosfatasa ácida, acetato deacetilasa para arilsulfatasa y N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa. El segundo componente que explica un 11,86 % con un 94,39 % de varianza acumulada se relaciona

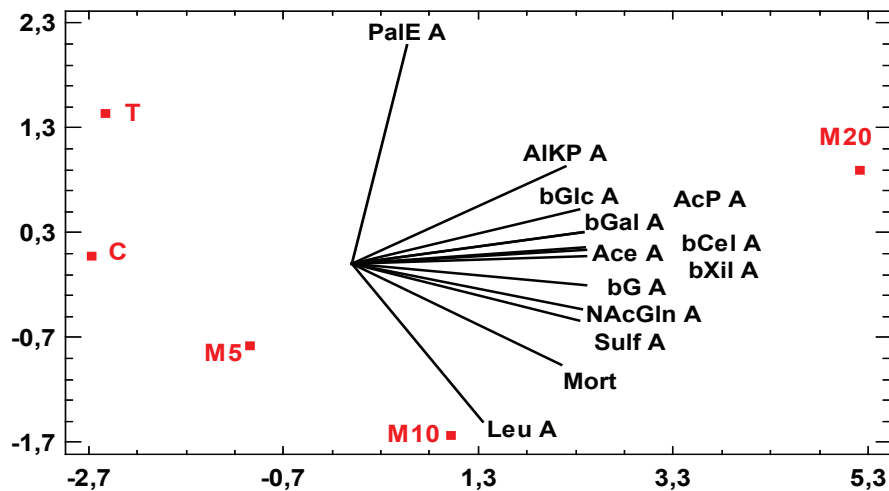
con fosfatasa alcalina y en mayor cuantía palmitato esterasa (Tabla 4.64).

Si referimos los componentes a las muestras según la tabla 4.65.

**Tabla 4.65.-** Componentes principales para cada una de las muestras de trabajo.

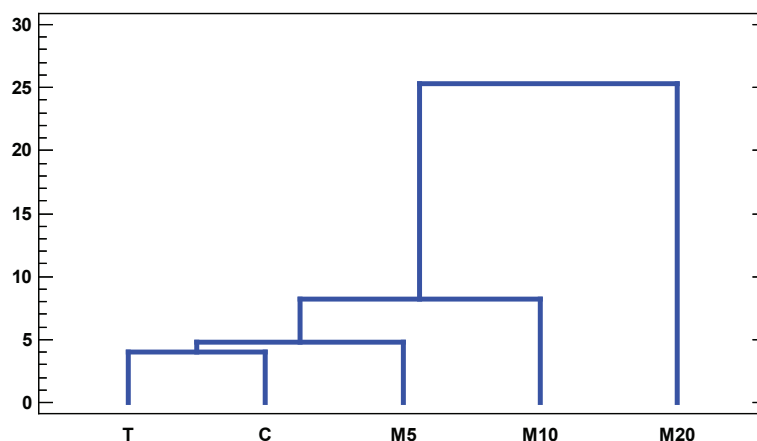
	Comp 1	Comp 2
<b>T</b>	-2,6730	0,0772
<b>C</b>	-2,5298	1,4363
<b>M 5</b>	-1,0363	-0,7757
<b>M10</b>	1,0179	-1,6387
<b>M20</b>	5,2212	0,9010

La representación gráfica del componente 2 frente al 1 reorienta las actividades hacia la asociación con las dosis 5 y 10 (M5 y M10) usada y queda asociada a la mortalidad con las actividades correlacionadas en la matriz estudiada.



**Figura 4.58.-** Representación de C2 frente a C1 en la aplicación de maíz con urea

En el dendograma se agrupan las muestras según las características similares nos aparecen las muestras según su contenido en aportes tal y como indicaban las respuestas enzimáticas a las diferentes aplicaciones.



**Figura 4.59.-** Dendograma agrupando según características similares

#### 4.10. EXPERIENCIA X.- APLICACIÓN DE RESIDUO DE LODO DE DEPURADORA BIOESTABILIZADO SIN Y CON CAL A DIFERENTES DOSIS.

##### 4.10.1. Resultados del análisis nematológico

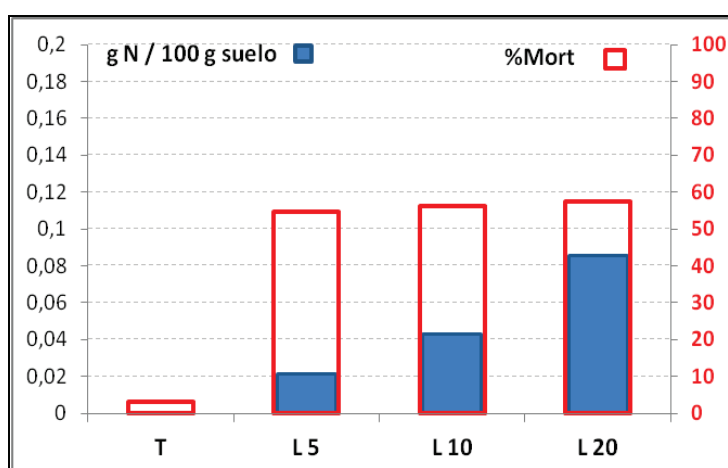
Representamos en la gráficas la capacidad nematicida junto con el aporte de N referido a g N / 100g de suelo para poder establecer las oportunas comparaciones teniendo en cuenta el aporte de N realizado con las dosis y tratamientos de los residuos (Tabla 4.66).

**Tabla 4.66.**-Contenido en N de cada muestra de Lodo y a la derecha de Lodo con cal y su relación con la mortalidad

	aporte g N / 100 g suelo	% Mortal		aporte g N / 100 g suelo	% Mortal
<b>T</b>	0	3,2	<b>T</b>	0	3,2
<b>L 5</b>	0,021372	54,5	<b>L+C 5</b>	0,021372	77,5
<b>L 10</b>	0,04274	56,31	<b>L+C 10</b>	0,04274	80,88
<b>L 20</b>	0,08549	57,44	<b>L+C 20</b>	0,08549	86,66

Representando la dosis de N junto con la mortalidad de la *G. rostochiensis* (Fig.4.60).

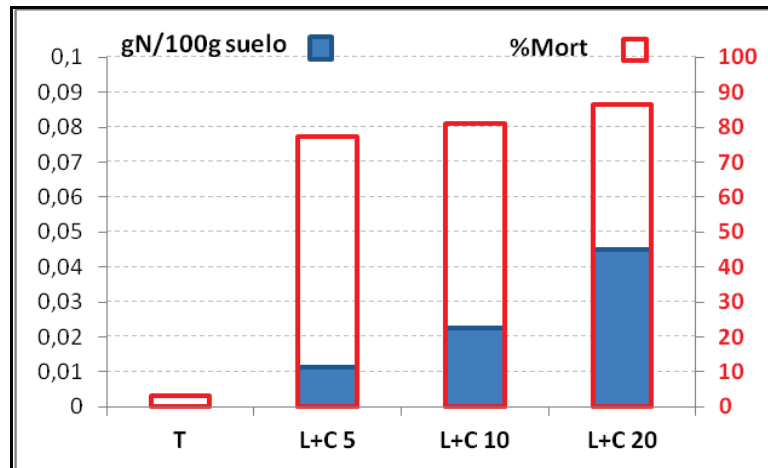
Como en casos anteriores queda bien patente que el incremento de la dosis de N aportada no esta relacionada proporcionalmente al incremento del potencial nematicida del lodo de depuradora, no alcanzando en ningún caso el 60%.



**Figura 4.60.**-Mortalidad de *G.rostochiensis* y contenido en N aportado en g/100 g suelo para suelo Testigo (T) y suelo con aportes compost de lodo en dosis de 5, 10 y 20g (L5, L10, L20)

El encalado de este compost de lodo con calcio y el aumento asociado del pH con un incremento de mortalidad desde un 57,4 % a un 86,7 % (Figs.4.60 y 4.61).

Como en el caso del lodo bioestabilizado y dado que el incremento de la dosis añadida de N solo, no es significativo para la obtención del mismo efecto nematicida, hace reflexionar sobre la conveniencia de incrementar la aplicación o el uso de aplicaciones menores, repetidas en el tiempo.



**Figura 4.61.**-Mortalidad de *G.rostochiensis* y contenido en N aportado en g/100 g suelo para suelo Testigo (T) y suelo con aportes de lodo bioestabilizado mas cal en dosis de 5, 10 y 20g (L+C 5, L+C 10, L+C 20)

#### 4.10.2. Resultados de actividades enzimáticas.

##### a) Valores de actividad

**Tabla 4.67.-**Actividades enzimáticas medias para la aplicación de biosólido estabilizado

Trat	bCel	bG A	bXil	bGal	Leu A	bGlc	Ace A	PaIE	AcP	AIKP	SulF	NACGln
<b>T</b>	0,805	10,357	0,794	0,182	1,303	0,210	19,748	1,069	1,100	6,705	0,616	2,388
<b>L 5 i</b>	0,354	6,006	0,499	0,396	0,765	0,493	16,901	0,252	0,881	2,712	0,030	1,256
<b>L 10 i</b>	0,775	8,168	0,803	0,265	3,064	0,254	28,997	1,498	0,817	8,782	0,474	2,462
<b>L 20 i</b>	0,970	6,797	0,670	0,237	2,388	0,213	28,486	0,917	0,348	7,528	0,436	2,280
<b>L 5</b>	0,936	10,421	0,871	0,686	0,802	0,187	14,530	1,622	0,492	3,530		3,293
<b>L 10</b>	0,917	8,599	0,231	0,535	0,356		10,066	1,842	1,096	3,600	0,274	3,067
<b>L 20</b>	1,277	8,829	0,396	0,562	0,637	0,021	16,645	2,233	1,114	4,351	0,326	3,355

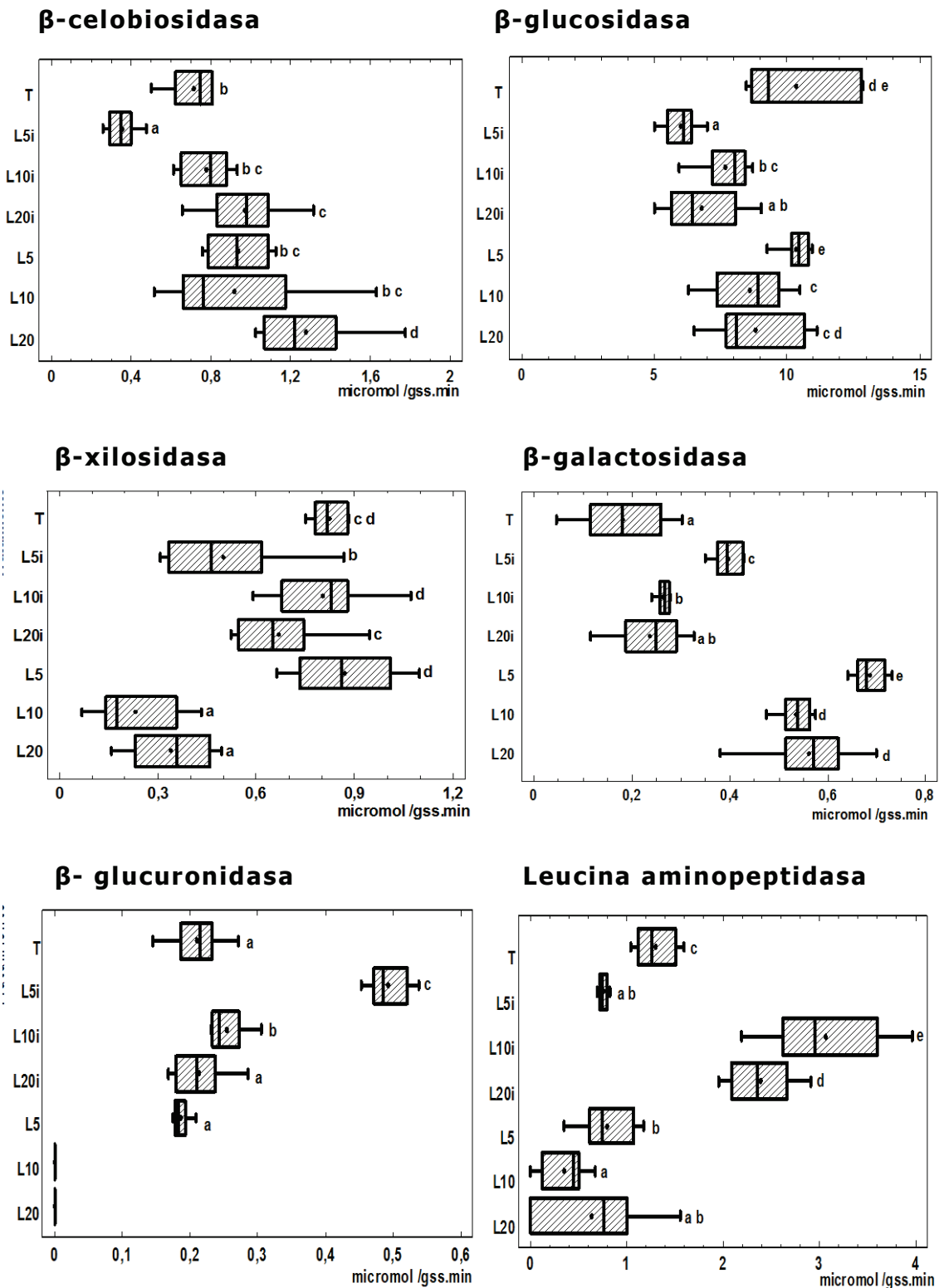
**Tabla 4.68.-** Actividades enzimáticas medias para la aplicación de biosólido estabilizado con adición de cal

Trat	bCel	bG A	bXil	bGal	Leu A	bGlc	Ace A	PaIE	AcP	AIKP	SulF	NACGln
<b>T</b>	0,805	10,357	0,794	0,182	1,303	0,210	19,748	1,069	1,100	6,705	0,616	2,388
<b>L+C 5 i</b>	1,113	8,401	0,733	0,325	3,162	0,234	30,341	0,826	0,588	7,797	0,556	2,109
<b>L+C 10 i</b>	1,408	11,794	1,157	0,290	3,398	0,266	34,863	1,214	0,854	9,260	0,718	2,362
<b>L+C 20 i</b>	1,056	13,900	0,794	0,250	7,454	0,228	36,890	1,414	0,729	8,314	0,543	6,428
<b>L+C 5</b>	1,226	13,611	1,126	0,592	1,329	0,437	18,352	1,783	0,176	3,576	0,092	5,371
<b>L+C 10</b>	2,105	12,851	1,011	0,652	1,906	0,953	20,688	2,086	0,527	5,425	0,352	4,924
<b>L+C 20</b>	1,608	12,529	0,933	0,639	2,027	0,967	12,960	1,474	0,377	3,189	0,266	3,294

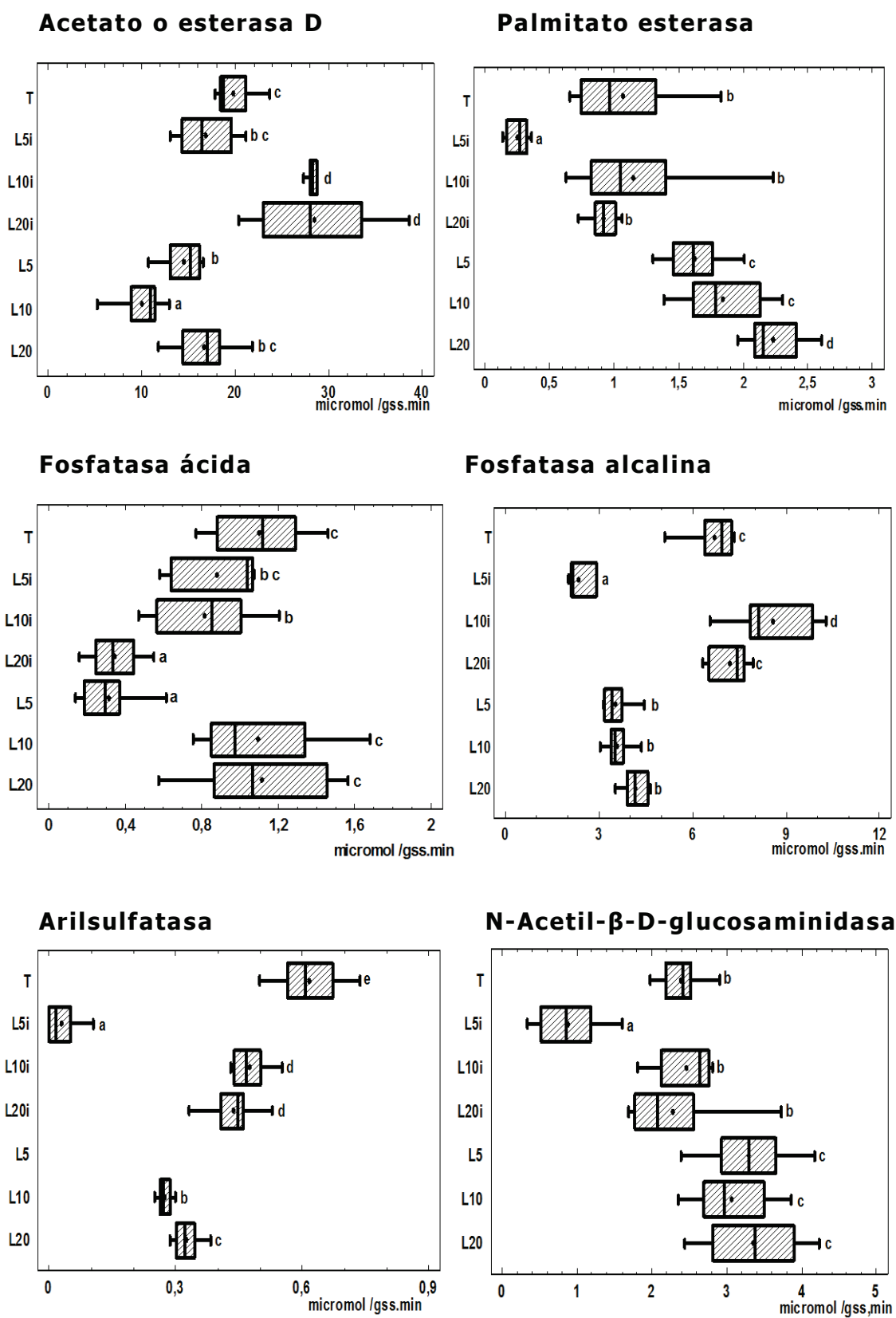


*b) Expresión gráfica de las actividades enzimáticas*

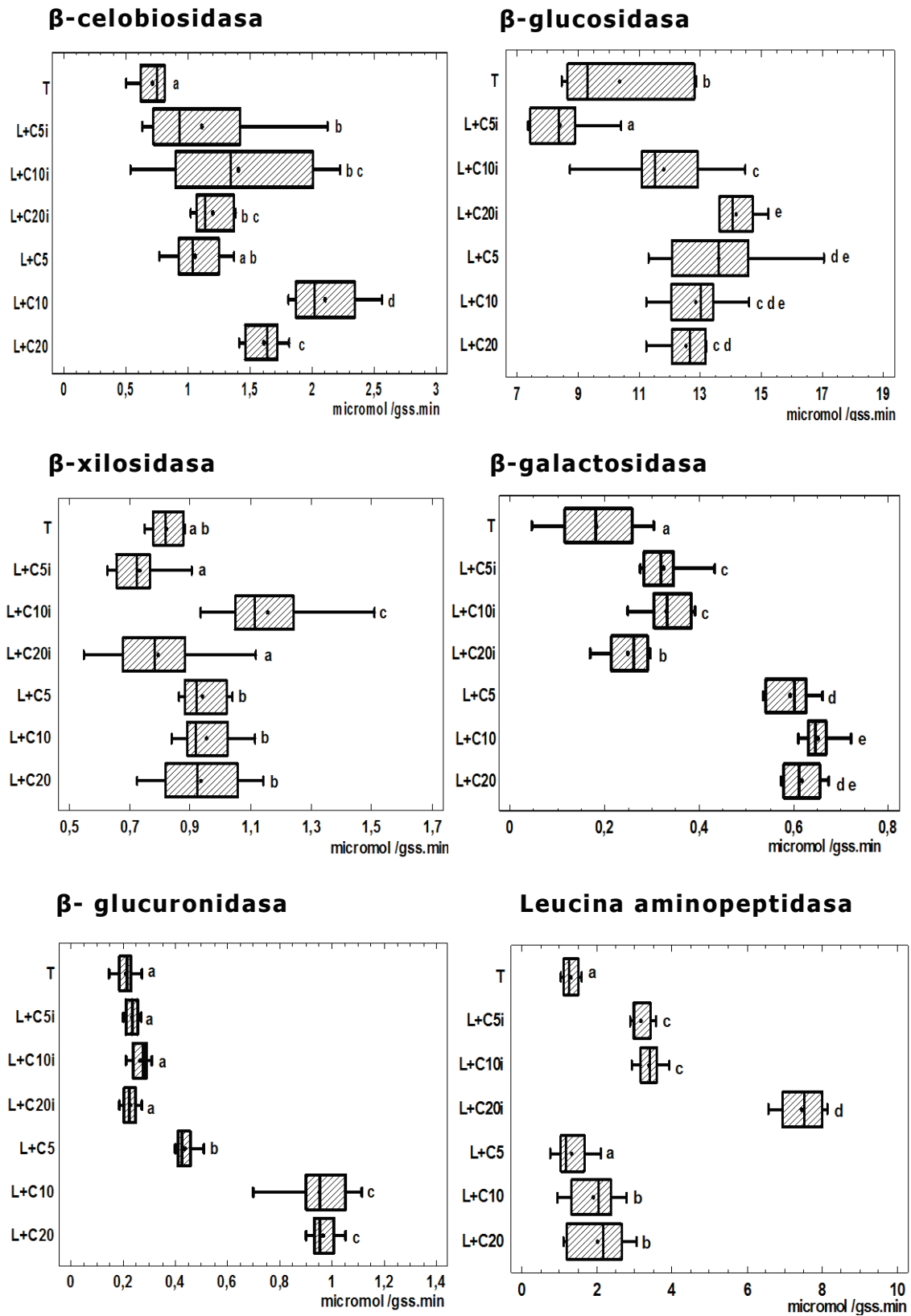
*b.1) Iodo bioestabilizado*



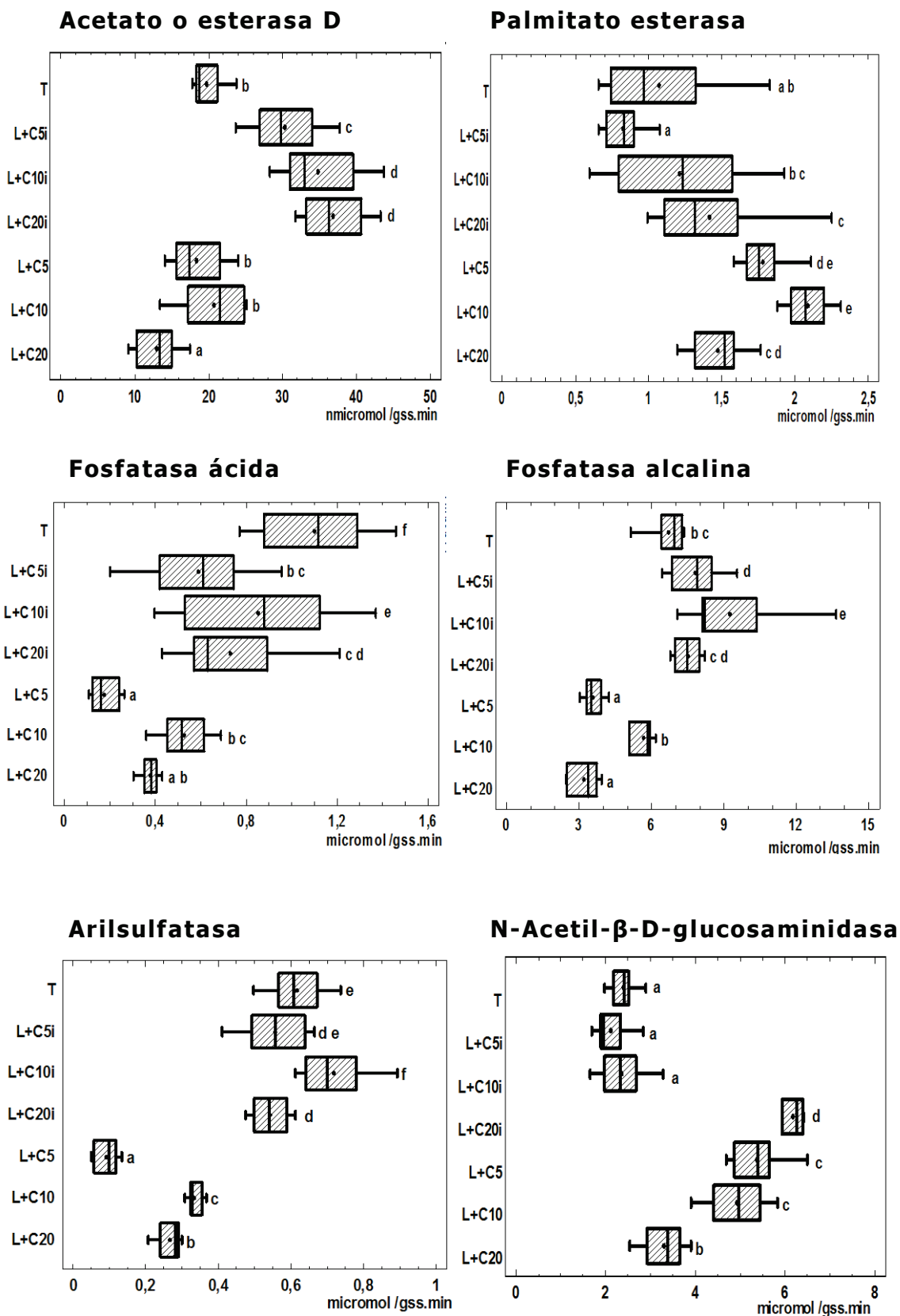
**Figura 4.62.-** Actividades enzimáticas. Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas



**Figura 4.63.-** Actividades enzimáticas. Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas

*b.2) biosólido bioestabilizado con cal*

**Figura 4.64.-** Actividades enzimáticas aplicación de lodo mas cal. Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativa



**Figura 4.65.-** Actividades enzimáticas aplicación de lodo mas cal. Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas

### ***c) Análisis conjunto de resultados enzimáticos***

#### ***c.1) Enzimas relacionadas con el metabolismo glucídico***

El efecto de incubación en la aplicación de compost de lodo de depuradora muestra un ligero incremento de la actividad  $\beta$ -glucosidásica y  $\beta$ -celobiosidásica respecto de la actividad inicial. Este efecto positivo es más intenso para la  $\beta$ -galactosidasa pero claramente negativo para la  $\beta$ -xilosidasa.

Dado que los lodos de depuradora contienen una elevada cantidad de residuos membranosos bacterianos, la actividad degradativa se centra fundamentalmente en la degradación de los galactolípidos existentes en las mismas.

En el caso de la aplicación de cal, se incrementa suavemente la actividad  $\beta$ -celobiosidasa y  $\beta$ -glucosidasa y ligeramente la actividad  $\beta$ -xilosidasa, y mantiene la actividad  $\beta$ -galactosidasa frente al valor encontrado en el lodo anteriormente, lo que resulta consecuente con lo mencionado respecto a los galactolípidos de membrana.

La actividad N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa manifiesta un incremento de actividad, posiblemente porque la aplicación de calcio incrementa el desarrollo fúngico, aun en medios anaeróbicos.

#### ***c.2) Enzimas relacionadas con el metabolismo protéico***

Se observa una reducción drástica tanto de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa como de la leucina aminopeptidasa en el caso del aporte de compost de lodo. La aplicación de Ca genera una clara estimulación de la  $\beta$ -glucuronidasa por encima de los valores de referencia del suelo testigo, y aunque la leucina aminopeptidasa se deprime por elevación del pH también duplica su valor con el aporte de lodo sin presencia de cal.

#### ***c.3) Enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico***

Si las dos esterasas mantienen unos niveles de actividad similares con y sin adición de cal, el efecto de la incubación hace que la acetato deacetilasa (acetato deacetilasa) se deprime en presencia de compost de lodo sin cal en ambos casos. La actividad palmitato esterasa crece proporcional a la dosis aplicada cuando no se aplica cal añadida.

### c.4) Metabolismos terminales del P y S

#### del Fósforo

El proceso de incubación anaeróbica hace que a bajas concentraciones de la aplicación se deprima fuertemente recuperando en dosis mayores su actividad inicial. La existencia de cal disminuye hasta 3 veces estos valores que a su vez son claramente menores que el suelo testigo. La fosfatasa alcalina en ambos casos mantiene un comportamiento y niveles similares.

#### del Azufre

El comportamiento asociado al sulfato repite con y sin cal para la arilsulfatasa.

### 4.10.3. Análisis estadísticos.- Aplicación de biosólido

#### a) Matriz de correlaciones

**Tabla 4.69.-** Muestra las correlaciones de Pearson, entre cada par de variables, para la aplicación de lodo

	bCel A	Ace A	PaIE A	AIKP A	Sulf A	NAcGln A	%Mort
<b>bG A</b>			0,5367 -52 ***				
<b>bGal A</b>	-0,586 -52 ***	0,5885 -53 ***	-0,6528 -50 ***	-0,702 -54 ***			0,8572 -54 ***
<b>bCel A</b>		0,6259 -54 ***				0,591 -54 ***	0,5099 -55 ***
<b>bGlc A</b>	-0,657 -52 ***	-0,8262 -52 ***				-0,732 -52 ***	-0,7088 -53 ***
<b>Ace A</b>			0,7449 -49 ***				-0,648 -53 ***
<b>PaIE A</b>							0,7858 -55 ***
<b>AIKP A</b>							-0,5535 -52 ***
<b>Sulf A</b>				0,7991 -52 ***			
<b>NAcGlnA</b>		0,7454 -54 ***					0,6554 -55 ***

Se muestra, entre paréntesis, el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. Valores de P menores de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$ . Aparece sombreado en amarillo las correlaciones positivas

Considerando solo valores mayores de 0.5, apreciamos correlaciones positivas de la mortalidad de la *G.rostochiensis* con la actividad de la  $\beta$ -galactosa,  $\beta$ -celobiosa, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa y con la palmitato esterasa y correlación negativa con la acetato deacetilasa, fosfatasa alcalina. En cuanto al resto de actividades, las correspondientes a metabolismo glucídico no establecen correlaciones positivas salvo para la palmitato esterasa y N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (esta última solo con la  $\beta$ -celobiosa. Entre las esterases no aparece correlación, pero si entre la acetato deacetilasa y la fosfatasa alcalina. Esta última se correlaciona a su vez positivamente con arilsulfatasa (Tabla 4.69).

### ***b) Análisis de componentes principales***

El análisis permite obtener 4 ejes de variación que explica más de un 96% de la varianza total (Tabla 4.70).

**Tabla 4.70.-** Análisis de componentes principales

Componente		Porcentaje de	Porcentaje
Número	Eigenvalor	Varianza	Acumulado
1	6,2592	48,15	48,15
2	3,5028	26,96	75,09
3	1,7409	13,39	88,49
4	1,0501	8,08	96,56

Se calcula el peso de los componentes para cada actividad:

**Tabla 4.71.-**Análisis de componentes principales. Peso de los componentes

	Comp 1	Comp 2	Comp 3	Comp 4
$\beta$ -glucuronidasa	0,302	-0,299	-0,155	-0,153
$\beta$ -glucosidasa	-0,203	0,248	-0,164	-0,672
$\beta$ -galactosidasa	-0,340	-0,156	-0,293	0,113
$\beta$ -celobiosidasa	-0,237	0,375	-0,046	0,245
$\beta$ -xilosidasa	0,200	0,171	-0,491	-0,461
Fosfatasa ácida	-0,146	-0,021	0,611	-0,350
Acetato deacetilasa	0,324	0,264	-0,102	0,230
Arilsulfatasa	0,150	0,382	0,427	-0,103
N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa	-0,320	0,298	-0,161	0,006
fosfatasa alcalina	0,250	0,412	0,027	0,030
Palmitato esterasa	-0,309	0,309	0,006	0,094
Leucina aminopeptidasa	0,304	0,292	-0,127	0,180
Mortalidad	-0,393	0,011	-0,106	0,111
% de varianza explicada	<b>48.2</b>	<b>26.9</b>	<b>13.4</b>	<b>8.1</b>
% de varianza acumulada	<b>48.2</b>	<b>75.1</b>	<b>88.5</b>	<b>96.6</b>

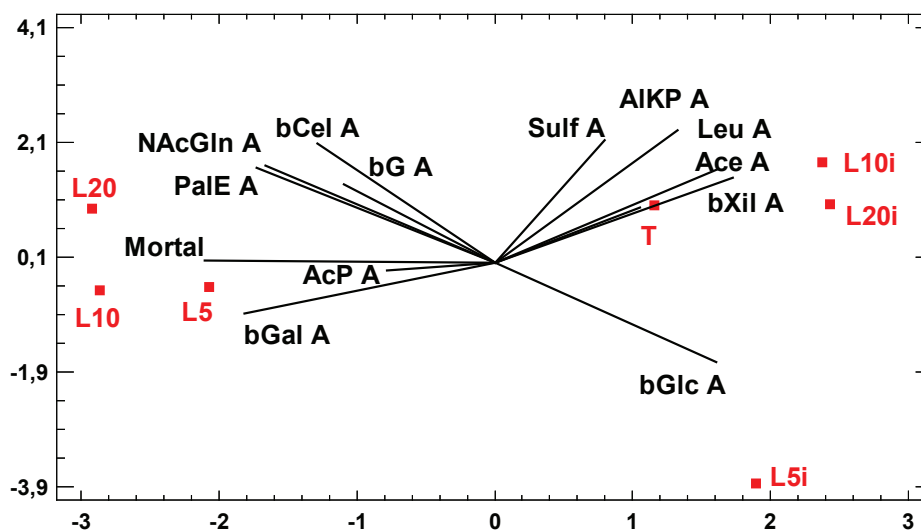
Si consideramos valores mayores de 0.3, el primer componente, que absorbe un 48% de la varianza, viene determinado en igual magnitud por la  $\beta$ -glucuronidasa,  $\beta$ -galactosidasa, acetato deacetilasa, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, palmitato esterasa leucina aminopeptidasa y en mayor proporción la mortalidad. El segundo componente que absorbe un 26,9% de la varianza con un 75,1% de varianza acumulada se relaciona con la  $\beta$ -celobiosidasa, fosfatasa alcalina, palmitato esterasa y leucina aminopeptidasa. El tercer componente que explica un 13,4% de varianza con una varianza acumulada del 88,5 se relaciona con la  $\beta$ -xilosidasa, fosfatasa ácida y arilsulfatasa. El cuarto componente con un 8,1 % de varianza y con un 96.6% de varianza acumulada se relaciona con la  $\beta$ -glucosidasa y con la  $\beta$ -xilosidasa (Tabla 4.71).

Representados en la tabla 4.72, los componentes para cada muestra se obtienen los componentes principales.

**Tabla 4.72.**-Componentes principales para cada muestra de trabajo

	Comp 1	Comp 2	Comp 3	Comp 4
<b>T</b>	1,1653	1,0021	0,9892	-1,8636
<b>L 5 i</b>	1,8646	-3,8390	0,3725	0,0692
<b>L 10 i</b>	2,3855	1,7471	-0,1232	0,0714
<b>L 20 i</b>	2,4439	0,9960	-0,5482	1,3853
<b>L 5</b>	-2,0609	-0,4149	-2,6371	-0,6385
<b>L 10</b>	-2,9052	-0,4273	1,2589	0,4035
<b>L 20</b>	-2,8932	0,9359	0,6881	0,5727

Esto nos permite representar gráficamente componente 2 frente al componente 1, lo que nos facilita la visualización de los resultados obtenidos.



**Figura 4.66.**-Componentes principales C2 frente a C1 para cada muestra de trabajo



La mortalidad se asocia a las dosis aplicadas e incubadas del aporte junto con las actividades  $\beta$ -galactosidasa, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, fosfatasa ácida, palmitato,  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -celobiosidasa. Queda fuera de la agrupación el resto de actividades junto con las muestras no incubadas o sin aporte (T).

#### **4.10.4. Análisis estadístico para la aplicación de biosólido con adición de cal**

##### ***a) Matriz de Correlaciones***

Considerando solo correlaciones con valores mayores de 0,5, aparecen correlaciones positivas importantes con la mortalidad de las actividades  $\beta$ -glucuronidasa,  $\beta$ -galactosidasa, y palmitato esterasa mientras que la correlación es negativa con la fosfatasa ácida, acetato deacetilasa, arilsulfatasa y fosfatasa alcalina (Tabla 4.73).

Del metabolismo glucídico podemos decir que se correlaciona positivamente  $\beta$ -celobiosidasa con  $\beta$ -galactosidasa y esta última con la palmitato esterasa. El metabolismo de las glicoproteínas relaciona la actividad  $\beta$ -glucuronidasa con palmitato esterasa y la acetato deacetilasa y esta con la leucina aminopeptidasa.

Las esterases además de la correlación ya comentada con metabolismo de carbohidratos se correlacionan con N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa. Y por último en el metabolismo del fósforo destaca la correlación entre las dos fosfatasas y la correlación positiva de estas con la aril-sulfatasa.

**Tabla 4.73.-** Muestra las correlaciones de Pearson, entre cada par de variables para la aplicación de lodo con cal

	bGal A	bCel	Leu A	Ace A	PalE A	AcP A	AIKP	Sulf A	NAcGlnA	Mort
<b>bG A</b>				0,651 -55 ***					0,686 -54 ***	
<b>bGal A</b>		0,574 -49 ***		-0,549 -54 ***	0,666 -54 ***	-0,630 -53 ***	-0,623 -52 ***	-0,771 -53 ***		0,926 -54 ***
<b>bGlc A</b>	0,839 -54 ***	0,607 -51 ***		-0,606 -56 ***	0,570 -56 ***		-0,588 -54 ***	-0,579 -55 ***		0,870 -56 ***
<b>Ace A</b>			0,695 -56 ***				0,794 -54 ***	0,605 -55 ***		-0,710 -56 ***
<b>Pal A</b>										0,643 -56 ***
<b>AcP A</b>							0,662 -53 ***	0,707 -54 ***		-0,629 -55 ***
<b>AIKP A</b>										-0,800 -54 ***
<b>Sulf A</b>				-0,527 -55 ***			0,809 -53 ***		-0,505 -54 ***	-0,862 -55 ***
<b>NAcGln A</b>					0,596 -55 ***					

Se indica, entre paréntesis, el número de pares de datos usado para calcular cada coeficiente. Valores de p menores de 0.05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%. \* P < 0,05 \*\* p<0,01 \*\*\* p<0,001. En amarillo se sombre las correlaciones positivas entre las actividades estudiadas.

### *b) Análisis de componentes principales*

Mediante este tipo de análisis obtenemos 3 ejes de variación que permiten explicar el 87,2 % de la varianza total (Tabla 4.74).

**Tabla 4.74.-** Análisis de componentes principales

Componente		Porcentaje de	Porcentaje
Número	Eigenvalor	Varianza	Acumulado
1	7,608	58,5	58,5
2	2,462	18,9	77,5
3	1,264	9,7	87,2

Si lo referimos a la tabla de pesos de los componentes (Tabla 4.75).

**Tabla 4.75.-** Análisis de los componentes principales indicadores del peso de cada componente

	Comp 1	Comp 2	Comp 3
B glucuronidasa	0,310	-0,081	0,220
B glucosidasa	0,209	0,461	-0,030
B galactosidasa	0,352	-0,043	0,078
B celobiosidasa	0,255	0,056	0,543
B xilosidasa	0,188	0,105	0,469
Fosfatasa acida	-0,291	-0,054	0,227
Acetato de acetilasa	-0,263	0,368	0,192
ArilSulfatasa	-0,325	0,005	0,358
N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina	0,156	0,521	-0,286
Fosfatasa alcalina	-0,318	0,191	0,312
Palmitatoesterasa	0,307	0,252	0,150
leucinaminopeptidasa	-0,168	0,502	-0,107
% mortalidad	0,360	-0,058	-0,009
% de varianza explicada	58,5	19,0	9,7
% de varianza acumulada	58,5	77,5	87,2

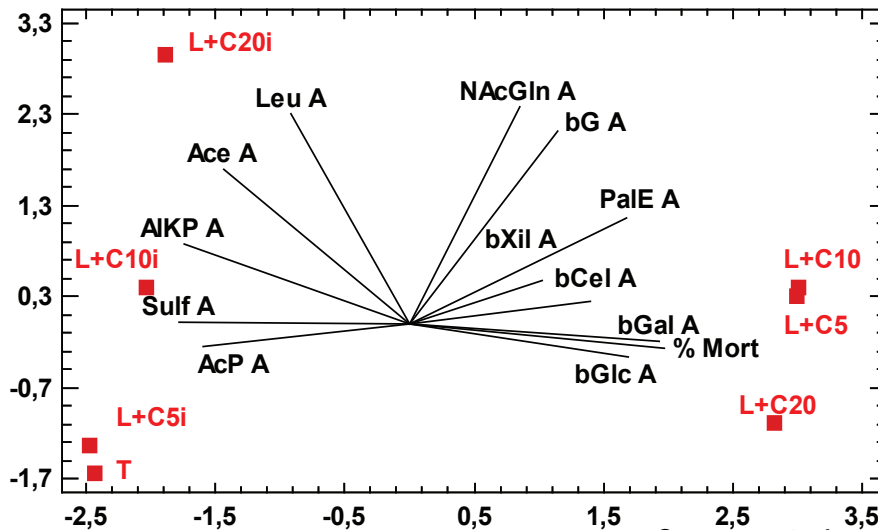
El primer componente que absorbe un 58,5% de la varianza, se determina con  $\beta$ -glucuronidasa,  $\beta$ -galactosidasa, arilsulfatasa, fosfatasa alcalina, palmitato esterasa y mortalidad. El segundo explica un 19% de la varianza y un 77,5 % acumulado con la  $\beta$ -glucosidasa, acetato de acetilasa, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, y la leucina aminopeptidasa y el tercero que explica un 9,7% de la varianza y un 87,2 % de varianza acumulada lo hace con  $\beta$ -celobiosidasa,  $\beta$ -xilosidasa, arilsulfatasa y fosfatasa alcalina.

Y trasladando los valores de las componentes para cada muestra se obtiene la tabla de componentes principales tabla 4.76.

**Tabla 4.76.-** Componentes principales para cada una de las muestras de trabajo

	Comp 1	Comp 2	Comp 3
<b>T</b>	-2,430	-1,643	-0,516
<b>L+C5i</b>	-2,474	-1,328	-0,433
<b>L+C10i</b>	-2,033	0,392	1,903
<b>L+C20i</b>	-1,883	2,951	-0,889
<b>L+C5</b>	2,990	0,313	-1,051
<b>L+C10</b>	3,005	0,403	1,244
<b>L+C20</b>	2,824	-1,088	-0,258

Si representamos gráficamente un componente frente a otro relacionamos los grupos presentes entre los diferentes tratamientos que se evaluarán en el apartado de discusión.

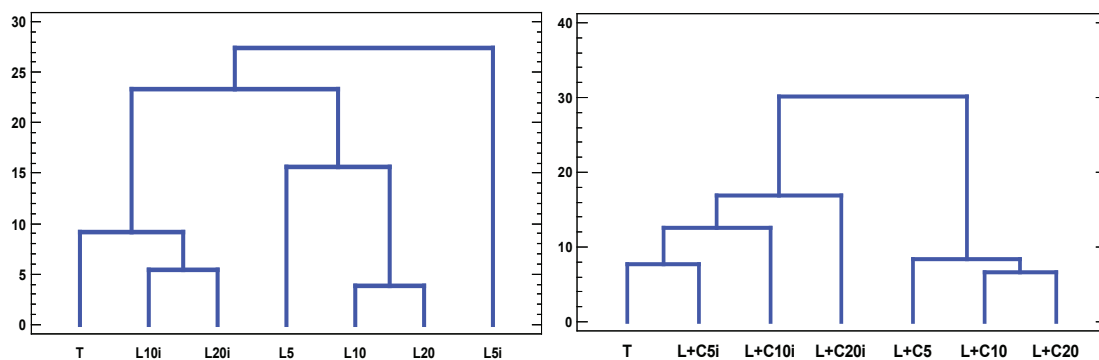


**Figura 4.67.-** Representación de componente 2 frente a 1 para las aplicaciones de biosólido estabilizado con cal

La representación nos lleva a asociar las aplicaciones incubadas de biosólido con cal y la mortalidad del nematodo estudiado *G.rostochiensis* claramente diferenciado de las muestras no incubadas.

Esto asocia las actividades enzimáticas según la figura claramente las relacionadas con la capacidad nematicida del aporte.

La agrupación de experiencias por similitudes nos ayuda a interpretar los resultados a partir del dendograma como aparece en las figuras siguientes:



**Figura 4.68.-** Dendograma agrupando según características similares la aplicación de lodo sin y Ca como estabilizador

Agrupados según las mínimas diferencias por un lado las muestras incubadas estableciendo una relación mayor para las dosis mayores. Queda fuera de la agrupación previsible la dosis menor inicial, que se supone debería agruparse con las dosis iniciales y el testigo (Fig. 4.68).

En el caso de la aplicación de cal los grupos están establecidos por tratamientos iniciales con el testigo en dosis crecientes y de forma separada en otra asociación los tratamientos incubados (Fig. 4.68).

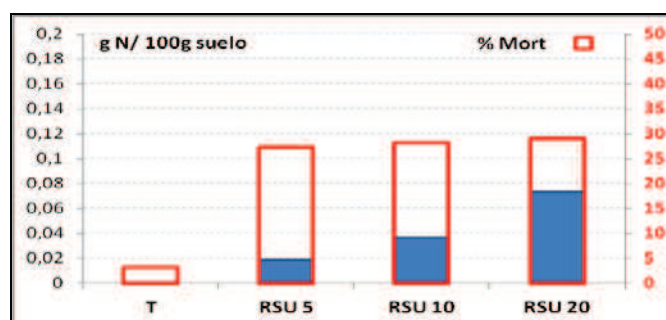
#### 4.11. EXPERIENCIA XI.- APLICACIÓN EN LABORATORIO DE RESIDUO SÓLIDO URBANO RSU, BIOESTABILIZADO

##### 4.11.1. Resultados del análisis nematológico

Se representamos la capacidad nematocida en función del aporte N (gN / 100g suelo) (Tabla. 4.77).

**Tabla 4.77.**-Contenido en N de cada muestra y su relación con la mortalidad

	aporte g N / 100 g suelo	% mortal
<b>T</b>	0	3,2
<b>RSU 5</b>	0,01838	27,3
<b>RSU 10</b>	0,03677	28,22
<b>RSU 20</b>	0,07355	29,09



**Figura 4.69.**-Mortalidad de *G.rostochiensis* y contenido en N aportado en g/100 g suelo para suelo Testigo (T) y suelo con aportes de RSU en dosis de 5, 10 y 20g (RSU5, RSU 10, RSU 20)

Las dosis de RSU aportadas y con ellas la dosis de N, no incrementan la mortalidad del nematodo *G.rostochiensis* de una forma apreciable ya que únicamente logran un aumento del 27 al 29 % siendo hasta el momento, junto con los restos de fresa, el aporte experimentado con menor capacidad nematocida (Fig. 4.69).

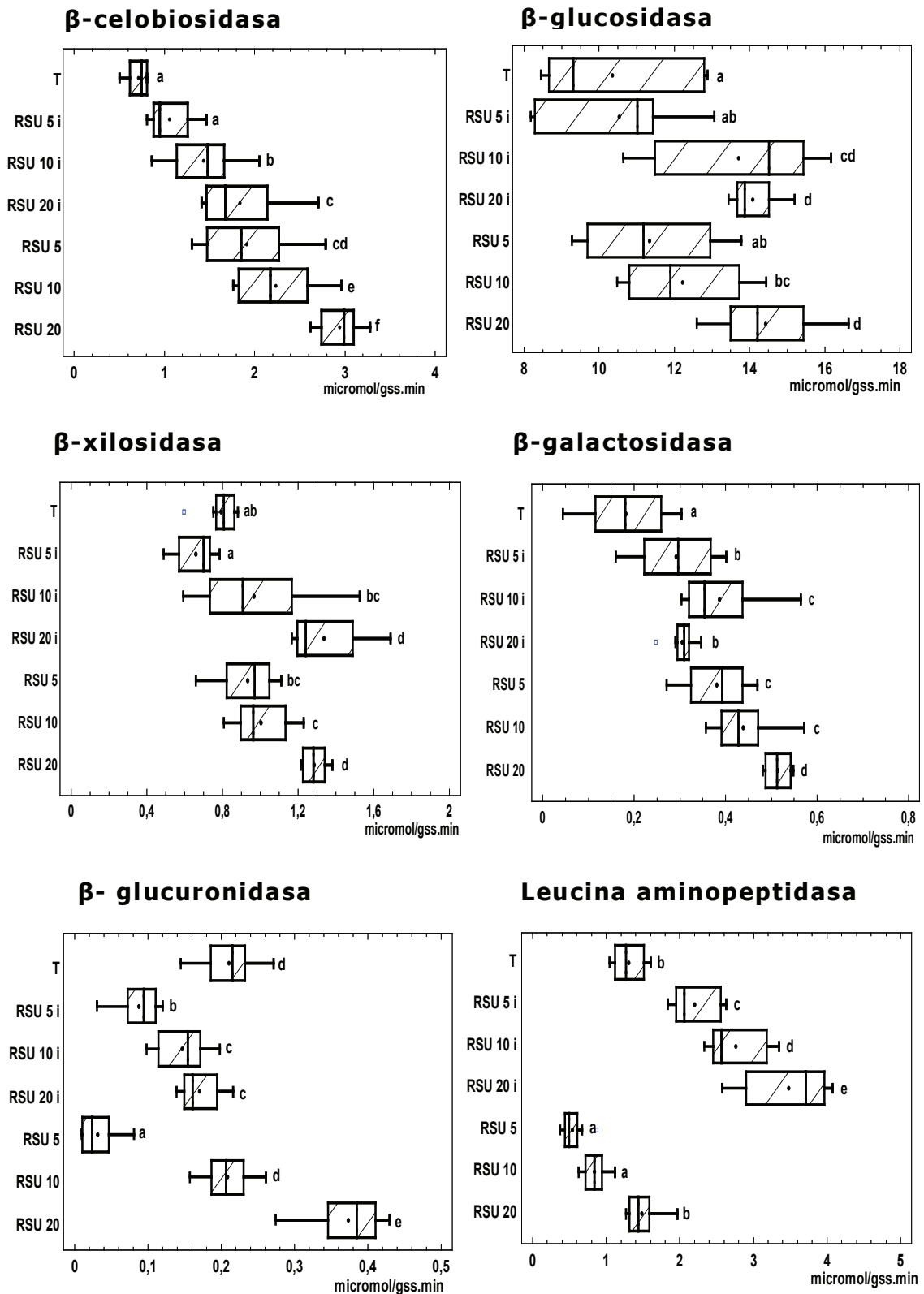
##### 4.11.2. Resultados de actividades enzimáticas.

###### a) valores de actividad

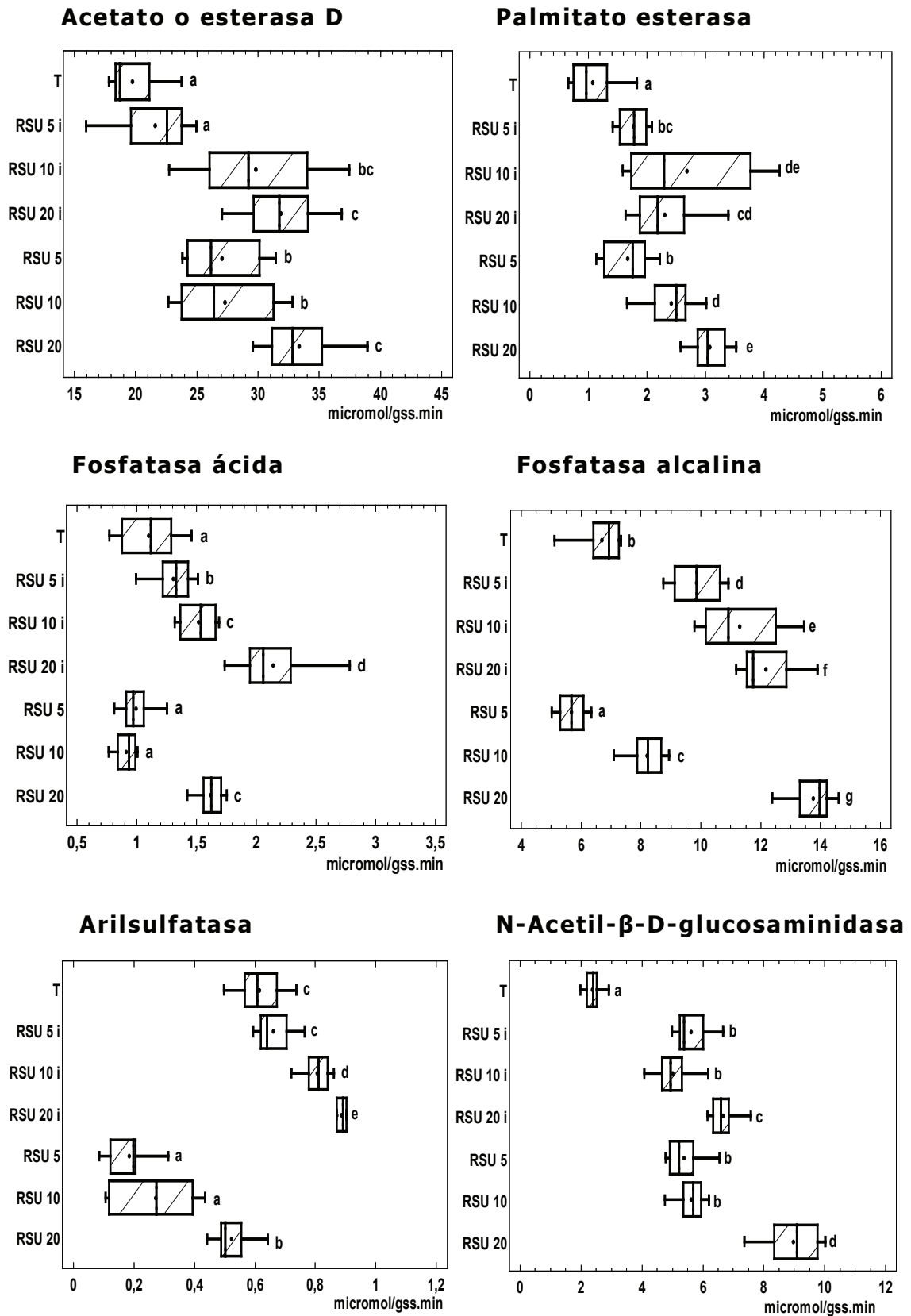
**Tabla 4.78.**- Actividades enzimáticas para el uso de bioresiduo urbano estabilizado

Trat	bCel	bG A	bXil A	bGal	Leu A	bGlc	Ace A	PaIE	AcP A	AIKP	Sulf	NAcGln
T	0,805	10,357	0,794	0,182	1,303	0,210	19,748	1,069	1,100	6,705	0,616	2,388
RSU 5 i	1,057	11,552	0,660	0,292	2,199	0,088	21,597	1,765	1,376	9,865	0,661	5,611
RSU 10 i	1,435	13,711	0,967	0,386	2,762	0,147	29,828	2,678	1,663	11,305	0,807	5,013
RSU 20 i	1,838	15,177	1,338	0,305	3,475	0,171	31,865	2,302	2,139	12,171	0,888	6,663
RSU 5	1,911	11,334	0,931	0,381	0,539	0,032	27,057	1,667	0,994	5,680	0,185	5,374
RSU 10	2,237	12,219	1,003	0,439	0,842	0,208	27,295	2,409	0,913	8,206	0,271	5,617
RSU 20	2,944	14,436	1,286	0,534	1,486	0,373	33,372	3,071	1,619	13,746	0,522	8,967

*b) Expresión gráfica de las actividades enzimáticas*



**Figura 4.70.-** Actividades enzimáticas. Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas



**Figura 4.71.-** Actividades enzimáticas aplicación de RSU bioestabilizado. Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores que comparten una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas



### ***c) Análisis de resultados enzimáticos***

#### ***c.1) enzimas relacionadas con el metabolismo glucídico***

Un análisis del comportamiento de las enzimas relacionadas con el metabolismo de los azúcares nos indica que salvo en la  $\beta$ -galactosidasa, los valores de actividad  $\beta$ -celobiosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilosidasa, se incrementan de forma más o menos proporcional con la aplicación de la dosis de RSU.

El proceso de incubación aunque incrementa en todos los cuatro casos su nivel de actividad en función de la dosis, el punto de partida de ese incremento es distinto para cada enzima apreciándose que en la  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilosidasa el valor de la dosis menor corresponde al valor del testigo.

Si nos fijamos en la  $\beta$ -celobiosidasa y  $\beta$ -galactosidasa el valor de sus actividades es el más elevado de las valoraciones realizadas.

La actividad N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa parece estar limitada según la dosis aportada al no ser proporcional a la dosis equivalente respecto al comportamiento del suelo. Esta limitación no es superada durante el proceso excepto en la dosis más alta donde el valor de esta capacidad catalítica casi duplica en general a todo el resto de las medidas obtenidas.

#### ***c.2) Enzimas relacionadas con el metabolismo protéico***

Un análisis del comportamiento de ambas enzimas degradativas nos muestra que el suelo ejerce una inhibición de la  $\beta$ -glucuronidasa mientras que la leucina aminopeptidasa mantiene intactos los valores que contienen los aportes del RSU.

El proceso de incubación también afecta de manera opuesta a ambas enzimas así la  $\beta$ -glucuronidasa a bajas dosis contenida en la mezcla suelo-RSU 5 ha sufrido una fuerte inhibición la cual desaparece en RSU 10 o en RSU 20.

La leucina aminopeptidasa durante el proceso de incubación solo consigue alcanzar un valor similar al del suelo en la dosis más alta, mientras que en aplicaciones menores no encontraría sustrato suficiente para desarrollar su actividad.

### ***c.3) Enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico***

El comportamiento catalítico de la palmitato esterasa y acetato deacetilasa es similar entre ellos y con respecto al testigo tanto en el momento inicial de aplicación del RSU como durante el proceso de incubación mostrando un desarrollo de actividad más intenso en la medida en que la dosis de RSU es más alta.

### ***c.4) Metabolismos terminales del P y S***

#### ***del fosfato***

La fosfatasa ácida (libre) es inhibida durante el proceso de incubación excepto en la dosis más alta, posiblemente porque este residuo orgánico bioestabilizado contiene altas cantidades de fosfato potencialmente disponible, lo cual es de esperar al ser de aplicación agronómica.

En cuanto a la actividad fosfatásica ubicada en sistemas membranosos (fosfatasa alcalina), los valores iniciales inmediatamente después de hacer el aporte son una expresión del alto índice biológico que el residuo aporta en forma activa y que el proceso de incubación en anaerobiosis obliga a reorganizar en sus actores.

Ello justifica el que en dosis pequeñas la actividad fosfatasa alcalina sea inferior a la del propio suelo y la mitad del valor obtenido después de aplicar de forma inmediata el RSU. La dosis más alta posiblemente con más recursos en cuanto a su organización biológica en un medio hipóxico, nos muestra al final de la prueba el resultado más elevado.

#### ***del sulfato***

Con respecto a la arilsulfatasa sus resultados en todos los casos una vez se realiza la incubación son inferiores a los del suelo testigo y nos recuerdan claramente a los obtenidos para la capacidad proteolítica definida por la leucina aminopeptidasa.

### 4.11.3. Análisis estadístico

#### a.) Matriz de Correlaciones

Considerando solo correlaciones con valores mayores de 0,5.

**Tabla 4.79.-**Correlaciones de Pearson, entre cada par de variables para la aportación de RSU

	bGal A	bCel A	bXil A	Leu A	Ace A	PalE A	AcP A	AIKPA	Sulf A	NAcGlnA	Mort
<b>bG A</b>	0,520 -51 ***		0,588 -52 ***		0,656 -53 ***	0,566 -53 ***	0,546 -51 ***	0,651 -53 ***			
<b>bGal A</b>		0,666 -53 ***			0,601 -54 ***	0,648 -54 ***				0,608 -54 ***	0,628 -54 ***
<b>bCel A</b>			0,511 -54 ***		0,554 -55 ***	0,561 -55 ***				0,737 -55 ***	0,716 -55 ***
<b>bXil A</b>					0,656 -55 ***		0,567 -53 ***	0,554 -55 ***		0,541 -55 ***	
<b>Leu A</b>											-0,694 -55 ***
<b>bGlc A</b>			0,514 -55 ***					0,578 -56 ***			
<b>Ace A</b>						0,577 -56 ***		0,600 -56 ***		0,607 -56 ***	
<b>AcP A</b>				0,808 -53 ***	0,528 -54 ***			0,747 -54 ***	0,711 -49 ***		
<b>AIKP A</b>				0,629 -55 ***		0,609 -56 ***					
<b>Sulf A</b>				0,86 -50 ***							-0,784 -50 ***
<b>NAcGlnA</b>						0,604 -56 ***		0,673 -56 ***			

Se indica, entre paréntesis, el número de pares de datos usado para calcular cada coeficiente. Valores de p menores de 0.05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%. \* P < 0,05 \*\* p<0,01 \*\*\* p<0,001 Aparece coloreado en amarillo las correlaciones positivas.

Podemos destacar correlaciones positivas entre la mortalidad y la actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -celobiosidasa y con correlación negativa en arilsulfatasa y leucina aminopeptidasa (Tabla 4.79).

Las correlaciones indican también una suave relación entre el metabolismo de los carbohidratos con valores no muy elevados y con una única relación de la  $\beta$ -xilosidasa con la  $\beta$ -glucuronidasa. La leucina aminopeptidasa se correlaciona con el metabolismo del P, del S, únicas correlaciones de las dos proteasas presentes.

Las esterases se correlacionan positivamente entre ellas y además de con todos los carbohidratos lo hacen con la fosfatasa ácida y alcalina (la leucina con ambas y la palmitato solo con la fosfatasa alcalina).

Las fosfatasas también están con correlaciones próximas a 0,6 con carbohidratos y esterases como ya se ha visto, y con arilsulfatasa (únicamente la fosfatasa ácida) y con N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (solo la alcalina).

Por último la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa se correlaciona con todas las enzimas estudiadas salvo  $\beta$ -glucosidasa, ninguna de las proteasas, fosfatasa ácida (pero sí la alcalina) y arilsulfatasa.

### *b) Análisis de Componentes Principales*

El análisis permite obtener dos únicos ejes de variación que explican más de un 87,88 % de la varianza total (Tabla 4.81).

**Tabla 4.80.**-Análisis de componentes principales

Componente		Porcentaje de Varianza	Porcentaje Acumulado
Número	Eigenvalor		
1	7,259	55,84	55,84
2	4,165	32,04	87,88

De acuerdo con esto los pesos de los componentes quedarían:

**Tabla 4.81.**- Análisis de componentes principales. Peso de los componentes

	Comp 1	Comp 2
$\beta$ -glucuronidasa	0,225	-0,067
$\beta$ -glucosidasa	0,348	0,147
$\beta$ -galactosidasa	0,276	-0,292
$\beta$ -celobiosidasa	0,297	-0,288
$\beta$ -xilosidasa	0,326	-0,005
Fosfatasa acida	0,248	0,352
Acetato deacetilasa	0,350	-0,044
Arilsulfatasa	0,094	0,468
N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa	0,330	-0,110
Fosfatasa alcalina	0,323	0,185
Palmitato esterasa	0,343	-0,056
Leucina aminopeptidasa	0,145	0,443
% mortalidad	0,112	-0,465
% varianza explicada	<b>55,84</b>	<b>32,04</b>
% varianza acumulada	<b>55,84</b>	<b>87,88</b>

Considerando el valor mayor de cada componente para cada actividad por encima de 0,3, el primer componente absorbe un 55,84 y viene

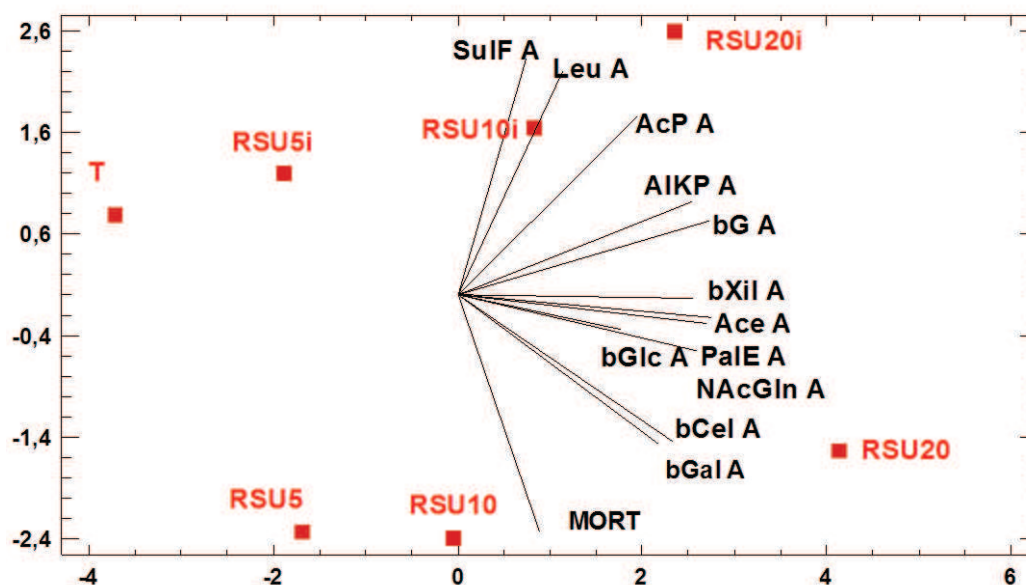
determinado por la  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -xilosidasa, acetato deacetilasa, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, fosfatasa alcalina y palmitato esterasa. El segundo componente que explica un 32 % de la varianza con un 87,88 % de varianza acumulada se relaciona con la actividad de la fosfatasa ácida, arilsulfatasa, leucin aminopeptidasa y la mortalidad (Tabla 4.81).

Trasladando los valores de las componentes para cada muestra y se obtiene la tabla de componentes principales (Tabla 4.82).

**Tabla 4.82.-** Componentes principales para cada uno de las muestras de trabajo

	Comp 1	Comp 2
<b>T</b>	-3,714	0,792
<b>RSU 5 i</b>	2,352	2,596
<b>RSU 10 i</b>	0,837	1,650
<b>RSU 20 i</b>	-1,879	1,205
<b>RSU 5</b>	-1,694	-2,331
<b>RSU 10</b>	-0,042	-2,383
<b>RSU 20</b>	4,139	-1,529

Lo que permite representar estos componentes C2 frente a C1.

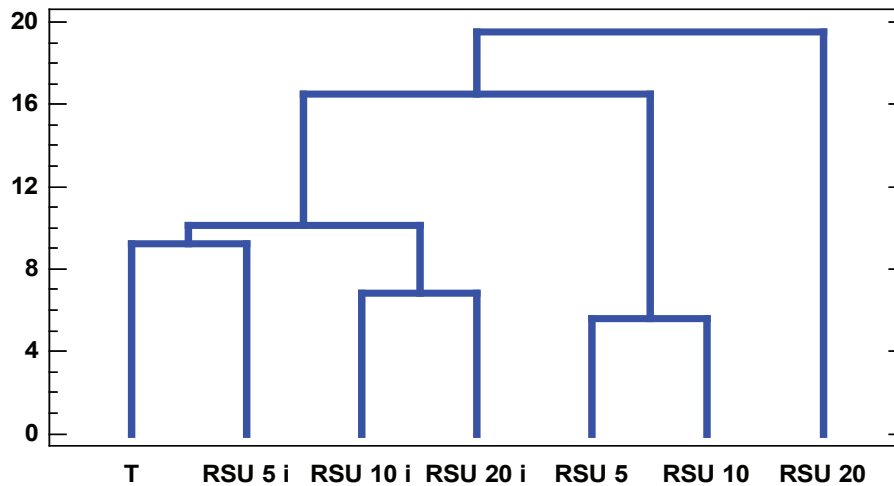


**Figura 4.72.-** Componentes C2 frente a C1 para esta experiencia de aplicación de bioresiduo urbano estabilizado

Las muestras iniciales junto con el testigo se asocian a leucina aminopeptidasa, arilsulfatasa y fosfatasas. Las muestras con RSU

incubadas se agrupan y se relacionan con la mortalidad, y con el resto de las actividades enzimáticas estudiadas.

A partir de los datos estadísticos podemos asociar según el dendograma similitudes en las aplicaciones.



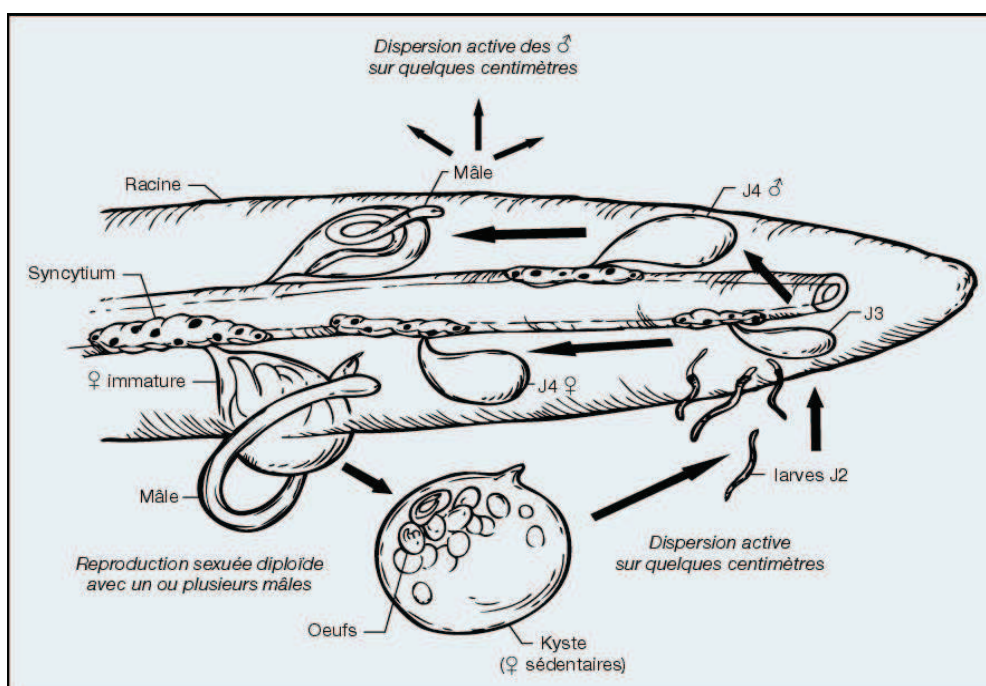
**Figura 4.73.-** Dendrograma que agrupa según características similares

Se aprecian similitudes entre las aplicaciones sin incubar y el testigo, y en orden creciente con la dosis utilizada según los resultados enzimáticos como era previsible, y de igual manera se agrupan para las muestras incubadas.

## 5.-DISCUSIÓN

Según Oka (2010), la actividad nematicida de un suelo y de los aportes que se aplican para este fin, puede circunscribirse a las capacidades derivadas de la presencia de bacterias, y hongos, su ubicación edafoespacial, sus metabolitos finales en forma líquida o gaseosa cedidos a la solución del suelo, y de cambios en la distribución espacial del espacio poral derivada de la naturaleza y susceptibilidad degradativa de las enmiendas aportadas, que permiten la entrada en juego de otros componentes de la fauna edáfica predadores de nematodos. Otros constituyentes inorgánicos, como los argílicos (alumínico-silicatados o amorfos de oxihidróxidos de Fe y Al,) sobre cuyas superficies pueden quedar en formas no disponibles, pueden jugar también papeles desconocidos a efectos de control de las actividades enzimáticas relacionadas.

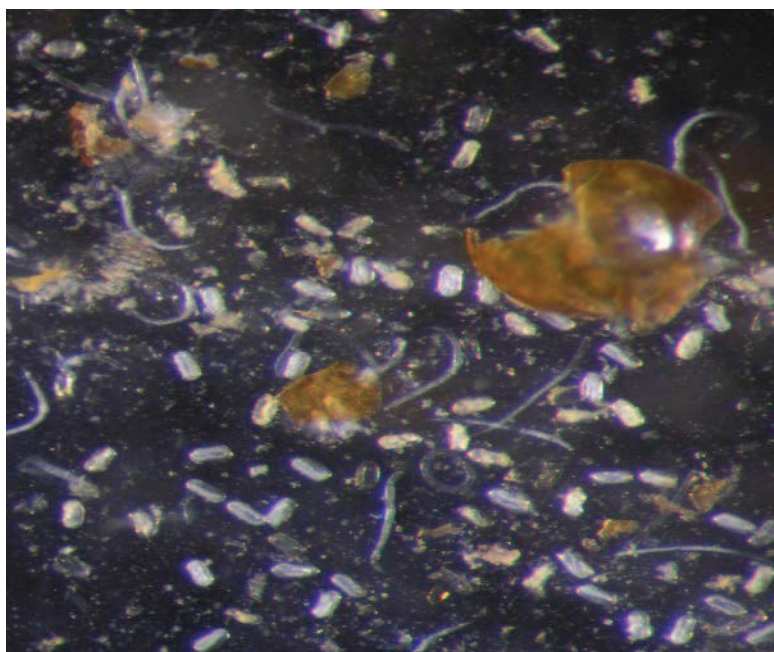
Para la actuación de los enzimas como componentes nematicidas de las enmiendas, o indicadores del proceso de muerte del animal nematodo, es conveniente visualizar el ciclo biológico del animal (Fig. 5.1) y conocer cual es el estadio más frágil para la acción de los hongos/bacterias.



**Figura 5.1.-** Representación esquemática de los ciclos de vida de *G. rostochiensis*, quiste, y etapas de desarrollo J2, J3, J4. (Caster-Picard, 2008)

Y conocer con claridad las barreras morfológicas y las estructuras de defensa que oponen el huevo, el quiste y el animal *G. rostochiensis* en

estado de libertad (forma juvenil J2) en el suelo, independientemente de la planta afectada (Fig.5.2).



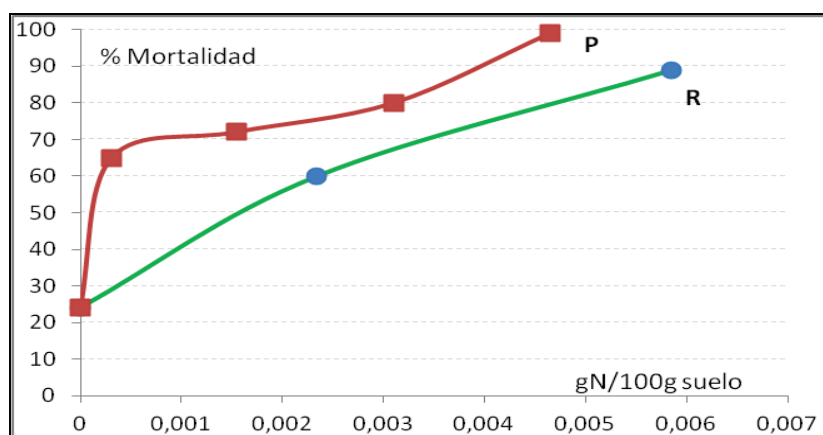
**Figura 5.2.-** *G. rostochiensis*: Quiste abierto, huevos y formas juveniles. Objetivos diana de la acción enzimática nematicida

En este escenario, las revisiones y trabajos que se han analizado sobre la capacidad supresora de nematodos, suelen excluir o se dan por supuestas, descripciones de las organizaciones y dianas moleculares que son propias de *G. rostochiensis*, de su quiste y de sus huevos (que deben de ser degradadas), sobre las que los enzimas van a actuar, y su interconexión con el ámbito enzimático y metabólico del suelo, quedando hoy un vacío de conocimiento, que solamente se explica por un "incremento o descenso de ciertas actividades enzimáticas, variaciones de la tasa respiratoria, y del carbono lábil"... Algunas han sido expuestas en la parte teórica, asociadas a los propios enzimas.

También se mencionó la existencia de una clara confusión sobre un patrón de referencia que normalice el efecto nematicida de las enmiendas que se aplican al suelo. Unos indican, que para que este ocurra, la enmienda debe de tener la relación C/N inferior a 15 (Mian *et al.*, 1982). Otros, que estas enmiendas de bajo C/N deben de aplicarse en concentraciones elevadas (Badra *et al.*, 1979; Rodríguez-Kábana *et al.*, 1981) y un tercer grupo nos indica que compuestos como la urea deben degradarse y liberar amoníaco u otros compuestos volátiles, para ejercer tal efecto (Oka, 2010).

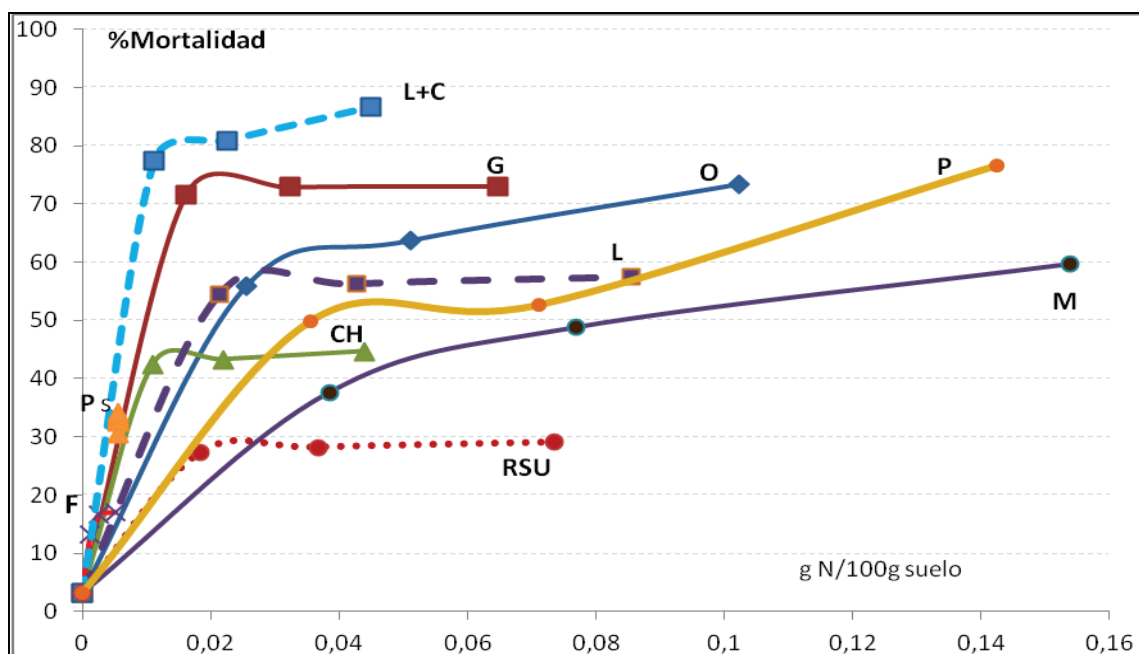


En la experimentación de esta Tesis Doctoral, se muestra en primer lugar (Fig.5.3) un orden de relación de la acción nematicida (mortalidad) en función del N aportado en cada una de las enmiendas más eficaces (purín líquido de cerdo y aporte sólido de rábano triturado).



**Figura 5.3-** Porcentaje de actividad nematicida comparada entre purín líquido de cerdo (rojo) y aportes sólidos de rábano (verde)

Queda evidente que el mecanismo nematicida que se desarrolla en el seno de cada experimento, es diferente y no depende exclusivamente del N aportado, por otro lado atribuible al  $NH_3$  liberado en el caso del purín líquido (Oka, 2010), dado el olor a amoníaco que se libera espontáneamente y que no es detectable en el aporte de rábano.

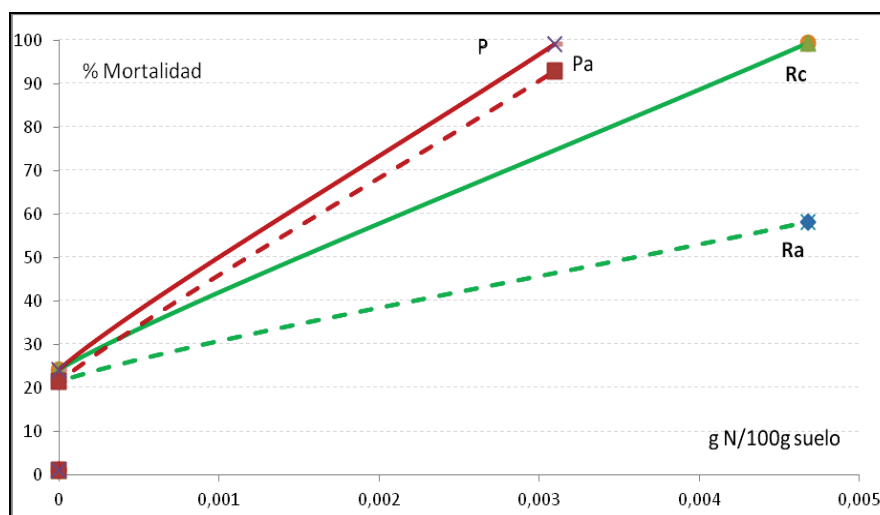


**Figura 5.4.-** Representación de la mortalidad frente al contenido en N aplicado para cada enmienda utilizada

Al incrementar la dosis de dos enmiendas (de reconocida efectividad) observamos que a la misma cantidad de N aportado, el purín de cerdo alcanza el 100%, superior en un 15% a los fragmentos triturados de rábano (cultivado "ex profeso"), lo que nos indica, la necesidad de añadir una cantidad superior de restos de rábano para alcanzar la tasa del 100% obtenido con el purin. Uniendo estos resultados al resto de las experiencias (Fig. 5.3 y 5.4) nos encontramos que sobre un mismo suelo:

- Cada enmienda muestra un nivel máximo de actividad nematicida.
- El rango de la eficacia nematicida inmediata máxima se alcanza rápidamente, con un tope asociado a un contenido en N mínimo, que se encuentra en un intervalo entre 0 y 0,02 g/100g de suelo (Fig. 5.3 y 5.4)
- El orden de capacidad nematicida de las enmiendas (unidas las dos figuras) que se ha podido establecer es el siguiente:

**Purín (liq) > Rábano > Lodo de EDAR+cal > Gallinaza > Estiércol de oveja > Lodo de EDAR > Purín sólido > Restos de champiñón > Restos de maíz > RSU > Restos de Fresa**



**Figura 5.5.-** % de actividad nematicida comparada entre purín líquido de cerdo y aportes sólidos de rábano en ámbitos con libertad o limitación del intercambio de oxígeno (experimentos en bolsas abiertas y cerradas, respectivamente)

Al evaluar la génesis de compuestos nematicidas vía anaerobiosis (experiencias en bolsa cerrada y ámbitos anaeróbicos), se aprecia un incremento de eficacia, hecho que es más significativo en el caso del aporte del rábano (generación de tiocianatos e isotiocianatos, a partir

de glicosinolatos (Sarwar *et al.*, 1998; Goud *et al.*, 2004) por una ruta enzimática compleja (Bonnes y Rossiter, 1996)) (Fig. 5.5) que en la aplicación de purín líquido, donde para la liberación de NH<sub>3</sub> basta la intervención de la actividad ureásica bacteriana la cual no precisa de ambiente reductor para actuar y en el que solo la presencia de bacterias es suficiente, pues dada la capacidad osmótica de la urea (bactericida), se excretan a gran velocidad, como una herramienta defensiva (Moliner, 1979; González-Carcedo, *et al.*, 1990).

La discusión se organiza en una primera parte, agrupando todas las experiencias por enmiendas según su origen (animal, vegetal y antrópica), con una exposición comentada de las capacidades enzimáticas asociadas con la muerte de *G. rostochiensis* y los diagramas de flujo metabólico generados en función de los coeficientes de correlación hallados, con comentarios sobre asociaciones enzimáticas de índole metabólico, que permitan conocer causas independientes asociadas con la mortalidad del nematodo y/o la salud del suelo.

En todo caso, esta discusión se hace con el propósito de mantenerla abierta a nuevas aportaciones y el desarrollo de nuevas estrategias, que permitan establecer el fundamento de acciones nematicidas basadas en la físico-química, la bioquímica y el metabolismo de suelos.

### **5.1. PUESTA DE MANIFIESTO EN LABORATORIO DE LAS ACTIVIDADES NEMATICIDA Y METABÓLICA RESILIENTES MEDIANTE SATURACION DEL SUELO CON AGUA DESTILADA**

La humectación del suelo es un hecho natural (lluvia) que puede ser utilizado técnicamente, (riego) en la lucha contra los nematodos. De aquí que el primer experimento planificado fue el comportamiento del suelo cuando una vez hidratado manifieste su capacidad nematicida, guardada en el seno de las estructuras agregacionales o texturales que posee.

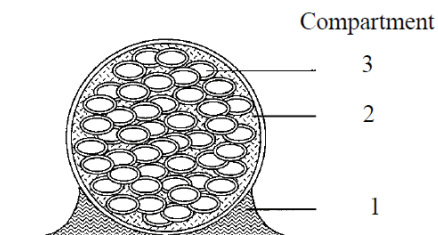
Los resultados nos han mostrado que la mortalidad de *G.rostochiensis* se incrementa visiblemente hasta alcanzar más de un 20% de mortalidad, independientemente de que la experiencia se realice en atmósfera renovable o no (bolsas abiertas y cerradas),(Fig. 4.4).

El análisis de componentes principales permitió asociar de una manera clara la mortalidad con dos parámetros físico químicos: conductividad (correlación 0,92  $p < 0,001$ ) y concentración de nitratos (correlación 0,58  $p < 0,05$ ) y uno enzimático (N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, correlación 0,97  $p < 0,001$ ) (Tabla 4.3) asociable específicamente a hongos.

Sin embargo, la acción nematicida de un suelo puede circunscribirse a efectos biológicos, pero no exclusivamente a capacidades edafológicas propias derivadas de la presencia de bacterias y hongos. Como consecuencia de la hidratación, factores asociados a cambios físicos del suelo, generados por su manipulación y la expansión de su estructura agregacional producida por la hidratación, pueden dar paso a la actividad nematófaga de otros componentes de la mesofauna, cuando se modifique aquella, y como consecuencia el espacio poral, dando paso a "loci" del suelo modificados en su diámetro (Oka, 2010).

Al añadir agua del grifo Mulder y Vroom-Wolf (1990), encontraron un alto porcentaje de eclosión, que va desde 5 a 60%, dependiendo de la época del año, en los experimentos sobre la periodicidad con quistes de época de una población de *G. rostochiensis*. Den Nijs y Lock, (1992) han encontrado, en todas las pruebas de incubación, que las tasas relativas de eclosión variaban entre 60 y 90%, lo que se corresponde con el 23 al 47% de eclosión, cuando se expresan como porcentajes sobre la cantidad total de huevos. Así, la eclosión espontánea de *G. rostochiensis* era consistentemente alta e independiente del período en que se realizaron las pruebas de incubación.

Dado que Clarke *et al.*, (1978) demostraron que el estrés osmótico inhibe la salida del huevo de *G. rostochiensis* y que cuando el valor osmótico del medio circundante es equivalente o mayor que el de los contenidos de los huevos, y que la absorción de agua, esencial para la eclosión, se detiene (Perry y Clarke, 1981), se hace necesario conocer el comportamiento osmótico del quiste y de los huevos de la *G. rostochiensis*, la distribución del agua de hidratación en su entorno e interior y la resistencia osmótica de sus membranas y tegumentos.



**Figura 5.6.**-Diagrama de los compartimentos del agua en el interior del quiste de *G. rostochiensis*. 1. el agua en el exterior del quiste; 2. la solución acuosa entre la pared del quiste y los huevos; 3. el contenido del agua en los huevos. (Wharton, and Ramløv, 1995)

Como referencia, (Fig. 5.6) el quiste soporta una presión osmótica de 0,24 atmósferas, mientras que en el interior de los huevos es de 9,78 atmósferas, (equivalente a una solución de sacarosa 0,4 M) (Clarke *et al.*, 1978). Por lo tanto la inhibición de la eclosión no es causada por un estrés osmótico de la solución (*G. rostochiensis*, por lo general, alcanza valores del 10% de eclosión), pero si de la rotura del quiste por captura de agua (Evans, 1982, 1983; Fenwick, 1952, Shepherd, 1962), lo cual provocaría una salida de sus huevos, total o parcialmente.

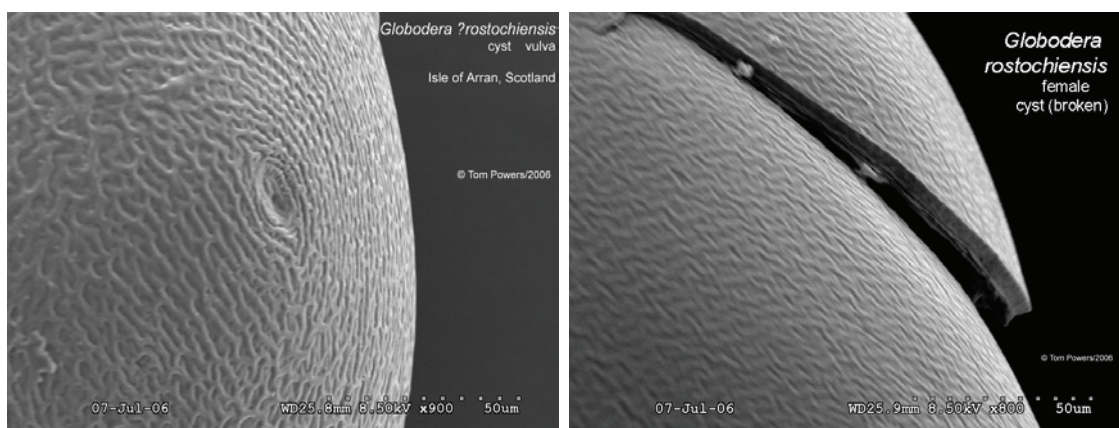
Por los resultados, ha quedado bien patente que la conductividad, y como apartado de ésta la concentración de nitratos, es indicadora e inductora de la capacidad nematicida resiliente que el suelo presenta (Poudel *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2007). La aportación de agua realizada a este suelo solubiliza componentes inorgánicos previamente precipitados durante los periodos de sequedad, elevando su concentración en la solución del suelo. Además, el esponjamiento de las organizaciones agregacionales preexistentes permite la salida de nitratos y otros iones retenidos en su seno. Ambos hechos justifican de manera suficiente el incremento de la conductividad, de los nitratos detectados y en definitiva, de la presión osmótica.

Como consecuencia de lo expuesto aparece un orden de actuación en la que el huevo debe de abrirse, y la forma J2 de *G.rostochiensis* queda expuesta a la acción de la carga iónica (CE y/o potencial osmótico de la solución del suelo además de las actuaciones enzimáticas que posteriormente exponemos.

Ante la duda de la participación de bacterias nematocidas como capacidad resiliente de mortalidad, este suelo muestra un comportamiento que oculta esa capacidad.

Sin embargo no debemos de pasar por alto el hecho de que la *Burkholderia cepacia* H111, (bacteria G-) aislada a partir de un paciente con fibrosis quística, mata efectivamente a las formas libres del nematodo *Caenorhabditis elegans* en 24 h. mediante la acumulación de bacterias en su lumen intestinal (Köthe *et al.*, 2003), que paralizan su intestino en un medio de alta osmolaridad. Dado que el proceso no es exclusivo del ser humano, se nos abre un camino para la intervención de las bacterias del suelo, como agentes nematocidas.

A su vez, la exposición externa del quiste, o interna de los huevos, y teniendo en cuenta la existencia en el huevo y en los juveniles de *Globodera* de estructuras equivalentes basadas en quitina, la inyección, por la fenestra del quiste, de la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa fúngica puede mermar la resistencia física del estilete y osmótica de las láminas del huevo, y de la cutícula superficial, a la par que se incrementa ligeramente la presencia de productos orgánicos por otras vías de hidrólisis enzimática, que también poseen actividad osmótica (Fig 5.7).

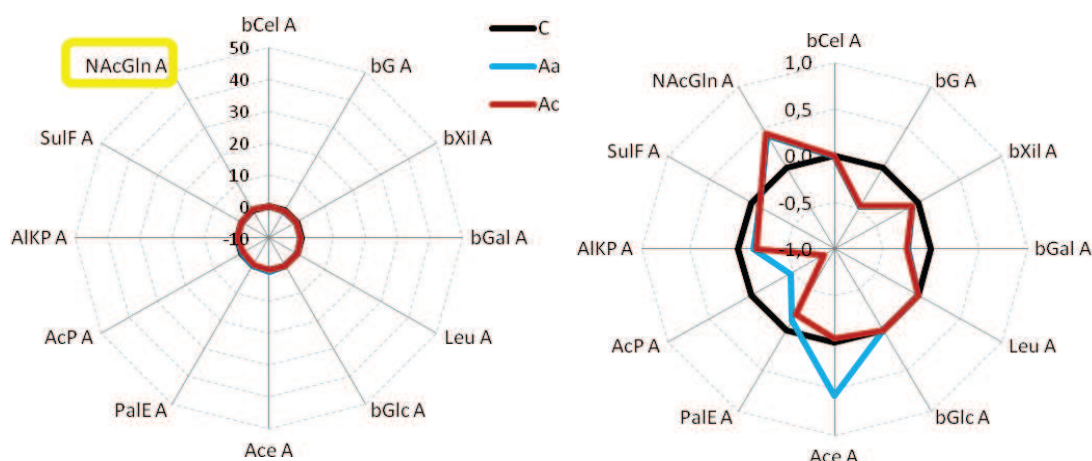


**Figura 5.7.-** Fenestra y ruptura del quiste de *Globodera rostochiensis* (SEM Photo gallery cyst)

En el conjunto de este nuevo escenario, quedaría justificada la eclosión de los huevos y la muerte del animal de forma prematura, además de una mayor incapacidad del estilete del nematodo para abrirse paso a través de la pared de la raíz, abriéndose de esta forma camino la acción supresora resiliente del suelo, ante la humectación.

De acuerdo con el análisis de los resultados (tabla 4.3), la humectación del medio pone de manifiesto que la actividad N-acetil- $\beta$ -D-glucosamini-

dasa se correlaciona muy intensamente (0.972  $p < 0.001$ ) con el incremento de la mortalidad de los nematodos (Fig. 5.8). Esta actividad se corresponde con un enzima asociado al componente fúngico del suelo, cuya expansión se ha alcanzado durante el periodo de incubación de 30 días a 30°C.

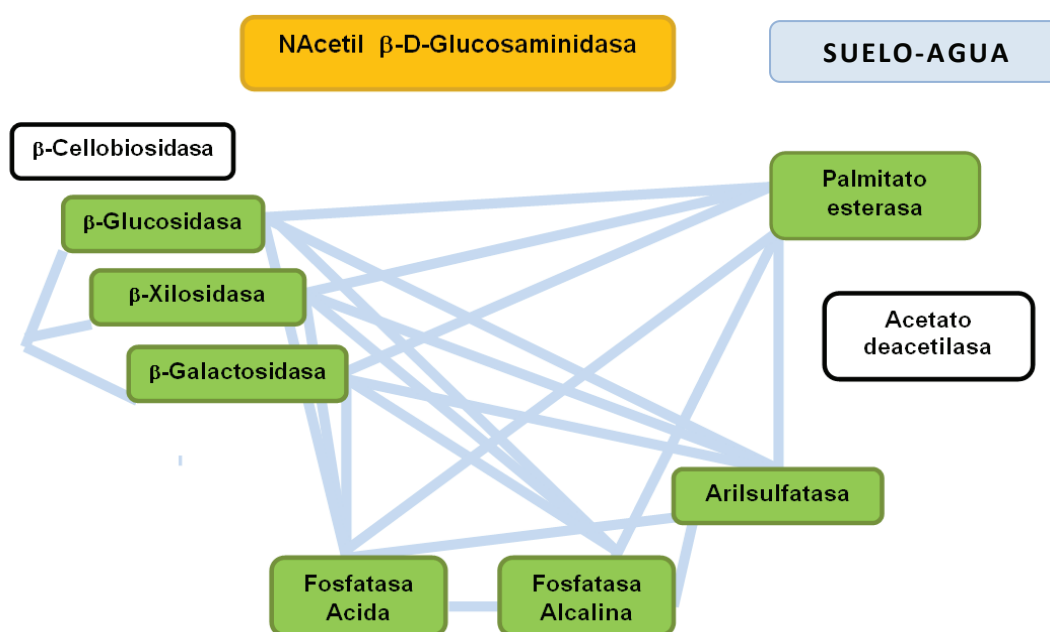


**Figura 5.8.**-Diagrama *sun-ray* derivado de las actividades enzimáticas netas del suelo hidratado con y sin renovación de oxígeno(a y c). (En amarillo la actividad enzimática que se correlaciona con la capacidad nematocida).

La capacidad para liberación específica de  $\text{NH}_4^+$  a partir del producto de reacción (glucosamina), hace de este enzima, la herramienta clave (directa e indirecta) de actuación de los hongos nematocidas (*Trichoderma*, *Penicillium*, y *Fusarium* spp.,) (Nordbring-Hertz, *et al.* 2006, Berg *et al.*, 2005; Rengel y Marschner, 2005). El subproducto generado por desaminación (ácido cetoglucónico), participa así en el control de nematodos como forma alternativa a actuaciones bacterianas, desconociéndose la actividad de este producto secundario de reacción, como secuestrante de metales, que como el  $\text{Ca}^{2+}$  o el  $\text{Zn}^{2+}$  aportan rigidez y estabilidad a la cáscara de los huevos o al estilete de *G. rostochiensis*.

Sorprende el hecho de la fuerte activación de la acetato deacetilasa (en el contexto de la experiencia) (Fig.5.8) en un medio con limitación de la renovación de gases (experiencia "con bolsas herméticas"). Parecería lógico pensar en la existencia de un incremento de ácido acético, pues en nuestra experiencia se ha detectado un incremento de este compuesto a pH en torno a la neutralidad, (López Robles *et al.*, 2009,2011). Quizás por ello la acción nematocida no se manifiesta asociada a este enzima.

Ello nos lleva a pensar que la deacetilación, tiene otra función asociable a la degradación de la multitud de moléculas acetiladas que conforman el espectro bioquímico de los seres vivos y que la muerte (por sucesión ecológica al variar el pH), condiciona su actuación en el suelo. Entonces habrá que buscar en la acción de la palmitato esterasa (grupo M 17) (Heath *et al.*, 2009) la cantidad de ácidos grasos suficientes para que su degradación posterior por  $\beta$ -oxidación permitan esa tasa mínima de acético requerida para la acción nematicida, tal y como expone Oka (2010).



**Figura 5.9.-** Diagrama de flujo metabólico desarrollado usando las correlaciones establecidas entre enzimas en la aplicación del suelo con agua a saturación con y sin presencia de oxígeno; (en naranja correlación positiva con la mortalidad; en verde correlación negativa; líneas azules indican correlaciones positivas entre actividades enzimáticas)

Si esto es así, la actividad acetato deacetilasa tendría como cometido participar de una ruta edafo-metabólica en la que los acetil derivados (peptidoglicanos, mureinas, extensinas, IG, quitinas, etc.) de bacterias, hongos y nematodos, estarían actuando como donadores de grupos acetilo (una vez unido al CoA) o ser donador de energía (vía ciclo de Krebs), correlacionándose con otros enzimas no incluidos en este trabajo (Fig. 5.9).

La capacidad fosfatásica (ácida y alcalina) asociada fundamentalmente al comportamiento de los enzimas responsables de la liberación de fosfatos (Goyal *et al.*, 1999; Albiach *et al.*, 2000, Makoi y Ndakidemi, 2008), tanto como opción nutricional, como degradativa de procesos de demolición de moléculas estructurales, (fosfolípidos, glicerofosfátidos, etc...) muestran entre ellas una correlación positiva elevada (0.87 con



$p < 0.001$ ) y excluyente de la acción nematicida (AcP A -0.93 AIKP A -0.94 con  $p < 0.001$ ), lo cual nos hace pensar que el conjunto bacteriano del suelo participa, aparentemente solo en un contexto metabólico, y los descensos que muestran ambas enzimas se relaciona más con el descenso del número de bacterias, la ausencia del componente vegetal (fosfatasa alcalina) y con el retrocontrol generado por la acumulación de ión fosfato (fosfatasa ácida).

Este último hecho impulsaría, aún más, la elevación de la conductividad eléctrica antes mencionada, y/o a la presión osmótica, que, como se ha discutido, son causas reales de mortalidad en las formas juveniles, y huevos, en combinación con la actividad de la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa una vez penetrado el quiste a través de su ventana.

Además, la modificación del pH del suelo participa dentro de la actividad de control del desarrollo de nematodos, (coeficiente de correlación con la mortalidad -0.83  $p < 0.001$ ) pues reduce su crecimiento al modificarse la biodisponibilidad de  $PO_4$ , siendo mayor cuanto más alto es el pH, lo cual está de acuerdo con De Ruijter y Haverkort, (1999).

A los hechos descritos anteriormente añadimos ahora la importancia diferencial de las especies químicas de fosfato (monoácido o diácido) cuya responsabilidad, como formas limitantes o potenciadoras del desarrollo particular de especies bacterianas está totalmente obviado en nematología y microbiología, pero no así en el mundo de la nutrición vegetal, donde la elección de las especies en cultivo se hace teniendo en cuenta el pH del suelo y como consecuencia estas formas específicas del ión fosfato disponible.

Además, la fosfatasa ácida también se correlaciona con la arilsulfatasa (0.785  $p < 0.001$ ) de forma significativa, responsable de la liberación de sulfato. Y esta a su vez, con la  $\beta$ -xilosidasa (0,868  $p < 0.001$ ), con la  $\beta$ -D-glucosidasa (0,850  $p < 0.001$ ), con la  $\beta$ -D-galactosidasa (0,689  $p < 0.001$ ), además de con la fosfatasa alcalina (0,798  $p < 0.001$ ).

Dado que la aril sulfatasa es un indicador aceptado de la actividad fúngica (Parham y Deng, 2000), se nos permite pensar en un desarrollo fúngico de esporas latentes, que coopere con la síntesis de la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (justificando el alto valor de correlación con la muerte de *G. rostochiensis*, expresado anteriormente) y una mayor disponibilidad de fosfatos y sulfatos, que permita el desarrollo de procesos metabólicos, no expresamente nematicidas.

Si la cutícula de *G.rostochiensis* es un segregado de colágeno asociado a ácido hialurónico, y condroitin-sulfato, integrado en muco-polisacáridos

y pequeñas cantidades de lípidos (Lee *et al.*, 2006), y el gen *Gus* fúngico es capaz de sintetizar xilanasas capaces de participar en la degradación de la estructura macromolecular anteriormente citada, (Davies y Curtis, 2011), la arilsulfatasa cobra un nuevo significado al participar en la demolición de condroitín sulfato, como parte de aquella superestructura de la cutícula, lo que justifica la elevada correlación encontrada entre  $\beta$ -D xilosidasa y arilsulfatasa.

También vemos la acción nutricional complementaria de las actividades enzimáticas degradadoras que favorecen la liberación, a la solución del suelo, de glucosa, galactosa y xilosa, capaces de impulsar el anabolismo, preciso para conservar la calidad biológica de este suelo.

Por todo lo expresado, se deduce que la hidratación temporal a saturación no solo expone la capacidad nematocida resiliente del suelo, sino también la activación de rutas metabólicas específicas del mismo.

## **5.2. LA APLICACIÓN COMO BIODESINFECTANTE DEL PURÍN DE CERDO (LÍQUIDO Y SÓLIDO) EN MEDIOS SATURADOS (LABORATORIO Y CAMPO) Y LOS EFECTOS DERIVADOS DEL MANEJO DE DOSIS**

Siguiendo el mismo criterio, que nos permitiera comparar, y complementar en su caso, lo anteriormente descrito, se ha desarrollado una experiencia múltiple de aplicación de un purín de cerdo (líquido y sólido) a un medio edáfico común, en experiencias de laboratorio y de campo, cuya eficiencia nematicida está ampliamente aceptada, aunque no sea homogénea su respuesta. Recordamos que este purín es el producto natural y residual con mejor respuesta nematicida (Fig. 5.4 y 5.5) y muy próxima en aerobiosis y anaerobiosis (Fig. 5.6) (López-Robles, *et al.*, 2009; Olalla, *et al.*, 2011; López-Robles, *et al.*, 2011).

En primer lugar nos referiremos a las aplicaciones líquidas. De acuerdo con Oka (2010) nos encontramos, en las pruebas con bolsas en abierto y en cerrado, (en laboratorio) con una ligera disminución del pH (Fig. 4.15) que puede ser atribuible a la acumulación de CO<sub>2</sub> (consecuencia de la hidrólisis de urea) y otros gases respiratorios, tras una reorganización física de la estructura agregacional del suelo receptor, como ya se dijo en el apartado anterior (el purín no deja de ser una solución acuosa, con sólidos en suspensión).

Este efecto sobre *G.rostochiensis*, como parte de la acción biodesinfectante, puede atribuirse de manera clara, cuando se observan las variaciones que sufre la conductividad en su conjunto (Fig. 4.16), como consecuencia de la degradación de los componentes orgánicos aportados (propios del purín usado), y la posterior liberación de compuestos iónicos, junto con otros orgánicos, con actividad osmótica reconocida (glucosa, xilosa, galactosa), y disponibles, nutricionalmente hablando, para la edafobiota.

La no valoración del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> liberado por acción de la ureasa ni la posibilidad de que este sea disipado a pH entre 5 y 6 como NH<sub>3</sub> libre, nos lleva a pensar en un proceso de encriptación derivado de los cambios en la organización agregacional del suelo, observables a simple vista, en los que los nuevos "loci" elegidos por los nematodos con diferente diámetro del espacio poral, se saturan de este gas sin necesidad de que el mismo llegue a la atmósfera edáfica para su posible evaluación, tal y como insiste Oka (2010).

Los nitratos son la consecuencia última del proceso de oxidación que sufren los compuestos orgánico-nitrogenados, siendo en cada prueba un

proceso específicamente asociado a la naturaleza orgánica de la enmienda. Los resultados (Fig.4.17) nos indican una nitrificación terminal, que se ve condicionada por la disminución de la tensión de  $O_2$  y la ligera acidificación que acompaña al proceso. El leve incremento mostrado como consecuencia de la modificación de la relación  $O_2/CO_2$ , conviene ser analizado desde el punto de vista enzimático y metabólico posteriormente, para conocer cómo intervienen en la mortalidad del nematodo.

Nos queda mostrar donde reside la capacidad de *G. rostochiensis* para adaptarse a situaciones de hipoxia propias del ámbito rizosférico.

Un análisis de las experiencias de Holz *et al.* (1998 a y b) muestra los grandes cambios de composición que sufren los quistes y los juveniles de segundo estadio (J2), de *G. rostochiensis*, cuando se hacen experiencias de rehidratación de los quistes. Dado el enorme significado que tiene el contenido lipídico de estas formas, un 29,4% de peso seco del nematodo (Orcutt *et al.* 1978) y de este, los triacilgliceroles, con un 55 a 75 % de lípidos totales (Gibson *et al.* 1995), llama la atención la gran reconversión de los ácidos grasos constituyentes de aquellos, fundamentalmente centrada en la reorganización de la longitud de las cadenas carbonadas y la aparición de un extraordinario número de dobles enlaces (Sekora *et al.*, 2008 a y b, 2009c). Así la fracción de ácidos grasos libres monoinsaturados (52% del total de ácidos grasos de los quistes) se convierte cuando el nematodo está eclosionado en J2, en ácidos grasos poliinsaturados (en un 60%) (Holz *et al.*, 1998 a y b).

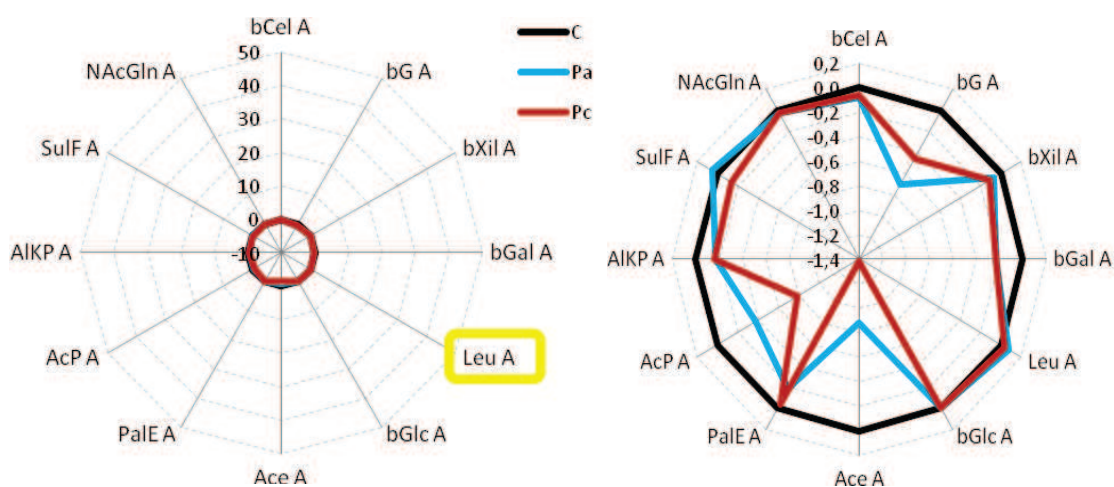
La gran velocidad a la que se realiza esta reorganización molecular es indicadora de la capacidad metabólica que tienen los quistes a la hora de adaptarse a los cambios ambientales (relación  $O_2/CO_2$ ) y su sensibilidad a la eclosión cuando los quistes se rehidratan. Y de estos cambios de localización molecular de los ácidos grasos es un buen exponente las modificaciones de comportamiento que ocurren con la palmitato esterasa (Fig.5.10), que si en un medio aerobio se inhibe fuertemente, recupera su pulso de actividad al evaluarla en un medio anaerobio.

Estos hechos, ya conocidos en las bacterias fotosintéticas anaeróbico-facultativas (paso evolutivo en la fotosíntesis cíclica o no cíclica) justifica la capacidad de subsistencia en ámbitos con tensión reducida de  $O_2$  y se contrapone, aunque no excluye, a la opinión de que proceso de reorganización de los dobles enlaces sea una adaptación a las variaciones térmicas, como afirma Holz *et al.*, (1998 a y b).

Una vez establecida la capacidad del nematodo para sobrevivir en un medio con baja tensión de  $O_2$  y alto nivel de  $CO_2$ , hay que dilucidar razones de otro tipo centradas en el metabolismo, que nos justifiquen que las aportaciones de MO líquida como el purín o su forma deshidratada, generan una mortalidad muy activa en la eclosión de los quistes y la mortalidad de sus formas libres.

Como son dos procesos diferentes, del primero debemos tener algún criterio que conduzca a la apertura del quiste o de su fenestra (Fig.5.7) y la ruptura del ensamblaje de sus paredes, fundamentalmente constituidas por combinaciones de carbohidratos. De forma paralela debemos de pensar en los huevos del nematodo, por quebranto prematuro de su cáscara. Respecto a la forma juvenil J2 debemos tener en cuenta el criterio bioquímico que conduce a su muerte y en que área morfológica/fisiológica del animal ocurren los hechos (Fig.2.17).

Todo ello plantea un dilema en el que de acuerdo con la tabla 4.10 solo la conductividad (0.920  $p < 0.001$ ) y concentración  $N-NO_3$  (0.790  $p < 0.001$ ) se asocian a su mortalidad.



**Figura 5.10.**-Diagrama *sun-ray* derivado de las actividades enzimáticas netas del suelo hidratado, con aportes de purín líquido e con y sin renovación de oxígeno.(a y c) (En amarillo la actividad enzimática que se correlaciona con la capacidad nematocida)

La figura 5.10 en su lado izquierdo apenas muestra las variaciones enzimáticas respecto al suelo testigo que, sin embargo, si expresan un cambio de titularidad enzimática en su capacidad nematocida.

Los aportes líquidos de purín generan una mortalidad asociada a la leucín aminopeptidasa, responsable del reciclado endocelular de aminoácidos a partir de sus proteínas, como expresión del estrés al que

está siendo sometida *G. rostochiensis* e índice evidente de su mortalidad (Fig.4.10).

Pero además aparece una depresión generalizada de  $\beta$ -D-glucosidasa, acetato deacetilasa y fosfatasas ácida y alcalina, que es tanto mayor cuanto más alta sea la deficiencia de  $O_2$  (mayor cantidad de MO y  $NH_4^+$  fermentables), indicador de que el purín afecta a más componentes vivos del suelo, disminuyendo su presencia en forma proporcional al descenso de la actividad fosfatasa alcalina (mayor mortalidad).

La primera manifestación del cambio metabólico desarrollado se circunscribe a un descenso claro del metabolismo glucídico respecto al suelo de referencia, tal y como se indicó en los resultados, y que afecta de forma paralela a  $\beta$ -D-glucosidasa, y  $\beta$ -D-galactosidasa pero no a la  $\beta$ -D-celobiohidrolasa y  $\beta$ -D-xilosidasa.

Cuando se añade purín líquido y respecto a las dos primeras enzimas expresadas, cabe indicar un cambio en la diana enzimática que permite demoler menos estructuras polisacaroideas, en las que participan glucosa y galactosa (arabino-galactanos), pero no de aquellas que contienen péptido-xiloglucanos, lo cual puede indicar que la destrucción de los nematodos no se inhibe por la limitación de la disponibilidad de  $O_2$ . Y en esta acción tampoco participan ciertas carbohidrato esterasas que catalizan deacetilaciones de substratos como xilano, quitina y algunos otros péptido glicanos (Polizeli *et al.*, 2005).

Así pues, queda como actor principal nematicida la leucín aminopeptidasa, (LAP M17) (correlación 0,575  $p < 0,01$ ) que afecta a la eclosión de los huevos del quiste de *G.rostochiensis*, modificando la permeabilidad y estabilidad de la cáscara (Clarke and Perry, 1985). Según Davies en Curtis (2011) la estructura de la cutícula del nematodo y de su cáscara de huevo indica la intervención de proteasas y quitinasas para la demolición de su estructura. Estas actividades nematicidas ya han sido descritas por Morton *et al.*, (2003) y López-Llorca *et al.*, (2008).

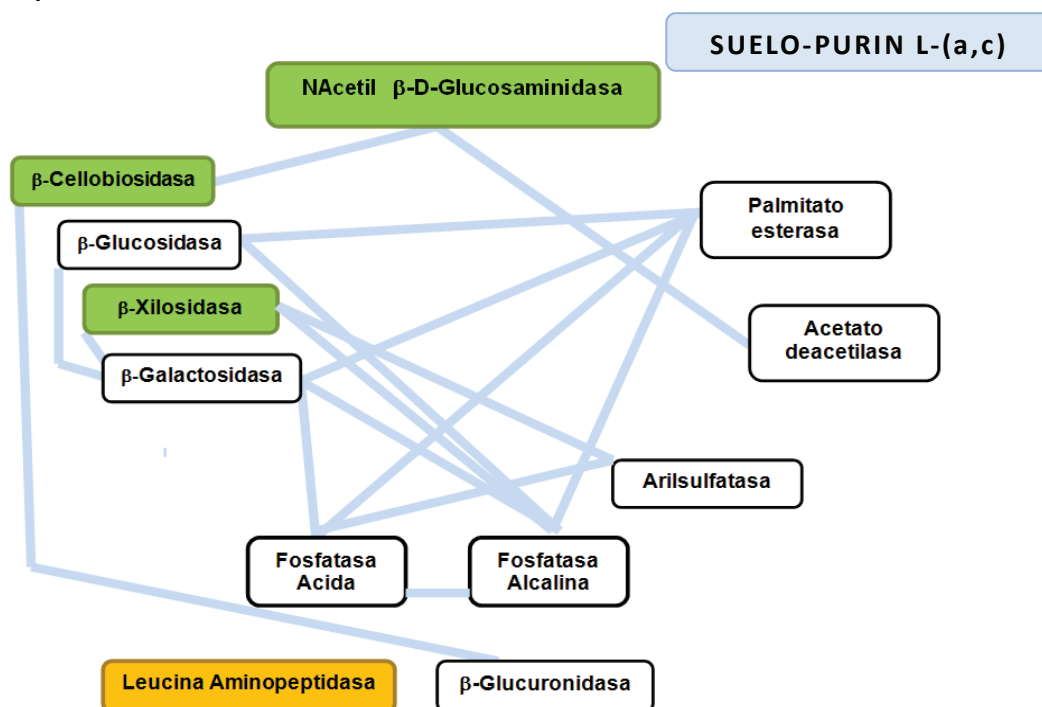
El análisis de la Fig. 5.11 nos lleva a pensar que la leucín aminopeptidasa (LAP) sea únicamente una herramienta enzimática **indicadora** de mortalidad aguda, y no la causa última de su muerte, dada su baja correlación con la mortalidad (0.575  $p > 0.001$ ) de la que es responsable el purín aplicado, en su conjunto.

Así, la LAP permitiría un aprovechamiento de los aminoácidos constituyentes de las proteínas del nematodo fallecido, evitando la nitrificación del N portado, y a su vez una fuente de aminoácidos, a la

hora de estimular el metabolismo de la edafobiota circundante, fundamentalmente fúngica, que autoestime la mortalidad. Esta LAP se correspondería con las proteasas ya identificadas en hongos nematófagos pertenecientes a la familia de proteinasa K (Morton, *et al.*, 2003).

En esta línea debemos de pensar en un efecto inductor de riesgo cierto de la mortalidad, y este le tenemos a la vista ante los elevados valores de correlación entre la mortalidad y la CE (0,920  $p < 0,001$ ) y con la presencia de  $\text{NO}_3^-$  (0,790  $p < 0,001$ ), como un partícipe de aquella. La LAP sería, por tanto, no la causa de muerte de *G. rostochiensis*, sino un exponente indicador de la misma, lo que justifica su aislamiento, en la Fig. 5.11.

La razón última de la no participación de la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, debemos buscarla en la depresión aguda de la acetato deacetilasa con la presenta un bajo nivel de correlación (0,523  $p < 0,001$ ).



**Figura 5.11.-** Diagrama de flujo metabólico desarrollado usando las correlaciones establecidas entre enzimas en la aplicación de purín líquido en suelo saturado con agua con y sin presencia de oxígeno. (en naranja correlación positiva con la mortalidad; en verde correlación negativa; líneas azules indican correlaciones positivas entre actividades enzimáticas)

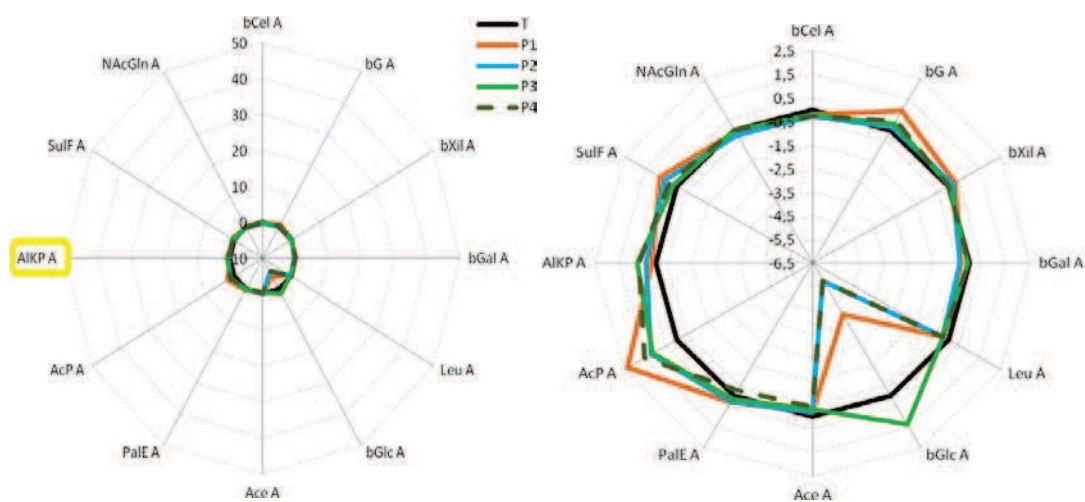
En el lado metabólico, se ve clara la participación de la palmitato esterasa (Fig. 5.11), gran recicladora de ácidos grasos, que manifiesta un prudente, pero similar nivel de correlación con la fosfatasa alcalina

(0.614  $p < 0.001$ ) e indicadora de membranas activas, y con la  $\beta$ -D glucosidasa (0.579  $p < 0.001$ ) y  $\beta$ -galactosidasa (0.608  $p < 0.001$ ) responsables de la recirculación de glucosa y galactosa, que son imprescindibles en cualquier metabolismo activo.

La aportación de dosis crecientes de purín líquido, ya se ha visto que incrementaba la mortalidad en torno a un 30% respecto a la aplicación anterior, alcanzando prácticamente el 100%, (Fig. 5.3).

Y de la misma forma que antes con la LAP, ahora el atributo de **indicador** de mortalidad de esta enmienda es la fosfatasa alcalina (Fig. 5.12) y que, aunque la actividad crezca muy poco, la correlación con mortalidad se incrementa notablemente (0,785  $p < 0,001$ ), incluso por encima de la LAP M17 (Tabla 4.19).

En la Fig. 5.12 observamos que se eleva claramente la actividad de la fosfatasa ácida, aunque no en función de la cantidad de purín añadido, y algo la actividad fosfatasa alcalina, la arilsulfatasa y la  $\beta$ -D-glucosidasa, decreciendo mucho la  $\beta$ -D-glucuronidasa. La N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa permanece estable, lo cual hace que pensar que la eficacia nematocida se debe a razones osmóticas o de toxicidad portadora por el purín en líquido, y no enzimáticas (que actuarían debilitando estructuras de paredes y membranas).



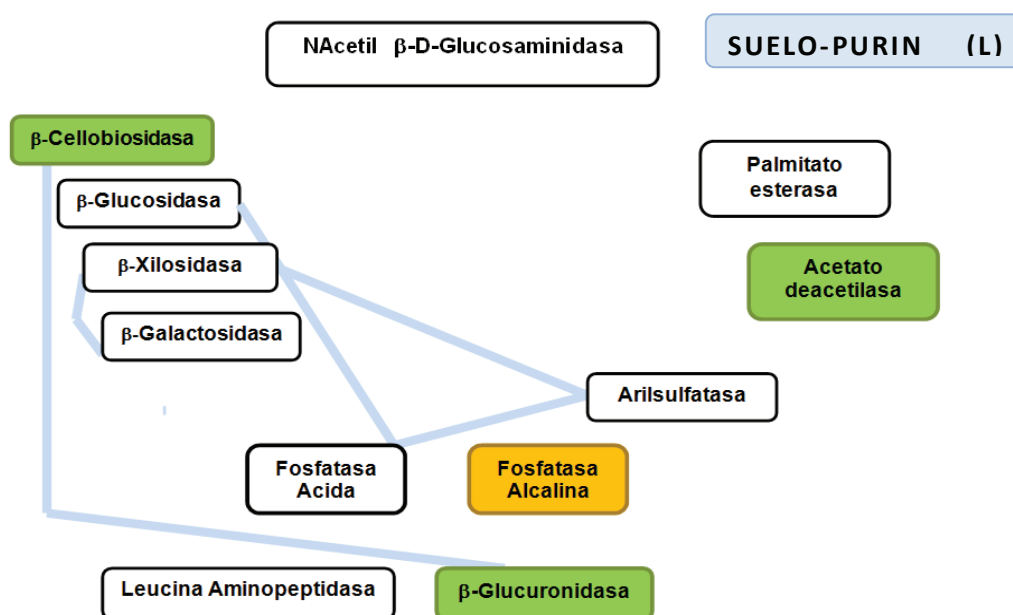
**Figura 5.12.-** Diagrama *sun-ray* derivado de las actividades enzimáticas netas del suelo incubado con saturación de agua con aportes de purín líquido a diferentes dosis. (En amarillo la actividad enzimática que se correlaciona con la capacidad nematocida)

Sin embargo, llama la atención el profundo descenso en las líneas asociativas de correlación metabólica (Fig. 5.13 respecto a Fig. 5.11), que nos lleva, con este aporte, a quedarnos con un bajo perfil de actividad y pensar en cómo funciona la asociación entre  $\beta$ -D-celobiohidrolasa y  $\beta$ -glucuronidasa (correlación 0,872  $p < 0,001$ ).



De ellas, ya se indicó en la parte teórica, que la primera se responsabiliza de la demolición de grandes estructuras celulósicas (Turner *et al.*, 2002) preexistentes en el suelo, y quizás en la conveniencia de añadir al purín algún resto vegetal y que la segunda participa en procesos en los que el suelo aparecen ante una contaminación por metales, de la que no se puede responsabilizar al purín líquido, pero si a su CE 4850  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Tabla 3.3.) del que su adición pretendía únicamente matar a *G.rostochiensis* (como mal mayor) y quizás a alguno de sus componentes metálicos en particular.

Debemos de tener en cuenta también, para justificar la alta capacidad nematocida que, este purín al contener compuestos orgánicos tensoactivos y afrógenos, (por tanto con capacidad para desnaturalizar proteínas) puede afectarse la permeabilidad del tegumento externo de las formas adultas de *G.rostochiensis*, sin matar directamente a sus embriones (la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa permanece estable) ni inactivar a la  $\beta$ -glucuronidasa.

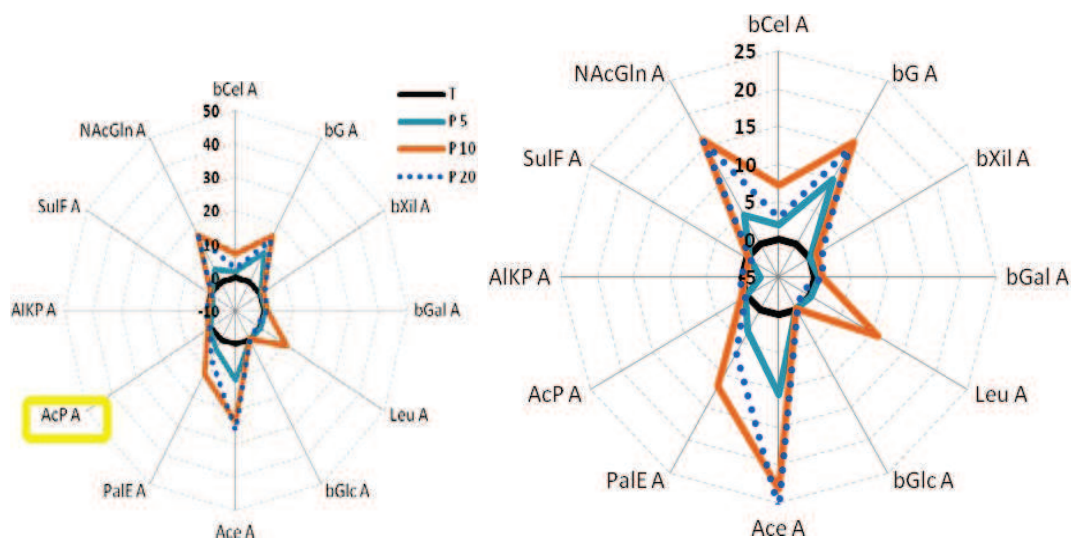


**Figura 5.13.-** Diagrama de flujo metabólico desarrollado usando las correlaciones establecidas entre enzimas en la aplicación de purín líquido a diferentes dosis para biodesinfección (en naranja correlación positiva con la mortalidad; en verde correlación negativa; líneas azules indican correlaciones positivas entre actividades enzimáticas)

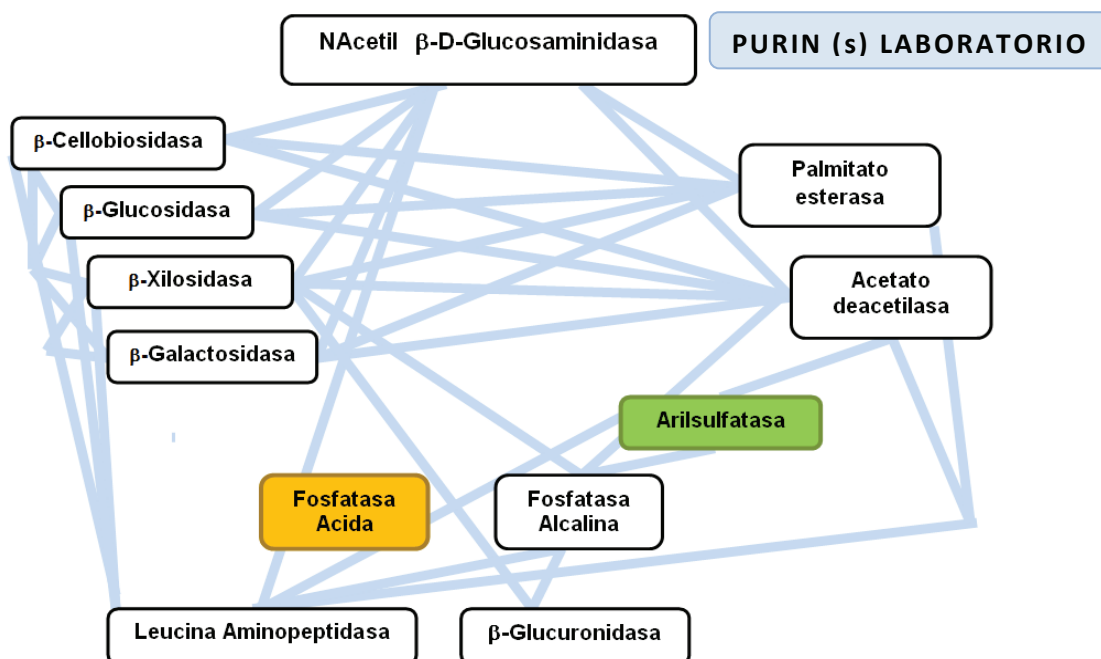
De esta forma, la salida de la  $\beta$ -glucuronidasa de los lisosomas del animal facilitaría bioquímicamente la entrada en juego de hongos, que actuarían causando la muerte de los embriones, al ser capaces de degradar sus polisacáridos ricos en ácido glucurónico o galacturónico (Kitamoto *et al.*, 2001; Kuroyama *et al.*, 2001) constituyéndose, estos a su vez, en una fuente nueva de C y de N (Nakagawa *et al.*, 2000; Alves de Cunha *et al.*, 2003).

La deshidratación del purín líquido para conseguir una forma sólida con mejor manejo agronómico, es un proceso que modifica de forma importante su impacto, al ser aplicado al suelo (Fig. 5.13 frente a Fig. 5.15). Grainge y Ahmed (1988), ya nos indican que utilizar determinados liofilizados derivados de extractos orgánicos transfiere mejor las capacidades nematocidas del producto de partida.

Pero al examinar en el purín las aportaciones en forma líquida y sólida, el comportamiento de las fosfatasa ante el aporte de purín sólido, se invierte. Ahora la fosfatasa ácida se convierte en el indicador de la mortalidad (Fig. 5.14) con valor de correlación (0,541  $p < 0,001$ ) ciertamente menor que en el caso anterior, aunque decrece su actividad junto con la de la fosfatasa alcalina (hay que tener en cuenta el elevado aporte de P que conlleva la aplicación del purín sólido (1,40 % de  $P_2O_5$ , Tabla 3.3), que podría desarrollar una actuación inhibitoria sobre la fosfatasa ácida y una acción estresante sobre la microbiota edáfica portadora de la alcalina), y en menor medida, la arilsulfatasa, pero que no afectaría a los procesos de nutrición, pues el purín aportaría las formas inorgánicas de ambos nutrientes.



**Figura 5.14.-**Diagrama *sun-ray* derivado de las actividades enzimáticas netas de la aplicación de purín sólido en laboratorio a dosis 5, 10 y 20 saturado de agua e incubado. (En amarillo la actividad enzimática que se correlaciona con la capacidad nematocida)



**Figura 5.15.-** Diagrama de flujo metabólico desarrollado usando las correlaciones establecidas entre enzimas en la aplicación de purín sólido en laboratorio a dosis 5, 10, y 20 para biodesinfección; (en naranja correlación positiva con la mortalidad; en verde correlación negativa; líneas azules indican correlaciones positivas entre actividades enzimáticas)

Ahora se elevan los niveles de  $\beta$ -D-celobiohidrolasa,  $\beta$ -D-glucosidasa, Leucina aminopeptidasa acetato deacetilasa, Palmitato esterasa y N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (Fig. 5.14), y el flujo metabólico se hace muy complejo (las correlaciones entre todas las áreas edafo-metabólicas se convierte en una tupida red de conexiones funcionales (Fig. 5.15), superando a la del propio suelo (Fig. 5.9).

Ello hace pensar que en esta experiencia de laboratorio, la aportación del purín sólido implementa en actividad asociativa de los enzimas estudiados (metabolismo del suelo). En primer lugar se intentará explicar el sorprendente comportamiento de ambas fosfatasas, que las convertirá en **indicadores** de la actividad nematocida y no en responsables de ella.

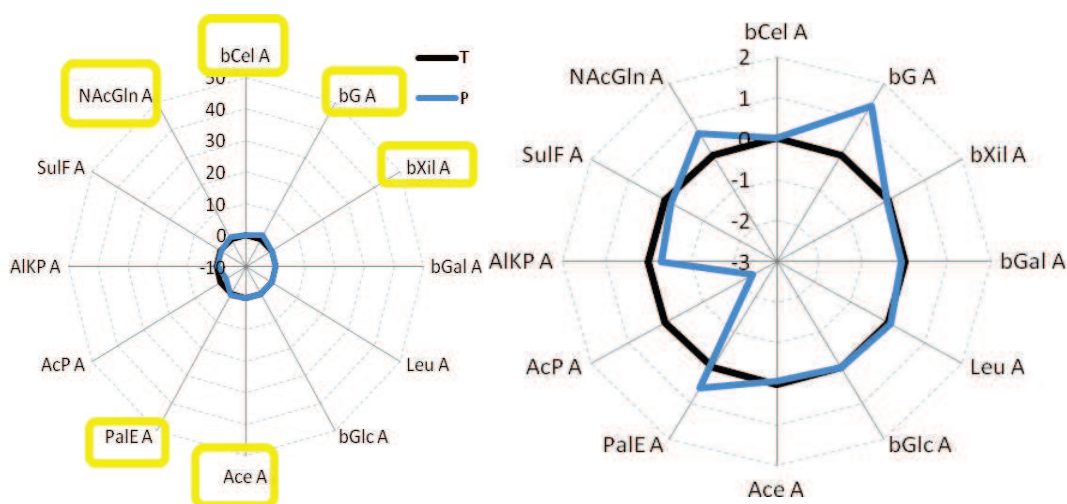
Por un lado debe de existir una fuente positiva de enzima derivada de la muerte de individualidades bacterianas, fúngicas y de la propia *G. rostochiensis* y la ruptura de sus membranas, con lo que esta forma de fosfatasa alcalina actuaría como indicador de la mortalidad nematocida. Como contrapartida, la aplicación del purín en polvo con un contenido elevado de P (Tabla 3.3), al entrar en solución, en las bolsas cerradas, puede estar generando una clara inhibición de la fosfatasa ácida por exceso de producto, que se contrapone al incremento anteriormente citado (González Carcedo *et al.*, 1984; Lafuente *et al.*, 1996).

Visualizar las diferencias de comportamiento entre las experiencias realizadas en el laboratorio y las desarrolladas en la realidad agrícola, pretenden ahondar en las discrepancias de múltiples investigadores que nos preceden, sin aportar ninguna evidencia enzimática o metabólica, por lo que de esta manera se cubre otro objetivo de esta Tesis Doctoral.

De acuerdo con el apartado de Material y Métodos (tabla 3.1) se va a manejar un suelo ácido, arenoso, pobre en MO, baja conductividad e infectado de forma natural con quiste de *G. rostochiensis* (suelo en cuarentena, cultivado "ex profeso" con patata).

La primera evidencia de que las experiencias en campo proporcionan resultados distintos a los realizados en bolsas, en el laboratorio, nos la encontramos al relacionar los enzimas que se asocian directamente con la mortalidad y que se corresponden a ámbitos metabólicos muy variados.

Estas actividades y sus coeficientes de correlación nematocida (Tabla 4.24) expuestos en orden creciente son:  $\beta$ -D-celobiohidrolasa, (0,690  $p < 0,001$ ),  $\beta$ -D-xilosidasa (0,819  $p < 0,001$ ),  $\beta$ -glucosidasa, (0,874  $p < 0,001$ ), acetato deacetilasa (0,927  $p < 0,001$ ), palmitato esterasa (0,945  $p < 0,001$ ), N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (0,950  $p < 0,001$ ) y en nada se parecen con los resultados discutidos anteriormente.



**Fig. 5.16.** Diagrama *sun-ray* derivado de las actividades enzimáticas netas de la aplicación de purín sólido en campo en dosis única con posterior saturación de agua. (En amarillo la actividad enzimática que se correlaciona con la capacidad nematocida)

En toda esta discusión, es la primera vez que aparecen relacionados enzimas cuya capacidad nematocida está claramente reconocida, frente a la figura de indicadores de mortalidad, como la leucina aminopeptidasa, y fosfatasa alcalina y ácida, establecidos en las pruebas de laboratorio, anteriormente discutidas.

Cuando se trabaja con suelo real se pueden identificar, las áreas bioquímicas diana sobre las que actúan los enzimas, entre las que algunas coinciden con una elevación real de su capacidad catalítica (caso de la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, y palmitato esterasa) o su funcionalidad trófica ( $\beta$ -glucosidasa) (Fig 5.16). Este último enzima es un buen indicador de que la degradación de dímeros o tetrámeros de glucosa (que libera a un ritmo edáfico propio la  $\beta$ -D-celobiohidrolasa), que se precisa para generar glucosa libre, permitirá satisfacer el incremento de la demanda generado por el aporte de N, que conlleva el purín en sólido, impulsando una elevación de su ritmo metabólico tal y como se muestra en la Fig. 5.17.

En suelos, la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa se correlaciona con sistemas dominados por hongos (Miller *et al.*, 1998), y fué propuesta como indicador indirecto de la actividad fúngica (Bandick y Dick, 1999; Parham y Deng, 2000), y de la existencia de sucesiones fúngicas (Dodor y Tabatabai, 2002; Ekenler y Tabatabai, 2002). Su crecimiento, que se corresponde con la elevación del ritmo metabólico y de la actividad nematocida subsiguiente, está asociado al incremento de especies fúngicas nematófagas, que hasta el momento de la aplicación del purín, no dominaban el ámbito edáfico.

Además, no hay que olvidar que en el suelo, las N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasas elevan su nivel de actividad con el incremento de CO<sub>2</sub> (Mayr *et al.*, 1999) y su actividad ha demostrado ser más prevalente cuando se incluye en la materia orgánica particulada (Allison y Jastrow, 2006), caso en el que estamos inmersos.

En general, todas las actividades hidrolíticas necesarias para la demolición de quitina y peptidoglicanos como las mureinas, son potencialmente letales para los nemátodos como *G. rostochiensis* y por tanto, muy regulados por mecanismos, hoy en gran parte desconocidos, y posiblemente desregulados por la enmienda añadida. Estos componentes bioquímicos participan entre otros procesos en la morfogénesis de la faringe (control de su longitud/diámetro) y en la remodelación de la cáscara del huevo durante el proceso de eclosión (Vollmer *et al.*, 2008b).

En el orden bioquímico, y bajo estas pautas, podemos entender, que si la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa cataliza la hidrólisis de residuos de N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina presentes en el extremo terminal no reductor de los quitina-oligosacáridos (Deshpande, 1986; Parham y Deng, 2000) en el suelo, se debe aceptar el ataque de estas estructuras en los puntos de contacto entre los hongos nematófagos y el nematodo en su estadio

juvenil (J2) y en otros estadios evolutivos, dado que la experiencia se está realizando en un campo de cultivo real.

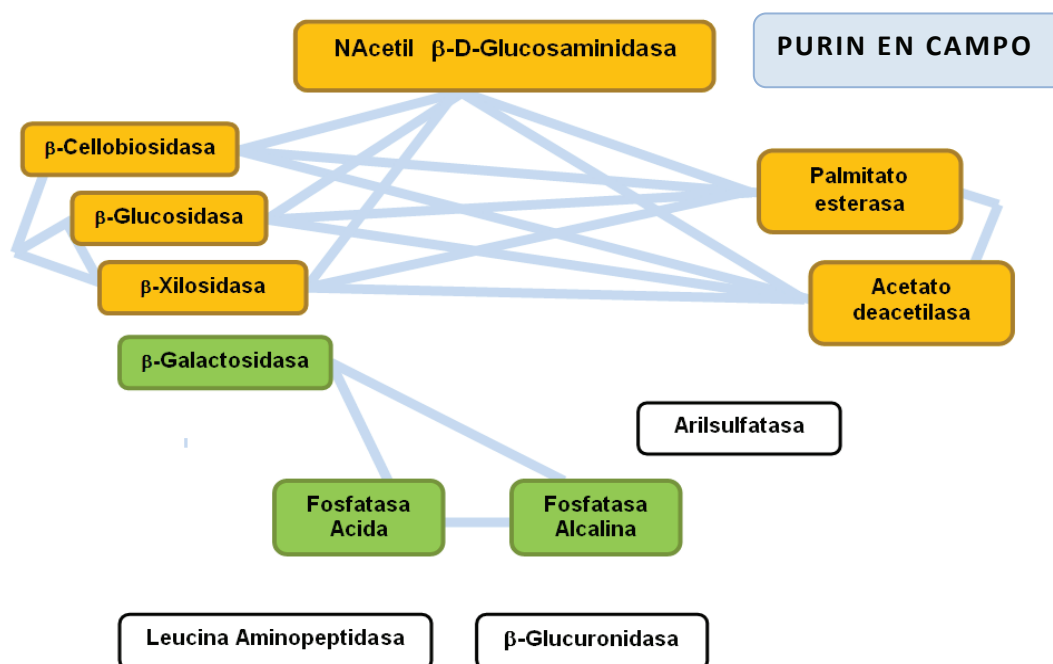
Todo lo dicho no excluye la posibilidad de intervención de la capacidad de las bacterias del suelo para producir este enzima, y establecer un nuevo criterio de supresividad edáfica de origen bacteriano. Recientemente se ha demostrado que *Stenotrophomonas maltophilia* y *Chromobacterium* spp. (Liu *et al.*, 2009) son capaces de afectar en un 90% al poro del quiste de *G. rostochiensis*, inhibiendo su eclosión. Ello está permitiendo la generación de una nueva estrategia de control biológico para la defensa de cultivos de patata frente al quiste de *G. rostochiensis*.

Entre las actividades hidrolíticas potencialmente letales, que cooperan con la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa en la demolición de quitina y de peptidoglicanos, se encuentran las polisacárido desacetilasas y como exponente la acetato deacetilasa evaluada, presente por todo el filum *Nematoda*, y entre sus funciones en *G. rostochiensis* pueden ser la desacetilación de la quitina de la mucosa faríngea (Heustis *et al.*, 2012), razón que justifica su presencia como nematicida en la Fig. 5.17.

En este experimento, la palmitato esterasa, de origen múltiple (Lee *et al.*, 2006), se incrementa ligeramente y se asocia también con la mortalidad. En *G.rostochiensis* se puede asociar en parte a la pérdida de capacidad nutricional de la capa lipídica de la cáscara de huevo, por hidrólisis de sus triglicéridos (Wallace, 1966, 1968), en parte a la alteración de la cutícula del nematodo, con un elevado contenido lipídico (Davis y Curtis, 2011) y finalmente porque estas enzimas pueden ser generados en las glándulas esofágicas subventrales de la forma juvenil del nematodo en situación de apoptosis, lo que justifica en su conjunto el alto valor del coeficiente de correlación de la palmitato esterasa (0,945  $p < 0,001$ ), con la mortalidad (el segundo en valor más alto, Tabla 4.26).

La alta correlación de palmitato esterasa con  $\beta$ -D-glucosidasa (0,895  $p < 0,001$ ),  $\beta$ -xilosidasa (0,806  $p < 0,001$ ) y  $\beta$ -celobiosidasa (0,684  $p < 0,001$ ), así como con acetato deacetilasa (0,877  $p < 0,001$ ) y de esta con ultima con  $\beta$ -D-glucosidasa (0,809  $p < 0,001$ )  $\beta$ -xilosidasa (0,802  $p < 0,001$ ) y  $\beta$ -celobiosidasa (0,581  $p < 0,001$ ) y ambas esterases, con la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa/acetato deacetilasa (0,899  $p < 0,001$ ) N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa/palmitato esterasa (0,935  $p < 0,001$ ) nos hacen pensar que la muerte de los nematodos se convierte en una extraordinaria fuente de nutrientes para la edafobiota del suelo en estudio y un auténtico estímulo nutricional teniendo presente que el

aporte de N que conlleva el purín, es de gran interés para potenciar la salud del suelo.



**Figura 5.17.-** Diagrama de flujo metabólico desarrollado usando las correlaciones establecidas entre enzimas en la aplicación de purín sólido en campo con posterior saturación de agua, en dosis única para biodesinfección; (en naranja correlación positiva con la mortalidad; en verde correlación negativa; líneas azules indican correlaciones positivas entre actividades enzimáticas)

En la acción nematicida ante la que nos enfrentamos, tampoco se puede dejar a un lado la acción osmótica que pueda desarrollar esta enmienda dada su elevada conductividad CE: 8600  $\mu\text{S}/\text{cm}$  con un coeficiente de correlación de 0,851.

En *G.rostochiensis*, la degradación de las expansinas (superfamilia molecular, que favorecen el proceso de infección de la patata) por acción de las  $\beta$ -xilosidasa (Li *et al.*, 2002; Sampedro *et al.*, 2006; Kudla *et al.*, 2006) y de las elastinas (moléculas capaces de romper puentes de hidrógeno que se inhiben por la acción de la acetato deacetilasa) impiden la elasticidad de sus organismos, causando la muerte en los nemátodos.

El aislamiento en que quedan en la Fig. 5.17, la  $\beta$ -galactosidasa asociada a las dos fosfatasa (con la ácida 0,605  $p < 0.001$  y con la alcalina (0.523  $p < 0.001$ ) y estas entre si (0.693  $p < 0.001$ ), (Tabla 4.26) junto con la elevada concentración en metales como Cu, Cr, Ni y Zn (Tabla 3.3) nos hacen pensar, dada la proximidad de sus valores de correlación, en una acción de detoxificación liderada por la  $\beta$  galactosidasa (Conesa *et al.*, 2007) una vez que el suelo (ácido

inicialmente) ha neutralizado la alcalinidad del aporte con los mecanismos edáficos habituales, lo que está de acuerdo con lo expuesto por el grupo de Trevisan (Trevisan *et al.*, 2012).



### 5.3. LA APLICACIÓN DE OTROS BIODESINFECTANTES DE ORIGEN ANIMAL: ESTIERCOLES DE OVEJA Y DE GALLINA

Dada la abundancia de estos animales en Castilla y León y la posible aplicación como nematicidas, se han escogido, para su comparación los estiércoles de oveja y gallina (gallinaza), dada la dispar alimentación de los animales correspondientes.

En primer lugar salta a la vista que una vez aplicados a los suelos, los niveles de actividades enzimáticas detectadas, por lo general son claramente mas bajos en la experiencia con el estiércol de oveja que con la gallinaza (Figs. 5.18 y 5.19) exponente de la clara diferencia de composición de su alimentación ya referida, y de la distinta configuración de la flora intestinal y procesos de digestión que realizan. De forma directa o indirecta esto va a influir cuando su residuo compostado se aplique sobre el suelo y se le someta a una situación de anaerobiosis.

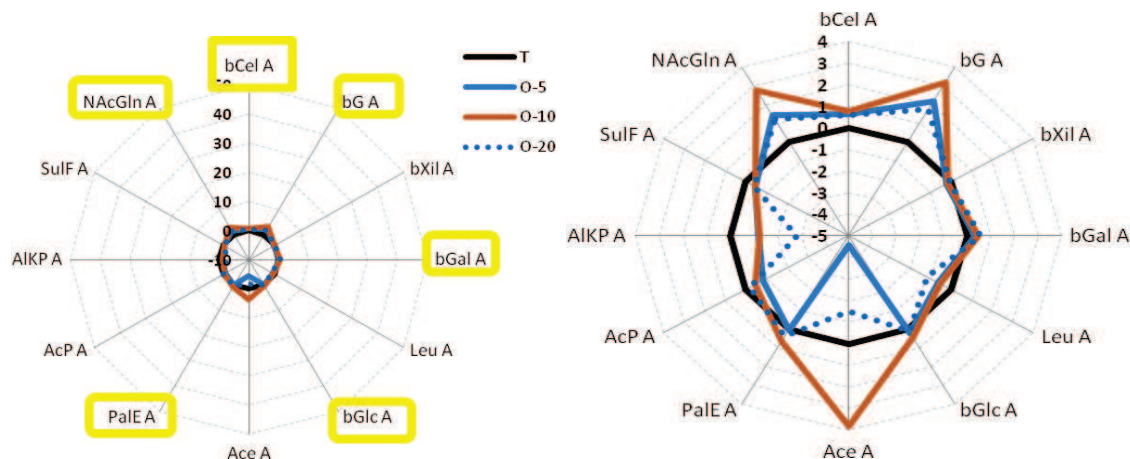
Y es que mientras en el estiércol de oveja, los residuos proceden de la ingestión de ensilados de alfalfa granulada, maíz, avena, con digestión propia de un rumiante, son sólidos agregados, y están mezclados con la cama que recoge sus orines, en el de gallina, proceden de piensos enriquecidos con metionina y huesos triturados, conforman heces fluidas y no estructuradas, junto a restos de huevos rotos que se incorporan a los restos de la cama.

Recordando la Fig. 5.4, encontramos que para alcanzar una mortalidad al 70% de *G.rostochiensis* las dosis de N que se precisan son distintas (estiércol de oveja 0,1; gallinaza 0,015, y purín sólido 0,14 g N x100g<sup>-1</sup> de suelo) siendo un sensor de que el N aportado no es indicador "a priori", de la capacidad nematicida del aporte.

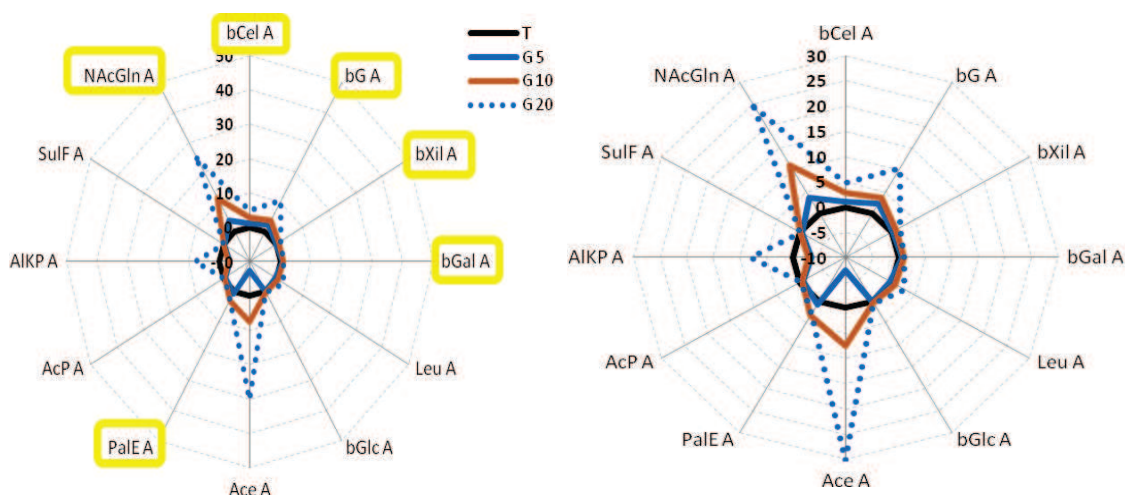
Por otro lado, comparando la CE de cada enmienda, nos encontramos que el orden de valor se acopla mas al orden de eficacia nematicida (fig. 5.4) (purín 8600, gallinaza 2900, oveja 960  $\mu$ S/cm) aunque la mortalidad al 70% se alcance a dosis distintas. Por ello sólo nos queda como agente nematicida, la concentración de compuestos (orgánicos e inorgánicos) con capacidad osmótica y excluyendo otras medidas indirectas de la misma, que como la conductividad eléctrica, será un indicador de la mortalidad con el que podemos encontrar correlaciones.

Respecto a la acción bioquímico-nematicida, entre los evaluados, los enzimas que se correlacionan con la mortalidad de *G.rostochiensis* en el estiércol de oveja, aparecen en orden decreciente  $\beta$ -D-galactosidasa

(0,927  $p < 0,001$ ), N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (0,812,  $p < 0,001$ ),  $\beta$ -D-glucuronidasa (0,807,  $p < 0,001$ ),  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0,762,  $p < 0,001$ ),  $\beta$ -glucosidasa (0,733,  $p < 0,001$ ), palmitato esterasa (0,531,  $p < 0,001$ ), mientras que con la gallinaza, los enzimas que intervienen son  $\beta$ -D-galactosidasa (0,857,  $p < 0,001$ ), palmitato esterasa (0,835  $p < 0,001$ ),  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0,804  $p < 0,001$ ),  $\beta$ -glucosidasa (0,803  $p < 0,001$ ),  $\beta$ -D-xilulosidasa (0,720  $p < 0,001$ ), N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (0,701  $p < 0,001$ ), (Figs. 5.18 y 5.19).



**Figura 5.18.-**Diagrama *sun-ray* derivado de las actividades enzimáticas netas de la aplicación de estiércol de oveja en laboratorio a dosis 5, 10 y 20 saturado de agua e incubado. (En amarillo la actividad enzimática que se correlaciona con la capacidad nematocida)



**Figura 5.19.-**Diagrama *sun-ray* derivado de las actividades enzimáticas netas de la aplicación de gallinaza en laboratorio a dosis 5, 10 y 20 saturado de agua e incubado. (En amarillo la actividad enzimática que se correlaciona con la capacidad nematocida)

De la comparación entre los resultados obtenidos observamos que los enzimas indicadores y/o "nematocidas", forman, con sus correlaciones,

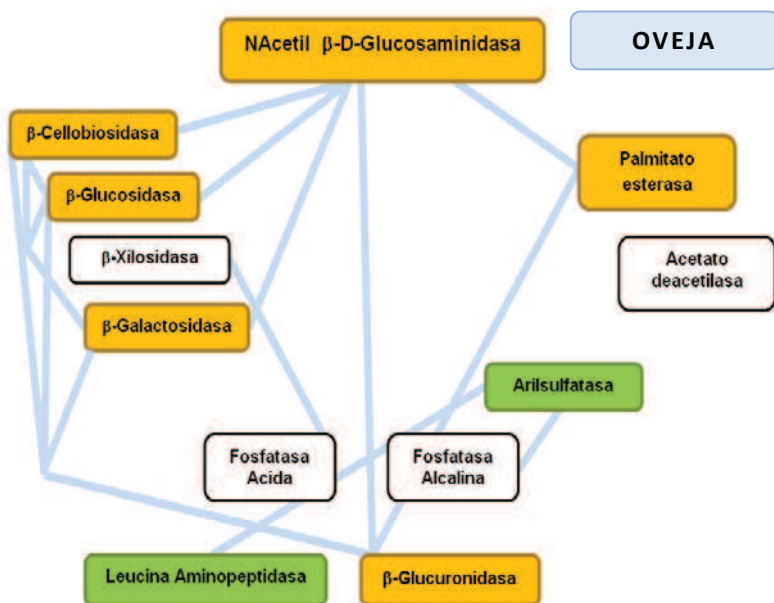
bloques similares, salvo que en el estiércol de oveja aparece la  $\beta$ -D-glucuronidasa y con la aportación de gallinaza aparece la  $\beta$ -D-xilulosidasa como agentes enzimáticos corresponsables de la muerte de *G.rostochiensis*. Dado que en ambos casos no aparecen diferencias significativas de actividad, respecto al suelo testigo, cabe suponer que la asociación con la mortalidad de *G.rostochiensis* no es tal, sino como en casos anteriores, tanto la  $\beta$ -D-glucuronidasa (estiércol de oveja) como la  $\beta$ -D-xilosidasa (gallinaza) y debieran de acogerse a la figura de **indicadores** de la acción nematicida.

Siguiendo con la comparación, se observa que su similitud de comportamiento se mantiene, pues en el estiércol de oveja crecen los niveles de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, y  $\beta$ -glucosidasa. La aplicación de gallinaza hace crecer a las anteriormente citadas, además a acetato deacetilasa, a  $\beta$ -D-celobiohidrolasa y a fosfatasa alcalina (aunque no siempre). Como contrapartida, decrecen con el aporte de estiércol de oveja, fosfatasa alcalina y ligeramente leucina aminopeptidasa y con gallinaza, solamente fosfatasa alcalina.

Conviene analizar el comportamiento de la acetato deacetilasa de forma separada pues cuando aplicamos gallinaza los niveles de actividad obtenidos son los más altos de entre todas las experiencias presentadas en esta Tesis Doctoral.

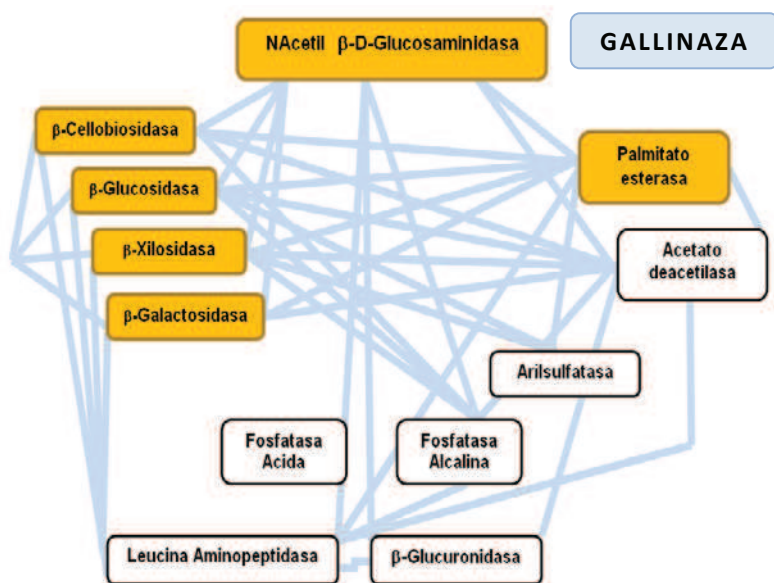
Analizando los enzimas implicados en la mortalidad de *G.rostochiensis* por estiércol de oveja, nos permite ver nodos de correlación que se reflejan en la Fig. 5.20., en que de una u otra forma la acción nematicida se apoya en la  **$\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -D-glucuronidasa** y la **N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa**.

Respecto a la primera de ellas, es capaz de liberar glucosa en cantidades masivas, aportando así un incremento de la capacidad osmótica a la solución del suelo. La  **$\beta$ -glucosidasa**, es punto de unión (se correlaciona positivamente y en orden decreciente) con  $\beta$ -D-glucuronidasa (0,780  $p < 0,001$ ), N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (0,763  $p < 0,001$ ),  $\beta$ -D-galactosidasa (0,706  $p < 0,001$ ), todos ellos con ubicación nematicida localizada además de con la  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0,683  $p < 0,001$ ).



**Figura 5.20.-** Diagrama de flujo metabólico desarrollado usando las correlaciones establecidas entre enzimas en la aplicación de estiércol de oveja en laboratorio a dosis 5, 10 y 20 saturado de agua e incubado para biodesinfección.

(En ambos con naranja correlación positiva con la mortalidad; en verde correlación negativa; líneas azules indican correlaciones positivas entre actividades)



**Figura 5.21.-** Diagrama de flujo metabólico desarrollado usando las correlaciones establecidas entre enzimas en la aplicación de estiércol de gallinaza en laboratorio a dosis 5, 10 y 20 saturado de agua e incubado para biodesinfección.

(En ambos, con naranja correlación positiva con la mortalidad; en verde co-rrelación negativa; líneas azules indican correlaciones positivas entre actividades)

En segundo lugar, la  $\beta$ -D-glucuronidasa se correlaciona positivamente con  $\beta$ -D-galactosidasa (0,747,  $p < 0,001$ ) y con la  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0,606  $p < 0,001$ ) y finalmente, en tono menor, la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa con la palmitato esterasa (0,582  $p < 0,001$ ).

Este escenario de acciones hidrolíticas nos hace recordar una intensa actividad de degradación sobre componentes orgánicos complejos, a los que ya se ha hecho referencia, en la parte teórica de este tesis doctoral y en esta misma discusión, que son constitutivos de *G.rostochiensis*, sus quistes y sus huevos.

Sin embargo también nos aparecen otros indicadores de hechos reguladores del proceso. Así un enzima, ya establecido como indicador del proceso de mortalidad, pero que no participa aparentemente ahora en la acción nematocida, es la leucina aminopeptidasa que se correlaciona negativamente con  $\beta$ -D-galactosidasa (-0,776  $p < 0,001$ ), con  $\beta$ -glucosidasa (-0,623  $p < 0,001$ ), y con  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0,547  $p < 0,001$ ), y en esta misma línea, la arilsulfatasa que regula de alguna forma a las actividades  $\beta$ -D-galactosidasa (-0,681  $p < 0,001$ ) y  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (-0,592  $p < 0,001$ ), apareciendo también correlacionadas, la  $\beta$ -D-xilosidasa y fosfatasa ácida (0,583  $p < 0,001$ ).

Con el estiércol de gallina, y sin mostrar el suelo incremento apreciable de actividad, la arilsulfatasa se correlaciona positivamente con  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -D-xilulosidasa y palmitato esterasa, y no muestra correlación con  $\beta$ -D-celobiohidrolasa  $\beta$ -D-galactosidasa, acetato deacetilasa y leucina aminopeptidasa.

Una explicación de este comportamiento edáfico especial, puede atribuirse a la alimentación forzada de la gallina, basada en el aporte de metionina como impulsor en la síntesis de proteínas, por lo cual la arilsulfatasa pierde su papel de restauración del metabolismo del S (al existir metionina disponible y suficiente en el suelo), pues se parte del aminoácido de forma directa para la síntesis "ex novo" de proteína durante las sucesiones microbiológicas (fundamentalmente fúngicas) que existen en el suelo en el periodo experimental anaerobio.

Ahora aparece además la actuación de la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, cuya elevada correlación positiva con la mortalidad de los nemátodos, al convertir sus estructuras quitinosas y las de componentes fúngicos y de actinomicetos, se convierte en generador de una fuente del N que se precisa para completar su síntesis proteica.

Por lógica, la alta correlación de la palmitato esterasa con la mortalidad, (0,835  $p < 0,001$ ) se encuentra integrada en el proceso metabólico que sufre el suelo, pues la desorganización de las membranas del nematodo libera cantidades importantes de fosfátidos y fosfogliceril-ésteres, cuyo uso está destinado a la formación de nuevas estructuras membranosas que precisa la neo-edafobiota del suelo.

La necesidad de fosfato, preciso para satisfacer el intenso metabolismo expuesto en la Fig. 5.21, se ve justificada con la correlación existente entre la fosfatasa alcalina (cuyo valor de actividad se eleva con la dosis de gallinaza aportada) y las actividades del metabolismo glucídico tales como la  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0,676  $p < 0,001$ ),  $\beta$ -glucosidasa (0,685  $p < 0,001$ ),  $\beta$ -D-xilulosidasa (0,714  $p < 0,001$ ), N-acetil- $\beta$ -D-glucosamini-

dasa (0,733  $p < 0,001$ ) (Tabla 4.44), que ordenadas en orden creciente a su significado nematocida, van ligando la mortalidad con la nutrición de las nuevas formas vivas que van configurando el metabolismo anaerobio de esta experiencia.

Hoy por hoy y por desconocimiento, queda sin justificar la diferencia de herramientas enzimáticas con capacidad nematocida entre los aportes de estiércol de oveja ( $\beta$ -D-glucuronidasa) y de gallina ( $\beta$ -D-xilosidasa).

#### **5.4. LA APLICACIÓN DE BIODESINFECTANTES DE ORIGEN VEGETAL: EL RÁBANO**

El rábano, recientemente germinado y finamente cortado, tiene comprobada, en esta Tesis Doctoral, una gran eficacia nematocida, al ser capaz de superar el 90% (Fig. 5.3). Esta capacidad, se multiplica por tres a la simple adición de agua en medios abiertos, y alcanza casi el 95% cuando se disminuye la relación  $O_2/CO_2$  por la degradación de la MO y consumo masivo de  $O_2$  (Fig.5.5) (experiencias en bolsas cerradas).

Recordando a Oka (2010), nos encontramos con una ligera disminución del pH que puede ser atribuible a la acumulación de  $CO_2$ , y de otros gases derivados del S, en el seno edáfico, tras una reorganización física de la estructura agregacional del suelo, además del componente acidificador que aporta el propio residuo (pH 4,6; Tabla 3.4 y Fig. 4.15).

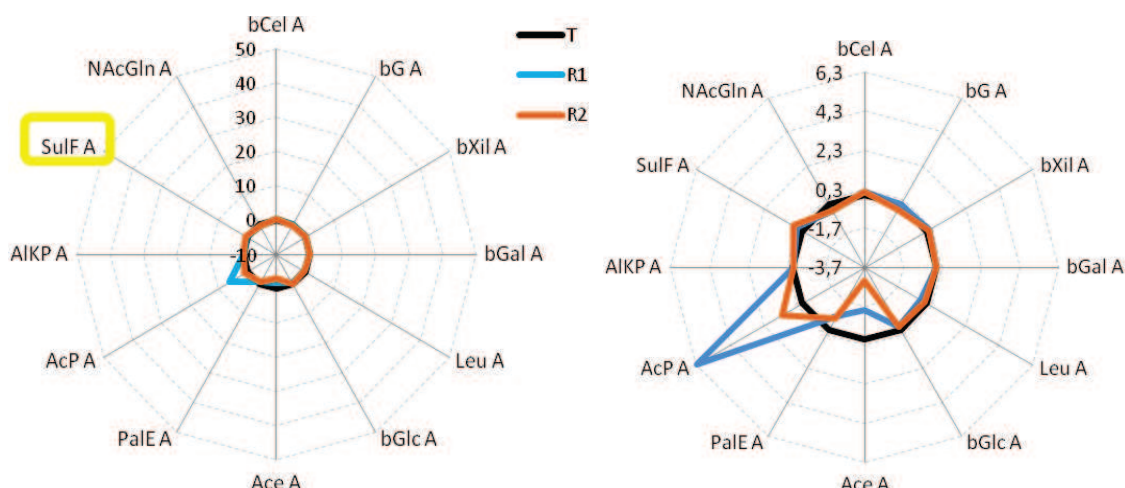
Estos hechos, que implementan la acción biodesinfestante, pueden también atribuirse a las variaciones que sufre la conductividad, y en consecuencia la presión osmótica en su conjunto, como resultado de la degradación de los componentes orgánicos aportados (C/N 20) (glucosa, xilosa, galactosa xilosa), y la liberación de compuestos iónicos, todos ellos nutrientes disponibles, como ya se ha indicado anteriormente en el caso del purín líquido.

La modificación del pH del suelo también afecta a la presencia de los nematodos, en general, al modificarse la biodisponibilidad de  $HPO_4^{2-}$  y  $H_2PO_4^-$  siendo mayor cuanto mas alto es el pH en el entorno de 7 (De Ruijter y Haverkort, 1999).

Una vez establecida la capacidad del nematodo para sobrevivir en un medio con baja tensión de  $O_2$  y alto nivel de  $CO_2$ , hay que dilucidar razones de otro tipo, centradas en el metabolismo, que nos justifiquen que las aportaciones de MO sólida como el rábano, generan una mortalidad tan activa en la eclosión de los quistes y en la mortalidad de sus formas libres.

Todo ello plantea un dilema en el que de acuerdo con la tabla 4.16., solo la conductividad (0,973  $p < 0,001$ ) y la concentración N- $NO_3$  (0,725  $p < 0,001$ ) se asocian a su mortalidad, de forma altamente significativa.

La figura 5.22 en su lado izquierdo, apenas muestra las variaciones enzimáticas respecto al suelo testigo con la excepción de la fosfatasa ácida. Solamente las imágenes incrustadas en el lado derecho, a una escala ampliada 33 veces, nos permiten apreciar los cambios que acaecen durante el proceso de incubación realizado.



**Figura 5.22.-**Diagrama *sun-ray* derivado de las actividades enzimáticas netas del suelo incubado con saturación de agua con aportes de rábano a diferentes dosis. (En amarillo la actividad enzimática que se correlaciona con la capacidad nematocida). Dosis 0,0023 y 0,0058 g N/ 100 g suelo

Que el suelo sufre cambios de comportamiento es evidente, pero paulatino, pues la arilsulfatasa toma un protagonismo significativo al correlacionarse con la  $\beta$ -D-celobiosidasa ( $0,602 p < 0,001$ ) y menos con la  $\beta$ -D xilosidasa ( $0,515 p < 0,001$ ) y esta última con la fosfatasa ácida ( $0,527 p < 0,001$ ), mostrando así que la aplicación del aporte, activa el metabolismo de degradación de estructuras vegetales y que la disponibilidad de P está acompañada y asegurada.

El incremento de actividad de la fosfatasa ácida, se correlaciona con  $\beta$ -D celobiosidasa ( $0,581 p < 0,001$ ) y con la  $\beta$ -D xilosidasa ( $0,527 p < 0,001$ ), nos estaría indicado que aquel enzima de excreción es también asociable a un incremento de la actividad biológica en general y de la bacteriana en particular, incluyendo quizás algún grupo nematocida no contrastado actualmente.

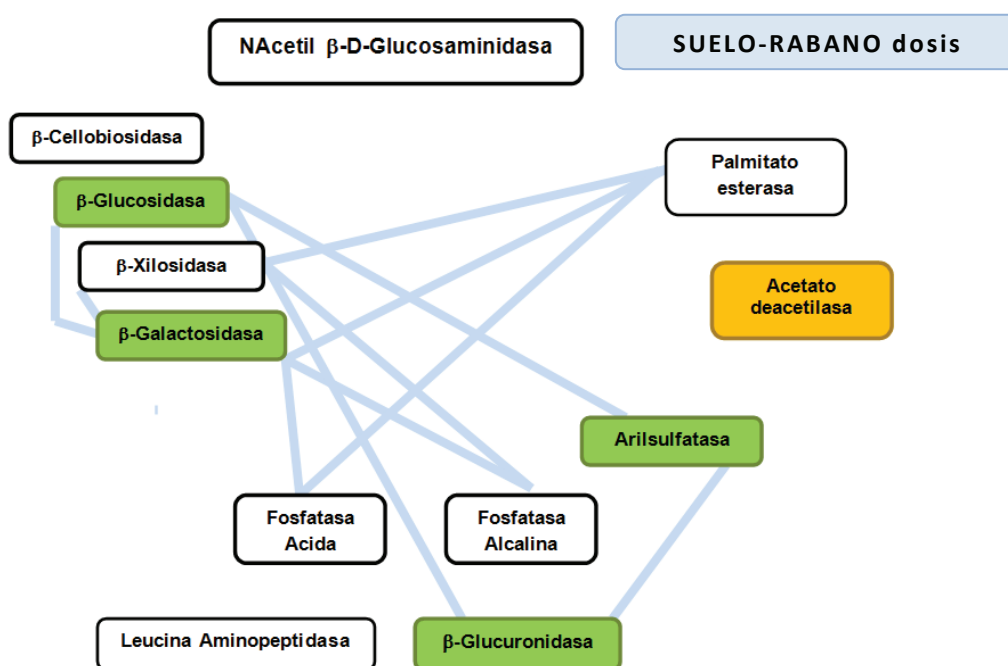
La aplicación de dosis más elevadas de rábano, hace cobrar protagonismo en su capacidad nematocida a la arilsulfatasa ( $0,888 p < 0,001$ ) (aunque no en su nivel de actividad; correlación del enzima con la CE:  $0,851 p < 0,001$ ), lo que hace pensar que la transferencia de grupos  $SO_4^-$  hacia el metabolismo endobacteriano no ocurre, como tampoco la degradación de moléculas orgánicas portadoras de S, y si la disponibilidad del ión o moléculas orgánicas azufradas en la solución del suelo, por lo que su reducción y quizás volatilización en ámbitos anaerobios, permitiría convertirla, de forma indirecta, en la responsable mayor de la muerte de *G.rostochiensis*.



Posiblemente y de forma simultánea aparezcan intensos procesos de sucesión, en la medida que la capacidad antiséptica de los componentes azufrados ejerce su acción (muerte de nematodos y parcialmente de especies microbianas), por lo que el incremento espectacular de la fosfatasa ácida queda justificado, ante las sucesiones por las que nuevos componentes bacterianos o fúngicos no se responsabilicen de la desacetilación, detectado por el descenso que sufre la acetato deacetilasa (correlación con la mortalidad  $-0,820$   $p < 0,01$ ).

Respecto de esta última actividad, aparecen claras divergencias de comportamiento entre suelo y suelo con aportes de MO sólida, como rábano, siendo la hipoxia quien estimula la actividad nematocida en los dos primeros casos (Fig.5.5).

Es posible que en nuevos experimentos orientados, nos permita demostrar que durante el proceso de anoxia (experiencia en cerrado) la degradación de fosfolípidos permita la liberación, no solo de ácidos grasos sino también de glicerol el cual estaría aportando presión osmótica en el entorno del nematodo junto a un incremento de las sucesiones ecológicas bacterianas y fúngicas propias de una atmósfera hipóxica.



**Figura 5.23.-** Diagrama de flujo metabólico desarrollado usando las correlaciones establecidas entre enzimas en la aplicación de rábano troceado a dosis R1 y R2 (0,0023 y 0,0058 g N/ 100 g suelo) (en naranja correlación positiva con la mortalidad; en verde correlación negativa; líneas azules indican correlaciones positivas entre actividades enzimáticas)

Respecto de la actividad arilsulfatásica no aparecen variaciones significativas del nivel de actividad. Su consecuencia inmediata es que ésta actividad afecta a la conservación de moléculas órgano sulfatadas, manteniendo en este caso un equilibrio metabólico estable. Así se puede justificar que el proceso de formación de sulfhídrico (nematicida contrastado), pueda generarse aunque no se detecta directamente, quizás porque en los 30 días de experiencia, no se han podido generar las bacterias reductoras, o bien por que el proceso enzimático de reducción del S no está presente en la intensidad debida.

Dos enzimas muestran una presencia y actividad insignificante, la leucina aminopeptidasa como enzima inhibidor de la capacidad infectiva del nematodo y la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa. Esto conduce a pensar que existe una capacidad nematicida que va a provenir de la capacidad osmótica de los azúcares liberados, pero dado que estos son metabólicamente consumidos como una manifestación del incremento de la actividad biológica, solo queda la tóxica por formación de isotiocianatos y glicosinolatos, que si ejercen dicha acción.

## 5.5. LA APLICACIÓN DE OTROS BIODESINFECTANTES DE ORIGEN VEGETAL: FRESA, CHAMPIÑÓN Y MAÍZ ENRIQUECIDO CON UREA

Estos restos de cultivo ecológico de fresa, (*Fragaria vesca*) manifiestan una pobre eficacia nematicida (17% sobre la del suelo, Fig. 5.4), hecho que se corresponde con su relación C/N de 20 (Tabla 2.7), por lo que estos restos no son ni fitotóxicos ni nematicidas según las indicaciones de Mian *et al.*, (1982).

Esto contrasta con la acidez que presenta este residuo (pH 4,3) (tabla 3.4) y las condiciones de anaerobiosis (acidificante) capaces de estimular el crecimiento de hongos en las condiciones de acidez y temperatura, por lo que hay que atribuir a otros factores esta baja mortalidad de *G.rostochiensis*. De esta forma queda en evidencia que aunque se incremente el número y variedad de hongos, no necesariamente estos tienen que ser nematicidas, y los saprófagos pueden excretar enzimas que de forma conjunta incrementen los valores de las correlaciones entre enzimas que si participan en la muerte de *G.rostochiensis*, justificándose por la variada gama de enzimas que se correlacionan con la mortalidad.

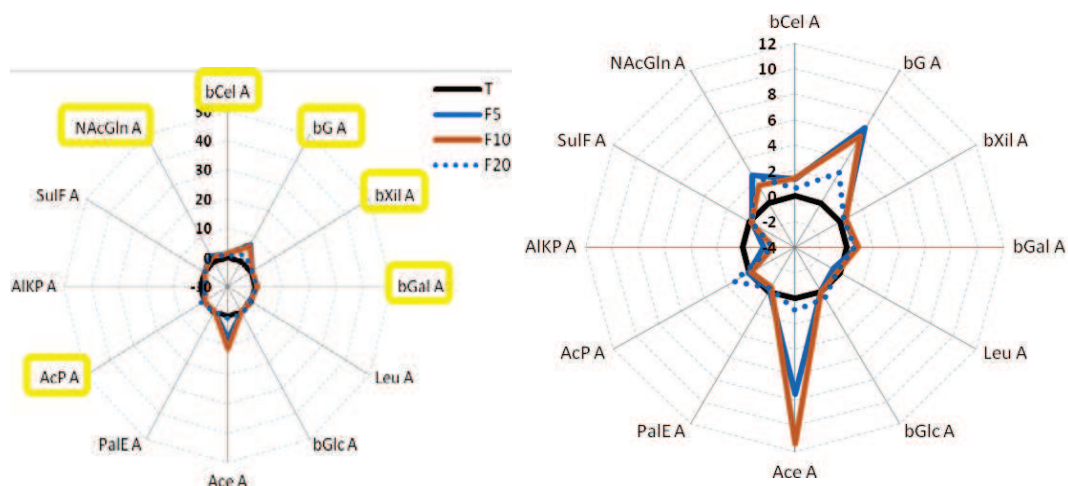
Puede ser que la mortalidad, asociada con el aporte, sea responsable del impulso enzimático que se genera en el suelo. Este impulso tiene una limitación de efecto con la dosis F10, pues tanto la  $\beta$ -glucosidasa como la acetato deacetilasa reducen su actividad una vez superada aquella.

Respecto al impulso enzimático, se advierte una correlación positiva entre la acción nematicida y los siguientes enzimas, que en orden decreciente son: N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (0,839,  $p < 0,001$ )  $\beta$ -D-galactosidasa (0,813,  $p < 0,001$ )  $\beta$ -glucosidasa (0,726,  $p < 0,001$ ),  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0,719,  $p < 0,001$ ), Fosfatasa ácida (0,597  $p < 0,001$ )  $\beta$ -D-xilulosidasa (0,587,  $p < 0,001$ ) (Tabla 4.50).

Si bien es verdad que las tres últimas capacidades se encuentran ya incluidas como "indicadores de mortalidad" de *G.rostochiensis*, el resto están encuadradas dentro de la normalidad, como componentes efectivos de muerte del animal.

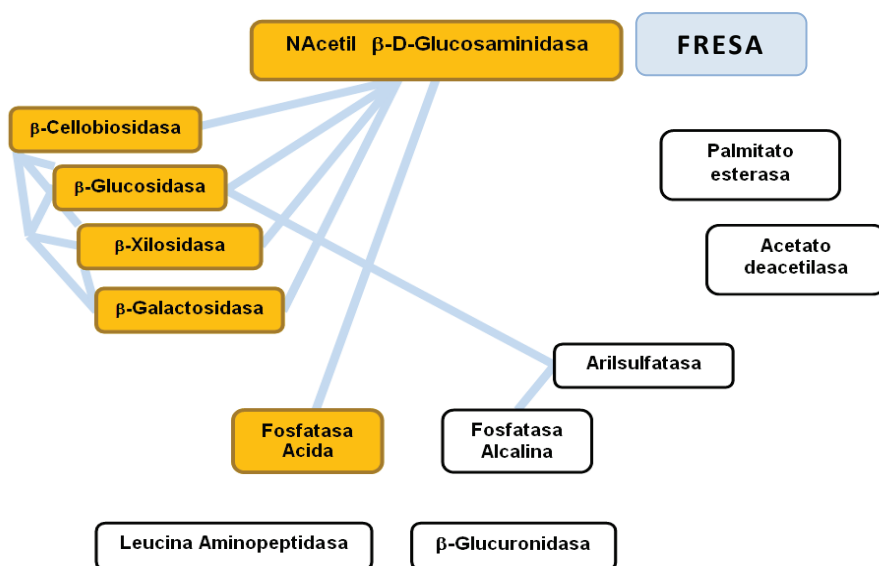
Llama la atención el espectacular incremento de la acetato deacetilasa (hasta 12 veces su valor inicial en el suelo de referencia) y su no correlación con la mortalidad, cuando otros enzimas como la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, la  $\beta$ -D-celobiohidrolasa, y la fosfatasa ácida, que también crecen, pero en rango mucho menor, si lo están. Y tampoco

aparecen correlaciones con la  $\beta$ -D-glucosidasa, como exponente de un crecimiento biológico general, pero con ubicación edáfica diferente.



**Figura 5.24.-** Diagrama *sun-ray* derivado de las actividades enzimáticas netas de la aplicación de restos de fresa en laboratorio a dosis 5, 10 y 20 saturado de agua e incubado. (En amarillo la actividad enzimática que se correlaciona con la capacidad nematocida)

Como explicación incipiente cabría la conjunción de varios hechos. Por un lado la producción de acetato deacetilasa se realiza en bacterias de bajo crecimiento (acentuado por la acidez del medio) pero con gran necesidad de degradar sustratos (macromoléculas acetiladas) que la baja mortalidad de *G.rostochiensis* limita en su disponibilidad. Por otro, la modificación del pH del suelo, aleja su óptimo de trabajo del enzima una vez secretado por la célula.



**Figura 5.25.-** Diagrama de flujo metabólico desarrollado usando las correlaciones establecidas entre enzimas en la aplicación restos de fresa a una única dosis para biodesinfección; (en naranja correlación positiva con la mortalidad; en verde correlación negativa; líneas azules indican correlaciones positivas entre actividades enzimáticas)

Finalmente, hay que pensar en los cambios estructurales que pueden sufrir las moléculas substrato al entrar en la solución del suelo, con pH más ácido de lo normal, pero insuficiente como para liberar ácido acético, (volátil) el cual de por sí sería nematicida (Oka, 2010).

Recogiendo el segundo ámbito de discusión referido a la reconstitución metabólica del suelo (Fig. 5.25) llama la atención el hecho de que todas las actividad enzimáticas que están correlacionadas con la mortalidad, también están implicadas en el metabolismo propio del suelo, como si el único objetivo que el aporte de fresa pretende fuera la acción sobre *G.rostochiensis*. Sin embargo, la relación C/N de 20 favorece, de forma preferente la evolución del suelo, como ya se ha indicado.

El análisis de correlación entre los enzimas, como antes desarrollamos en la aplicación de purín en polvo sobre el suelo, nos revela la existencia de nodos metabólicos (Fig. 5.25).

Así constatamos que la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa está correlacionada con  $\beta$ -glucosidasa (0,714  $p < 0,001$ )  $\beta$ -D-galactosidasa (0,692  $p < 0,001$ ) /fosfatasa ácida (0,644  $p < 0,001$ )  $\beta$ -D-xilulosidasa (0,627  $p < 0,001$ ) y  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0,589  $p < 0,001$ ).

La  $\beta$ -glucosidasa lo hace con  $\beta$ -D-galactosidasa (0,689  $p < 0,001$ )  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0,682  $p < 0,001$ )  $\beta$ -D-xilulosidasa (0,597  $p < 0,001$ ) y /aril sulfatasa (0,532  $p < 0,001$ ).

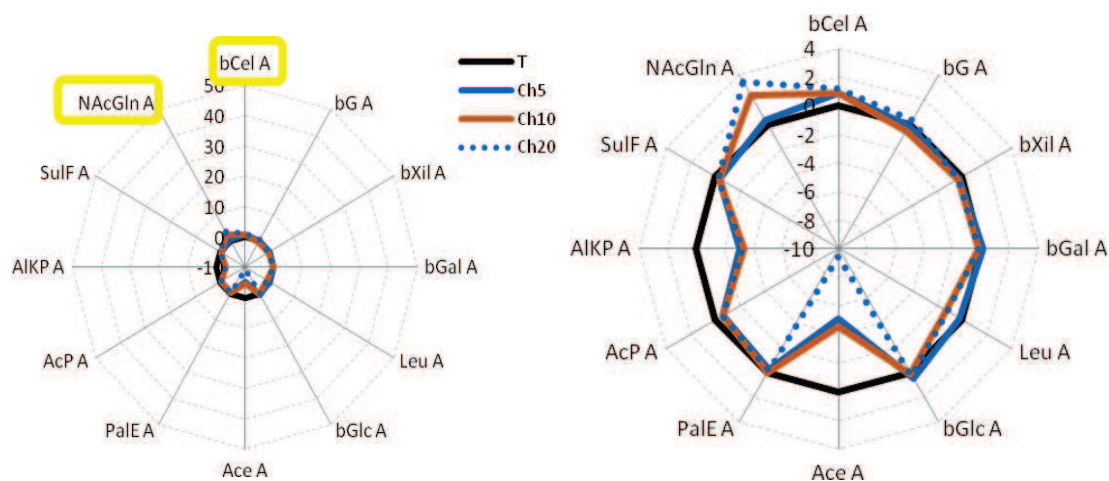
La  $\beta$ -D-galactosidasa lo establece con la  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0,729  $p < 0,001$ ) y  $\beta$ -D-xilulosidasa ( $p$  0,637  $< 0,001$ ) y finalmente la fosfatasa alcalina establece correlación únicamente con arilsulfatasa (0,537  $p < 0,001$ ) (como buenos indicadores que ambos son).

Si, como se conoce del metabolismo, existen vías específicas que orientan el anabolismo hacia la producción de N-acetil  $\beta$ -D-glucosamina, su catabolismo pasa frecuentemente por un ruta que revierte en los productos iniciales, y quizás por ello las correlaciones de la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa se producen con el nodo de la  $\beta$ -glucosidasa// $\beta$ -D-galactosidasa y con la fosfatasa ácida encargada de recoger P del medio bacteriano o fúngico externo. Así, potenciada con la degradación de los materiales vegetales aportados o preexistentes en el suelo, estaríamos ante la conexión entre la actividad nematicida y los procesos de recuperación de suelo tal y como indican Ferris *et al.*, (2001) en la Fig. 2.18.

Los residuos del cultivo de champiñón, menos frecuentes en su aplicación como nematocida, cobran interés por la intensa producción de este hongo en nuestra región limítrofe (La Rioja). Nos sorprende la actividad nematocida (45%) que este aporte manifiesta (Fig.5.4), pues siendo inferior que la que genera el purín líquido o el lodo de EDAR, se alcanza con una dosis inferior de N.

Con un contenido en N (2,2%) (algo menor que los aportes discutidos anteriormente), una relación C/N 12,6 (tipificada como nematocida) y un de pH 7,4, la mortalidad del nematodo se consigue mejor (Tabla 3.4). Ahora las actividades enzimáticas que crecen tras el aporte son las mismas que se correlacionan con la mortalidad: N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (0,739,  $p < 0,001$ )  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0,737,  $p < 0,001$ ). Sin embargo, la correlación entre ellas, aun siendo positiva (0,564  $p < 0,001$ ) no es demasiado elevada como para asociarla a un mismo proceso de letalidad.

La correlación negativa con la mortalidad que manifiestan  $\beta$ -D-galactosidasa (-0,735,  $p < 0,001$ ), leucina aminopeptidasa (-0,514,  $p < 0,001$ ) y acetato deacetilasa (-0,717,  $p < 0,001$ ) (que decrecen cuantitativamente), las excluyen de los procesos nematocidas del aporte, y se incluyen reorganización del metabolismo del suelo.



**Figura 5.26.-** Diagrama *sun-ray* derivado de las actividades enzimáticas netas de la aplicación de restos de cultivo de champiñón en laboratorio a dosis 5, 10 y 20 saturado de agua e incubado. (En amarillo la actividad enzimática que se correlaciona con la capacidad nematocida)

La  $\beta$ -glucosidasa (de valor similar al testigo y no afectado por la dosis) se correlaciona con palmitato esterasa (0,596  $p < 0,001$ ) y con aril sulfatasa (0,685  $p < 0,001$ ), que a su vez se correlaciona positivamente

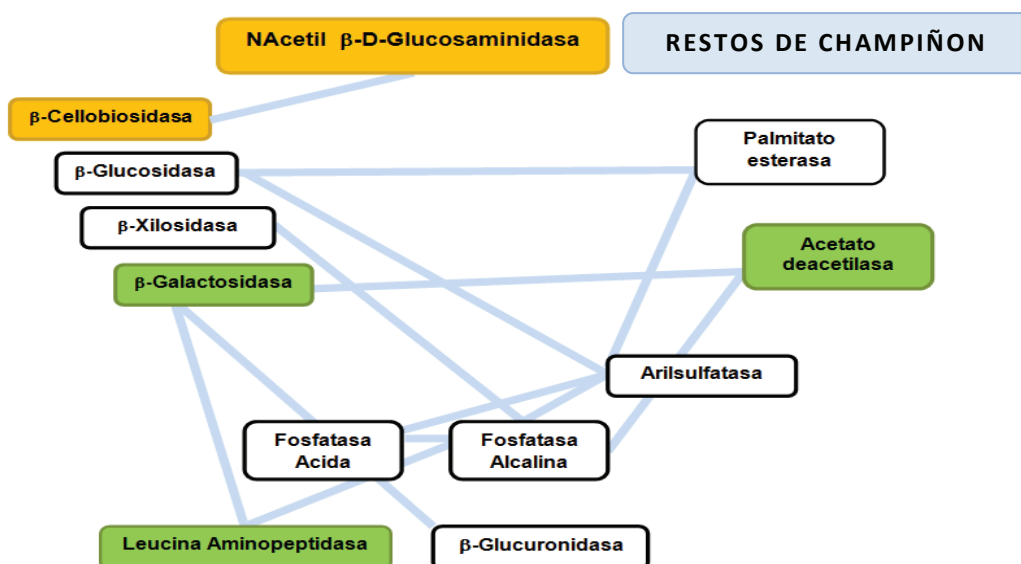
con la fosfatasa ácida (0,568  $p < 0,001$ ) y con la palmitato esterasa (0,526  $p < 0,001$ ).

Si comparamos este comportamiento con el del suelo inicial se mantiene la relación entre las tres primeras y se pierde la relación con la fosfatasa alcalina (Fig. 5.9). La consecuencia inmediata es la existencia de menos seres vivos en esta mezcla (suelo-restos de champiñón).

La correlación entre la  $\beta$ -xilosidasa (valores por debajo del inicial y retrocontrolada) con fosfatasa alcalina (0,530  $p < 0,001$ ), que a su vez lo hace con la arilsulfatasa (0,721  $p < 0,001$ ), con la acetato deacetilasa (0,532  $p < 0,001$ ) y con la fosfatasa ácida (0,578  $p < 0,001$ ) (Tabla 4.56), la asociamos una demanda de fosfato, acetato y sulfato, que a su vez se integra en los procesos de degradación de estructuras vegetales (fúngicas).

En bacterias y hongos, el S se precisa posiblemente asociado a sus mecanismos de defensa frente a la aparición de sustancias tóxicas y a los sistemas de regulación del pH endocelular, en base a la producción de glutatión.

En esta vía edafo-microbiana de degradación la acetato deacetilasa, es nueva en este aporte y sustituye a la palmitato esterasa (aunque sus niveles de actividad sean semejantes). Los grupos acetato, aceptamos que en vez de extraerlos directamente por la acetil deacetilasa, los obtiene el metabolismo por  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos.

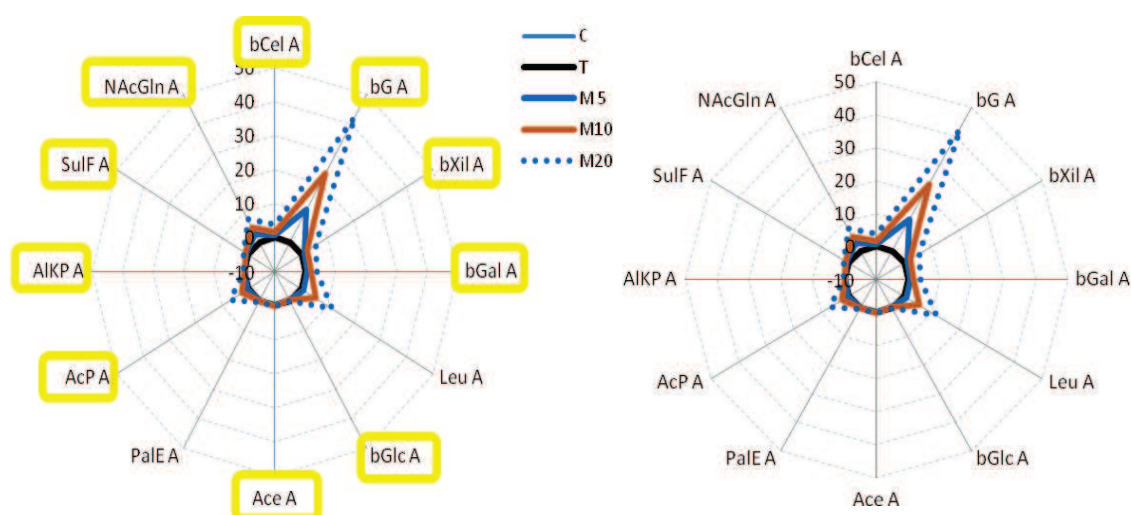


**Figura 5.27.-** Diagrama de flujo metabólico desarrollado usando las correlaciones establecidas entre enzimas en la aplicación restos de champiñón a dosis 5,10, y 20 para biodesinfección; (en naranja correlación positiva con la mortalidad; en verde correlación negativa; líneas azules indican correlaciones positivas entre actividades enzimáticas)

La  $\beta$ -galactosidasa, con muy bajo nivel de actividad, se relaciona con acetato deacetilasa (0,707  $p < 0,001$ ) y con leucina aminopeptidasa (0,631  $p < 0,001$ ) con  $\beta$ -D-glucuronidasa (0,629  $p < 0,001$ ). Dado que este enzima participa en los procesos de detoxificación del medio edáfico dirigidos por la  $\beta$ -D-glucuronidasa y en los procesos de neoformación en los que se demande acetato, y aminoácidos (donados por la leucina aminopeptidasa) tenemos abierto el camino de neoformación de moléculas estructurales y comparando con lo que acaece en el suelo de referencia, se pierden la relación con el aril sulfatasa y con la palmitato esterasa, (sustituida por el acetato deacetilasa, con valores  $\frac{1}{4}$  menores que el suelo de referencia, y con retrocontrol por exceso de dosis).

La aplicación de restos del cultivo de maíz, enriquecido en urea a distintas dosis, vuelve a mostrarnos la importancia de la incorporación del N fácilmente degradable y el impulso metabólico que ejerce sobre el suelo, aunque su efecto nematicida no alcance el 60%, y siendo el contenido en N el mayor de los aportados (0.15g de N/100 g de suelo).

Este es el mejor ejemplo, dentro de lo experimentado en este trabajo de Tesis Doctoral, de que la dosis de N añadida, incluso en forma de un compuesto orgánico como la urea, fácilmente degradable por vía enzimática, no se convierte necesariamente en un aporte nematicida. Bastaría simplemente con que la ureasa esté inhibida por algún compuesto no detectado.

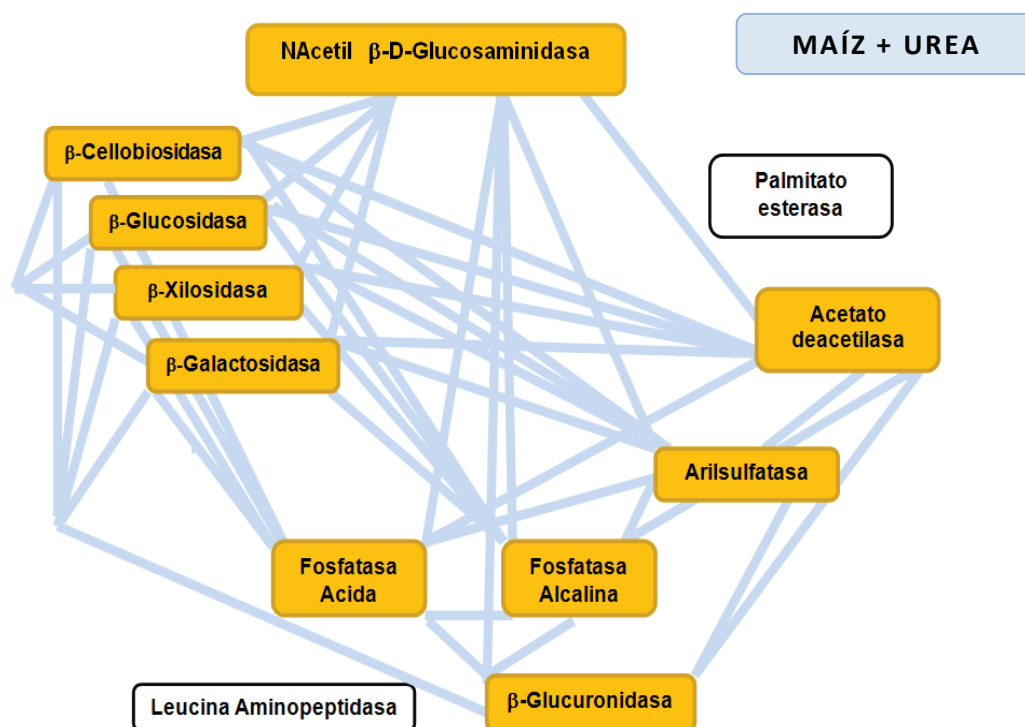


**Figura 5.28.-** Diagrama *sun-ray* derivado de las actividades enzimáticas netas de la aplicación de restos de cultivo de maíz con urea en laboratorio a dosis 5, 10 y 20 saturado de agua e incubado. (En amarillo la actividad enzimática que se correlaciona con la capacidad nematicida)



La Fig. 5.28, muestra que prácticamente todas las actividades enzimáticas ensayadas (salvo palmitato esterasa y leucín aminopeptidasa), participan en la acción nematocida sobre *G.rostochiensis* con unos índices de correlación muy elevados y significativos ( $\beta$ -D-galactosidasa (0,993  $p < 0,001$ ), arilsulfatasa (0.942  $p < 0,001$ ),  $\beta$ -glucosidasa (0.937  $p < 0,001$ ), N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (0,932  $p < 0,001$ ),  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0.913  $p < 0,001$ ), acetato deacetilasa (0,879  $p < 0,001$ ),  $\beta$ -D-xilosidasa (0,838  $p < 0,001$ ), fosfatasa ácida (0,814  $p < 0,001$ ),  $\beta$ -D-Glucuronidasa (0,810  $p < 0,001$ ), fosfatasa alcalina (0,741  $p < 0,001$ ) (Tabla 4.62).

Esta situación nos hace reflexionar de que la actividad nematocida no es exclusiva de las actividades enzimáticas, independientemente de que crezcan en valor de actividad catalítica (lo hacen claramente la  $\beta$ -glucosidasa, y en menor medida  $\beta$ -D-celobiohidrolasa, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa y fosfatasa ácida), y aunque algunas como la leucina aminopeptidasa no se relacionen con la mortalidad de *G.rostochiensis*.



**Figura 5.29.-** Diagrama de flujo metabólico desarrollado usando las correlaciones establecidas entre enzimas en la aplicación restos de maíz con urea a una única dosis para biodesinfección; (en naranja correlación positiva con la mortalidad; en verde correlación negativa; líneas azules indican correlaciones positivas entre actividades enzimáticas)

Que el estímulo de todo el metabolismo edáfico queda activado lo demuestra el valor de las correlaciones establecidas entre actividades enzimáticas (Tabla 4.62) tan elevadas y significativas, (valores

superiores a 0,900  $p < 0.001$ ). Únicamente palmitato esterasa y leucina aminopeptidasa no aparecen correlacionada con ninguna actividad (Fig. 5.29).

De la misma forma, podemos observar nodos edafo-metabólicos como por ejemplo la  $\beta$ -D-galactosidasa, que une por una lado todo el metabolismo glucídico activado por la enmienda (con  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0,984  $p < 0,001$ ),  $\beta$ -D-xilosidasa (0,983  $p < 0,001$ ), y con  $\beta$ -glucosidasa (0,977  $p < 0,001$ )), por otro las capacidades nematocida N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (0,959  $p < 0,001$ ) y la detoxificante del suelo, como la glucuronidasa (0,916  $p < 0,001$ ) y finalmente los indicadores enzimáticos de proceso tales como la asociación de la fosfatasa alcalina con  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0,785  $p < 0,001$ ), y  $\beta$ -D-galactosidasa (0,761  $p < 0,001$ ), con N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (0,745  $p < 0,001$ ), y con arilsulfatasa (0,735  $p < 0,001$ ).

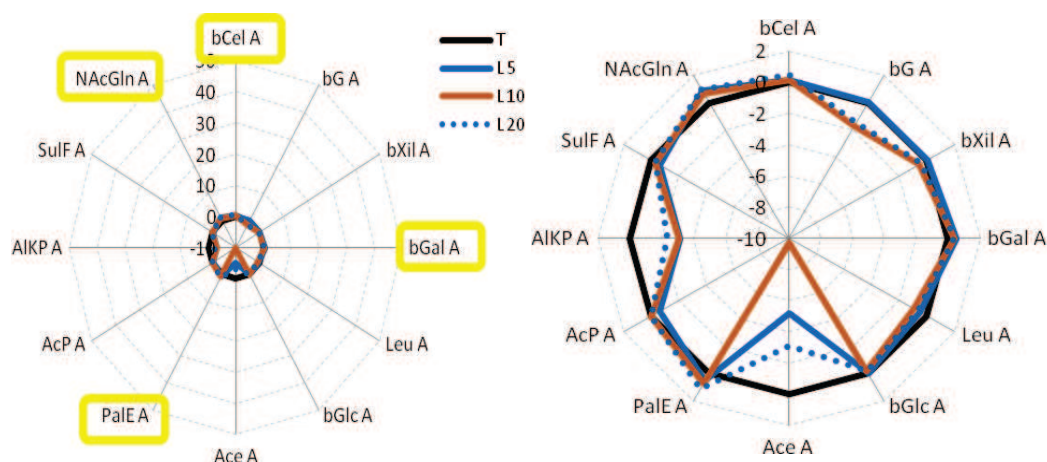
## 5.6. LA APLICACIÓN DE BIODESINFECTANTES DE ORIGEN ANTROPICO: BIOSÓLIDO ESTABILIZADO DE EDAR Y DE RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS

El uso de los residuos de origen antropogénico (biosólidos estabilizados de EDAR y de residuos sólidos urbanos), por el volumen del recurso, están siendo aplicados masivamente en suelo, a pesar del recelo que despiertan y de las continuas reformas de la legislación que aparecen de forma sucesiva y continua. Ahora se han elegido, como un apartado de las enmiendas con posible aplicación para conocer su poder nematicida, a la par que su impacto sobre el metabolismo edáfico.

En principio, es un residuo constituido por restos bacterianos y fúngicos y macromoléculas de difícil degradación, junto a formas bacterianas y fúngicas de resistencia, pues la génesis del lodo y su compostado han desarrollado un intenso proceso de selección biológica.

La aplicación al suelo de este tipo de lodo, abre procesos de sucesión ecológica, siendo un buen índice del descenso de número, la deflacción de las actividades acetato deacetilasa,  $\beta$ -D-glucosidasa y sobretodo de la fosfatasa alcalina (Fig.5.30), sin olvidar el impacto que pudieran generar la carga metálica existente Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn sobre las actividades enzimáticas (Tabla 3.5).

Sin embargo, el comportamiento del biosólido estabilizado de EDAR, con ser un aporte con capacidad nematicida media, la corrección con cal para su estabilización hace de esta enmienda un agente nematicida de primera magnitud, no quedando claro si por acción del lodo o por algún otro mecanismo asociado a la aplicación de cal (Fig.5.4).

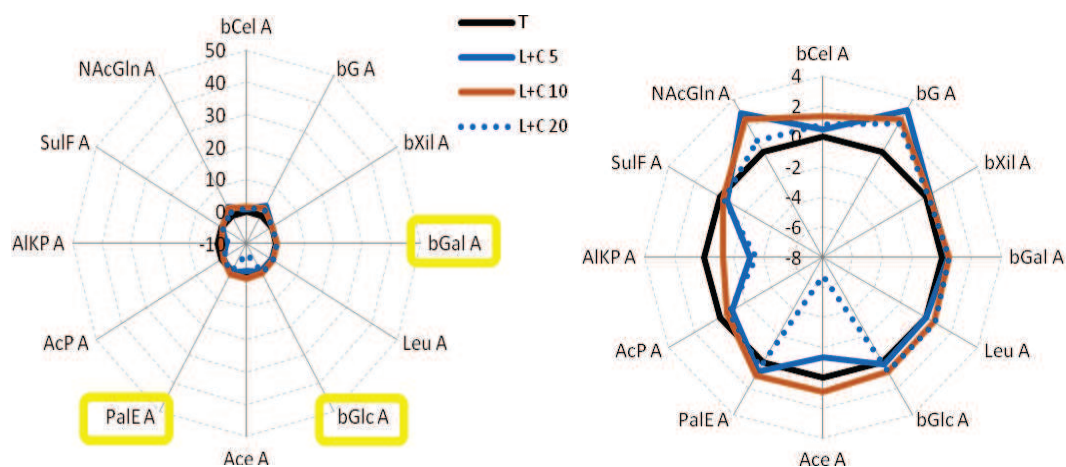


**Fig.5.30.** Diagrama *sun-ray* derivado de las actividades enzimáticas netas de la aplicación de biosólido estabilizado de EDAR en laboratorio a dosis 5, 10 y 20 saturado de agua e incubado. (En amarillo la actividad enzimática que se correlaciona con la capacidad nematicida)

La aplicación de este biosólido estabilizado de EDAR genera, a su vez, ligeros incrementos de la actividad palmitato esterasa y N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (Fig 5.30)

La mortalidad de *G.rostochiensis* aparece asociada con  $\beta$ -D-galactosidasa (0,857  $p < 0,001$ ) Palmitato esterasa (PAL) (0,786,  $p < 0,001$ ), N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (0,655,  $p < 0,001$ )  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0,509  $p < 0,001$ ) (Tabla 4.69), independientemente de su valor de actividad catalítica, lo que induce a pensar que este hecho no se correlaciona con los niveles catalíticos particulares en un lugar único de acción, sino con el conjunto de ellos y sobre distintos estados de evolución del animal, el quiste y la cáscara y cubiertas de los huevos.

La incorporación de cal al lodo (como estabilizador de la evolución de la materia orgánica, que evita malos olores en el proceso posterior de aplicación a los suelos) tiene su repercusión inmediata en el cambio de los actores enzimáticos nematocidas y en componentes biológicos responsables de su biosíntesis.



**Fig.5.31.** Diagrama *sun-ray* derivado de las actividades enzimáticas netas de la aplicación de biosólido estabilizado de EDAR con cal en laboratorio a dosis 5, 10 y 20 saturado de agua e incubado. (En amarillo la actividad enzimática que se correlaciona con la capacidad nematocida)

Ahora, los enzimas correlacionadas con la capacidad nematocida son únicamente  $\beta$ -galactosidasa (0.926  $p < 0,001$ ),  $\beta$ -D-glucuronidasa (0.870  $p < 0,001$ ) y palmitato esterasa (PAL) (0.643,  $p < 0,001$ ) (Tabla 4.73), observando, además, que si bien actividades como  $\beta$ -D-celobiohidrolasa, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, y  $\beta$ -glucosidasa crecen, la adición de cal disocia de la acción nematocida de la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, hace descender en sus niveles catalíticos a la acetato deacetilasa (mas a

mayor dosis, como ocurría con la aplicación de estiércol de oveja) y justifica la muerte de bacterias y hongos con el comportamiento de la fosfatasa alcalina, cuya manifestación es la estabilidad del material orgánico del lodo por muerte celular.

Sin cal, (Tabla 4.69) las actividades relacionadas con la palmitato esterasa (PAL) en orden decreciente de correlación son, además de la nematocidas N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (0,745  $p < 0,001$ ), y  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0,626  $p < 0,001$ ), la  $\beta$ -D-galactosidasa (0,589  $p < 0,001$ ) y  $\beta$ -D-glucosidasa (0,537  $p < 0,001$ ), incorporándose de esta forma al enriquecimiento del flujo metabólico del conjunto suelo/lodo. Y la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa asocia su evolución a la  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0,591  $p < 0,001$ ) (Fig.5.32).

La aplicación de cal también afecta a las correlaciones negativas entre actividades enzimáticas y mortalidad (Tabla 4.73). Así, mientras sin cal aparecen la  $\beta$ -D-glucuronidasa (-0,709  $p < 0,001$ ), la acetato deacetilasa (-0,648  $p < 0,001$ ) y la fosfatasa alcalina (-0,554  $p < 0,001$ ), con cal esta correlación negativa corresponden a algunas ya mencionadas como acetato deacetilasa (-0,710  $p < 0,001$ ) y fosfatasa alcalina (-0,800  $p < 0,001$ ) (con un serio decrecimiento de actividad asociado a la dosis aplicada, pues son claramente dependientes de la actividad biológica presente) y otras nuevas como la arilsulfatasa (-0,862  $p < 0,001$ ) y la fosfatasa ácida (-0,629  $p < 0,001$ ), que sufren una elevación del valor del coeficiente de correlación negativo, además de las consecuencias directas de la adición de Ca capaz de precipitar a los iones sulfato y/o fosfato liberados (Fig.5.31).

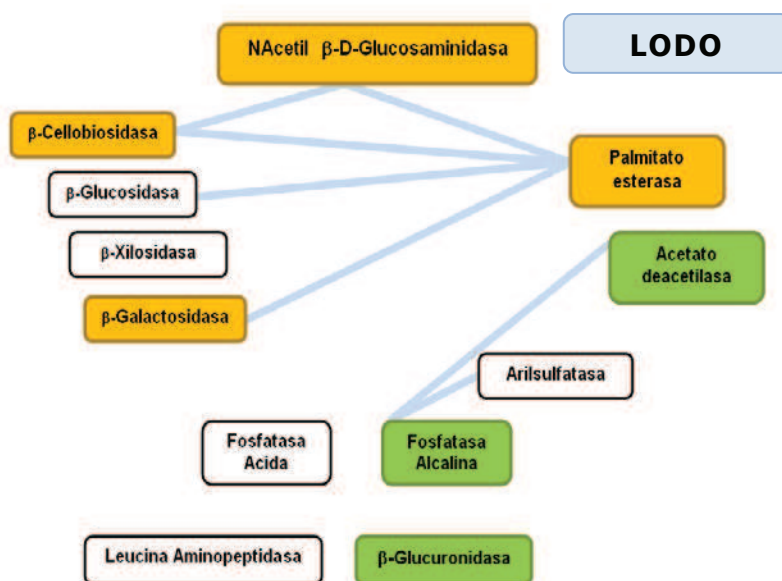
La adición de cal también reorganiza y potencia los diagramas de flujo metabólico del suelo, al cobrar mayor relevancia enzimas tales como la  $\beta$ -D-glucuronidasa, fosfatasa ácida, arilsulfatasa y acetato deacetilasa. (Fig 5.33 frente a 5.32)

Las líneas de flujo más intensas se corresponden con correlaciones de  $\beta$ -D-glucuronidasa con  $\beta$ -D-galactosidasa (0,839  $p < 0,001$ ) con  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0,607  $p < 0,001$ ) y con la palmitato esterasa (PAL) (0,570  $p < 0,001$ ) estando esta última correlacionada a su vez con  $\beta$ -D-galactosidasa (0,666  $p < 0,001$ ) y con  $\beta$ -D-glucosidasa (0,651  $p < 0,001$ ) y con N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (0,596  $p < 0,001$ ) cierra el ciclo la correlación de estas dos (0,686  $p < 0,001$ ) sin cal.

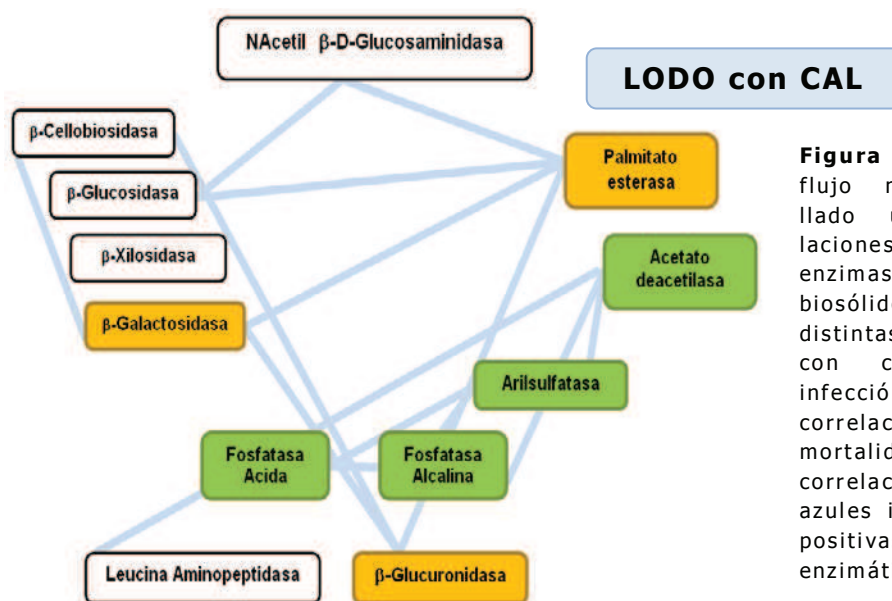
Queda por comentar la correlación positiva de fosfatasa alcalina con arilsulfatasa (0,799  $p < 0,001$ ) y acetato deacetilasa (0,745  $p < 0,001$ ), curiosamente las actividades que tienen valores mayores de correlación, a la vez que reducen sus valores tras mezclar lodo con suelo y que correspondería a un balance negativo de las bacterias propias del lodo

respecto de las que aparecen en la mezcla lodo suelo durante el tiempo que dura la experiencia de laboratorio.

En cuanto al metabolismo del P, la fosfatasa alcalina se correlaciona con arilsulfatasa (0,809  $p < 0,001$ ), con acetato deacetilasa (0,794  $p < 0,001$ ) y con fosfatasa ácida (0,662  $p < 0,001$ ) y ésta última a su vez con arilsulfatasa (0,707  $p < 0,001$ ) que también se correlaciona con la acetato deacetilasa (0,605  $p < 0,001$ ) y acetato deacetilasa con leucina aminopeptidasa (0,570  $p < 0,001$ ). Comportamiento parecido a la oveja y distinto del de Gallinaza (que también tiene calcio).



**Figura 5.32.-** Diagrama de flujo metabólico desarrollado usando las correlaciones establecidas entre enzimas en la aplicación biosólido estabilizado de EDAR a distintas dosis para biodesinfección; (en naranja correlación positiva con la mortalidad; en verde correlación negativa; líneas azules indican correlaciones positivas entre actividades enzimáticas)

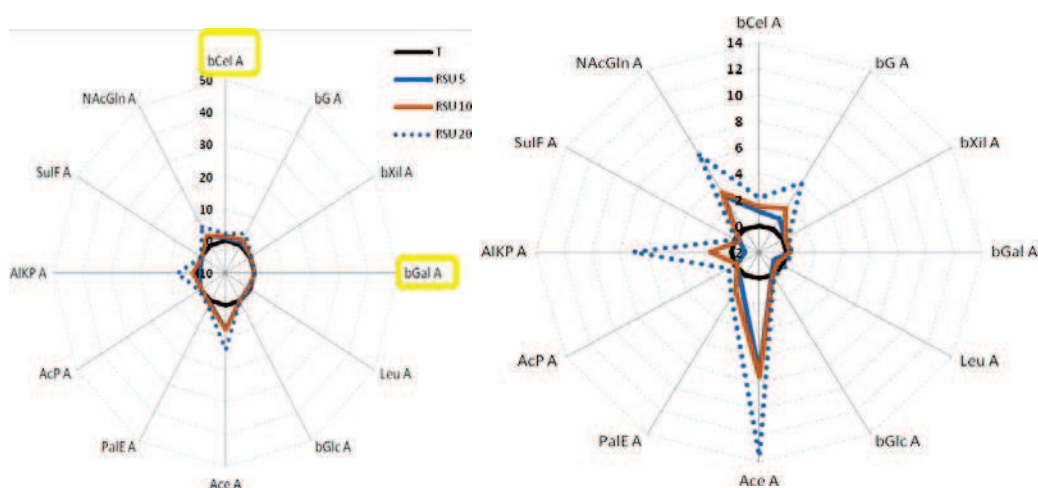


**Figura 5.33.-** Diagrama de flujo metabólico desarrollado usando las correlaciones establecidas entre enzimas en la aplicación biosólido de EDAR a distintas dosis estabilizado con cal, para biodesinfección; (en naranja correlación positiva con la mortalidad; en verde correlación negativa; líneas azules indican correlaciones positivas entre actividades enzimáticas)

De entre todas las enmiendas experimentadas, el biosólido estabilizado de RSU, es la que menor poder nematocida manifiesta (Fig. 5.4).

Un hecho de interés que puede justificar esta actuación respecto a los lodos aplicados, es su menor contenido en metales con capacidad tóxica (Tabla 3.5), indicador indirecto de que estos pueden participar en la mortalidad de *G.rostochiensis* de una forma muy activa.

La composición cuantitativa de sus materiales orgánicos, la granulación del aporte y su pH (Tabla 3.5), hacen posible un elevado desarrollo bacteriano que se puede apreciar enzimáticamente por los incrementos de actividad de acetato deacetilasa (hasta multiplicar por 15 su nivel de actividad) de fosfatasa alcalina (lo eleva 8 veces),  $\beta$ -glucosidasa (multiplica por 2) y N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (la multiplica por 5) pero aquel no es asociable a la acción nematocida (Fig. 5.34).

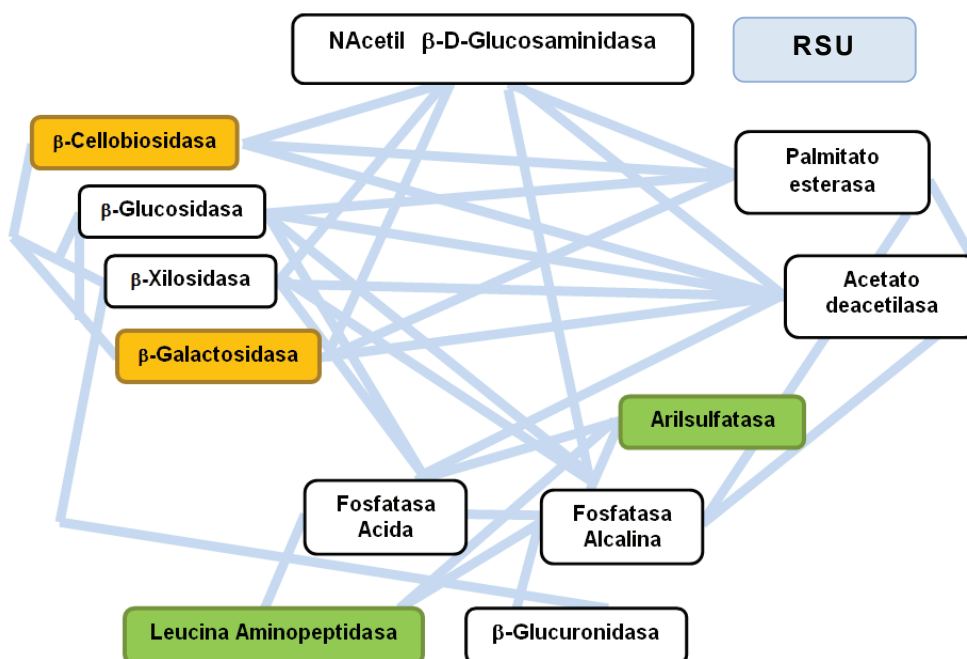


**Figura 5.34.-** Diagrama *sun-ray* derivado de las actividades enzimáticas netas de la aplicación de RSU bioestabilizado en laboratorio a dosis 5, 10 y 20 saturado de agua e incubado. (En amarillo la actividad enzimática que se correlaciona con la capacidad nematocida)

Sin embargo su razón C/N de 15 no se corresponde con su capacidad nematocida, pues es la que menos eficacia manifiesta (Fig.5.4.), asociando a la misma las actividades relacionadas con la mortalidad (Tabla 4.79), como  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0,716,  $p < 0,001$ ) y  $\beta$ -D-galactosidasa (0,628,  $p < 0,001$ ). Por el contrario, se oponen a aquella actividad arilsulfatasa (-0,784  $p < 0,001$ ) y leucina aminopeptidasa (0,694  $p < 0,001$ ).

A efectos de establecer los flujos metabólicos y su intensidad, las correlaciones que se aprecian entre las enzimas responsables del metabolismo glucídico son de valores poco elevados.

Así la  $\beta$ -glucosidasa se relaciona con  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -xilosidasa con valores (0,520  $p < 0,001$ ), (0,588  $p < 0,001$ ) respectivamente; La  $\beta$ -galactosidasa con la  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0,666  $p < 0,001$ ) y esta con la  $\beta$ -xilosidasa (0,511  $p < 0,001$ ).



**Figura 5.35.-** Diagrama de flujo metabólico desarrollado usando las correlaciones establecidas entre enzimas en la aplicación de biosólido estabilizado de RSU a distintas dosis, para biodesinfección; (en naranja correlación positiva con la mortalidad; en verde correlación negativa; líneas azules indican correlaciones positivas entre actividades enzimáticas)

Más elevadas son las correlaciones de la leucina aminopeptidasa con el metabolismo del fósforo (con fosfatasa ácida y alcalina respectivamente (0,808  $p < 0,001$ ) (0,629  $p < 0,001$ ) y con el del S la ariilsulfatasa (0,860  $p < 0,001$ )). También se correlacionan acetato deacetilasa y palmitato esterasa entre si (0,577  $p < 0,001$ ) y con todos los componentes enzimáticos del metabolismo glucídico, con valores semejantes, que median entre 0,55 y 0,65.

En cuanto al metabolismo del fósforo se establecen correlaciones entre ambas fosfatasas y la  $\beta$ -glucosidasa (0,546  $p < 0,001$ ) (0,651  $p < 0,001$ ) con la ácida y básica respectivamente y con la  $\beta$ -xilosidasa de (0,567  $p < 0,001$ ) (0,554  $p < 0,001$ ). También correlaciona fosfatasa ácida y alcalina con acetato deacetilasa con valores no elevados (0,528  $p < 0,001$ ) y (0,600  $p < 0,001$ ) respectivamente.



La máxima correlación se establece entre ambas fosfatasas (0,747  $p < 0,001$ ), y entre fosfatasa ácida con arilsulfatasa (0,711  $p < 0,001$ ).

Por último N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa se correlaciona con  $\beta$ -D-celobiohidrolasa (0,737  $p < 0,001$ ), con  $\beta$ -galactosidasa (0,608  $p < 0,001$ ) y con  $\beta$ -xilosidasa de (0,541  $p < 0,001$ ), además de con acetato deacetilasa y palmitato esterasa (0,607 y 0,604  $p < 0,001$ ) y con fosfatasa alcalina (0,673  $p < 0,001$ ).

Posiblemente este conjunto tan grande de correlaciones se pueda asociar con la elevada posibilidad de biodegradación que ofrece la materia orgánica aportada, la posibilidad de expansión de la biomasa residente en el suelo, y la escasez de metales pesados.

Es posible que de la acción nematocida, aunque baja, pueda responsabilizarse la acción osmótica de los azúcares liberados enzimáticamente y no consumidos por la biomasa en desarrollo, aunque hay que no dejar fuera a la acción menor, pero real, de degradación enzimática de las distintas estructuras del nematodo, lo que facilitaría la acción osmótica nematocida de las mismas.

## 6. CONCLUSIONES

### Respecto a métodos y técnicas:

1. La elección de técnicas multienzimáticas permite la evaluación simultánea de los enzimas, facilitando la obtención de correlaciones fiables entre si, e independientemente del objetivo y el proceso de cada experiencia.
2. El desarrollo de los flujos metabólicos del suelo se desarrollan mediante el uso de las correlaciones matemáticas obtenidas entre enzimas, en cada experiencia particular.
3. Su estudio permite establecer criterios de organización/desorganización metabólica en el suelo, que ocurren tras 30 días de incubación de cada experimento.
4. Las experiencias realizadas en laboratorio se alejan claramente en sus resultados de aquellos obtenidos, sobre suelo real, tanto en su comportamiento y herramientas enzimáticas, como en las formas de correlacionarse los enzimas y en su impacto sobre los flujos metabólicos del suelo.

### Respecto a la capacidad nematocida resiliente del suelo en estudio

1. Existe una capacidad nematocida resiliente sobre *G. rostochiensis* en los suelos, cuya eficacia aflora tras la saturación con agua, en pruebas de laboratorio.
  - Se pone de manifiesto de forma distinta si el proceso de incubación se realiza en aerobiosis estricta (bolsas abiertas) que en anaerobiosis (bolsas cerradas).
  - Viene regulada por la actividad N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa propia de los hongos nematocidas.
  - La capacidad de daño al nematodo viene también derivada del incremento de la CE (con alta osmolaridad del medio se paraliza la motilidad de su intestino).
  - La modificación de pH, por acidificación, cambia la proporción de especies de fosfato, lo que causa problemas de disponibilidad para *G. rostochiensis* incrementando el potencial nematocida si éste adquiere de forma preferente una determinada especie química de fosfato.
  - La capacidad indirecta de liberar amoníaco que tiene la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa limita la evolución del pH (acidificación).
2. La capacidad supresiva natural puede deberse a una doble interacción a niveles diferentes: Nivel de quiste o de huevo: Con baja presión osmótica *G. rostochiensis* no alcanza el estado J2 "normal" por eclosión prematura del huevo. La N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa actúa debilitando las estructuras quitinosas del huevo y del animal.

**Respecto a las enmiendas añadidas, su impacto mortal sobre la *G. rostochiensis* y su capacidad para modificar el flujo metabólico del suelo.**

1. La eficacia nematicida obtenida en función de la cantidad de N aportado al suelo en las enmiendas evaluadas, es muy variable (entre el 100%, para el purín líquido y el 30%, para el RSU).
2. En todos los casos responde a una parábola con un tramo ascendente hasta 0,02 g N /100 suelo seguido de una meseta de máxima eficacia sobre *G. rostochiensis*.
3. Para un mismo aporte de N el orden de eficacia nematicida de las enmiendas orgánicas experimentadas, sobre *G. rostochiensis*, es el siguiente:

***Purín(liq) > Rábano > Lodo de EDAR+cal > Gallinaza > Estiércol de oveja > Lodo de EDAR > Purín sólido > Restos de champiñón > Restos de maíz > RSU > Restos de Fresa***

4. El orden de eficacia nematicida sobre *G. rostochiensis* parece depender del origen y composición de la MO que constituye la enmienda, siendo por lo general más alta, la generada por las enmiendas de origen animal, que las de origen vegetal o antrópica, y se ve incrementada por los tratamientos anaerobios.
5. La conductividad eléctrica (CE), y como apartado de ésta, la concentración de nitratos, fosfatos y sulfatos, es indicadora e inductora de la capacidad nematicida resiliente que el suelo tiene o que las enmiendas aportan directa o enzimáticamente.
6. La adición de estabilizantes como la cal sobre el lodo, la urea sobre el maíz, la presencia de metionina (aditivo alimentario) en la gallinaza, o la deshidratación en el purín, modifican claramente la mortalidad de *G.rostochiensis* y el impacto que tiene la enmienda sobre los diagramas de flujo metabólico obtenidos, incrementando el número y el valor de las correlaciones entre los enzimas estudiados.
7. Los mucopolisacáridos (condroitín sulfato colágeno y ácido hialurónico) que componen la superestructura cuticular de *G. rostochiensis* son degradados por la arilsulfatasa, (indicadora de actividad fúngica), cooperando las  $\beta$ -D-xilosidasas,  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -glucuronidasa, razón que justifica la elevada correlación encontrada entre ellas y ellas con la mortalidad del nematodo por la CE.
8. Y esta capacidad edáfica está potenciada por actividades enzimáticas que como la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa actúa sobre estructuras tales como la cutícula del animal, estructura del estilete que merma su resistencia física, ruptura de la ventana del quiste que facilita actuaciones enzimáticas sobre la lámina del huevo, que en ciertos casos facilita la acción osmótica.

- Abid, M., Choudhary, M.I., Maqbool, M, A. Rahman, A. (1997)** Preliminary screening of some plants for their nematocidal activity against *Meloidogyne javanica*. *Nematol. Medit.* 25, 155-157.
- Abrams, B.I., Mitchell, M.J., (1980)** Role of nematode-bacterial interactions in heterotrophic system with emphasis on sewage sludge decomposition. *Oikos* 35, 404-410.
- Acosta-Martínez, V., Tabatabai, M.A. (2000)** Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils* 31, 85-91.
- Acosta-Martínez, V., Zobeck, T.M., Allen, V. (2004)** Soil microbial, chemical and physical properties in continuous cotton and integrated crop-livestock systems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 68, 1875– 1884.
- Aires, A., Carvalho,R., Barbosa,C., Rosa,E. (2009)** Suppressing Potato Cyst Nematode, *Globodera rostochiensis*, with Extracts of *Brassicacea*. *Plants American Journal of Potato Research* Volume 86, 4, 327-333.
- Ajwa, H.A., Tabatabai, M.A. (1994)** Decomposition of different organic materials in soils. *Biol. Fert. Soils* 18, 175-182.
- Akhtar, M. (2000)** Effect of organic and urea amendments in soil on nematode communities and plant growth. *Soil Biology & Biochemistry*, 32, 573-575.
- Akhtar, M., Malik , A. (2000)** Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. *Bioresource Technology* 74, 35-47.
- Alabouvette, C. (1999)** Fusarium wilt suppressive soils: an example of disease-suppressive soils. *Australasian Plant Pathology* 28, 57-64.
- Alam, M.M., Ahmed, A., Khan, A.M. (1980)** Effect of organic amendments on the growth and chemical composition of tomato, eggplant and chilli and their susceptibility to attack by *Meloidogyne incognita*. *Plant and Soil* 57, 231- 236.
- Alam, M.M., Siddiqui, S.A., Khan, A. (1977)** Mechanism of control of plant parasitic nematodes as a result of the application of organic amendments to the soil. Role of phenols and amino acids in host root. *Indian. J. Nematol.* 7, 27-31.
- Alam, MM; Siddiqui, MA and Ahmad, A. (1990)** Antagonistic plants pp: 41.50. *In Nematode bio-control (Aspects and prospects)*. Edt. M.S. Jairajpuri, M.M. Alam & I. Ahmad. CBS Publishers and Distributors. Delhi.11032, India.
- Albiach, R., Canet R., Gómez A., Pomares F. (1998)** Actividades enzimáticas como índices de la actividad biológica del suelo en huertos ecológicos de cítricos. *Actas del segundo congreso SEAE*. pp 406-412.
- Albiach, R., Canet, R., Pomares, F., Ingelmo, F. (2000)** Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to a horticultural soil. *Bioresource Technology* 75, 43-48.
- Albiach, R., Gómez, A., Pomares, F., Canet, R. (1998)** Efecto del tipo de fertilización sobre la actividad biológica del suelo en reconversión a la agricultura ecológica. En Una alternativa para el mundo rural del Tercer Milenio. *III Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Valencia*.
- Ali, A.H. (1996)** Biocontrol of reniform and root-knot nematodes by new bacterial isolates. *Bull. Fac. Agric., Cairo Univ.* 47, 487-490.
- Allison, S.D., J.D. Jastrow. (2006)** Activities of extracellular enzymes in physically isolated fractions of restored grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 3245-3256.
- Altieri, M. A. (1997)** Agroecología. Bases científicas para una agricultura sustentable *CLADES, La Habana, Cuba*, 249 pp.
- Alves da Cunha, M. A., A. M. Barbosa, E. C. Giese, and Dekker, R. F. (2003)** The effect of carbohydrate carbon sources on the production of constitutive and inducible laccases by *Botryosphaeria* spp. *J. Basic Microbiol.* 43, 385–392.

- Angus, J.F., Gardner, P.A., Kirkegaard, J.A., Desmarchelier, J.M. (1994).** Biofumigation : Isothiocyanates released from *Brassica* roots inhibit growth of the take-all fungus. *Plant and Soil* 162, 107-112.
- Antcheva, N., Pintar, A., Patthy, A., Simoncsits, A., Barta, E., Tchorbanov, B., Pongor, S. (2001)** Proteins of circularly permuted sequence present within the same organism: the major serine proteinase inhibitor from *Capsicum annuum* seeds. *Protein Sci.*, 10, 2280-2290.
- Aon M.A., Colaneri, A.C. (2001)** Temporal and spatial evolution o enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology* 18, 255–270.
- Armas, C.M., Santana, B., Mora, J.L., Notario, J.S., Arbelo C.D., Rodriguez A. (2007)** A biological quality index for volcanic Andisols and Aridisols (Canary Islands Spain) variations related to the ecosystem development. *Science Total Environment* 378, 238-244.
- Aro, N., Pakula, T., Penttilä, M. (2005)** Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev.* 29, 719-39.
- Arpigny, J.L., Jaeger, K.E. (1999)** Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343(Pt 1), 177–183
- Arpin, P., Kilbertus, G. (1981)** Ultrastructure du contenu digestif et de l'épithélium intestinal chez quelques nématodes prédateurs (*Mononchida*) et bactériophages. *Revue de Nématologie*, 4, 131-143.
- Arshad, M.A., Martin, S. (2002)** Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 88, 153-160.
- Atungwu, J.J. (2005)** An overview of the impact of organic manure as plant parasitic nematode suppressant. *Proceedings, 1st National Conference on Organic Agriculture,UNAAB, Abeokuta, Nigeria, 25 – 28th October.*
- Badra, T., Saleh, M. A., Oteifa, B. A. (1979)** Nematicidal activity and composition of some organic fertilizers and amendments. *Revue de Nématologie* 2, 29-36.
- Bai Y, Wu J, Clark CM, Naeem S, Pan Q, et al. (2010)** Tradeoffs and thresholds in the effects of nitrogen addition on biodiversity and ecosystem functioning: evidence from inner Mongolia Grasslands. *Global Change Biol.* 16, 358–372.
- Bais, H., Vepachedu, R., Gilroy, S., Callaway, R., Vivanco, J. (2003)** Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science*, 301, 1377-1380.
- Baker, E.F., Cook, R.J., (1974)** Biological Control of Plant Pathogens, W. H. Freeman and Co, San Francisco, California. 433 pp. (Book, reprinted in 1982, *Amer. Phytopathol. Soc.*, St. Paul, Minnesota).
- Baldwin, J.C., Karthikeyan, A.S., Raghothama, K.G. (2001)** LEPS2, a phosphorus starvation induced novel acid phosphatase from tomato. *Plant Physiol.* 125: 728-737.
- Bandick, A.K., Dick, R.P. (1999)** Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biol. Biochem.* 31, 1471-1479.
- Barrés, M.T., Bello, A., Jordá, C., Tello, J.C. (2007)** La eliminación del bromuro de metilo en la protección de cultivos como modelo mundial para la conservación del medio ambiente, *MAPA, Madrid*, 500 pp..
- Barret, J., Ward, C.W., Fairbaikd, N. (1970)** The glyoxylate cycle and the conversion of tryglycerides to carbohydrate in the developing eggs of *Ascaris lumbricoides*. *Comp. Biochem. Physiol.* 35, 577-586.
- Barron, G. L. (1977)** The nematode destroying fungi. *Canadian Biological Publications: Guelph, Ontario.*
- Barron, G.L. (1992)** Lignolytic and cellulolytic fungi as predators and parasites. The Wicklow, Eds. 2ª Ed. 311-326. Marcel Dekker, Inc New York.
- Bartelt-Ryser, J., Joshi, J., Schmid, B., Brandl, H., Balsler, T. (2005)** Soil feedbacks of plant diversity on soil microbial communities and subsequent plant growth. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 7, 27-49.

- Bartinicki-Garcia, S. (1968)** Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Ann. Rev. Microbiol.* 144, 346-349.
- Bastida, F., Kandeler, E., Moreno, J.L., Ros, M., García, C., Hernández, T. (2008)** Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semiarid climate. *Applied Soil Ecology*, 40, 318-329.
- Bastida, F., Zsolnay, A., Hernandez, T., Garcia, C. (2008)** Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma* 147, 159-171.
- Beck, Th., (1984)** Methods and application of soil microbiological analysis at the Landensanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau (LBB) for the determination of some aspects of soil fertility. In: *Proceedings of the Fifth Symposium on Soil Biology, Rumanian National Society of Soil Science, Bucharest, Rumania*, pp. 13-20
- Bello, A. (1979)** Nematodos encontrados en los suelos de la provincia de Toledo. *Anal. Edaf. Agrob.*, 38, 1765-1784.
- Bello, A. (1998)** Biofumigation and integrated pest management. In: A Bello, JA González, M Arias, R Rodríguez Kábana (Eds). *Alternatives to Methyl Bromide for the Southern European Countries. EC DG XI-CSIC, Valencia*, 99-126.
- Bello, A., González, J.A. (1994)** "Potato cyst nematodes in the Canary Islands: an epidemiologic model for the Mediterranean region". *Boletín EPPO*, 24. "Jornadas Técnicas sobre enfermedades producidas por nemátodos en vegetales". *Ed. M.A.P.A. y C.S.I.C.*
- Bello A, López Pérez JA, García Álvarez, A. (2003)** Biofumigación en Agricultura Extensiva de Regadío. Producción Integrada de Hortícolas. *CSIC-Caja Rural de Alicante*, Mundi-Prensa, Madrid.
- Bello, A., Arias, M., López-Pérez, JA., García-Álvarez, A., Fresno, J., Escuer, M., Arcos, SC., Lacasa, A., Sanz, R., Gómez, P., Díez-Rojo, MA., Piedra-Buena, A., Goitia, C., Horra, J.L. de la, Martínez, C. (2004)** Biofumigation, fallow, and nematode management in vineyard replant. *Nematopica* 34, 1.
- Bello, A., López-Pérez, J.A., Sanz, R., Escuer, M., Herrero, J. (2000)** Biofumigation and organic amendments. *MB Alternative for North Africa and Southern EC, UNEP Francia* 113-141.
- Bello, A., López-Pérez, JA., Díaz-Viruliche, L., Tello, J.C. (2001)** Alternatives to methyl bromide for soil fumigation in Spain. In: R Labrada, L Fornasari (Eds). *Global Report on Validates Alternatives to the Use of Methyl Bromide for Soil Fumigation. FAO Plant Production and Protection* 166, 33-46.
- Berg, G., Zachow, C., Lottmann, J., Götz, M., Costa, R., Smalla, K. (2005)** Impact of plant species and site on rhizosphere-associated fungi antagonistic to *Verticillium dahliae* Kleb. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4203-4213.
- Bergstrom, D.W., Monreal, C.M., King, D.J. (1998)** Sensitivity of soil enzyme activities to conservation practices. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 62, 1286-1295.
- Bettany, J. R., Stewart, J. W. B. (1983)** Sulphur cycling in soils. In: More, A. I. (Ed.). *Proceedings of the International Sulphur '82 Conference*, Nov. 1982, London, England, Vol. II. The British Sulphur Corporation, pp. 767-86.
- Bidochka, M.J., Khachatourians, G.G. (1993)** Regulation of extracellular N-acetyl-D-glucosaminidase production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Can. J. Microbiol.* 39,6-12.
- Biely, P. (1985)** Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3, 286-290.
- Bilgrami, A.L., Ahmad, I., Jairajpuri, M.S. (1986)** A study of the intestinal contents of some mononchs. *Rev. Nematology*, 9, 191-194.
- Bird, A. F. (1968)** Changes associated with parasitism in nematodes. III. Ultrastructure of the egg shell, larval cuticle, and contents of the subventral oesophageal glands in *Meloidogyne javanica*, with some observations on hatching. *J. Parasitology* 54, 475-489.

- Bird, G.W. (1987)** Role of nematology in integrated pests management programs. *Plenum Press*. New York and London, 164 pp.
- Birkhofer, K., Bezemer, T.M., Bloem, J., Bonkowski, M., Christensen, S., Dubois, D., Ekelund, F., Fließbach, A., Gunst, L., Hedlund, K., Mäder, P., Mikola, J., Robin, C., Setälä, H., Tatin-Froux, F., Van der Putten, W.H., and Scheu, S., (2008)** Long-term organic farming fosters below and aboveground biota: implications for soil quality, biological control and productivity. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2297–2308.
- Blair, A. C., Hanson, B. D., Brunk, G. R., Marrs, R. A., Westra, P., Nissen, S. J., Hufbauer, R. A. (2005)** New techniques and findings in the study of a candidate allelochemical implicated in invasion success. *Ecology Letters*, 8, 1039-1047.
- Blair, A. C., Nissen, S. J., Brunk, G. R., Hufbauer, R. A. (2006)** A lack of evidence for an ecological role of the putative allelochemical ( $\pm$ )-catechin in spotted knapweed invasion success. *Journal of Chemical Ecology*, 32, 2327-2331.
- Blanck, H., Wångberg, S., Molander, S. (1988)** Pollution-induced community tolerance a new ecotoxicological tool. In: Cairns J, Pratt JR (eds) Functional testing of aquatic biota for estimating hazards of chemicals. *Am. Soc. for Testing and Materials, Philadelphia*, pp 219–230.
- Blok, W.J., Lamers, J.G., Termorshuizen, A.J., Bollen, G.J. (2000)** Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. *Phytopathology* 90, 253-259.
- Boczar, B.A., Forney, L.J., Begley, W.M., Larson, R.J., Federle T.W. (2001)** Characterization and distribution of esterase activity in activated sludge. *Wat. Res.* 35, 4208–4216.
- Bonanomi, G., Antignani V., Pane C., Scala F. (2007)** Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments. *Journal of Plant Pathology* 89, 311-324.
- Bonanomi, G., Antignani, V., Capodilupo, M., Scala, F. (2010)** Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soilborne plant diseases. *Soil Biol. Biochem.* 42, 136–144.
- Bones, A.M., Rossiter, J.T. (1996)** The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum*. Vol. 97, Issue 1, 194–208.
- Bongers, T. (1990)** The maturity index: An ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia* 83, 14–19.
- Bongers, T., Bongers, M. (1998)** Functional diversity of nematodes. *Applied Soil Ecology* 10, 239–251.
- Bongers, T., Ferris, H. (1999)** Nematode community structure as a biomonitor in environmental monitoring. *Trends in Ecology and Evolution* 1, 224–228.
- Borner, H. (1958)** Untersuchungen über den Abbau von Phlorizin im Boden. Ein Beitrag zum Problem der Bodenmüdigkeit bei Obstgehölzen. *Naturwiss* 45, 138–139
- Boyd, S.A., Mortland, M.M. (1990)** Enzyme interactions with clays. In Bollag I.M., Stotzky, G. Ed. *Soil Biochemistry* 6, 1-28.
- Brady, N. C., Weil, R. R. (2002)** The Nature and Properties of Soils. *Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ*.
- Bray, R.H., Kurtz, L.T. (1945)** Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* 59: 39-45.
- Browman, M.G., Tabatabai, M.A. (1978)** Phosphodiesterase activity of soils. *Soil Science Society of America Journal* 42, 284–290.
- Browning, M., Dawson, C., Alm, S.R., Gorres, J.H., Amador, J.A., (2004)** Differential effects of butyric acid on nematodes from four trophic groups. *Applied Soil Ecology* 27, 47–54.
- Browning, M., Wallace, D.B., Dawson, C., Alm, S.R., Amador, J.A., (2006)** Potential of butyric acid for control of soil-borne fungal pathogens and nematodes affecting strawberries. *Soil Biology and Biochemistry*. 38, 401–404.

- Bünemann, E.K., Bossio, D.A., Smithson, P.C., Frossard, E., Oberson, A. (2004)** Microbial community composition and substrate use in a highly weathered soil as affected by crop rotation and P fertilization. *Soil Biol. Biochem.* 36, 889–901.
- Burns, R.G. (1982)** Enzyme Activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 14, 423-427.
- Burns, R.G. (1983)** Extracellular enzyme-substrate interactions in soil. In: *Microbes in Their Natural Environment* (Slater JH, Wittenbury R and Wimpenny JWT Eds), pp. 249-298. Cambridge University Press, London.
- Callaway, R., Aschehoug, E. (2000)** Invasive plants versus their new and old neighbors: a mechanism for exotic invasion. *Science* 290, 521-523.
- Callaway, R., Thelen, G., Rodriguez, A., Holben, W. (2004)** Soil biota and exotic plant invasion. *Nature* 427, 731-733.
- Callis, J., Vierstra, R.D. (2000)** Protein degradation in signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 381–386.
- Carrero, J.M., Planes, S. (2008)** Plagas del campo. 13ª edición. Ed Mundi Prensa.
- Caster-Picard, P. (2008)** Control of potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *Cahiers Agricultures*. Volume 17, Number 4, 368-74.
- Castillo, P., Nico, A. I., Azcón-Aguilar, C., Del Rio Rincón, C., Calvet, C., Jiménez-Díaz, R. M. (2006)** Protection of olive planting stocks against parasitism of root-knot nematodes by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Pathology* 55(5), 705 – 713.
- Cattani, I., Spalla, S., Beone, G.M., Del Re, A.A.M., Boccelli, R., Trevisan, M. (2008)** Characterization of mercury species in soils by HPLC–ICP–MS and measurement of fraction removed by diffusive gradient in thin films. *Talanta*, 74, 1520–1526.
- Ceccanti, B., Garcia, C. (1994)** Coupled chemical and biochemical methodologies to characterize a composting process and the humic substances. In: Senesi, N. and Miano, T.M. (Eds.), *Humic Substances In The Global Environment And Implications On Human Health*. Elsevier, Amsterdam. pp. 1279-1284.
- Chaboud, A. (1983)** Isolation, purification and chemical composition of maize root cap slime. *Plant Soil* 395-402.
- Chao, W.S., Gu, Y-Q., Pautot, V., Bray, E.A., Walling, L.L. (1999)** Leucine aminopeptidase RNAs, proteins and activities increase in response to water deficit, salinity and the wound signals: systemin, methyl jasmonate, and abscisic acid. *Plant Physiol.* 120, 979–992.
- Chao, W.S., Pautot, V., Holzer, F.M., Walling, L.L. (2000)** Leucine aminopeptidases: the ubiquity of LAP-N and the specificity of LAP-A. *Planta.* 210, 563–573.
- Chet, I. (1987)** Trichoderma-application, mode of action, and potential as biocontrol agent of soil borne pathogenic fungi. In: Chet I (Ed.) *Innovative approaches to plant disease control*, Wiley, New York, pp. 137-349.
- Chet, I., Henis, Y. (1969)** Effect of catechol and disodium EDTA on melanin content of hyphal and sclerotial walls of *Sclerotium rolfsii* Sacc. and the role of melanin in the susceptibility of these walls to  $\beta$ -1-3 glucanase and chitinase. *Soil Biol. Biochem.* 1, 131-138.
- Chet, I., Henis, Y. (1975)** Sclerotial morphogenesis in fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 13, 169-192.
- Chet, I., Ordentlich, A., Shapira, R., Oppenheim, A. (1990)** Mechanism of biocontrol of soil borne plant pathogen by rhizobacteria. *Plant Soil.* 129, 85-92.
- Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., Li, J., Wang, X. (2009)** Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. *Biotechnology Advances*, 27, 236–255.



- Choi, D., Park, J.A., Seo, Y.S., Chun, Y.J., Kim, W.T. (2000)** Structure and stress-related expression of two cDNAs encoding proteinase inhibitor II of *Nicotiana glutinosa*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1492, 211-215.
- Christeller, J.T. (2005)** Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS Journal*, 272, 5710–5722.
- Christeller, J., Liang, W. (2005)** Plant serine protease inhibitors. *Protein and Peptide Letters*, 12, 439-447.
- Chrost, R.J. (1991)** Microbial enzymes in aquatic environments. *Springer-Verlag*, New York, USA.
- Chu, C. P., Kariyama, R., Daneo-Moore, L., Shockman, G. D. (1992)** Cloning and sequence analysis of the muramidase-2 gene from *Enterococcus hirae*. *J. Bacteriol.* 174, 1619-1625.
- Clarke, A. J., Perry, R. N. (1985)** Egg-shell calcium and the hatching of *Globodera rostochiensis* *International Journal of Parasitology* 15, 511–516.
- Clarke, A.J., Perry, R.N. (1977)** Hatching of cyst-nematodes. *Nematologica* 23, 350-368.
- Clarke, A.J., Perry, R.N., Hennessy, J. (1978)** Osmotic stress and the hatching of *Globoclera rostochiensis*. *Nematologica* 24, 384-392.
- Cleemput, G., Hessing, M., Van Oort, M., Deconynck, M., De Cour, A. (1997).** Purification and characterization of a b-D-xylosidase and an endoxylanase from wheat flour. *Plant Physiol.*, 113, 377-386.
- Conesa, H.M., García, G., Faz, A., Arnaldos, R. (2007)** Dynamics of metal tolerant plant communities development in mine tailings from the Cartagena-La Unión Mining District (SE Spain) and their interest for further revegetation purposes. *Chemosphere*, 68, 1180–1185.
- Confer, D. R., Logan, B. E. (1998)** Location of protein and polysaccharide hydrolytic activity in suspended and biofilm wastewater cultures. *Water. Res.* 32, 31–38.
- Cook J.R., Baker, K.R. (1983)** The nature and practice of biological control of plant pathogens. *Phytopathological Society Biological*, 8, 539.
- Cooper, P.J.M. (1972)** Arylsulphatase activity in Northern Nigerian soils. *Soil Biol. Biochem.* 4, 333-337.
- Cosgrove, D. (1967)** Metabolism of organic phosphates in soil. McLaren AD, Peterson GH, editors. *Soil Biochemistry*.1, 216-28. New York, USA7 Marcel Dekker.
- Couglan, M.P., Hazlewood, G.P. (1993)**  $\beta$ -1,4-D-xylan degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology, and applications. *Biotechnol Appl Biochem* 17, 259-289.
- Cronin, D., Cronin, D., Cronin, D., Moenne-Loccoz, Y., Dunne, C., O’Gara, F. (1997)** Inhibition of egg hatch of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* by chitinase-producing bacteria. *European Journal of Plant Pathology* 103, 433–440.
- Culbreath, A. K., Rodríguez-Kábana, R., Morgan-Jones, G. (1985)** The use of hemicellulosic waste matter for reduction of the phytotoxic effects of chitin and control of root-knot nematodes. *Nematropica* 15, 49-75.
- D’Addabbo, T. (1995)** The nematicidal effect of organic amendments: A review of the literature, 1982-1994. *Nematology Mediterranea.* 23, 299-305.
- D’Addabbo, T., Sasanelli, N. (2003)** Control of phytoparasitic nematodes by biocidal plants. *Atti XXXV Convegno SIA*, N° 23, 363 – 364.
- D’Addabbo, T., Sasanelli, N., Greco, N., Stea, V., Brandonisio, A. (2005)** Effect of Water, Soil Temperatures, and Exposure Times on the Survival of the Sugar Beet Cyst Nematode: *Heterodera schachtii*. *Phytopathol* 95 (4), 339 – 344.
- Dackman, C., Norbreng-Hertz, B. (1992)** Conidial-traps a new survival structure of nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Mycological Research*, 96, 194-198.

- Dalal, R.C. (1998)** Soil microbial biomass. What do the number really mean? *Australian Journal of Experimental Agriculture* 38, 645-665.
- Daram, P., Brunner, S., Rausch, C., Steiner, C., Amrhein, N., Bucher, M. (1999)** Pht2; I encodes a low affinity phosphate transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 11, 2153-2166.
- Darrah, P.R., Harris, P.J., (1986)** A fluorometric method for measuring the activity of soil enzymes. *Plant and Soil* 92, 81-88.
- Davies, K.G., Curtis R.H.C (2011)** Cuticle Surface Coat of Plant-Parasitic Nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 49, 135-156.
- Davis, D., Waggoner, P.E., Dimond, A.E. (1953)** Conjugated phenols in the *Fusarium wilt* syndrome. *Nature, Land*. 172, 959-961.
- De Cesare, F., Garzillo, A.M.V., Buonocore, V., Badalucco, L. (2000)** Use of sonication for measuring acid phosphatase activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 825-832.
- De Deyn, G.B., Raaijmaker, C.E., van Ruijven, J., Berendse, F., van Der Putten, W.H. (2004)** Plant species identity and diversity effects on different trophic levels of nematodes in the soil food web. *Oikos* 106, 576-586.
- De la Paz-Jimenez, M., de la Horra, A.M., Pryzzo, L., Palma, R.M. (2002)** Soil quality: a new index base microbiological and biochemical parameters. *Biology Fertility Soils* 35, 302-306.
- De Ruijter, F.J., Haverkort, A.J. (1999)** Effects of potato-cyst nematodes (*Globodera pallida*) and soil pH on root growth, nutrient uptake and crop growth of potato. *European J. Plant Pathology* 105, 61-76.
- DeForest, J.L. (2009)** The influence of time, storage temperature, and substrate age on potential soil enzyme activity in acidic forest soils using MUB-linked substrates and L-DOPA. *Soil Biology & Biochemistry* 41, 1180-1186.
- del Pozo, J.C., Allona, I., Rubio, V., Layva, A., de la Pena, A., Aragoncillo, C., Paz-Area, J. (1999)** A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilizing/oxidative stress conditions. *Plant J.* 19, 579- 589.
- den Nijs, L.J.M.E., Lock, C.A.M. (1992)** Differential hatching of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* in root diffusates and water of differing ionic composition *Neth. J. Plant Path.* 98, 117-128.
- Deng, S.P., Tabatabai, M.A. (1994)** Cellulase activity of soils. *Soil Biol. Biochem.* 26, 1347-1354.
- Deng, S.P., Tabatabai, M.A. (1995)** Cellulase activity of soils: effect of trace elements. *Soil Biol. Biochem.* 27(7), 977-979.
- Deshpande, M.V. (1986)** Enzymatic degradation of chitin and its biological applications. *J. Sci. Ind. Res.* 45, 273-281.
- Devine, K.J., Jones, P.W. (2001)** Effects of hatching factors on potato cyst nematode hatch and in-egg mortality in soil and in vitro. *Nematology*, 3 (1), 65-74
- Dianez, F., Santos-Hernandez, M., Blanco, M.R., Chevaani, M., Castillo, P., Yelamos, J.A., Gea, F.J., Trillas, M.J., Avilés, M., Sinobas, J., Tello, J.C. (2002)** Supresividad de la microbiota bacteriana presente en el compost de orujo de vid frente a hongos fitopatógenos. *I Congreso Iberoamericano de Agroecología*, 983-991 Gijón.
- Dick, R.P. (1994)** Soil enzyme activities as indicators of soil quality. In: Doran JV, Coleman DC, Bezdicek DF, Stewart BA (Eds.). *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*, Soil Science Society of America, American Society of Agriculture, Madison, pp. 107-124.
- Dick, R.P. (1997)** Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR (Eds.). *Biological Indicators of Soil Health*, CAB International, Wellingford, pp. 121-156.

- Dick, R.P., Breakwell, D.P., Turco, R.F. (1996)** Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. In: *Methods for Assessing Soil Quality*, vol. 9. Soil Sci. Soc. Am. Madison, WI pp. 9-17.
- Dick, R.P., Tabatabai, M.A. (1986)** Hydrolysis of polyphosphate in soils. *Soil Sci* 142, 132–140
- Dick, W.A., Juma, N.G., Tabatabai, M.A. (1983)** Effects of soils on acid phosphatase and inorganic pyrophosphatase of corn roots. *Soil Sci.* 136, 19–25.
- Dick, W.A., Tabatabai, M.A. (1984)** Kinetic parameters of phosphatase in soils and organic waste materials. *Soil Sci.* 137, 7-15.
- Dick, W.A., Tabatabai, M.A. (1987)** Kinetic and activities of phosphatase-clay complexes. *Soil Sci.* 143, 5–15.
- Dick, W.A., Tabatai, M.A. (1992)** Potential uses of soil enzymes. In: Metting FB Jr. (Ed.), *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*, Marcel Dekker, New York, pp. 95-127.
- Dick, W.A., Cheng, L., Wang, P. (2000)**. Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1915- 1919.
- Díez-Rojo, M.A., López-Pérez, J.A., Urbano-Terrón, P., Bello, A. (2010)** *Biodesinfección de suelos y manejo agronómico*. MAPA. Madrid
- Díez-Rojo, M.A., Bello, A., Escuer, M., López-Pérez, J.A., García-Álvarez, A. (2006)** Nematodos Fitoparásitos Encontrados en Castilla y León. Alternativas no Químicas de Control. MAPA, Madrid.
- Dodgson, K.S., White, G., Fitzgerald, J.W. (1982)** Sulphatase Enzyme of Microbial Origin, Vol. I. CR Press, Florida.
- Dodor, D.E., Tabatabai, M.A. (2002)** Effects of cropping systems and microbial biomass on arylamidase activity in soils. *Biol. Fertil. Soils* 35, 253–261.
- Dolinger, D. L., Daneo-Moore, L., Shockman, G. D. (1989)** The second peptidoglycan hydrolase of *Streptococcus faecium* ATCC 9790 covalently binds penicillin. *J. Bacteriol.* 171, 4355-4361.
- Domínguez, J., Negrín, M. A., Rodríguez, C. M. (2001)** Aggregate water-stability, particle-size and soil solution properties in conducive and suppressive soils to *Fusarium* wilt of banana from Canary Islands (Spain). *Soil Biology and Biochemistry* 33, 449-455.
- Doran, J.W., Parkin, B.T. (1994)** Defining Soil Quality for a Sustainable Environment. *Soil Science Society of America*, Inc. Special Publication. Number 35. Madison, Wisconsin, USA.
- Drouillon, M., Merckx, R. (2005)** Performance of para-nitrophenyl phosphate and 4-methylumbelliferyl phosphate as substrate analogues for phosphomonoesterase in soils with different organic matter content. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 1527-1534.
- Duff, S.M.G., Sarath, G., Plaxton, W.C. (1994)** The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol. Plant.* 90, 791-800.
- Duineveld, B.M., Rosado, A.S., van Elsas, J.D., van Veen, J.A. (1998)** Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. *Appl. Environ. Microb.* 64, 4950–4957.
- Eckert, C., Lecerf, M., Dubost, L., Arthur, M., Mesnage, S. (2006)** Functional analysis of AtIA, the major N-acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol.* 188, 8513–8519.
- Ehrenfeld, J. (2003)** Effects of exotic plant invasions on soil nutrient cycling processes. *Ecosystems*, 6, 503-523.
- Ehrenfeld, J., Ravit, B., Elgersma, K. (2005)** Feedback in the plant-soil system. *Ann. Rev. Environment and Resources*, 30, 75-115.
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A. (1977)** Phosphatases in soils. *Soil Biol. Biochem.* 9, 167–172.

- Eivazi, F., Tabatabai, M.A. (1988)** Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biol. Biochem.* 20, 601-606.
- Ekenler, M., Tabatabai, M.A. (2002)**  $\beta$ -Glucosaminidase activity of soils: effect of cropping systems and its relationship to nitrogen mineralization. *Biol. Fertil. Soils* 36, 367–376.
- Elad, Y., Chet, I., Henis, Y. (1982)** Degradation of plant pathogenic fungi by *Trirhoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.*, 28, 719-725.
- Elad, Y., Katan, J., Chet, I. (1980)** Physical, biological, and chemical control integrated for soilborne diseases in potatoes. *Phytopathology* 70, 418-422.
- Elend, C., Schmeisser, C., Hoebenreich, H., Steele, H.L., Streit, W.R. (2007)** Isolation and characterization of a metagenome-derived and coldactive lipase with high stereospecificity for (R)-ibuprofen esters. *J. Biotechnol.* 130, 370–377.
- Elgersma, K.J. (2010)** The Community-level and ecosystem level consequences of feedbacks between the soil ecosystem and the plant community during forest understory invasion. PhD Thesis School-New Brunswick Rutgers, The State University of New Jersey.
- Eliwa, E.S., El-Hofi, M. (2010)**  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -GAL) from the yeast *Rhodotorula ingeniosa* and its utilization in ice milk production. *Electronic J. of Polish Agricultural Universities* 13(1).
- El-Nagdi, W.M.A., Youssef, M.M.A. (2004)** Soaking faba bean seeds in some bioagents as prophylactic treatment for controlling *Meloidogyne incognita* rootknot nematode infection. *J. Pest. Sci.*, 77, 75-78.
- El-Sherif, M.A., Ali, A.H., Barakat, M.I.C. (1999)** Suppressive bacteria associated with plant parasitic nematodes in Egyptian agriculture. *Jap. J. Nematol.*, 24, 55-59.
- EPPO A2 List: N° 125 Directiva 2007/33/EC on control of potato cyst nematode**
- Esen, A. (1993)**  $\beta$ -Glucosidases-Biochemistry and Molecular Biology, ACS Symposium Series, 533, American Chemical Society, Washington, D. C.
- Estañol, BE. (1987)** Efecto de la inoculación de *Rhizobium phaseoli* y de la endomicorriza vesicular-arbuscular (V-A) sobre el parasitismo de los nematodos *Meloidogyne incognita* y *ditylenchus dipsaci* en cultivos de frijol y cebolla. Tesis de Licenciatura. ENEP Zaragoza, UNAM. México.
- Evans, K. (1982)** Effects of host variety, photoperiod and chemical treatments on hatching of *Globodera rostochiensis*. *Journal of Nematology* 14, 203-207.
- Evans, K. (1983)** Hatching of potato cyst nematodes in root diffusates collected from twenty five potato cultivars. *Crop Protection* 2, 97-103.
- Evans, K., Trudgill, D. L., Webster, J. M. (1993)** Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. ISBN: 0851988083.
- Fancelli, A.L. (1990)** Adubacao verde. Ed. A.L. Fancelli. Piracicaba: ESALQ/USP, Sao Paulo, Brasil.
- FAO (1996)** Fao Production Yearbook, 49. FAO Roma .
- Fenwick, D. W. (1940)** Methods for recovery and counting of cyst *Heterodera Sachtii* from soil. *Journal of Helminthology* 18, 155-172.
- Fenwick, D.W. (1952)** The bio-assay of potato-root diffusate. *Annals of Applied Biology* 39, 457-467.
- Ferris, H., Bongers, T., de Goede, R.G.M. (2001)** A framework for soil food web diagnostics: Extension of the nematode faunal analysis concept. *Appl. Soil Ecol.* 18, 13–29.
- Ferris, H., Matute, M.M. (2003)** Structural and functional succession in the nematode fauna of a soil food web. *Appl Soil Ecol.* 23, 93–110.
- Fitzgerald, J.W. (1976)** Sulphate ester formation and hydrolysis: a potentially important yet often ignored aspect of the sulphur cycle of aerobic soils. *Bacteriol. Rev.* 40, 628-721.

- Fitzgerald, J.W., Stickland, T.C. (1987)** Mineralization of organic sulphur in the O-horizon of a hardwood forest: involvement of sulphatase enzyme. *Soil Biol. Biochem.* 19, 779-781.
- Fleck, A.T., Nye, T., Repenning, C., Stahl, F., Zahn, M., Schenk, M.K. (2012)** Silicon enhances suberization and lignification in roots of rice (*Oryza sativa*). *J. Exp. Bot.* 62, 2001-2011.
- Forge, T.A., Bittman, S., Kowalenko, C.G. (2005)** Responses of grassland soil nematodes and protozoa to multi-year and single-year applications of dairy manure slurry and fertilizer. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1751-1762.
- Franco, J. (1994)** Problemas de nematodos en la producción de papa en climas templados en la región andina. *Nematropica*, 24, 179-195.
- Franklin, M.T. (1971)** Taxonomi of Heteroderidae, pp 139-162. In B.M. Zucherman, W.F. Mai and rhode (eds.) *Plant parasitic Nematodes Vol 1: Morphology, Anatomy, Taxonomy and Ecology*. Academic Press. New York USA.
- Freckman, D.W., Ettema, CH. (1993)** Assessing nematode communities in agroecosystems of varying human intervention. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 45, 239-261.
- Freeman, C., Liska, G., Ostle, N., Jones, S.E., Lock, M.A., (1995)** The use of fluorogenic substrates for measuring enzyme activity in peatlands. *Plant and Soil* 175, 147-152.
- Fries, L.L.M.; Pacovsky R.S. and Safir. G.R. (1996)** Expression of isoenzymes altered by both *Glomus intraradices* colonization and formononetin application in corn (*Zea mays* L.) roots. *Soil Biol. Biochem.* 28, 981-988.
- Gamliel, A., Austerweil, M., Kritzman, G., (2000)** Non-chemical approach to soilborne pest management: organic amendment. *Crop Protection* 19, 847-853.
- Ganeshamurthy, A.M., Singh, G., Singh, N.T. (1995)** Sulphur status and response of rice to sulphur on some soils of Andaman and Nicobar Islands. *J. Indian Soc. Soil Sci.* 43, 637-641.
- Garbeva, P., Postma, J., van Veen, J.A., van Elsas, J.D. (2006)** Effect of above-ground plant species on soil microbial community structure and its impact on suppression of *Rhizoctonia solani* AG3. *Environmental Microbiology* 8, 233-246.
- García, C., Gil, F., Hernández, T., Trasar, C. (2003)** Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en Suelos. Medida de Actividades Enzimáticas y Biomasa Ed. Mundi-Prensa. I.S.B.N. 84-8476-154-1
- García, C., Hernández, T., Pascual, J., Moreno, M.R. (2000)** Actividad microbiana de suelos del sureste español sometidos a procesos de degradación y desertificación. Estrategias para su rehabilitación. pp. 43-92. En: García, C. y T. Hernández (eds.). *Investigación y perspectivas de la enzimología de suelos en España*. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC), Murcia. 352 p.
- García, G.J.M., Ocampo, J.A. (1987)** Interacción entre micorrizas V-A y organismos patógenos de plantas. *Ann. Edafol. Agrobiol.* 1233-1245.
- García-Gil, J. C., Plaza, C., Soler-Rovira, P., Polo, A. (2000)** Long-term effects of municipal solid waste compost application on soil enzyme activities and microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1907-1913.
- García-Ruiz R., Ochoa, V., Viñegla, B., Hinojosa, M.B., Peña-Santiago, R., Liébanas, G., Linares, J.C., Carreira J.A. (2009)** Soil enzymes, nematode community and selected physico-chemical properties as soil quality indicators in organic and conventional olive oil farming: Influence of seasonality and site features. *Applied Soil Ecology* 41, 305-314.
- García-Ruiz, R., Ochoa, V., Hinojosa, M.B., Carreira, J.A. (2008)** Suitability of enzyme activities for the monitoring of soil quality improvement in organic agricultural systems. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2137-2145.
- Gardi, C., Sconosciuto, F. (2007)** Evaluation of carbon stock variation in Northern Italian soils over the last 70 years. *Sustain. Science* 2, 237-243.

- German, D.P., Chacon, S.S., Allison, S.D. (2011)** Substrate concentration and enzyme allocation can affect rates of microbial decomposition. *Ecology*, 92, 1471–1480.
- German, D.P., Weintraub, M.N., Grandy, A.S., Lauber, C.L., Rinkes, Z.L., Allison, S.D. (2011)** Optimization of hydrolytic and oxidative enzyme methods for ecosystem studies. *Soil Biol. Biochem.*, 43, 1387–1397.
- Gianfreda, L., Ruggiero, P., (2006)** Enzyme activities in soil. In: Nannipieri, P., Smalla, K. (Eds.), *Nucleic Acids and Proteins in Soil. Soil Biology*, 8, 257-311.
- Gibson, D. M., Moreau, R.A., McNeil, G.P., Brodie, B.B. (1995)** Lipid Composition of Cyst Stages of *Globodera rostochiensis*. *Journal of Nematology* 27, 304–311.
- Gil-Sotres, F., Leirós de la Peña, MC., Trasar-Cepeda, C., Seoane, S. (2005)** Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biol. Biochem.* 37, 877-887.
- Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Ciardi, C., Ceccantti, B., Leiros, M., (1992)** Biochemical characterization of biological activity in very young mine mine soils. *Biology and Fertility of Soils* 13, 25-30.
- Goldstein, A.H. (1992)** Phosphate starvation inducible enzymes and proteins in higher plants. In: Wray JL (ed.) *Society for Experimental Biology Seminar series 49. Inducible plant proteins*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 25-44.
- González-Carcedo, S. (2011)** Los biofilms y sus implicaciones en Edafología y en Sanidad. Discurso de entrada en la Real Academia de Farmacia de Castilla y León. Ed. Sever-Cuesta. Valladolid.
- González-Carcedo, S., Alvarez, F., Barriuso, E., Rojo Cámara, MJ. (1984)** Hipótesis sobre el mecanismo regulador de la actividad fosfatásica del suelo. XX. *Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Física y Química*. Castellón de la Plana.
- González-Carcedo, S., Barriuso, E., Pérez-Mateos, M. (1990)** Actividad ureásica en diferentes medios edafo-ecológicos. *Agrochimica* XXXIV, 32-42.
- González-Carcedo, S., Sagredo, M., Navarro, M. (1995)** Signification of phosphatase present inside immobilized and "Olsen" soil fractions. *Meeting on The Soil as a strategic resource: Degradation processes and conservation measures. European Society of Soil Conservation* D.30. Tenerife.
- Goswami, B.R., Rumperhorst, J. (1978).** Association of an unknown fungus with potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Nematropica* 24, 251-256.
- Goud, J. K. C., Termorshuizen, A. J., Blok, W. J., Van Bruggen, A. H. C. (2004)** Long-term effect of biological soil disinfestations on verticillium wilt. *Plant Disease* 88, 688-694.
- Goyal, S., Chander, K., Mundra, M., Kapoor, K. (1999)** Influence of inorganic fertilizers and organic amendments on soil organic matter and soil microbial properties under tropical conditions. *Biol. Fertil. Soils* 29, 196-200.
- Graham, J.H., Leonard, R.T., Menge, J.A. (1981)** Membranemediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular formation. *Plant Physiology* 68, 548-552.
- Grainge, M., Ahmed, S. (1988)** Handbook of plants whit pest-control properties. John Willey and Son. 470 pg.
- Grandy, A.S., Neff, J.C., Weintraub, M.N. (2007)** Carbon structure and enzyme activities in alpine and forest ecosystems. *Soil Biol. Biochem.* 39, 2701–11.
- Gray, N.F. (1988)** Fungi attacking vermiform nematodes. *Diseases of Nematodes*. pp 33.
- Grayston, S. J., Germida, J. J. (1990)** Influence of crop rhizosphere on populations and activity of heterotrophic sulfur-oxidizing microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 22, 457-63.
- Gregorich, E.G., Carter, M.R., Angers, D.A., Monreal, C.M., Ellert, B.H., (1994)** Towards a minimum data set to assess soil organic-matter quality in agricultural soils. *Can. J. Soil Sci.* 74, 367–385.

- Griffiths, B.S. (1994)** Microbial-feeding nematodes and protozoa in soil: Their effects on microbial activity and nitrogen mineralization in decomposing hotspots and the rhizosphere. *Plant Soil* 164, 25–33.
- Gu, Y.Q., Chao, W.S., Walling, L.L. (1996)** Localization and post-translational processing of the wound-induced leucine aminopeptidase proteins of tomato. *J. Biol Chem.* 271, 25880–25887.
- Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. (2004)** Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 763–781.
- Gupta, V. V. S. R. (1989)** Microbial biomass sulfur and biochemical mineralization of sulfur in soil. Ph.D. Thesis, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada.
- Gupta, V. V. S. R., Germida, J. J. (1988 a)** Distribution of microbial biomass and its activity in different soil aggregate size classes as affected by cultivation. *Soil Biol. Biochem.* 20, 777-786.
- Gupta, V. V. S. R., Germida, J. J. (1988 b)** Populations of predatory protozoa in field soils after 5 years of elemental S fertilizer application. *Soil Biol. Biochem.* 20, 787-791.
- Gupta, V. V. S. R., Germida, J. J. (1989)** Influence of bacterial-amoebal interactions on sulfur transformations in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 21, 921-930.
- Gupta, V.V.S.R., Farrell, R.E., Germida, J.J. (1993)** Activity of arylsulphatases in Saskatchewan soils. *Can. J. Soil Sci.* 73, 341-347.
- Haanstra, L., Doelman, P. (1991)** An ecological dose-response model approach to short- and long-term effects of heavy metals on arylsulphatase activity in soil. *Biol. Fert. Soils.* 11, 18-23.
- Hadar, Y., Harman, G.E., Taylor, A.G., Norton, J.A. (1983)** Effect of pregermination of pea and cucumber seeds and of seed treatment with *Enterobacter cloacae* on rots caused by *Pythium* spp. *Phytopathol.* 73, 1322-1325.
- Halstead, R.L., McKercher, R.B. (1975)** Biochemistry and cycling of phosphorus. In: Paul, E.A. and McLaren, A.D. (eds) *Soil Biochemistry*, Vol. 4, 31-63.
- Hankin, L., Sands, D. C. (1974)** Bacterial production of enzymes in activated sludge systems. *J. Water Pollut. Control Fed.* 46, 2015–2025.
- Hans, Y.W., Snivasan, V.R. (1969)** Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidases of *Alcaligenes faecalis*. *J. Bacteriol.* 100, 1355-1363.
- Haq, S.K., Atif, S.M., Khan, R.H. (2004)** Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Arch. Biochem. Biophys.* 43, 145-159.
- Haran, S., Logendra, S., Saskar, M., Bratanova, M., Raskin, I. (2000)** Characterization of Arabidopsis acid phosphatase promoter and regulation acid phosphatases expression. *Plant Physiol.* 124, 615- 626.
- Hargrove, W. L. (1991)** Cover crops for clean water. Ed: Hargrove W.L. ISBN 0-935734-25-2.
- Hargrove, W.L., Frye, W.W. (1987)** The need for legume cover crop in conservation tillage production. In *The Role of Legumes in Conservation Tillage Systems*. J. F. Power [ed.] Soil Conservation Society of America. Ankeny, Iowa. pp. 1-5.
- Hattori, T., Inanaga, S., Tanimoto, E., Lux, A., Luxová, M., Sugimoto, Y. (2003)** Silicon-Induced Changes in Viscoelastic Properties of Sorghum Root Cell Walls. *Plant Cell. Physiol.* 44, 743-749.
- Hawkes, C. V., Wren, I. F., Herman, D. J., Firestone, M. K. (2005)** Plant invasion alters nitrogen cycling by modifying the soil nitrifying community. *Ecology Letters* 8, 976-985.
- Hayes, J.E., Richardson, A.E., Simpson, R.J. (1999)** Phytase and acid phosphatases activities in roots of temperate pasture grasses and legumes. *Austr. J. Plant Physiol.* 26, 801-809.
- Heald, C.M., Burton, G.W. (1968)** Effect of organic and inorganic nitrogen on nematode populations on turf. *Plant Disease Report* 52, 46-48.

- Heath, C., Hu, X.P.S., Cary, S.C., Cowan, D. (2009)** Identification of a Novel Alkaliphilic Esterase Active at Low Temperatures by Screening a Metagenomic Library from Antarctic Desert Soil. *Appl Environ Microbiol.* 75, 4657–4659.
- Hendrix, P.F., Mueller, B.R., Bruce, R.R., Langdale, G.W., Parmelee, R.W. (1992)** Abundance and distribution of earthworms in relation to landscape factors on the Georgia Piedmont, USA. *Soil Biol. Biochem.* 24, 1357–1361.
- Herbers, K., Prat, S., Willmitzer, L. (1994)** Functional analysis of a leucine aminopeptidase from *Solatum tuberosum* L. *Planta* 194: 230-240.
- Heustis, R.J., Ng, H.K., Brand, K.J., Rogers, MC, Le, L.T. (2012)** Pharyngeal polysaccharide Deacetylases Affect Development in the Nematode *C. elegans* and Deacetylate Chitin *In Vitro*. *PLoS ONE* 7(7),
- Hildmann, T., Ebneith, M., Peña-Cortés, H., Sanchez-Serrano, J.J., Willmitzer, L., Prat, S. (1992)** General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell.* 4, 1157–1170.
- Hinds, A.A., Lowe, L. E. (1980)** Ammonium-N determination. Soil nitrogen. Berthelot reaction. *Boil Sci. Plant Anal.*, 11, 469—475.
- Hoitink, H.A.J. (1988)** Basis for the control of soilborne plant pathogens with compost. *Ann. Rev. Phytopathology* 24, 93-114.
- Hoitink, H.A.J., Boehm, M.J. (1999)** Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon *Ann. Rev. Phytopathology* 37, 427-446.
- Holz, R. A., Wright, D. J., Perry, R. N. (1998 a)** The effect of long term storage on the lipid reserves and fatty acid composition of cysts and hatched juveniles of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* . *Journal of Helminthology* 72, 133-141.
- Holz, R. A., Wright, D.J., Perry, R.N. (1998b)** Changes in the lipid content and fatty acid composition of 2nd-stage juveniles of *Globodera rostochiensis* after rehydration, exposure to the hatching stimulus and hatch. *Parasitology* 116, 183-190.
- Höper, H., Alabouvette, C. (1996)** Importance of physical and chemical soil properties in the suppressiveness of soils to plant diseases. *European Journal of Soil Biology* 32, 41–58.
- Hoppe, H.G. (1983)** Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: Measurements by means of methylumbelliferyl- substrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 11, 299–308.
- Hornby, D., Bateman, G. L. (1997)** Potential use of plant root pathogens as bioindicators of soil health. In: *Biological Indicators of Soil Health*. Pankhurst, C. E., Doube, B. M., and Gupta, V. V. S. R. (eds.). CAB International, pp. 179-200.
- Huebner, R., Rodríguez-Kabana, R., Patterson, R. M. (1983)** Hemicellulosic waste and urea for control of plant parasitic nematodes: effect on soil enzyme activities. *Nematropica* 13, 37 54.
- Hussey, R.S., Roncadori, R.W. (1982)** Vesicular arbuscular mycorrhizae may limit nematode activity and improve plant growth. *Plant Disease* 66, 9-14.
- Inderjit, Callaway, R.M., Vivanco, J. M. (2006)** Can plant biochemistry contribute to understanding of invasion ecology? *Trends in Plant Science*, 11, 574-580.
- Ingham, R. (1985)** Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers: Effects on nutrient cycling and plant growth. *Ecology Monographs* 55, 119–140.
- Inserra, R.N., Vovlas, N., O´Bannon, J.H., Griffin, G.D. (1985)** Development of *Meloidogyne chitwoodi* on wheat. *Journal of Nematology* 17, 322-326.
- Ismail, A.E., Hasabo, S.A. (2000)** Evaluation of some new Egyptian commercial biofertilizers, plant nutrients and biocide against *Meloidogyne incognita* rootknot nematode, infecting sunflower. *Pak J. Nematol.* 18, 39-49.



- Iwasaki, T., Kiyohara, T., Yoshikawa, M. (1971)** Purification and partial characterization of two different types of proteinase inhibitors (inhibitors II-a and II-b) from potatoes. *J. Biochem.*, 70, 817-826.
- Izaguirre-Mayoral, M.L., Flores, S., Carballo, O. (2002)** Determination of acid phosphatases and dehydrogenase activities in the rhizosphere of nodulated legume species native to two contrasting savannah sites in Venezuela. *Biology Fertility Soils* 35, 470-472.
- Jaco, V. A., Fortuner, R. (1979)** Biological control of rice nematodes using sulphate reducing bacteria. *Rev. de Nematol.*, 2, 41- 50.
- Jaeger, K.E., Eggert, T. (2002)** Lipases for biotechnology. *Current Op. Biotechnol.*, 13, 390-397.
- Jaffee, B.A., Zehr, E.I. (1982)** Parasitism of the nematode *Criconebella xenoplax* by fungus *Hirsutella rhossiliensis* in California sugarbeet fields. *Biological Control*, 1, 63-67.
- James, E.S., Russel, L.W., Mitrick, A. (1991)** Phosphate stress response in hydroponically grown maize. *Plant Soil* 132, 85-90.
- Jansson, H.B. (1982).** Attraction of nematodos to endoparasitic nematophagous fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 79, 25-29.
- Jansson, H-B., Lopez-Llorca, L. (2004)** Control of nematodes by fungi. In *Fungal Biotechnology in Agriculture, Food, and Environmental Applications* (Aroa, D.K., ed.). Pp 205-215. Marcel Dekker, New York.
- Jansson, H-B., Lopez-Llorca, L.V. (2001)** Biology of Nematophagous Fungi. In: *Mycology: Trichomycetes, other Fungal Groups and Mushrooms* (JK Misra & BW Horn, eds.). Pp. 145-173. Science Publishers, Enfield.
- Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Mateille, T., Steinberg, C. (2007).** Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? *Soil Biol. . Biochem.* 39, 1-23.
- Jeng, W.Y., Wang, N.C., Lin, M.H., Lin, C.T., Liaw, Y.C., Chang, W.J., Liu, C.I., Liang, P.H., Wang, A.H.J. (2010)** Structural and functional analysis of three beta-glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. *J. Struc. Biol.* 173, 46-56.
- Joanitti, G.A., Freitas, S.M., Silva, L.P. (2006)** Proteinaceous Protease Inhibitors: Structural Features and Multiple Functional Faces. *Current Enzyme Inhibition* 2, 199-217.
- Johansson, M., Stenberg, B., Torstensson, L. (1999)** Microbiological and chemical changes in two arable soils after long-term sludge amendments. *Biology and Fertility of Soils*, 30, 160-167.
- Joinville, S., Revault, M., Quiquampoix, M., Baron, M.H. (2004)** Structural Effects of Drying and Rehydration for Enzymes in Soils: Kinetics-FTIR Analysis of Chymotrypsin Adsorbed on Montmorillonite. *Journal of Colloid and Interface Science.* 273, 414-425.
- Joner, E.J., Jakobsen, I. (1995)** Growth and extracellular phosphatase activity of arbuscular mycorrhizal. *Soil Biol. Biochem.* 9, 1153-1159.
- Jordan, D., Kremer, R.J. (1994)** Potential use of microbial activity as an indicator of soil quality. In: Pankhurst CE, Double BM, Gupta VWSR, Grace PR (Eds.): *Soil biota. Management in sustainable farming systems*, CSIRO Australia pp. 245-249.
- Juma, N.G., Tabatabai, M.A. (1977)** Effects of trace elements on phosphatase activity in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41, 343-346.
- Juma, N.G., Tabatabai, M.A. (1988a)** Hydrolysis of organic phosphates by corn and soybean roots *Plant Soil* 107, 31-38.
- Juma, N.G., Tabatabai, M.A. (1988b)** Phosphatase activity in corn and soybean roots: conditions for assay and effects of metals. *Plant Soil* 107:39-47.

- Juma, N.G., Tabatabai, M.A. (1988c)** Comparison of kinetic and thermodynamic parameters of phosphomonoesterases of soils and of corn and soybean roots. *Soil Biol. Biochem.* 20, 533–539.
- Kai, M., Takazumi, K., Adachi, H., Wasaki, J., Shinano, T., Osaki, M. (2002)** Cloning and characterization of four phosphate transporter cDNAs in tobacco. *Plant Sci.* 163, 837-846.
- Kandeler, E., Stemmer, M., Klimanek, E M. (1999)** Response of soil microbial biomass, urease and xylanase within particle size fractions to long-term soil management. *Soil Biol. Biochem.* 31, 261–273.
- Kandeler, E., Tschirko, D., Spiegel, H. (1999)** Long-term monitoring of microbial biomass, N mineralization and enzyme activities of a Chernozem under different Tillage management. *Biology Fertility of Soil* 28, 343-351.
- Kanfer, J.N., Mumford, R.A., Raghavan, S.S., Byrd, J. (1974)** Purification of b-glucosidase activities from bovine spleen affinity chromatography. *Anal Biochem* 60, 200–205.
- Kardol, P., Bezemer, T. M., van der Putten, W. H. (2006)** Temporal variation in plant-soil feedback controls succession. *Ecology Letters* 9, 1080-1088.
- Karthikeyan, A.S., Varadarajan, D.K., Mukatira, U.T., D'Urzo, M.P., Damaz, B., Raghothama, K.G. (2002)** Regulated expression of Arabidopsis phosphate transporters. *Plant Physiol.* 130, 221-233.
- Kaspari, H. (1973)** Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Feinstruktur der endotrophen Tabakmykorrhiza. *Arch. Microbiology* 92: 201-207.
- Kawamura, T., Shockman, G. D. (1983)** Purification and some properties of the endogenous, autolytic N-acetylmuramoylhydrolase of *Streptococcus faecium*, a bacterial glycoenzyme. *J. Biol. Chem.* 258, 9514-9521.
- Kerry, B.R., De Leij, A.A.M. (1992).** Key factors in the development of fungal agents for the control of Cyst and root-knot nematodes. *Biological Control Plant Diseases*. Athens, Greece, New York.
- Kertesz, M.A., Mirleau, P. (2004)** The role of soil microbes in plant sulphur nutrition. *J. Exp. Bot.* 55, 1939-1945.
- Khaziyev, F.K., Gulke, A.Y. (1991)** Enzymatic activity of soils under agrocenoses: status and problems. *Pochvovedenie*, 8, 88-103.
- Kimura, I., Sasahara, H., Tajima, S. (1995)** Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*. *J Ferment Bioeng.* 80, 334-9.
- Kirkegaard, J.A., Akiew, S., Pattison, T., Young, A., Prior, L. (2008)** Understanding mechanism of plant pest suppression using *Brassica* green manures. Proceedings of 3th Int. *Biofumigation Symposium*. Canberra, Australia.
- Kirkegaard, J.A. (2006)** Glucosinolate and isothiocyanate concentration in soil following incorporation of *Brassica* biofumigants. *Soil Biol. Biochem.* 2255–2264.
- Kirkegaard, J.A., Angus, J.F., Gardner, P.A., Cresswell, HP. (1993a)** Benefits of *Brassica* break crops in the Southeast wheat belt. *Proceedings of the 7th Australian Agronomy Conference*, 19-24 September 1993, The University of Adelaide, Adelaide, South Australia. 282-285.
- Kirkegaard, J.A., Gardner, J., Desmarchelier, J.M., Angus, JF. (1993b)** Biofumigation using *Brassica* species to control pest and diseases in horticulture and agriculture. In: N Wraether, RJ Mailes (Eds). Proc. 9<sup>th</sup> Australian Research Assembly on Brassicas (Wagga Wagga) 77-82.
- Kirkegaard, J.A., Gardner, P.A., Angus, J.F., Koetz, E. (1994).** Effect of Brassica crops on the growth and yield of wheat. *Australian J. Agric. Res.* 45, 529-545.
- Kirkegaard, J.A., Matthiessen, J.N. (2004)** Developing and refining the biofumigation concept. *Proceedings 1<sup>st</sup> International Symposium on Biofumigation*, 31 Marzo-1 Abril. 2004, Florence, Italy.
- Kirkegaard, J.A., Sarwar, M. (1998)** Biofumigation potential of *Brassicac* - I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown *Brassicac*. *Plant and Soil.* 201, 71-89.

- Kitamoto, N., S. Yoshino-Yasuda, K. Ohmiya, and Tsukagoshi, N.. (2001)** Sequence analysis and overexpression of a pectin lyase gene (pel1) from *Aspergillus oryzae* KBN616. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 209–12.
- Klerks, P.L., Weis, J.S. (1987)** Genetic adaptation to heavy-metals in aquatic organisms—a review. *Environ. Pollut.* 45, 173–205.
- Klironomos, J. N. (2002)** Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature* 417, 67-70.
- Klose, S., Moore, J.M., Tabatabai, M.A. (1999)** Arylsulphatase activity of microbial biomass in soils as affected by cropping systems. *Biology Fertility of Soils.* 29, 46-54.
- Klose, S., Tabatabai, M.A. (1999)** Arylsulfatase activity of microbial biomass in soils. *Soil Science Society of America Journal* 63, 569–574.
- Knudsen, I.M.B., Deboz, K., Hockenhull, J., Jensen, D. F., Elmholt, S. (1999)** Suppressiveness of organically and conventionally managed soils towards brown foot rot of barley. *Applied Soil Ecology* 12, 61-72.
- Koper, J., Piotrowska, A. (2003)** Application of biochemical index to define soil fertility depending on varied organic and mineral fertilization. *Electronic Journal Polish Agricultural Universities.* 6,(1) online <http://www.ejpau.media.pl/volume6/issue1/agronomy/art-06.html>.
- Köthe, M., Antl, M., Huber, B., Stoecker, K., Ebrecht, D., Steinmetzvo, I., Eberl, L. (2003)** Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Burkholderia cepacia* is controlled by the *cep* quorum-sensing system. *Cellular Microbiology* 5, 343–351.
- Krattiger, A.F. (1997)** Insect resistance in crops: a case study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its transfer to developing countries. *ISAAA Briefs*, 2, 42.
- Krusberg, L. R., Hussey, R. S., Fletcher, C. L. (1973)** Lipid and fatty acid composition of females and eggs of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 45B, 335-341.
- Kudla, U., Qin, L., Milac, A., Kielak, A., Maissen, C., Overmars, H., Popeijus, H., Roze, E., Petrescu, A., Smant, G., Bakker, J., Helder, J. (2006)** Origin, distribution and 3D-modeling of Gr-EXPB1, an expansin from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *FEBS Letters.* 579, 2451-7.
- Kulmatiski, A., Beard, K. H., Stevens, J. R., Cobbold, S.M. (2008)** Plant soil feedbacks: a meta-analytical review. *Ecology Letters* 11, 980-992.
- Kuperman, R.G., Carreiro, M.M. (1997)** Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. *Soil Biol. Biochem.* 29, 179-190.
- Kuroyama, H., Tsutsui, N., Hashimoto, Y., Tsumuraya, Y. (2001)** Purification and characterization of a b-glucuronidase from *Aspergillus niger*. *Carbohydrate Res.* 333, 27–39.
- Ladd, J. N. (1985)** Soil enzymes. In: *Soil organic matter and biological activity*. Vaughan D and Malcom RE. Eds. Nijhoff, Dordrecht, pp. 175-222
- Lafuente, F., Rad, C., González-Carcedo, S. (1996)** Algunas claves del comportamiento enzimático en relación con la disponibilidad de fosfato en suelos ácidos. *IV Congreso Nacional de suelos*. Sesión I.
- Lal, R., Regnier, E., Exkert, D. J., Edwards, W. M., Hammond, R. (1991)** "Expectations of cover crops for sustainable agriculture", in: W. L. Hargrove (ed.) Cover crops for clean water. *Soil and Water Conservation Soc. Iowa*, 1-14.
- Larson, W.E., Pierce, F.J. (1991)** Conservation and enhancement of soil quality. Evaluation of Sustainable Land Management in the Developing World. *International Board for Soil Research and Management*, Bangkok, Thailand.
- Lawrence, P.K., Koundal, K.R. (2002)** Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electron. J. Biotechnol.* 5, 93-109.

- Lazzeri, L., Leoni, O., D'Avino, L., Malaguti, L. (2008)** Biorefinery *Brassicaceae* plants as more than biofumigants. *Third International Biofumigation Symposium*, Canberra, Australia, 22 p.
- Lazzeri, L., Manici, L.M. (2000)** The glucosinolate-myrosinase system: a natural and practical tool for biofumigation. *Acta Horticulturae* 532, 89-95.
- Ledoigt, G., Griffaut, B., Debiton, E., Vian, C., Mustel, A., Evray, G., Maurizis, J.C., Madelmont, J.C. (2006)** Analysis of secreted protease inhibitors after water stress in potato tubers. *Int. J. Biol. Macromols.* 38, 268-271.
- Lee, M.H., Lee, C.H., Oh T.K., Song, J.K., Yoon, J.H. (2006)** Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal Xat sediments: evidence for a new family of bacterial lipases. *Applied Environmental Microbiology* 72, 7406-7409
- Lee, S.W., Won, K., Lim, H.K., Kim, J.C., Choi, G.J., Cho, K.Y. (2004)** Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Applied Microbiology Biotechnology* 65, 720-726.
- Lee, Y.B., Lorenz, N., Dick, L.K., Dick, R.P. (2007)** Cold storage and pretreatment incubation effects on soil microbial properties. *Soil Science Society of America Journal* 71, 1299-1305
- Leiros, M.C., Trasar-Cepeda, C. García, F., Gil-Sotres, F. (1999)** Defining the validity of a biochemical index of soil quality. *Biology and Fertility of Soils.* 30, 140-146.
- Leroy, B.L.M., Herath, H.M.S.K., Sleutel, S., De Neve, S., Gabriels, D., Reheul, D., Moens, M., (2008)** The quality of exogenous organic matter: short-term effects on soil physical properties and soil organic matter fractions. *Soil Use Manage.* 24, 139-147.
- Li, D., Zhu, H., Liu, K., Liu, X., Leggewie, G., Udvardi, M., Wang, D, (2002)** Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*, *J. Biol. Chem.* 277, 27772-27781.
- Li, M., Shinamo, T., Tadano, T. (1997)** Distribution of exudates of lupin roots in the rhizosphere under phosphorus deficient conditions, *Soil Sci. Plant Nutr.* 43, 237-245.
- Li, Q., Allen, H.L., Wollum II, A.G. (2004)** Microbial biomass and bacterial functional diversity in forest soils: effects of organic matter removal, compaction, and vegetation control. *Soil Biol. Biochem.* 36, 571-579.
- Li, Q., Jiang, Y., Liang, W., Lou, Y., Zhang, E. (2010)** Long-term effect of fertility management on the soil nematode community in vegetable production under greenhouse conditions. *Appl Soil Ecol.* 46, 111-118.
- Li, Y., Darley, C.P., Ongaro, V., Fleming, A., Schipper, O., Baldauf, S.L., McQueen-Mason, S.J. (2002)** Plant expansions are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin. *Plant Physiol.* 128, 854-64.
- Liang, W., Lou, Y., Li, Q., Zhong, S., Zhang, X. (2009)** Nematode faunal response to long-term application of nitrogen fertilizer and organic manure in Northeast China. *Soil Biol. Biochem.* 41, 883-890.
- Lifshitz, R., Stanghellini, M.E., Baker, R. (1984)** A new species of *Pythium* isolated from soil in Colorado. *Mycotaxon* 20, 373-379.
- Liu, Ch-L., Shen, Ch-R., Hsu, F.F., Chen, J-K., Wu, P-T., Guo, S-H., Lee, W-C., Yu, F-W., Mackey, Z.B, Turk, J., Gross, M.L. (2009)** Isolation and identification of two novel SDS-resistant secreted chitinases from *Aeromonas schubertii*. *Biotechnol. Progress.* 25(1), 124-131.
- Lizarazo, L.M., Jordá, J.D., Juárez, M., Sánchez-Andreu, J. (2005)** Effect of humic amendments on inorganic N, dehydrogenase and alkaline phosphatase activities of a Mediterranean soil. *Biol. Fert. Soils.* 42, 172-177.
- López, N., Castillo, S., Cuaresma, I. M., Carmona, I., González, J. E., Avilla, C., López-Medina J., Aguirre, I. (2004)** Efecto de la biofumigación sobre la flora arvensis del fresón. *VI Congreso SEAE*, Almería. 1531-1538.

- Lopez-Llorca, L.V., Maciá-Vicente, J.G., Jansson, H.B. (2008)** Mode of action and interactions of nematophagous fungi, en: Ciancio A., Mukerji K.G. (Eds.), *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes*. Springer, The Netherlands, pp. 51–76.
- López-Robles, J., Díez-Rojo, M.A., Arcos, S., López-Pérez, J.A., Bello, A. (2009)** "Management of cyst nematode on potato using purines and green manure". Abstracts *II Internacional Congreso of Tropical Nematology Maceió* (Alagoas), Brasil 4-9 de octubre.
- López-Robles, J., Olalla C., Rad C., Bello A., Díez-Rojo, M.A., López-Pérez, J.A., (2011)** Use of liquid swine manure for the disinfection of soils-management of the potato cyst nematode". Abstracts XLIII ONTA Meeting. Coimbra (Portugal), 4-8 de septiembre.
- Lotter, L. H., van der Merwe, E.H.M. (1987)** The activities of some fermentation enzymes in activated sludge and their relationship to enhanced phosphorus removal. *Water Res.* 21, 1307–1310.
- M.A.P.A. (1994)** Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación Métodos Oficiales de Análisis. Madrid.
- Maciel, A.S., Araújo J.V., Campos, A.K., Lopes E.A., Freitas L.G. (2009)** Predation of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by nematophagous fungi in different conidial concentrations. *Veterinary Parasitology* 161, 239-247.
- Mackereth, F.J.H., Heron, J., Talling, J.F. (1978)** Water analysis: some revised methods for limnologists. FBA Scientific Publication. 120 p.
- Madejón, E., Burgos, P., López, R., Cabrera, F. (2001)** Soil enzymatic response to addition of heavy metals with organic residues. *Biol. Fertility of Soils* 34, 144-150.
- Makoi, J., Ndakidemi, P.A. (2008)** Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (3), 181-191.
- Malcom, R.E. (1983)** Assessment of phosphatase activity in soils. *Soil Biol. Biochem.* 15, 403-408.
- Marschner, H. (1986)** Mineral nutrition of higher plants. London Academica Press.
- Marshall, V.G., (1977)** Effect of manures and fertilizers on soil fauna: a review, Special Bulletin No. 3. *Commonwealth Bureau of Soils, Commonwealth Agricultural Bureaux*, Wallingford.
- Martinez ,C.E., Tabatabai, M.A.(1997)** Decomposition of biotechnology by products in soils. *Journal Environ Quality.* 26, 625-632
- Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F.,Martínez, M.J., Gutiérrez, A., del Río, J.C. (2005)** Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int. Microbiol* 8, 195-204.
- Martínez, M<sup>a</sup> L. (1990)** "Control del nematodo dorado de la patata *G. rostochiensis*, mediante calentamiento solar del suelo (Solarización)". Resultados de los proyectos de investigación terminados en 1987. *Tomo I: Cultivos herbáceos*. Proyecto nº 5.799. Ed. M.A.P.A. 323-325.
- Marx, M. C., Wood, M., Jarvis, S. C. (2001)** A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biol. Biochem.* 33, 1633–1640.
- Marx, M.C., Kandeler, E., Wood, M., Wermbter, N., Jarvis, S.C. (2005)** Exploring the enzymatic landscape: distribution and kinetics of hydrolytic enzymes in soil particle size fractions. *Soil Biol. Biochem.* 37, 35–48.
- Masciandaro, G., Ceccanti, B. (1999)** Assessing Soil Quality in Different Agro- Ecosystems Through Biochemical and Chemico-Structural Properties of Humic Substances. *Soil and Tillage Research* 51, 129-137.
- Masler, EP., Kovaleva, ES., Sardanelli, S. (2001)** Aminopeptidase-like activities in *Caenorhabditis elegans* and the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. *J. Helminthol.* 75, 267-272.
- Matlack,G. (2001)** Factors determining the distribution of soil nematodes in commercial forest landscape. *Forest Ecology and Management* 146, 129-143.

- Matsui, M., Jonathan, H.F., Walling, L. (2006)** Leucine aminopeptidase: diversity in structure and function. *Biol. Chem.* 387, 1535-1544.
- Mayr, C., Miller, M., Insam, H. (1999)** Elevated CO<sub>2</sub> alters community-level physiological profiles and enzyme activities in alpine grassland. *J. Microbiol. Methods.* 36, 35-43.
- Mazurkiewicz-Zapałowicz, K., Kołodziejczyk, L. (2009)** Antagonistic interactions between saprotrophic fungi and geohelminths. 1. Saprotrophic fungi in the biological control of phytopathogenic geohelminths. *Wiad Parazytol.* 55, 1-8.
- Mazzola, M., Gu, Y.H. (2002)** Wheat genotype-specific induction of soil microbial communities suppressive to disease incited by *Rhizoctonia solani* Anastomosis Group (AG)-5 and AG-8. *Phytopathology* 92, 1300-1307.
- MBTOC. Methyl Bromide Technical Options Committee, (2009)** Assessment Report. UNEP, Nairobi, Kenya.
- McGill, W.B., Colle, C.V. (1981)** Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma* 26, 267-286.
- McLaren, A.D. (1975)** Soil as a system of humus and clay immobilised enzymes. *Chem Scripta* 8, 97-99.
- McLeod, R. W., Steele, C. C. (1999)** Effects of Brassica leaf green manures and crops on activity and reproduction of *Meloidogyne javanica*. *Nematology* 1, 613-624.
- McSorley, R., Gallaher, R. N. (1996)** Effect of yard waste compost on nematode densities and maize yield. *Journal Nematology* 28, 655-660.
- McSorley, R., Stansly, P. A., Noling, J. W., Obreza T. A., Conner J. N. (1997)** Impact of soil organic amendments and fumigation on plant parasitic nematodes in a southern Florida vegetable field. *Nematropica* 27, 181-189.
- Melouk, H.A., Horner, C.E. (1973)**  $\beta$ -glucosidase from *Phoma strasserii* and its possible role in a disease of peppermint. *Phytopathology*, 63, 973-975.
- Mena, J., Vazquez, R., Fernandez, M., Perez, L., Garciz, M., Pimental, E., López, A., Mencho, J.D., Zaldua, Z., Garcia, R., Somontes, D., Moran, R. (1996)** Use of *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki to control *Meloidogyne incognita* and *Radopholus similis*. *Centre Agric.*, 23, 31-36.
- Mengin-Lecreulx, D., Lemaitre, B. (2005)** Structure and metabolism of peptidoglycan and molecular requirements allowing its detection by the *Drosophila* innate immune system. *J Endotoxin Res.* 11, 105-111.
- Mesnage, S., Chau, F., Dubost, L., Arthur, M. (2008)** Role of N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramidase activities in *Enterococcus faecalis* peptidoglycan metabolism. *J. Biol. Chem.* 11, 283(28), 19845-53.
- Mian, I.H., Godoy, G., Shelby, R., Rodríguez-Kábana, R., Morgan-Jones, G. (1982)** Chitin amendments for control of *Meloidogyne arenaria* in infested soil. *Nematropica* 12, 71-84.
- Mian, I.H., Rodriguez-Kábana, R. (1982b)** Survey of the nematicidal properties of some organic materials available in Alabama as amendments to soil for control of *Meloidogyne arenaria*. *Nematropica* 12, 235-246.
- Mian, I. H., Rodriguez-Kábana, R. (1982a)** Soil amendments with oil cakes and chicken litter for control of *Meloidogyne arenaria*. *Nematropica* 12, 205-220.
- Miller, E.A., Lee, M.C., Atkinson, A.H., Anderson, M.A. (2000)** Identification of a novel four-domain member of the proteinase inhibitor II family from the stigmas of *Nicotiana glauca*. *Plant Molecular Biology.* 42, 329-333.
- Miller, S.L., McClean, M., Stanton, N.L., Williams, S.E. (1998)** Mycorrhization, physiognomy, and first-year survivability of conifer seedlings following natural fire in Grand Teton National Park. *Canadian Journal of Forest Research* 28, 115-122.

- Miller, S.S., Liu, J., Allan, D.L., Menzhuber, C.J., Fedorova, M., Vance, C.P. (2001)** Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorous stressed white lupin. *Plant Physiol.* 127, 594-606.
- Moeskops, B., Buchan, D., Van Beneden, S., Fievez, V., Sleutel, S., Gasper, M.S., D'Hose, T., De Neve, S. (2012)** The impact of exogenous organic matter on SOM contents and microbial soil quality. *Pedobiologia* 55, 175-184.
- Moliner, A. (1979)** Actividad ureásica y condiciones naturales del suelo. Tesis de Licenciatura, Fac. Químicas. Universidad de Valladolid.
- Moore-Kucera, J., Acosta-Martinez, V., Azarenko, A., Myrold, D., Wester, D. (2010)** Soil Chemical and Biochemical Surveys of *Sweet Cherry* Agroecosystems In the Pacific Northwest. 102-3 Texas University.
- Morandi, D., Bayley J.A., Gianinazzi-Pearson, V. (1984)** Isoflavonoid accumulation in soybean roots infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Physiol. Plant Pathol.* 24, 357-364.
- Morgan-Jones, G., Rodríguez-Kábana, R (1988)** Fungi colonizing cyst and eggs. *Nematropica*, 113, 39-58.
- Morgan-Jones, G., Rodríguez-Kábana, R., Jatala, P. (1986)** Fungi associated with cyst of *Heterodera glycinis* cyst in Arkansas, Florida, Mississippi and Missouri soils. *Nematropica* 11, 155-164.
- Morton, O.C., Hirsch, P.R., Peberdy, J.P., Kerry, B.R. (2003)** Cloning of and genetic variation in protease VCP1 from the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Mycol. Res.* 107(1), 38-46.
- Mosolov, V.V., Grigorieva, L.I., Valueva, T.A. (2001)** Plant proteinase inhibitors as polyfunctional proteins (a review). *Prikl. Biokhem. Mikrobiol.* 37, 643-650.
- Mosolov, V.V., Valueva, T.A. (2005)** Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 41, 261-282.
- Muchhal, U.S., Pardo, J.M., Raghothama, K.G. (1996)** Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 10519-10523.
- Mudge, S.R., Rae, A.L., Diatloff, E., Smith, F.W. (2002)** Expression analysis suggests novel roles for members of Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *Plant J.* 31, 341-353.
- Mulder, J.G., Vroom-Wolf, A.J. (1990)** Periodiciteit bij cysten van *Globodera rostochiensis*. Onderzoek 1990. Uitgave" Stichting Interprovinciaal Onderzoekcentrum voor de Akkerbouw op zand- en veenkoloniale grond in Middenoost- en Noordoost-Nederland, 132-138.
- Mungai, W.N., Motavalli, P.P., Kremer, R.J., Nelson, K.A. (2005)** Spatial variation in soil enzyme activities and microbial functional diversity in temperate alley cropping systems. *Biol. Fert. Soils* 42, 129-136.
- Murakami, H., Tsushima, S., Shishido, Y. (2000)** Soil suppressiveness to clubroot disease of Chinese cabbage caused by *Plasmodiophora brassicae*. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1637-1642.
- Nakagawa, T., Miyaji, T., Yurimoto, H., Sakai, Y., Kato, N., Tomizuka, N. (2000)** A methylotrophic pathway participates in pectin utilization by *Candida boidinii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4253-4257.
- Nakas, J.P., Gould, W.D., Klein, D.A. (1987)**. Origin and expression of phosphatase activity in a semi-arid grassland soil. *Soil Biol. Biochem.* 19, 13-18.
- Nanninga, N. (1998)** Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 110-129.
- Nannipieri, P., Greco, S., Ceccanti, B. (1990)** Ecological significance of the biological activity in soil. In: J.M. Bollag and G. Stozky (Eds). Marcel Dekker. New York. *Soil Biochemistry*, 6, 293-355.
- Nannipieri, P., Sequi, P., Fusi, P. (1996)** Humus and enzyme activity, in: Piccolo, A. (Ed.). *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Marcel Dekker, New York, pp. 293-328.

- Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P. (2003)** Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil, in: Burns, R., Dick, R. (Eds.), *Enzymes in The Environment: Activity, Ecology and Application*. Marcel Dekker, New York, pp. 1–34.
- Ndakidemi, P.A. (2006)** Manipulating legume/cereal mixtures to optimize the above and below ground interactions in the traditional African cropping systems. *African Journal of Biotechnology*, 5, 2526-2533.
- Ndiaye, E.L., Sandeno, J.M., McGrath, D., Dick, R.P. (2000)** Integrative biological indicators for detecting change in soil quality. *Am. J. Altern. Agric.* 15, 26-36.
- Negrín, M.A., González-Carcedo S., Hernández, J.M. (1995)** P fractionation in sodium bicarbonate extracts of andic soils. *Soil Biol. Biochem.* 27, 761-766.
- Nehemiah, J. (1977)** Untersuchungen über den Einfluss des endotrophen Mycorrhizapilzes *Glomus mosseae*. Gerd & Trappe (*Endogone mosseae*, Nicolson & Gerd.) auf *Zea mays* L. Doctoral Dissertation. Rheinischen Friedrich-Wilhelms Univ. Bonn. West Germany.
- Neher, D.A. (2001)** Role of nematodes in soil health and their use as indicators. *J. Nematol.* 35, 161–168.
- Neurath, H. (1989)** Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem. Sci.* 14, 268-271.
- Nickle, W.R., Hooper, D.J. (1991)** The Apahelenchina: bud, leaf and insect nematodes; cap 10. En: Nickle, W.R. (ed). *Manual of agricultural nematology*. Marcel Dekker, New York, pp. 465–508.
- Nico, A. I., Jimenez-Díaz, R. M., Castillo, P. (2004)** Control of root-knot by composted agro-industrial wastes in potting mixtures. *Crop Prot.*, 23, 581 – 587.
- Nordbring-Hertz, B., Jansson, H-B., Tunlid, A. (2006)** Nematophagous Fungi. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester. <http://www.els.net/> pp1-1.
- Nordbring-Herz, B., Jansson, H.-B., Friman, E., Persson, Y., Dackman, C., Hard, T., Poloczek, E. Feldman, R. (1995)** Nematophagous Fungi. Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen. Film No. C 1851.
- Nortcliff, S. (2002)** Standardisation of soil quality attributes. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 88, 161-168.
- Norton, D.C. (1979)** Relation ship of physical and chemical factors to populations of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopatology* 17, 279-299.
- Nowfer, E.M.A., Hasabo, S.A.A. (2005)** Effect of Different Management Practices for Controlling Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita* on Squash. *Egypt. J. Phytopathol.*, 33, 73-80.
- Núñez Sánchez, A.E. (2002)** Aislamiento y evaluación de hongos nematófagos asociados quistes de *Globodera rostochiensis* (Woll) en la Región de Cofre Perote (Méjico) Tesis Doctoral Universidad de Colima.
- Nybroe, O., Jorgensen, P. E., Henze, M. (1992)** Enzyme activities in wastewater and activated sludge. *Water Res.* 26, 579–584.
- Ochoa, V., Hinojosa, B., Gómez-Muñoz, B., García-Ruiz, R. (2007)** Actividades enzimáticas como indicadores de calidad del suelo en agroecosistemas ecológicos Inicio a la Investigación.2: r1. Universidad de Jaén.
- Oka, Y. (2010)** Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments-A review *Applied Soil Ecology* 44, 101-115.
- Oka, Y., Pivonia, S. (2002)** Use of ammonia-releasing compounds for control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematology* 4, 65 -71.
- Oka, Y., Yermiyahu, U. (2002)** Suppressive effects of composts against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on tomato. *Nematology* 4, 891- 898.



- Olalla C., López-Robles J., González-Carcedo S., Bello A., Díez-Rojo M.A., Arcos, S., López-Pérez, J.A. (2011)** Effects on soil nematode community structure associated with swine manure application techniques". Abstracts XLIII ONTA Meeting. Coimbra (Portugal), 4-8 de septiembre 2011.
- Olsen, S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S., Dean, L.A.(1954)** Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. USDA Washington, D.C. Circular 939.
- Orcutt, D.M., Fox, J.A., Jake, C.A. (1978)** The Sterol, Fatty Acid, and Hydrocarbon Composition of *Globodera solanacearum*. *J. Nematol.* 10 (3), 264-269.
- Ordentlich, A., Elad, Y., Chet, I. (1988)** The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, 78, 84-88.
- Osman, G.Y., Salem, F.M., Chattis, A. (1988)** Bio-efficacy of two bacterial insecticides strains of *Bacillus thuringiensis* as a biological control agent in comparison with a nematicide Nematicur on certain plant parasitic nematodes. *Anz. Schadlingskde, Pflanzeuschutz, Umweltschutz*, 61, 35-37.
- Page, G.L., Brigde, J. (1985)** Observations on *Pasteuria penetrans* as a parasite of *Meloidogyne acronera*. *Nematologica*, 31, 238-240.
- Parham, J.A., Deng, S.P. (2000)** Detection, quantification and characterization of beta-glucosaminidase activity in soil. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1183-1190.
- Park, D. (1960)** Antagonism the background of soil fungi. In: Parkinson D, Waid JS (Eds.). *The Ecology of Soil Fungi*, Liverpool University Press, Liverpool, pp. 148-159.
- Park, J.T. (1996)** The murein sacculus. En: "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology", 2ª edición (F.C. Neidhart, ed.). American Society for Microbiology Press. Washington, D.C. (1996), págs. 48-57.
- Pascual, J. A., García, C., Hernández, T. (1999)** Lasting microbiological and biochemical effects of the addition of municipal solid waste to an arid soil. *Biology and Fertility of Soils.* 30, 1-6.
- Patra, D.D., Brookes, P.C., Coleman, K. y Jenkinson, D.S. (1990)** Seasonal changes of soil microbial biomass in an arable and a grassland soil which have been under uniform management for many years. *Soil Biol. Biochem.* 22, 739-742.
- Patrick, Z.A. (1955)** The peach replant problem in Ontario. II. Toxic substances from microbial decomposition products of peach root residues. *Can. J. Bot.* 33, 461-486.
- Pautot, V., Holzer, F.M., Reisch, B., Walling, L.L. (1993)** Leucine aminopeptidase: an inducible component of the defense response in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 9906-9910
- Peacock, A.D., Mullen, M.D., Ringelberg, D.B., Tyler, D.D., Hedrick, D.B., Gale, P.M., White, D.C. (2001)** Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate applications. *Soil Biol. Biochem.* 33, 1011-1019.
- Pearce, G., Johnson, S., Ryan, C.A. (1993)** Purification and characterization from Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Leaves of Six small, Wound-Inducible, Proteinase Isoinhibitors of the Potato inhibitor II Family. *Plant Physiol.* 102, 639-644.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martínez, J. (2002)** Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5, 53-63.
- Pérez-Piqueres, A., Edel-Hermann, V., Alabouvette, C., Steinberg, C. (2006)** Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 460-470.
- Perry, R.N., Clarke, A.J. (1981)** Hatching mechanisms of nematodes. *Parasitology* 83, 435-449.
- Perry, R.N., Wharton, D.A., Clarke, A.J. (1982)** The structure of the egg-shell of *Globodera rostochiensis* (Nematoda: Tylenchida). *Int. J. Parasitology* 12, 481-485.
- Persson, L., Larsson-Wikstrom, M., Gerhardson, B. (1999)** Assessment of soil suppressiveness to *Aphanomyces* root rot of pea. *Plant Disease* 83, 1108-1112.

- Perucci, P., Scarponi, L., Businelli, M. (1984).** Enzyme activities in a clayloam soil amended with various crop residues. *Plant Soil*. 81, 345-351.
- Picard, D., Sempere, T., Plantard, O. (2008)** Direction and timing of uplift propagation in the Peruvian Andes deduced from molecular phylogenetics of highland biotaxa. *Earth and Planetary Science Letters* 271: 326–336.
- Piedra Buena, A. (2004)** Agroecología de *Meloidogyne* Göldi, 1892 (Nematoda: *Heteroderidae*) en Cultivos Hortícolas Protegidos. Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad de Almería, 397 pp.
- Polizeli, M.L., Rizzatti, A.C., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Amorim, D.S. (2005)** Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 67, 577-91.
- Portal Diez, E. (1978)** Génesis evolución enzimática y potencial agrícola de un lodo industrial específico. Tesis doctoral. Universidad de Burgos.
- Posta, K., Marschner H., Roheld. V. (1995)** Manganese reduction in the rhizosphere of mycorrhizal and nonmycorrhizal maize. *Mycorrhiza* 5-2, 119-124.
- Potter, M.J., Davies, K., Rathjen, A.J., (1998)** Suppressive impact of glucosinolates in *Brassica* vegetative tissues on root lesion nematode *Pratylenchus neglectus*. *Journal of Chemical Ecology* 24, 67-80.
- Poudel, D.D., Horwath, W.R., Lanini, W.T., Temple, S.R., van Bruggen, A.H.C.(2002)** Comparison of soil N availability and leaching potential, crop yields and weeds in organic, low-input and conventional farming systems in northern California Agriculture, Ecosystems & Environment, 90, Issue( 2), 125–137
- Puglisi, E., Del Re, A.A.M., Rao, M.A., Gianfreda, L. (2006)** Development and validation of numerical indices integrating enzymatic activities of soils. *Soil Biol. Biochemi*. 38, 1673-1681.
- Qi, S., Zhao, X., Zheng, H., Lin, Q. (2010)** Changes of soil biodiversity in Inner Mongolia steppe after 5 years of N and P fertilizer applications. *Acta Ecol. Sin.* 30, 5518–5526.
- Quiquampoix, H., Mousain, D. (2005)** Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus. In: Turner B.L., Frossard E. and Baldwin D.S. (editors), *Organic Phosphorus in the Environment*. CABI International, Wallingford, UK; Cambridge, MA,
- Quiroz-Castañeda, R.E., Folch-Mallo, J.L. (2011)** Proteínas remodeladoras de la pared celular. *Biotecnología Aplicada* 28,194-204
- Raaijmakers, J.M., Weller, D.M. (1998)** Natural plant protection by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in Take-all decline soils. Molecular. *Plant-Microbe Interactions* 11, 144–152.
- Radwan, M.A., Abu-Elmayem, M.M., Kassem, S.H.M.I., El-Maadawy, E.K. (2004)** Management of *Meloidogyne incognita* root-knot nematode by integration of *Bacillus thuringiensis* with either organic amendments or carbofuran. *Pak. J. Nematol.*, 22, 135-142.
- Ramírez-Martínez, J. R., Mc Laren A. D. (1966)** Determination of soil phosphatase activity by a fluorimetric technique. *Enzymologie*, 31, 23-38
- Rapport, D. J., McCullum, J., Miller, M. H (1997)** Soil health: Its relation ship to ecosystem health. Pp 29–47 in C. E. Pankhurst, B. M. Doube, and V. V. S. R. Gupta, eds. *Biological indicators of soil health*. Wallingford, UK: CAB International.
- Redel, Y., Rubio, R., Rouanet, J., Borie, F. (2007)** Phosphorus bioavailability affected by tillage and crop rotation on a Chilean volcanic derived Ultisol. *Geoderma* 139, 388-396.
- Reeves, D.W. (1997)** The role of soil organic matter in maintaining soil quality in continuous cropping systems. *Soil Tillage Res.* 43, 131–167.
- Reinhart, K. O., Callaway, R. M. (2004)** Soil biota facilitate exotic *Acer* invasions in Europe and North America. *Ecological Applications*, 14, 1737-1745.

- Reinhart, K.O., Callaway, R.M. (2006)** Soil biota and invasive plants. *New Phytologist*, 170, 445-457.
- Reitz, M., Rudolph, K., Schröder, I., Hoffmann-Hergarten, S., Hallmann, J., Sikora, RA. (2000)** Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 3515-3518.
- Renella, G., Landi, J., Ascher, M., Ceccherini, G., Pietramellara, P., Nannipieri (2006)** Phosphomonoesterase production and persistence and composition of bacterial communities during plant material decomposition in soil with different pH values Elsevier *Soil Biology & Biochemistry* 38, 795-802.
- Renella, G., Landi, L., Valori, F., Nannipieri, P., (2007)** Microbial and hydrolase activity after release of low molecular weight organic compounds by a model root surface in a clayey and sandy soil. *Applied Soil Ecology* 36, 124-129.
- Rengel, Z., Marschner, P. (2005)** Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. *New Phytol.* 168, 305-312.
- Rhoton, F.E., Bruce, R.R., Buehring, N.W., Elkins, G.B., Langdale, C.W., Tyler, D.D., (1993)** Chemical and physical characteristics of four soil types under conventional and no-tillage systems. *Soil Tillage Res.* 28, 51-61.
- Richards, S. R., Hastwell, C., Davies, M. (1984)** The comparative examination of 14 activated-sludge plants using enzymatic techniques. *J. Water Pollut. Control Fed.* 83, 300-313.
- Richmond, P.A. (1991)** Occurrence and functions of native cellulose. In: Haigler CH, Weimer PJ (eds) Biosynthesis and biodegradation of cellulose. Marcel Dekker, New York, pp 5-23.
- Riffaldi, R., Saviozzi, A., Levi-Minzi, R., Menchetti, F. (1994)** Chemical characteristics of soil after 40 years of continuous maize cultivation. *Agric. Ecosyst. Environ.* 49, 239-245.
- Rinklebe, J., Doring, A., Overesch, M., Du Laing, G., Wennrich, R., Stärk, H.-J., Mothes, S. (2010)** Dynamics of mercury fluxes and their controlling factors in large Hg-polluted floodplain areas. *Environmental Pollution*. 158, 308-318.
- Rivera, L., Abbalay, E. (2008)** Nematicide Effect of Various Organic Soil Amendments on *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968, on Potted Vine Plants. *Chil. J. Agric. Res.*, 68(3), 290 - 296.
- Robinson, M.P., Atkinson, H.J., Perry R. N. (1987a)** The influence of soil moisture and storage time on the motility, infectivity, and lipid utilization of second-stage juveniles of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Revue de Nematologie* 10, 343-348.
- Robinson, M.P., Atkinson, H.J., Perry, R.N. (1987b)** The influence of temperature on the hatching, activity, and lipid utilization of second-stage juveniles of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Revue de Nematologie* 10, 349-354.
- Rodríguez-Kábana R., King, P. S., Pope. M. H. (1981)** Combinations of anhydrous ammonia and ethylene dibromide for control of nematodes parasitic of soybeans. *Nematropica* 11, 27-11.
- Rodríguez-Kábana, R. (1986)** Organic and inorganic nitrogen amendments to soil as nematode suppressants. *Journal of Nematology* 18, 129-135.
- Rodríguez-Kábana, R. and Hollis, JP. (1965)** Biological control of nematodes in rice fields: role of hydrogen sulfide. *Science* 148, 524-526.
- Rodríguez-Kábana, R., King, P. S. (1980)** Use of mixtures of urea and blackstrap molasses for control of root-knot nematodes in soil. *Nematropica*, 10, 38-40.
- Rodríguez-Kábana, R., Morgan-Jones, G., Chet, I. (1987)** Biological control of nematodes: Soil amendments and microbial antagonists. *Plant and Soil*. 100, 237-247.
- Roessner, J. (1987)** Fungi antagonists of *Globodera rostochiensis*. *Nematologica*, 33, 106-118.
- Rogers, H.J. Perkins, H. R., Ward, J. B. (1980).** *Microbial Cell Walls and Membranes*, pp. 437-460. Chapman and Hall, London.

- Roncadori, R.W., Hussey, R.S. (1982)** Mycorrhizae in interaction with other microorganisms. Endomycorrhizae. pp. 219-224. In: N.C. Schenck (ed.) *Methods and principles of mycorrhizal research*. The American Phytopath. Society. USA.
- Ros, M., Pascual, J.A., García, C., Hernández, M.T., Insam, H., (2006)** Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts. *Soil Biol. Biochem.* 38: 3443–3452.
- Ros, M., Pascual, J.A., García, C., Hernández, T., Guerrero, M. M., Lacasa, A., Fernández, P., Ros, C., Guirao, P. (2002)** Efectos de la biofumigación con solarización sobre las propiedades de los suelos para cultivos de pimiento en agricultura ecológica. V Congreso de la SEAE. *I Congreso Iberoamericano de Agroecología*. Gijón, Asturias-España.
- Ross, D.J. (1976)** Invertase and amylase activities in ryegrass and white clover plants and their relationships with activities in soils under pasture. *Soil Biol. Biochem.* 8, 351-356.
- Rotenberg, D., Wells, A.J., Chapman, E.J., Whitfield, A. E., Goodman, R. M., Cooperby, L. R. (2007)**. Soil properties associated with organic matter-mediated suppression of bean root rot in field soil amended with fresh and composted paper mill residuals. *Soil Biol. Biochem.* 39, 2936-2948.
- Ruess, L., Häggblom, M.M., García-Zapata, E.J., Dighton, J. (2002)** Fatty acids of fungi and nematodes-possible biomarkers in the soil food chain? *Soil Biol. Biochem.* 34, 745–756.
- Ryan, S.N., Liang, W.A., McManus, M.T. (1998)** A cysteine proteinase inhibitor purified from apple fruit. *Phytochemistry*. 49, 957-63.
- Sagredo, M., Negrín, M.A., Navarro, M., González-Carcedo, S. (1995)** Soil fertility and phosphatase in "Olsen fraction". Meeting on The Soil as a strategic resource: Degradation processes and conservation measures. *European Society of Soil Conservation D.31* Tenerife.
- Saiya-Cork, K.R., Sinsabaugh, R.L., Zak, D.R. (2002)** The effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an *Acer saccharum* forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1309–1315.
- Sakurai, M., Wasaki, J., Tomizawa, Y., Shinano, T., Osaki, M. (2008)** Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase gene in organic matter applied soil. *Soil Biol. Biochem.* 54, 62–71
- Sampedro, J., Carey, R., Cosgrove, D. (2006)** Genome histories clarify evolution of the expansin superfamily: new insights from the poplar genome and pine ESTs. *J. Plant Res.* 119, 11-21.
- Sánchez, C. (2009)** Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv.* 27(2), 185-94.
- Santos, M., Vicente, N., Diáñez, F., de Cara, M., Tello, J. C. (2007)** Vinazas y hongos del suelo. *Agroecología* 2, 39-45.
- Sarathchanda, S.U., Perrot, K.W., Boase, M.R. y Waller, J.E. (1988)** Seasonal changes and the effects of fertiliser in some chemical, biochemical and microbiological characteristics of high-producing pastoral soil. *Biology and Fertility of Soils* 6, 328-335.
- Sarwar, M., Kirkegaard, J. A., Wong, P.W., Desmarchelier, J.M. (1998)** Biofumigation potential of Brassicas. *Plant and Soil.* 201, 103-112.
- Sasanelli, N., Anton, A., Takács, T., D'Addabbo, T., Biró, I., Malov, X (2009)** Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on the nematicidal properties of leaf extracts of *Thymus vulgaris* L. *Helminthologia*, 46, 230-240.
- Sasanelli, N., Ciccacese, F., Papajova, I. (2008)** *Aphanocladium album* by sub-irrigation in the control of *Pyrenochaeta lycopersici* and *Meloidogyne incognita* on tomato in a plastic-house. *Helminthologia*, 45, 137 – 142.
- Sasanelli, N., D'Addabbo, T., Convertini, G., Ferri, D. (2002)** Soil Phytoparasitic Nematodes Suppression and Changes of Chemical Properties Determined by Waste Residues from Olive Oil Extraction. In *Proceedings of 12<sup>th</sup> ISCO Conference*, May 26 – 31, Beijing China. Vol. III, 588– 592

- Sastoque, C. (2005)** Aislamiento y selección de microorganismos productores de quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial biocontrolador». Pontificia Universidad Javeriana. Tesis de grado.
- Saur, É., Arpin, P. (1989)** Ultrastructural analysis of the intestinal contents of *Clarkus papilla - tus* (Nematoda: Mononchina): ecological interest of the survey. *Rev. Nématol.*, 12, 413-422.
- Schoenau, J. J., Bettany, J. R. (1987)** Organic matter leaching as a component of carbon, nitrogen, phosphorus, and sulfur cycles in a forest, grassland, and gleyed soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 51, 646-51.
- Schottel, J.L., Shimizu, K., Kinkel, L.L. (2001)** Relationships of in vitro pathogen inhibition and soil colonization to potato scab biocontrol by antagonistic *Streptomyces* spp. *Biological Control* 20, 102-112.
- Schuster, R.P., Sikora, R.A. (1992)** Persistence and growth of an egg pathogenic fungus, applied in alginate granules to field soil and pathogenicity toward *Globodera pallida*. *Fundamentals Applied Nematology*, 4, 66-72.
- Seinhorst, J.W., Den Ouden, H. (1966)** An improvement of Bijloo's method for determining the egg content of *Heterodera* cysts. *Nematologica*, 12, 170-171.
- Sekora NS, Lawrence KK, van Santen E, McInroy JA. (2008a)**. Memphis TN: National Cotton Council; Fingerprinting nematode fatty acid compositions as a means for identification. Proceedings of the National Beltwide Cotton Conference, Vol. 1, 235-244.
- Sekora NS, Lawrence KK, van Santen E, McInroy JA. (2008b)** Host influence on the fatty acid profiles of selected plant parasitic nematodes. *Phytopathology*. 98, S143.
- Sekora NS, Lawrence KS, Agudelo P, van Santen E, McInroy JA. (2009b)** FAME analysis as an alternative means for distinguishing *Meloidogyne* species and races. *Phytopathology*. 99, S200.
- Sekora NS, Lawrence KS, van Santen E, McInroy JA, (2009c)** Identifying selected nematode species based on fatty acid profiles using FAME analysis. *Southeastern Biology*. 56, 254.
- Sekora, N.S., Lawrence, K.S., Agudelo, P., van Santen, E., McInroy, J. (2009a)** Using FAME Analysis to Compare, Differentiate, and Identify Multiple Nematode Species. *Journal of Nematology*. 41(3), 163-173.
- Seybold, C.A., Mausbach, M.J., Karlen, D.L., Rogers, H.H. (1997)** Quantification of soil quality. In R. Lal, J.M. Kimble, R.F. Follett and B.A. Stewart, eds. *Soil Processes and the Carbon Cycle*. CRC Press. Washington, D.C., USA.
- Shapira, R., Ordentlich, A., Chet, I., Oppenheim, A.B. (1989)** Control of plant diseases by chitinase expressed from cloned DNA in *Escherichia coli*. *Phytopathology*, 79, 1246-1249.
- Shawale, J.G., Sadana, J. (1981)** Purification, characterization and properties of b-glucosidase enzyme from *Sclerotium rolfsii*. *Arch Biochem Biophys* 207, 185-196.
- Shepherd, A.M. (1962)** The emergence of larvae from cysts in the genus *Heterodera*. *Technical Communication 32 of the Commonwealth Bureau of Helminthology*, St. Albans, Hefts, England. 1-90.
- Sherrod, L.L., Domsch, K.H. (1970)** Amino acids in exudates of healthy and fungus-affected pea roots. *Arch. Mikrobiol.* 70, 240-242.
- Shockman, G. D., Cheney, M. C. (1969)** Purification and some properties of the endogenous, autolytic N-acetylmuramoylhydrolase of *Streptococcus faecium*, a bacterial glycoenzyme. *J. Bacteriol.* 98, 1199-1207.
- Sikora, R.A., Hiemer, M., Schuster, R.P. (1990)** Reflections on the complexity of fungal infection of nematode eggs and the importance of facultative perthophytic fungal pathogens in biological control of *Globodera pallida*. *Landbouwwet Rijksuniv Gent* 55 (IIB), 699-712.
- Singer, M. J., Ewing, S. (2000)** Soil Quality. En *Handbook of Soil Science. Chaptre 11* (ed. Sumner, M. E.), 271-298, CRC Press, Boca Raton, Florida.

- Singh, P.P., Shin, Y.C., Park, C.S., Chung, Y.R. (1999)** Biological control of Fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology*, 89, 92-99.
- Singh, R. S., Sitaramaiah, K. (1973)** Control of plant parasitic nematodes with organic amendments of soil. Final Technical Report. *Effect of organic amendments, green manuring and inorganic fertilizers on root-knot of vegetable crops*. Research Bulletin Experimental Station & College of Agriculture. N°6
- Sinsabaugh, R. L. (1994)** Enzymic analysis of microbial pattern and process *Biology and Fertility of Soils*. 17, 69-74.
- Sinsabaugh, R. L., Antibus, R. K., Linkins, A. E. (1991)** An enzymatic approach to the analysis of microbial activity during plant litter decomposition. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 34, 43-54.
- Sinsabaugh, R., Gallo, M., Lauber, C., Waldrop, M., Zak, D. (2005)** Extracellular Enzyme Activities and Soil Organic Matter Dynamics for Northern Hardwood Forests receiving Simulated Nitrogen Deposition. *Journal of Biogeochemistry* 75, 201-215.
- Skujins, J. (1976)** Extracellular enzymes in soil. *Crit. Rev. Microbiol.* 4, 383-421.
- Small, R. W. (1988)**. Invertebrate predators. en G. O. Poinar y Hans-Borje Jansson, eds. *Diseases of Nematodes*. Vol. II. Pp. 73-92 CRC Press: Boca Ratón, Florida, EE.UU.
- Smith, S.E., Giaginazzi P.V. (1988)** Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plant. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.* 39, 221-244.
- Sneh, B. (1981)** Use of rhizosphere chitinolytic bacteria for biological control of Fusarium oxysporum f. sp. dianthi incarnation. *Phytopathologisches Zeitschrift* 100, 251-256.
- Sparling, G. P. (1997)** Soil Microbial Biomass, Activity and Nutrient Cycling, as Indicators of Soil Health. En *Biological Indicators of Soil Health* (eds. Pankhursts, C.E., Doube, B.M. y Gupta, V.S.R.), pp. 97-105, Cab International, Oxon, UK.
- Speir, T. W. Ross, D.J. (1978)** Soil phosphatase and sulphatase, In Soil Enzymes; D. J. Ross and R. G. Burns (Eds.) *Soil enzymes*. Academic Press, New York. p. 198-235.
- Spier, T.W., Lee, R., Eisebeth, A.P., Cairns, A. (1980)** A comparison of sulphatase, urease and phosphatase activity in planted and fallow soils. *Soil Biol. Biochem.* 12, 281-291.
- SQI Soil Quality Institute. (1996)** Indicators for Soil Quality Evaluation. USDA Natural Resources Conservation Service. Prepared by the National Soil Survey Center in cooperation with The Soil Quality Institute, NRCS, USDA, and the National Soil Tilth Laboratory, Agricultural Research Service. USA.
- Staddon W.J., Duchesne, L.C., Trevors, J.T. (1997)** Acid phosphate, alkaline phosphatase and arylsulfatase activities in soils from a jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) ecosystem after clear-cutting, prescribed burning, and scarification. *Biol. Fertil. Soils*, 27, 1-4.
- Stefanic, F., Eliade, G., Chirnogeanu, J. (1984)** Researches concerning a biological index of fertility. In: Nemes, M.P., Kiss, S., Papacostea, P., Stefanic, G., Rusan, M. (Eds.), *Proceedings of the Fifth Symposium on Soil Biology, Rumanian National Society of Soil Science, Bucharest, Rumania*, pp 35-45.
- Stevenson, F.J. (1994)** Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions, 2nd ed. Wiley, New York.
- Stevenson, F.J., Cole, M.A. (1986)** Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulphur, Micronutrients. Ed: John Wiley and Sons, ISBN: 0-471-32071-4
- Stirling, G.R. (1991a)** Biological control of plant parasitic nematodes: Progress, problems and prospects. ISBN: 0851987036.
- Stirling, G.R. (1991b)** Conservation and enhancement of naturally occurring antagonists and the role of organic matter. In: Biological Control of Plant Parasitic Nematodes. Progress, Problems and Prospects. CAB International, Wallingford, UK.

- Stone, A. G., Traina, S. J., and Hoitink, H. A. J. (2001)** Particulate organic matter composition and *Pythium* damping-off of cucumber. *Soil Science Society of America Journal* 65, 761-770.
- Storey, R. M.J. (1983)** The initial neutral lipid reserves of juveniles of *Globodera* sp. *Nematologica* 29, 144-150.
- Storey, R.M.J. (1984)** The relation ship between neutral lipid reserves and infectivity for hatched and dormant juveniles of *Globodera* sp. *Ann. of Applied Biology* 104, 511-520.
- Strater, N., Sherratt, D.J., Collons, S.D. (1999)** X-ray structure of aminopeptidase A from *Escherichia coli* and a model for the nucleoprotein complex in Xer site-specific recombination. *EMBO J.* 18, 4513-4522.
- Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L. (1995)** Biochemistry. 4th Ed., W. H. Freeman and Company, New York. ISBN-13: 978-0716746843
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Clare, B.W. (2002)** Bacterial protease inhibitors. *Med Res Rev.* 22, 329-72.
- Sutherland, I. W. (1995)** Polysaccharide lyases. *FEMS Microbiol. Rev.* 16, 323-347.
- Svensson, K., Pell, M. (2001)** Soil microbial tests for discriminating between different cropping systems and fertiliser regimes. *Biology and Fertility of Soils*, 33, 91-99.
- Szczech, M., Rondonanski, W., Brzeski, M. W., Smolinska, U., Kotowski, J. F. (1993)** Suppressive effect of a commercial earthworm compost on some root infecting pathogens of cabbage and tomato. *Biological Agriculture and Horticulture.* 10, 47-52.
- Tabatabai, M. A., Bremner, J. M. (1969)** Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1, 301-307.
- Tabatabai, M. A., Bremner, J. M. (1970a)** Arylsulfatase activity of soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 34, 225-9.
- Tabatabai, M. A., Dick, W. A. (2002)** Enzymes in Soil. Research and Developments in Measuring Activities. En: Burns, R. G. y Dick, R. P. (Eds.). *Enzymes in the Environment. Activity, Ecology and Applications.* Marcel Dekker, New York.
- Tabatabai, M.A. (1994)** Soil enzymes. In: Weaver RW, Angle JS, Bottomley PS (eds) *Methods of soil analysis, part 2. Microbiological and biochemical properties.* SSSA Book Series No. 5. Soil Sci. Soc. Am. Madison, Wis., pp. 775-833.
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M. (1970b)** Factors affecting soil arylsulphatase activity. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 34, 427-429.
- Tarafdar, J.C., Jungk, A. (1987)** Phosphatase activity in rhizosphere and its relation to the depletion of soil phosphorus. *Biol. Fert. Soils* 2, 199-204.
- Tate, R.L. (2000)** Soil microbiology. 2nd Edition. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Taylor, A.L., Sasser, J.N. (1983)** Biología, identificación y control de nematodos del nódulo de la raíz. Carolina del Norte de E.U.A.
- Tello, J., Bello, A. (1994)** El suelo como ente vivo. La rizosfera, los hongos y los nematodos fitopatógenos en la "memoria del suelo". *I Congreso SEAE*, 28-29, Toledo, 506-516.
- Tenuta, M., Ferris, H. (2004)** Sensitivity of Nematode Life-History Groups to Ions and Osmotic Tensions of Nitrogenous Solutions. *Journal of Nematology* 36, 85-94.
- Tester, M., Smith S.E., Smith. F.A. (1987)** The phenomenon of non mycorrhizal plants. *Can. J. Bot.* 65, 419-431.
- Teuber, M., Brodish, K. E. V. (1977)** Enzymatic activities of activated sludge. *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 4, 185-194.

- Tomerlin, H.A., Smart, G.C. (1969)** The influence of organic soil amendments on nematode and other soil organisms. *Journal of Nematology* 1, 29-30.
- Toyota, K., Kamesaka, T., Kimura, M. (1995)** Autecology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* in soils suppressive and conducive to *Fusarium*-wilt of radish. *FEMS Microbiology Ecology* 16, 261-267.
- Toyota, K., Kimura, M., Kinoshita, T. (2000)** Microbiological factors affecting the colonization of tomato roots by *Ralstonia solanacearum* YU1Rif43lux. *Soil Science and Plant Nutrition* 46, 643-653.
- Trasar-Cepeda, C., Gil-Sotres, F. (1988)** Kinetics of acid phosphatase activity in various soils of Galicia (NW of Spain). *Soil Biol. Biochem.* 20, 275-280.
- Trasar-Cepeda, C., Leirós, M. C., Seoane, S., Gil-Sotres, F. (2008)** Biochemical properties of soils under crop rotation. *Applied Soil Ecology.* 39, 133-143.
- Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Gil-Sotres, F., Seoane, S. (1998)** Towards a biochemical quality index for soils: An expression relating several biological and biochemical properties. *Biology and Fertility of Soils* 26, 100-106.
- Trevisan, M., Coppolecchia, D., Hamon, R., Puglisi, E. (2012)** Potential nitrification, nitrate reductase, and  $\beta$ -galactosidase activities as indicators of restoration of ecological functions in a Zn contaminated soil. *Biology and Fertility of Soils* 48, 923-931.
- Tribe, H.T. (1980)** Prospects for the biological control of plant parasitic nematodes. *Parasitology*, 81, 619-639.
- Tu, C.-J., Park, S.-Y., Walling, L. (2003)** Isolation and Characterization of the Neutral Leucine Aminopeptidase (*LapN*) of Tomato. *Plant Physiol.* 132, 243-255.
- Tuitert, G., Szczech, M., Bollen, G.J. (1998)** Suppression of *Rhizoctonia solani* in potting mixtures amended with compost made from organic household waste. *Phytopathology* 88, 764-773.
- Turner, B., Haygarth, P. (2005)** Phosphatase activity in temperate pasture soils: Potential regulation of labile organic phosphorus turnover by phosphodiesterase activity. *Sci. Total Environ.* 344, 27-36.
- Turner, B.L., (2010)** Variation in pH optima of hydrolytic enzyme activities in tropical rain forest soils. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 6485-6493.
- Turner, L.B., Hopkins, D.W., Philip, M., Haygarth, P.M., Ostle, N. (2002)**  $\beta$ -Glucosidase activity in pasture soils. *Applied Soil Ecology*, 20, 157-162.
- Turner, S. J., Evans, K. (1998)** The origins, global distribution and biology of potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* (Woll.) and *Globodera pallida* Stone). In Marks, R. J. and Brodie, B. B. (eds.). *Potato Cyst Nematodes: Biology, Distribution and Control*. New York: CAB International.
- Tyler, G. (1981)** Heavy metals in soil biology and biochemistry. In: *Soil Biochem.* 5, 371-414. (Paul EA, Ladd JN Eds) Dekker, New York.
- Uziel, A., Sikora, R.A. (1992)** Use of non-target isolate of the entomopathogen *Verticillium lecanii* (Zimm) Viegas to control the potato cyst nematode, *Globodera pallida* (Stone). *Nematologica* 38, 123-130.
- Valueva, T.A., Mosolov, V.V. (2004)** Role of Inhibitors of Proteolytic Enzymes in Plant Defense against Phytopathogenic Microorganisms. *Biochemistry*, 69, 1305-1309.
- Valueva, T.A., Revina, T.A., Gvozdeva, E.L., Gerasimova, N.G., Ilhinskaia, L.I., Ozretskovakaia, O.L. (2001)** Effects of Elicitors on the Accumulation of Proteinase Inhibitors in Injured Potato Tubers. *Appl. Biochem. Microbiol.* 37, 512-516.
- van der Putten, W. H., Kowalchuck, G. A., Brinkman, E. P., Doodeman, G. T. A., van der Kaaij, R. M., Kamp, A. F. D., Menting, F. B. J., Veenendaal, E. M. (2007)** Soil feedback of exotic savanna grass relates to pathogen absence and mycorrhizal selectivity. *Ecology*, 88, 978-988.



- van Grunsven, R. H. A., van der Putten, W. H., Bezemer, T. M., Tamis, W. L. M., Berendse, F., Veenendaal, E. M. (2007)** Reduced plant-soil feedback of plant species expanding their range as compared to natives. *Journal of Ecology*, 95, 1050-1057.
- van Os, G.J., van Ginkel, J.H. (2001)** Suppression of *Pythium* root rot in bulbous iris in relation to biomass and activity of the soil microflora. *Soil Biol. Biochem.* 33, 1447-1454.
- Vannacci, G., Gullino, M. L. (2000)** Use of biological agents against soil borne pathogens: Results and limitations. *Acta Horticulturae*, 532, 79-87.
- Varela, F.L. y A. Estrada-Torres. (1991)** El papel de los microorganismos de la rizosfera y de la micorriza en la absorción de nutrimentos minerales y agua. Memorias del X Curso-Taller de Otoño. 1-29 Nov. CYCY, Mérida, Yucatán, México.
- Verger, R. (1997)** 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol* 15, 32-38.
- Versaw, W.K., Harrison, M.J. (2002)** A Chloroplast Phosphate Transporter, PHT2; 1, Influences Allocation of Phosphate within the Plant and Phosphate-Starvation Responses. *Plant Cell* 14, 1751-1766.
- Vivrette, N. J., Muller, C. H. (1977)** Mechanism of invasion and dominance of coastal grassland by *Mesembryanthemum crystallinum*. *Ecological Monographs*, 47, 301-318.
- Vollmer, W., Blanot, D., de Pedro, M.A. (2008a)** Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev.* 32, 149-67.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., Foster, S. (2008b)** Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 259-286
- Vong, P.C., Dedouge, O., Lasserre-Joulin, F., Guckert, A. (2003)** Immobilized-S, microbial biomass-S and soil arylsulphatase activity in the rhizosphere soil of rape and barley as affected by labile substrate C and N additions. *Soil Biol. Biochem.* 35, 1651-1661.
- Walkley, A., Black, I. (1934)** An examination of the Degtjareff method and a proposed modification of the chromic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 34, 29-38.
- Wallace, H. R. (1966)** The influence of moisture stress on the development, hatch and survival of eggs of *Meloidogyne javanica*. *Nematologica* 12, 57-69.
- Wallace, H. R. (1968)** Undulating locomotion of the plant parasitic nematode, *Meloidogyne javanica*. *Parasitology* 58, 377-391.
- Wallenstein, M.D., McMahon, S.K., Schimel, J.P. (2009)** Seasonal variation in enzyme activities and temperature sensitivities in Arctic tundra soils. *Global Change Biology* 15, 1631-1639.
- Wardle, DA. (2002)** Communities and ecosystems: linking the aboveground and belowground components: Princeton University Pres.
- Watson, A.P., van Hook, R.I., Jackson, D.R., Reichle, D.E. (1976)** Impact of lead mining and smelting complex on the forest floor litter arthropod fauna in the New Lead Belt Region of Southern Missouri. ORNL/NSF/EATC-30, Oak Ridge National Laboratory.
- Weidel, W., Pelzer, H. (1964)** Bagshaped Macromolecules. A new outlook on bacterial cell walls. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 26, 193-232.
- Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., McSpadden Gardener, B.B., Thomashow, L.S. (2002)** Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 40, 309-348.
- Wenzel, W.W., Pollak, M.A., Riedler, C., Zischka, R.R., Blum, W.E.H. (1995)** Influence of site conditions and heavy metals on enzyme activities of forest topsoil. In: Environmental Impact of Soil Component Interactions-Metals, Other Inorganics, and Microbial Activities, (Huang PM, Berthelin J, Bollag JM, McGill WN, Page AL, Eds.) pp. 211-225, CRC, Baton Rouge.
- Wenzl, P., Wong, L., Kwang-won, K., Jefferson, R.A. (2005)** A Functional Screen Identifies Lateral Transfer of  $\beta$ -Glucuronidase (*gus*) from Bacteria to Fungi. *Mol. Biol. Evol.* 22, 308-316.

- Wharton, D.A., Ramløv, H. (1995)** Differential scanning calorimetry studies on the cysts of the potato-cyst nematode *globodera rostochiensis* during freezing and meeting. *The Journal of Experimental Biology* 198, 2551–2555.
- Wick, B., Kühne, R.F., Vlek, P.L.G. (1998)** Soil microbiological parameters as indicators of soil quality under improved fallow management systems in southwestern Nigeria. *Plant Soil* 202, 97-107.
- Wirth, S.J., Wolf, G.A. (1992)** Microplate colourimetric assay for endoacting cellulose, xylanase, chitinase, 1,3- $\beta$ -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. *Soil Biol. Biochem.* 24, 511-519.
- Workneh, F., van Bruggen, A.H.C. (1994)** Suppression of corky root of tomatoes in soils from organic farms associated with soil microbial activity and nitrogen status of soil and tomato tissue. *Phytopathology* 84, 688–694.
- Wright, A. L., Reddy, K. R. (2001)** Phosphorus loading effects on extracellular enzyme activity in Everglades wetland soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 65, 588-595.
- Xia, J., Wan, S. (2008)** Global response patterns of terrestrial plant species to nitrogen addition. *New Phytology* 179, 428-39.
- Yadav, R.S., Tarafdar, J.C. (2001)** Influence of organic and inorganic phosphorus supply on the maximum secretion of acid phosphatase by plants. *Biol Fertil Soils* 34, 140–143
- Yadav, R.S., Tarafdar, J.C. (2003)** Phytase of fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolysing different organic P compounds. *Soil Biol Biochem* 35, 1–7
- Yakovchenko, V., Sikora, L.J., Kaufman, D.D. (1996)** A biologically based indicator of soil quality. *Biol. Fertility Soils*, 21, 245–251.
- Yao, L.X., Li, G.L., Tu, S.H., Sulewski, G., He, Z.H. (2007)** Salinity of animal manure and potential risk of secondary soil salinization through successive manure application. *Sci. Total Environ.* 383, 106-114.
- Yeates, G. (1999)** Effects of plants in nematode community structure. *Annual Review of Phytopathology* 37, 127-149.
- Yeates, G.W. (1987)** Significance of developmental stages in the co-existence of three species of Mononchoidea (Nematoda) in a pasture soil. *Biol. Fert. Soils*, 5, 225-229.
- Yeates, G.W., Bongers, T., de Goede, R.G.M., Freckman, D.W., Georgieva S.S. (1993)** Feeding Habits in Soil Nematode Families and Genera - An Outline for Soil Ecologists. *J. Nematol.* 25, 315-331.
- Yoon, H-G., Kim, H-Y., Lim Y-H., Kim, H-K., Shin, D-H. (2000)** Thermostable chitosanase from *Bacillus* spp. Strain CK-4; Cloning and expression of the gene and characterization of the enzyme. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3727-3734.
- Zak, D. R., Holmes, W. E., White, D. C., Peacock, A. D., Tilman, D. (2003)** Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: Are there any links? *Ecology*, 84, 2042-2050.
- Zanón, M. J. (2009)** Efecto de la Biofumigación y biosolarización en el control de bacterias fitopatógenas. Tesis doctoral, Escuela Universitaria de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Valencia.
- Zhao, Y. X., Liu, Q. Z., Cao, Z. P., Wu, W. L. (2003)** Effect of fertilizer on population dynamics of plant parasitic nematodes. *Journal of Plant Protection* 29, 19-22.
- Zornoza, R., Guerrero, C., Mataix-Solera, J., Scow, K.M., Arcenegui, V., Mataix-Beneyto, J. (2009)** Changes in soil microbial community structure following the abandonment of agricultural terraces in mountainous areas of Eastern Spain. *Appl. Soil Ecol.* 42, 315–323.