

**RECOVERING CONTAMINATED SOILS THROUGH PHYTOMANAGEMENT
IN SOUTHWEST EUROPE**

Producto 1.1 Guía técnica avanzada de herramientas para la monitorización a largo plazo de espacios fitogestionados

GT1-Mantenimiento y monitorización a largo plazo de los emplazamientos de la red PhytoSUDOE mediante metodología armonizada

Este producto se ha producido en el marco del proyecto Phy2SUDOE
(SOE4/P5/E1021):

“Avanzando en la aplicación de estrategias innovadoras de fitogestión en zonas contaminadas del espacio Sudoe”

Financiado por el Programa Interreg Sudoe a través del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Autores: Beatriz Rodríguez-Garrido (MBG-CSIC), Carmela Monterroso-Martínez (USC), Ángeles Prieto-Fernández (MBG-CSIC), Carmen Trasar-Cepeda (MBG-CSIC), Carlos Garbisu (NEIKER), Michel Mench (INRA), Paula Castro (UCP), José María Becerril (UPV/EHU), Manu Soto (UPV/EHU), Mikel Anza (NEIKER), Lur Epelde (NEIKER), Erik Urionabarrenetxea (UPV/EHU), Juan Vilela (CEA), Helena Moreira (UCP), Sofía Pereira (UCP), Ana Sofía Sousa (UCP), Souhir Soussou (Fertil'Innov Environnement), Álvaro Nunes de Sousa (CloverStrategy).



ÍNDICE

JUSTIFICACIÓN.....	1
1. Introducción.....	2
1.1 ¿Qué es la fitogestión?.....	2
1.2 El proyecto Phy2SUDOE.....	5
2. Evaluación inicial de los emplazamientos.....	6
3. Plan de Monitorización de los espacios fitogestionados.....	9
3.1 Selección de los indicadores de control.....	9
3.2 Toma de muestras.....	12
3.3 Preparación de muestras.....	15
3.4 Propiedades físicas y físico-químicas del suelo.....	16
3.5 Concentración de elementos traza y contaminantes orgánicos.....	27
3.6 Propiedades biológicas y bioquímicas del suelo.....	32
3.7 Análisis de vegetación.....	45
3.8 Protocolo simplificado: Las Tarjetas de Salud de los Ecosistemas Agrícolas.....	50
4. Referencias.....	60

JUSTIFICACIÓN

Las actividades humanas llegan a degradar y contaminar el suelo, lo que produce la pérdida de sus funciones y servicios ecosistémicos subyacentes, esenciales para la conservación del medio ambiente y la salud humana. La fitogestión de espacios degradados/contaminados permite recuperar (incluso ampliar) las funciones y servicios ecosistémicos dañados, cuyo alcance puede ser evaluado a través del seguimiento de las propiedades edáficas y biológicas del lugar.

Durante el proyecto PhytoSUDOE se estableció una red de emplazamientos degradados/contaminados y fitogestionados que cubre una amplia gama de condiciones edafoclimáticas, tipos de degradación y opciones de fitogestión, a lo largo de la región SUDOE. Ya que los procesos del suelo son específicos del sitio y cambian con el tiempo, para evaluar el éxito y sostenibilidad de las estrategias de fitogestión, es esencial obtener información precisa a lo largo del tiempo en cada emplazamiento. Para ello, en el proyecto Phy2SUDOE se diseñó un Plan de Monitorización y se seleccionó un grupo de indicadores de control (edáficos y biológicos) que proporcionan la información necesaria para evaluar la evolución a largo plazo de los emplazamientos fitogestionados.

En esta guía se presenta un breve resumen de la metodología utilizada para la evaluación inicial de los emplazamientos degradados/contaminados de la red PhytoSUDOE y se detalla el Plan de Monitorización y los indicadores de control seleccionados para evaluar el éxito de las estrategias de fitogestión implementadas en cada uno de ellos.

1. Introducción

1.1 ¿Qué es la fitogestión?

La fitogestión es una fitotecnología, surgida a partir de la fitorremediación, que utiliza la combinación de diversas plantas y microorganismos, asistida, si es necesario, por enmiendas del suelo, para controlar el riesgo asociado a la presencia de contaminantes en emplazamientos degradados, a la vez que produce una biomasa de alto valor y/o de interés ecológico, y mejora las funciones ecológicas del suelo y los servicios ecosistémicos subyacentes. Es una opción de restauración ambiental menos invasiva y costosa que la excavación y el vertido, y, además, es más respetuosa con el medio ambiente y está integrada en la bioeconomía.

La fitogestión promueve el uso de opciones *blandas* de remediación (siglas en inglés GRO, de *Gentle Remediation Options* por su denominación en inglés) dentro de una solución integrada de gestión de riesgos para espacios degradados o contaminados abandonados. El uso de fitotecnologías se considera una alternativa a los métodos tradicionales de ingeniería civil, respetuosa con el medio ambiente, estética y económicamente viable. Además, la fitogestión tiene la ventaja adicional de que puede ser aplicada *in situ* y a gran escala.

Mientras que la fitorremediación tiene como objetivo la reducción del riesgo asociado a los contaminantes, la fitogestión promueve el uso de los GROs como parte de una gestión integrada del emplazamiento, en la que, junto con la reducción del riesgo, se tiene en cuenta la obtención de beneficios económicos, sociales y medioambientales (Figura 1).

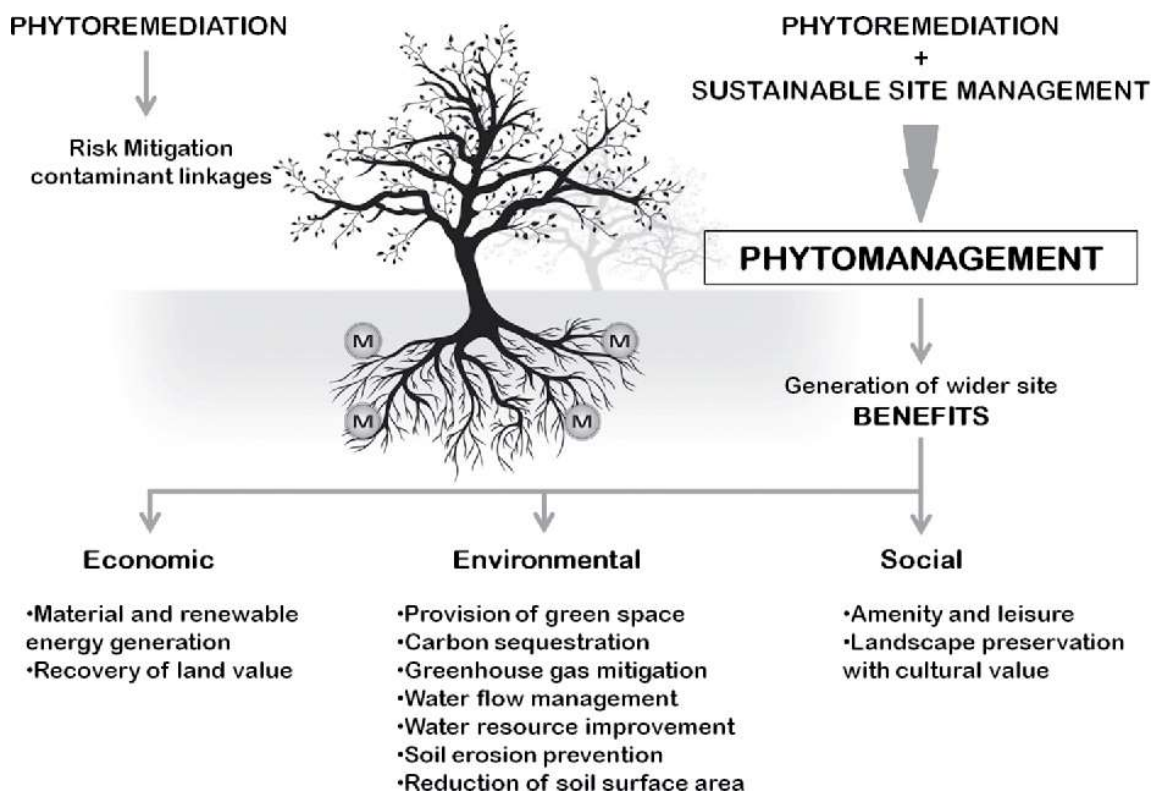
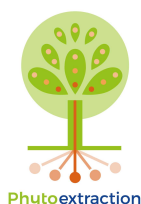


Figura 1. Representación conceptual del proceso de fitogestión (Burges et al., 2018).

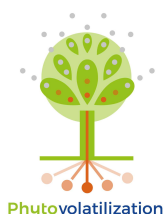
Las GROs fueron desarrolladas como alternativas ecológicas a los métodos tradicionales de ingeniería civil de rehabilitación de suelos (Kidd et al. 2015). Estas opciones incluyen técnicas de estabilización *in situ* (inactivación) y técnicas basadas en especies vegetales (generalmente denominadas fitorremediación), y tienen como objetivo disminuir el contenido total y/o de formas lábiles (biodisponibles) de distintos tipos de contaminantes (Cundy et al., 2016). Las principales opciones de fitogestión son las siguientes:



La **fitoestabilización** utiliza especies vegetales tolerantes con un fenotipo de exclusión para establecer una cubierta vegetal y estabilizar y/o reducir progresivamente la disponibilidad de los contaminantes del suelo (Mench et al. 2006, Ruttens et al. 2006a, 2006b, Vangronsveld et al. 2009, Dary et al. 2010). La incorporación de enmiendas en el suelo o el uso de la inoculación microbiana (fitoestabilización asistida) (Mench et al. 2010) puede disminuir aún más la biodisponibilidad y la fitotoxicidad de los contaminantes en la zona de la raíz, al tiempo que mejora el establecimiento de la planta. La fitoestabilización no conduce a la eliminación real de los contaminantes, pero reduce su biodisponibilidad y transferencia a otros compartimentos ambientales. La acción mecánica de las raíces de las plantas reduce la erosión y el transporte de partículas del suelo a través de agentes naturales, mientras que la evapotranspiración minimiza la lixiviación durante la temporada de crecimiento y, por lo tanto, la diseminación de contaminantes. Además, la adsorción, la precipitación y la acumulación de contaminantes en la rizosfera (en colaboración con microorganismos asociados con las raíces de las plantas) conllevan su inmovilización (Mench et al. 2010).



La **fitoextracción** se basa en el uso de plantas tolerantes que absorben determinados contaminantes (en general, dos o tres metal(oid)es, rara vez más) del suelo y los acumulan en su biomasa aérea cosechable en cantidades superiores a sus concentraciones normales (Vangronsveld et al. 2009). La fitoextracción puede ser ayudada por enmiendas, agentes químicos y microorganismos del suelo (fitoextracción asistida). Cuando los elementos traza (ET) con valor económico (como Ni, Au, etc.) se recuperan de la biomasa vegetal (bio-minerales), se la conoce como fitominería (Chaney et al. 2007).



La **fitovolatilización** aprovecha la capacidad de las plantas para transformar los contaminantes en compuestos volátiles ya sea fuera o dentro de algunas partes de la planta, después de su absorción, o absorber y transportar compuestos volátiles desde el suelo a la biomasa aérea, donde pueden liberarse a la atmósfera (Wenzel 2009). Cuando el contaminante se transforma y se libera directamente del suelo que rodea las raíces de las plantas (rizosfera), generalmente se denomina rizovolatilización (Zhang y Frankenberger 2000).



La **fitodegradación** o fitotransformación utiliza plantas (y sus microorganismos asociados) para degradar los contaminantes orgánicos a metabolitos que tienen a sus concentraciones un efecto tóxico menor o nulo (Weyens et al. 2009). Cuando la degradación tiene lugar en la rizosfera de las plantas (debido a la actividad microbiana o la liberación de enzimas de las plantas), los términos como fitoestimulación o rizodegradación son más correctos (Becerra-Castro et al. 2013).

Dentro del proyecto Phy2SUDOE, se han aplicado distintas técnicas para la mejora de la fitogestión, como la aplicación de enmiendas edáficas, la bioinoculación o distintos patrones de cultivo:



Las **enmiendas** son compuestos que se añaden al suelo para mejorar sus propiedades físicas, químicas y/o biológicas, favoreciendo el crecimiento de las plantas (por ejemplo: enmienda de materia orgánica a través de la adición de compost).



El **bioaumentación** consiste en la inoculación de plantas con microorganismos que puedan potenciar el crecimiento vegetal o la tolerancia a los contaminantes, o influir en la acumulación de elementos traza o la degradación de contaminantes orgánicos. En el caso de Phy2SUDOE se han usado inóculos bacterianos (endófitos y rizósfericos) y hongos (para formar micorrizas).



Se han cultivado árboles con probada capacidad fitorremediadora como chopos y sauces (entre otras especies). En general, se han utilizado especies de rápido crecimiento y tolerantes a la contaminación.



En algunas de las parcelas de Phy2SUDOE se han cultivado especies herbáceas (colza, gramíneas, etc.) o de elevada biomasa (girasol, tabaco) en sistemas de rotación.



Para potenciar la fitorremediación, en algunas parcelas se han intercalado plantaciones forestales con cultivos agrícolas, o se han establecido policultivos de especies arbóreas, que incluyen leguminosas, o plantas que se asocian con microorganismos fijadores de nitrógeno (p.ej. *Salix/Populus* con *Alnus*).

1.2 El proyecto Phy2SUDOE

El proyecto Phy2SUDOE tiene como objetivo principal la gestión sostenible de emplazamientos contaminados en la región Interreg SUDOE, mediante la aplicación de estrategias de fitogestión encaminadas a la minimización del riesgo asociado a la presencia de los contaminantes, a la vez que se generan beneficios, en términos de productos y servicios ecosistémicos, y se protege y promueve la biodiversidad, a través de la cooperación de todos los agentes involucrados en este campo (investigadores, administraciones, gestores y empresas). Phy2SUDOE surge como continuación del proyecto PhytoSUDOE (SOE1/P5/E0189, 1ª convocatoria Interreg SUDOE; finalizado el 21/10/2018), en el que se detectó la necesidad de continuar y complementar los estudios realizados.

Durante la ejecución de PhySUDOE se estableció una red de emplazamientos degradados/contaminados y fitogestionados (PhytoSUDOE Network); el proyecto Phy2SUDOE, que como ya se dijo, es continuación de PhytoSUDOE pretende: i) consolidar la red de emplazamientos fitogestionados (GT1), ii) ampliarla con nuevas casuísticas de contaminación y estrategias de fitogestión (GT2), y iii) potenciar la conservación de la biodiversidad endémica de interés ambiental y biotecnológico (GT3).

El GT1 se centra en el mantenimiento de los emplazamientos de la red PhytoSUDOE, así como en implementar estrategias de monitorización a largo plazo para el seguimiento de los beneficios aportados por la fitogestión. Los emplazamientos de la red PhytoSUDOE (Tabla 1) cubren una gran variedad de condiciones edafo-climáticas, tipos de degradación y alternativas de fitogestión.

Tabla 1. Emplazamientos de trabajo del GT1 del proyecto Phy2SUDOE (procedentes de la red emplazamientos establecidos en el proyecto PhytoSUDOE).

Site	Location	Partners	Type of degraded soil	Contaminant/stress
S1	St Médard d'Eyrans (Gironde, FR)	INRA	Abandoned industrial área	Cu/PAH
S2	Chaban-Delmas (Gironde, FR)	INRA	Abandoned industrial área	metal(loid)s/PAHs/ aliphatic hydrocarbons
S3	Borralha (Montalegre, PT)	UCP-CRP, LNEG	Mine site	Ag, W, Cu, Pb
S5a/S5b	Ariñez (Basque Country, ES)	UPV, NEIKER, CEA	Abandoned zone in peri-urban area	As/Pb/PCB/PAH/HCs
S6	Mendiguentxo (Basque Country, ES)	UPV, NEIKER, CEA	Peri-urban used for dumping	Trace elements
S7	Pedrafita do Cebreiro (Galicia, SP)	CSIC, USC	Mine tailing	Cd, Pb, Zn
S8	Touro (Galicia, SP)	CSIC, USC	Mine tailing	Cu, acid drainages

2. Evaluación inicial de los emplazamientos

Hacer una evaluación inicial de los emplazamientos contaminados y/o degradados es el primer paso necesario para: i) desarrollar el modelo conceptual de los riesgos de exposición y transferencia de los contaminantes, ii) proponer los protocolos de fitogestión más adecuados y iii) diseñar un plan de monitorización que permita evaluar su éxito a lo largo del tiempo, o detectar los retrocesos e implementar las correcciones pertinentes de forma temprana.

A partir de la evaluación inicial se pretende comprender la naturaleza, las propiedades, la dinámica y las funciones del ecosistema. Para ello, es necesario abordar el estudio de los factores ambientales de la zona, la obtención de información in situ mediante observación y descripción en el campo, así como caracterización de las propiedades físicas, físico-químicas y biológicas del suelo. Las fotos o dibujos que muestren el estado del emplazamiento serán de gran utilidad para una interpretación adecuada de los de los resultados.

Toda la información recogida es especialmente relevante para definir las acciones de fitogestión necesarias. Así, se definirán las necesidades de fertilización del suelo, riego (periódico, sistemático, ...), especies vegetales más adecuadas para el emplazamiento (nativas o nuevas) y sistemas de cultivo (agrícolas/forestales, rotación/permanente, mono-/policultivo,...).

En la figura 2 se presenta un modelo conceptual del procedimiento seguido para realizar la evaluación inicial de los emplazamientos fitogestionados de la red PhytoSUDOE y en la tabla 2 se incluye de forma detallada la información obtenida en el procedimiento.



Figura 2. Modelo conceptual para realizar una evaluación inicial de un espacio contaminado/degradado.

Tabla 2. Procedimiento general para abordar la evaluación inicial de un emplazamiento.

1 INFORMACIÓN ACERCA DEL SITIO, REGISTRO Y LOCALIZACIÓN	
Fecha de observación	
Autores	
Ubicación	Localización y coordenadas
Altitud	Metros sobre el nivel del mar (msnm)
2 INFORMACION GENERAL Y FACTORES DE FORMACIÓN DEL SUELO	
Clima y condiciones atmosféricas	Condiciones atmosféricas actuales
	Condiciones climáticas pasadas/precipitaciones
Regímenes climáticos del suelo	
Forma del terreno y topografía (relieve)	Geoforma principal (morfología del paisaje)
	Posición del sitio dentro del paisaje
	Pendiente: forma, gradiente y orientación
Uso del suelo y vegetación	Uso de la tierra
	Cultivos
	Vegetación
	Influencia humana/evidencias de contaminación
Material de partida	Origen y naturaleza
Edad del paisaje	
Hidrología	Cursos de agua, arroyos, lagunas, escorrentía,...
3 DESCRIPCIÓN DEL SUELO <i>IN SITU</i>	
Afloramientos rocosos	% superficie cubierta, dureza, distancia entre afloramientos
Pedregosidad	% superficie cubierta, tamaño
Erosión	No evidencia/erosión por agua y/o viento
	tipo de deslizamientos
	% área afectada
	Grado (ligero, moderado, severo, extremo)
Encostramiento	anchura y consistencia de la costra superficial
Grietas superficiales	Anchura, distancia entre grietas, profundidad
Drenaje	
Condiciones de humedad del suelo	
Color del suelo (clave Munsell)	Matriz
	Moteados: color, abundancia, forma, tamaño,.....
Estructura del suelo	Prismática, columnar, bloques, laminar, granular o migajosa
Consistencia	Friabilidad, plasticidad, adhesividad, resistencia a la compresión
Textura	Método de campo (comportamiento de una muestra de mano)
4 TOMA DE MUESTRAS	
Perfil	
Capa superficial	
Vegetación	

5

PROCESADO DE MUESTRAS

Muestras húmedas	Condiciones de conservación
Muestras secas	Secado, tamizado (suelos)/triturado (vegetación), conservación de las muestras

6

INDICADORES MEDIDOS EN LABORATORIO

Propiedades físico-químicas del suelo	
Textura	
Estructura	
Densidad	
Capacidad de retención hídrica	
pH (en agua y cloruro potásico)	
Potencial redox	
CIC al pH del suelo	
Cantidad y disponibilidad de nutrientes (N, P, K)	
P extraíble (Olsen)	
C y N totales	
Carbonatos	
Elementos traza y contaminantes	
Elementos traza biodisponibles	
Elementos traza totales	
Contaminantes orgánicos	
Propiedades biológicas y bioquímicas	
Actividades enzimáticas	
CLPP (Ecoplates Biolog™)	
Respiración	
Comunidades microbianas	
Test de ecotoxicidad	
Fauna presente en el suelo	
Análisis de plantas	
Parámetros biométricos	
Parámetros fisiológicos y pigmentarios	
Nutrientes	
Concentración de elementos traza	
Factores de bioconcentración y translocación de elementos traza	
Concentración de contaminantes orgánicos	

3. Plan de monitorización de los espacios fitogestionados

3.1 Selección de los indicadores de control

Cuantificar el grado de recuperación y/o ampliación de las funciones y servicios ecosistémicos de un suelo durante o después de la fitogestión es clave para evaluar el éxito de las distintas alternativas y escalar las más adecuadas. Si tenemos en cuenta que las funciones del suelo son propiedades integrales que surgen de interacciones complejas entre los procesos físicos, químicos y biológicos, en función de múltiples factores, podemos entender que su evaluación y cuantificación es una tarea difícil. Las funciones del suelo y los servicios aportados no pueden medirse directamente, por lo que se recurre a la medida de propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo para cuantificar el cumplimiento de las funciones del suelo relacionadas con objetivos específicos. Estas propiedades son utilizadas como indicadores (directos o indirectos) de la función del suelo y clásicamente se agrupan bajo el término de indicadores de calidad del suelo. La selección de los indicadores de calidad del suelo adecuados es uno de los pasos más importantes para evaluar el éxito de las estrategias de fitogestión.

Para evaluar la calidad del suelo, lo ideal sería tener valores de referencia objetivo, que fueran universales. Sin embargo, esto no es posible, ya que el material de partida del suelo, el clima, la topografía, la hidrología, la actividad biológica y el tiempo, entre otros factores, influyen directamente en las propiedades del suelo y su evolución.

También debemos tener en cuenta que las condiciones climáticas plantean una limitación crucial y obvia para el éxito de la fitogestión. La temperatura controla la transpiración, la química del agua, el crecimiento y el metabolismo de las plantas y, por tanto, afecta directamente la absorción de contaminantes y a su destino dentro de la planta y otros compartimentos del ecosistema (Bhargava et al., 2012). La humedad del suelo afecta tanto al crecimiento vegetal como el transporte de contaminantes en el suelo. La sequía prolongada induce el estrés, lo que aumenta la sensibilidad de las plantas a los patógenos o herbívoros y, lo que es más importante, reduce el crecimiento de las plantas, con implicaciones negativas en el éxito de la fitorremediación. Otros problemas específicos del sitio se refieren a áreas de minería y suelos arenosos donde los suelos a menudo se caracterizan por una baja capacidad de retención de agua (Kidd et al., 2015).

Teniendo en cuenta las características de cada emplazamiento, en Phy2SUDOE se diseñó un Plan de Monitorización de los parámetros edáficos y biológicos que permite evaluar la evolución del emplazamiento y los beneficios aportados por la fitogestión a lo largo del tiempo, así como corregir las desviaciones detectadas (Tabla 3 y Tabla 4).

Tabla 3. Parámetros edáficos y biológicos seleccionados para la monitorización de los distintos emplazamientos.

		S1	S2	S3	S5b	S7	S8	
Physic-chemical properties	Soil pH (1:2.5 soil:water; or 1M KCl)	X	X	X	X	X	X	
	CEC	Cobaltihexamine method	X	X	X	X	X	X
		1M NH ₄ Cl AAS/ICP-OES					X	X
	Extractable P (Olsen's NaHCO ₃ method)	X	X	X	X	X	X	
	Phosphorus speciation/fractionation					X		
	Total C and N (Combustion, LECO analyzer)	X	X	X	X	X	X	
	SOM fractionation					X	X	
	Carbonates (Gravimetry, Schleiber method)	X	X			X	X	
	Fe/Al oxi(hidroxi)des					X	X	
	Bulk density	X	X			X	X	
	Soil moisture	X	X	X	X	X	X	
	Water-holding capacity	X	X			X	X	
Trace elements and organic contaminant	Bioavailable TE (EDTA, H ₂ O,...)	NH ₄ Cl				X	X	
		NH ₄ NO ₃	X	X	X	X	X	
		H ₂ O					X	X
		EDTA					X	X
	Total TE (H ₂ O ₂ /3:1 HCl:HNO ₃ , microwave)	X	X	X	X	X	X	
	Soil metal fractionation (modified BCR protocol)					X	X	
Total PAH (Hexane extraction, GC-MS determination)	X	X						
Biological and biochemical properties	Enzymatic activities	X	X	X		X	X	
	CLPP (Ecoplates Biolog™)	X	X	X		X	X	
	Respiration	X		X				
	Microbial communities	X						
	Ecotoxicity test (germination, microtox...)	germination				X	X	
	Soil fauna	invertebrates nematodes	invertebrates nematodes					
	Metabarcoding (16S, ITS, 18S and COI)	X	X	X	X		X	
Plant analysis	Biometric parameters	X	X	X	X	X	X	
	TE concentration	X	X	X		X	X	
	Physiological and pigment parameters	chlorophyll index		X	X	X	X	
	Nutrients	X	X	X		X	X	
	TEs bioconcentration and translocation factors	X	X			X	X	
Soil Health Cards (TSAE)					X			

Tabla 4. Plan de monitorización en los distintos emplazamientos de la red Phy2SUDOE.

Site	Soil sampling				Plant sampling		Plant mortality		Replanting	
	Metabarcoding				Times	When?	Times	When?	Times	When?
S1	1	04/2022	3	03/2021 03 & 10/2022	4 /year	12/2020 3, 6-7 & 12/2021 3, 6 & 11/2022	2/year	germination (Oct.), harvest (June)	1	10 & 11/2021 (Eucalyptus instead of died non- mycorrhizal poplars)
S2	1	04/2022	2	04/2021 03/2022	2/year	03-04 & 10/2021 06 & 11/2022	not relevant		not relevant	
S3	1	04/2022	1	09/2021	1	09/2021	1 per year (2021/2022)	Spring	Yes	October
S5a	No		No		No		1 per year	Autum	1	Spring 2022 (last time)
S5b	1	04/2022	1 (phy/chem+TE)	04/2022	1 per year	spring	1 per year	Spring	No	
			2 (soil cards)	05 & 10/2022						
S6	No		No		No		1 per year	Autum	1	Spring 2022 (last time)
S7	No		1	07/10/2021	1	07/10/2021	1	07/10/2021	No	
S8	<i>Salix & Agrostis</i> plots (established in 2011)	No	2	22/09/2021 04/11/2022	1 per year (2021/2022)	22/09/2021 04/11/2022	1 per year (2021/2022)	22/09/2021 04/11/2022	No	
	<i>Poplar</i> plots (established in 2017)	1	04/2022	1	28/04/2022	1	28/04/2022	1	28/04/2022	No

3.2 Toma de muestras

Para una monitorización óptima, las distintas campañas de observación y muestreo se realizarán en las mismas condiciones ambientales y en la misma parcela control. Se evitarán los días excesivamente calurosos, fríos o lluviosos, y las medidas se realizarán antes o después del laboreo del suelo, dejando tiempo para que el suelo se estabilice.

De forma general, se realizará el estudio de todo el perfil del suelo para una correcta caracterización inicial de un emplazamiento, mientras que la monitorización a lo largo del tiempo se realizará específicamente en la “capa arable”, más afectada por las actuaciones de la fitogestión. En cualquier caso, previamente a la toma de muestras, se realizará una completa descripción de la zona de estudio (ver puntos 1, 2 y 3 en la Tabla 2).

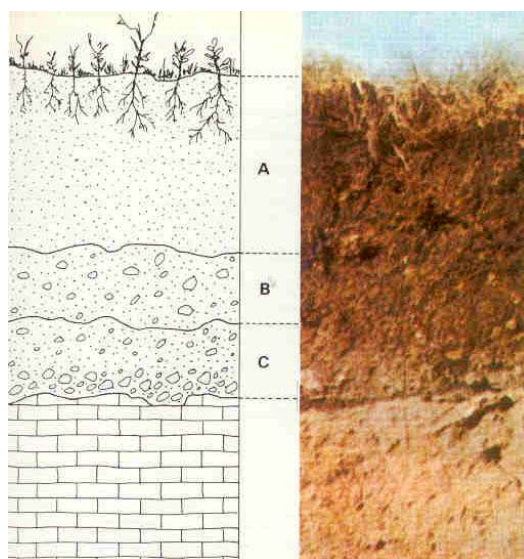


3.2.1 Muestreo del perfil del suelo

El perfil de un suelo es un corte vertical del terreno que permite estudiar todos los horizontes del suelo, desde la superficie hasta el material original. Para poder estudiarlo podemos excavar una calicata en el terreno, suficientemente grande para permitir la observación del perfil completo. También podemos utilizar antiguos cortes del terreno, por ejemplo, en caminos o carreteras, pero después retirar suficiente material para exponer el suelo fresco. En primer lugar, anotamos las características de la superficie del terreno y después, hacemos la descripción del suelo horizonte a horizonte, empezando por el más superficial. Debemos completar la descripción en el campo tanto como sea posible siguiendo el listado de la Tabla 2 (puntos 1 a 3). Para información detallada ver *Guía para la descripción de suelos*, 4th Ed. (FAO, 2006).

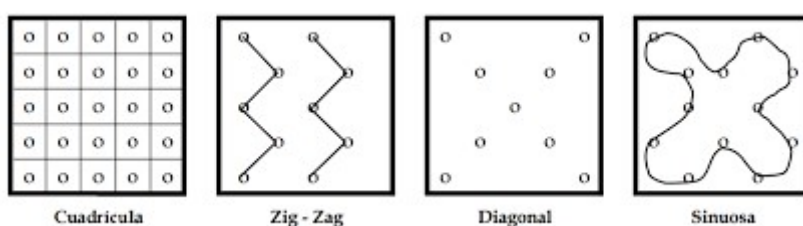
Realización del muestreo de cada horizonte:

- Se debe realizar empezando por la base del perfil, para no contaminar las muestras siguientes.
- Las muestras no deben cogerse en los límites de los horizontes.
- El peso de cada muestra debe de ser en torno a 1 kg.
- Las muestras deben guardarse en bolsas debidamente etiquetadas, evitando la contaminación o pérdida de muestra.



3.2.2 Muestreo de la capa arable del suelo

- La toma de muestras de la capa superficial o de la capa arable se realiza en los 20 cm superficiales (0-20 cm), o menos si la profundidad del suelo es menor de 20 cm.
- Deben retirarse las plantas y hojarasca fresca de la superficie.
- La muestra consistirá en una combinación de, al menos, 5 submuestras de volúmenes similares (aproximadamente 0.5-1 kg de suelo) que se mezclan y homogenizan para formar una muestra compuesta.
- Se recomienda seguir un patrón sistemático (cuadrícula, zig-zag, diagonal, ...) para la elección de los puntos de recogida de las submuestras.



- Cuando se realizan muestreos en terrenos plantados, la toma de muestras de suelos debe realizarse entre las hileras de cultivo, o si es necesario, en caso de plantaciones forestales, en el suelo próximo a las raíces.

RECORDAR: El objetivo es obtener una muestra lo más representativa posible del suelo.

3.2.3 Toma de muestras de vegetación

En el caso de la vegetación hay algunas medidas que se deben hacer en campo, como son las medidas de los parámetros biométricos y fisiológicos.

Para la toma de muestras para llevar al laboratorio:

- Debemos tomar una muestra representativa, para lo cual si es posible se debe hacer una composición de, al menos, 5 plantas diferentes y, en el caso de los análisis que requieran solo una hoja debemos coger hojas siempre de la misma orientación y posición, y si es posible coger al menos 3 réplicas.
- Las muestras deben etiquetarse correctamente y en caso necesario conservarlas en las condiciones adecuadas para su traslado al laboratorio.



3.3 Preparación de muestras

Las muestras de suelo y plantas que se necesiten frescas deben guardarse adecuadamente en cámara fría (a 4 °C) o en congelador (a -20 o -80 °C) según sea necesario.

Las muestras de suelo que no requieren conservación en fresco se extienden y se secan al aire en el laboratorio (alternativamente, se pueden secar en un horno de aire forzado, a menos de 30 °C).



A continuación, las muestras de suelo se tamizan (malla 2 mm) y se pesa la fracción mayor de 2 mm. La fracción menor de 2 mm (fracción tierra fina) se homogeniza y se guarda una alícuota de 500 g para su posterior análisis. Los elementos gruesos son los mayores de 2 mm (gravilla: 0.2 a 0.6 cm; grava: 0.6 a 6 cm; cantos: 6 a 25 cm y bloques: 25 a 60 cm y mayores) y la tierra fina son los menores de 2 mm (arcilla: menores de 2 μ m; limo: 2 a 50 μ m y arena: 50 μ m a 2mm). En el laboratorio la textura del suelo se mide realizando un análisis granulométrico de la fracción menor de 2mm.



Las muestras de vegetación que no requieren conservación en fresco se lavan y se secan, mejor en horno de aire forzado (entre 30 y 60 °C) para evitar que se estropeen. A continuación, se trituran o muelen y se guardan bien etiquetadas en un lugar fresco y seco para su posterior análisis.

3.4 Propiedades físicas y físico-químicas del suelo

El proyecto PhytoSUDOE estableció un paquete básico de indicadores físico y físico-químicos para obtener una base de datos armonizada que permitiera comparar los resultados en los distintos emplazamientos fitogestionados en el territorio Interreg SUDOE a lo largo del tiempo. Para ello se utilizaron métodos estándar (AFNOR/DIN/ISO/UNE) y procedimientos recomendados en el proyecto GREENLAND (KBBE.2010.3.5-01, Gentle remediation of trace element contaminated land. UE, 2015), incluyendo: textura, estructura, densidad aparente, capacidad de retención de agua, pH, salinidad, C orgánico e inorgánico, contenido total de N, P disponible, CIC, cationes de cambio, contenido total y biodisponible de elementos traza (Tabla 3).

3.4.1 Textura

El suelo está formado por partículas de distintos tamaños, cuyos límites pueden variar en función del sistema utilizado. Generalmente, se distingue la fracción gruesa del suelo (>2 mm) de la fracción fracción tierra fina (partículas < 2 mm). La primera forma el esqueleto del suelo e incluye gravilla (0.2 a 0.6 cm), grava (0.6 a 6 cm), cantos (6 a 25 cm) y bloques (25 a 60 cm y mayores). La fracción tierra fina incluye arcilla (< 2 μ m); limo (2 a 50 μ m) y arena (50 μ a 2 mm). La textura se refiere a la distribución de partículas minerales de diferentes tamaños (arena, limo y arcilla) en la fracción tierra fina y es uno de los atributos más estables del suelo, difícilmente modificable. La organización de partículas primarias en agregados permite el desarrollo de la estructura del suelo que define el espacio poroso del suelo.

Información que proporciona

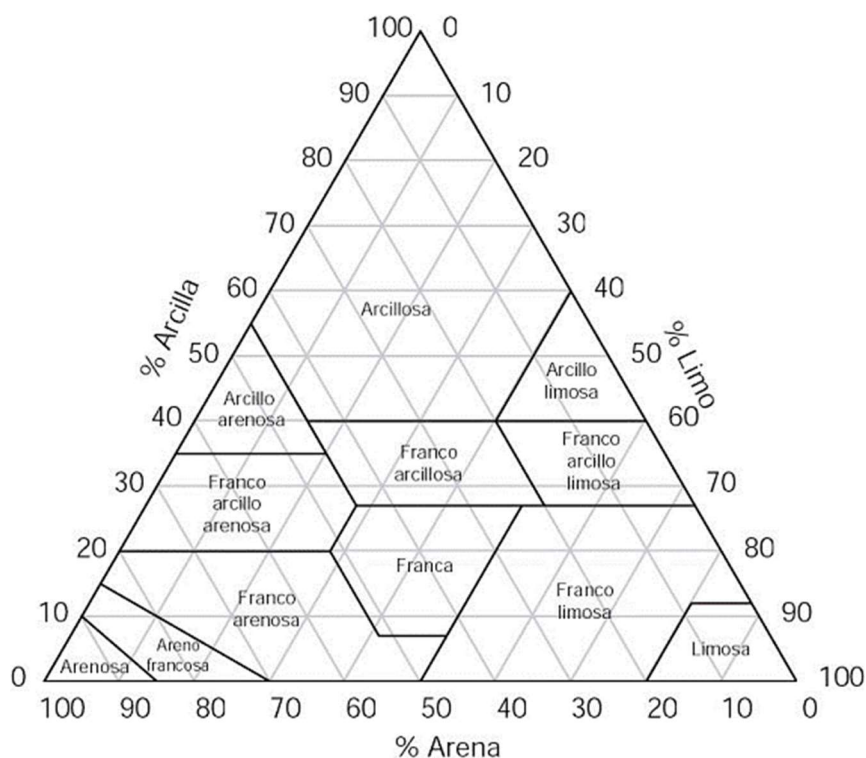
La textura del suelo afecta al comportamiento frente al laboreo, a la capacidad de retención de agua disponible para las plantas, a la erosionabilidad, al rendimiento de los cultivos y a la disponibilidad de nutrientes (baja en horizontes arenosos). En horizontes muy arcillosos existe riesgo de compactación, que supone dificultad para el desarrollo de las raíces.

Procedimiento

- 1 Pesar 20 gramos de suelo previamente secado al aire y tamizado a 2 mm.
- 2 Eliminación de la materia orgánica: Añadir 20 ml de agua destilada y se va añadiendo peróxido de hidrogeno poco a poco, primero en frío y después calentando (a menos de 60 °C), hasta eliminar por completo la materia orgánica (hasta que deje que formar espuma). Añadir unos 150 ml de agua destilada.
- 3 Dispersión: Trasvasar a una botella de 1 L, añadir agua hasta la mitad y añadir 10 ml de dispersante CALGÓN (35,7 gr de hexametáfosfato sódico + 7,94 gr de carbonato sódico/ 1000 ml), tapar y agitar en agitador rotatorio durante 16 h.
- 4 Sedimentación: Pasar la suspensión por un tamiz de 50 μ recogiendo las aguas de lavado, lavar cuidadosamente con la menor cantidad de agua posible. Recoger las partículas que quedan en el tamiz y secar a 105 °C, dejar enfriar y pesar, obteniéndose así la fracción *arena*. Pasar las aguas de lavado a una probeta de un litro, enrasar con agua destilada y agitar con una varilla "ad hoc" para uniformizar. A partir del momento en que cesa la agitación, se deja reposar durante menos de 30 seg y se toman 20 ml de muestra, con una pipeta Robinson introducida 10 cm en la suspensión. El contenido de la pipeta y el agua de lavado de ésta se introducen en una cápsula tarada y se seca a

105 °C. Después de enfriar, se pesa, obteniendo así la fracción *arcilla + limo*. A las 8 h de agitación se toma otra muestra con la pipeta Robinson usando el mismo procedimiento. Después de evaporar a sequedad se pesa, obteniéndose la fracción *arcilla*.

Los resultados se expresan en porcentaje. Con ayuda de un triángulo de texturas, como el presentado a continuación, se determina la clase textural.



La textura de un suelo puede estimarse también en campo a través de pruebas simples y sintiendo los constituyentes del suelo (descripción del comportamiento de una muestra en la mano), aunque la determinación en laboratorio da un resultado más preciso.

Además, del método de laboratorio aquí descrito (método de la pipeta), para la determinación de clase textural hay otros métodos (ej. método del densímetro o análisis mecánico, en el que se usan una serie de tamices con mallas de diversos tamaños).

3.4.2 Estructura

La estructura hace referencia a la organización de las partículas individuales de un horizonte de un suelo en unidades estructurales compuestas o agregados, relativamente estables (Porta et al. 2013).

La estructura del suelo se describe en términos de grado, tipo y tamaño de los agregados siguiendo una observación sistemática. La descripción se realizará *in situ* con el suelo seco o ligeramente húmedo, tomando un terrón de suelo grande, de varias partes del horizonte.

Cuando un horizonte contenga agregados de más de un grado, tipo o tamaño, los diferentes tipos de agregados se deben describir por separado e indicar sus relaciones.

Información que proporciona

A diferencia de la textura, la estructura es una propiedad dinámica, muy sensible a las prácticas de manejo del suelo, lo que significa que puede cambiar a corto plazo, en función de la actividad biológica y de las prácticas de cultivo. El mantenimiento de una buena estructura incide positivamente en el comportamiento y las funciones del suelo. La estructura condiciona: las relaciones suelo-agua, la aireación, la resistencia mecánica, las relaciones suelo-planta, el riesgo de erosión y las relaciones suelo-organismos vivos. En el caso de suelos de regadío, es muy importante que estén bien estructurados y tengan una tasa de infiltración elevada, para evitar que se forme una costra superficial. Con ello disminuye el agua de escorrentía superficial y el riesgo de erosión, al tiempo que aumenta el agua disponible para las plantas, así como que pueda haber un excedente de agua que drene y evite la acumulación de sales en el suelo.

Tipos de estructura del suelo		
Granular y migajosa	Partículas individuales de arena, limo y arcilla agrupadas en granos pequeños casi esféricos.	
En bloques o bloques subangulares	Las partículas de suelo se agrupan en bloques casi cuadrados o angulares con los bordes más o menos pronunciados.	
Prismáticas y columnares	Las partículas de suelo han formado columnas o pilares verticales separados por fisuras verticales diminutas, pero definidas.	
Laminar	Se compone de partículas de suelo agrupadas en láminas o capas finas que se acumulan horizontalmente una sobre otra.	

3.4.3 Capacidad de retención hídrica

La capacidad de retención hídrica se usa para determinar la cantidad máxima de agua que queda retenida en el suelo bajo presión atmosférica (humedad máxima del suelo).

Procedimiento

- 1 - Se coloca en el fondo de un recipiente con orificios en su base una malla de nylon (para evitar la pérdida de suelo) y se pesan unos 150 g de suelo seco.
- 2 - El recipiente se coloca en una bandeja y se añade agua destilada en ella para que el suelo se sature desde su base por capilaridad.
- 3 - Una vez saturado el suelo, transcurridas unas horas, se tapa la superficie con un vidrio de reloj o similar (para evitar el secado superficial) y se deja drenar durante aproximadamente 12 horas.
- 4 - Se pesa y se determina la humedad retenida por diferencia de pesadas.

Donde:

- P1: peso del recipiente + malla sin el suelo.
- P2: peso del recipiente + malla + suelo antes de saturación.
- P3: peso del conjunto tras su drenaje.

La retención de agua del suelo es una propiedad básica, necesaria para el estudio del agua disponible para la planta, infiltración, drenaje, estrés hídrico sobre las plantas y movimiento de solutos.

En general, cuanto mayor es el tamaño de las partículas menor es el agua retenida por los suelos (los suelos arenosos son más permeables y retienen menos agua que los arcillosos) y cuanto mayor es el contenido en materia orgánica más aumenta el agua retenida por el suelo.

3.4.4 Densidad aparente

La densidad aparente es la relación entre una masa de suelo seca y el volumen total que ocupa la muestra inalterada. Este volumen incluye tanto sólidos como el espacio poroso, por lo que la densidad aparente refleja la porosidad total del suelo. La densidad es una medida indirecta de la estructura y el grado de compactación del suelo.

Información que proporciona

La densidad aparente es un parámetro importante para la descripción de la calidad del suelo y la función del ecosistema. Valores de densidad aparente altos indican un ambiente pobre para el crecimiento de raíces, aireación reducida, y cambios indeseables en la función hidrológica, como la reducción de la infiltración del agua. Valores de densidad aparente bajos (generalmente por debajo de $1,3 \text{ kg dm}^{-3}$) indican generalmente una condición porosa del suelo.

Procedimiento

- 1 - En el campo se coge un volumen conocido de suelo, con un cilindro metálico de dimensiones (y por consiguiente volumen) conocidas y, se tapan los dos lados del cilindro para evitar pérdida de la muestra.
- 2 - En el laboratorio se seca la muestra de suelo del interior del cilindro a $105 \text{ }^\circ\text{C}$.
- 3 - Se determina la masa seca de suelo.
- 4 - Se expresa el resultado en kg m^{-3} de suelo.



El valor de la densidad aparente se puede utilizar como un indicador de la compactación, si bien no se han establecido valores umbral que faciliten la interpretación de los resultados.

3.4.5 pH

Propiedad que hace referencia al grado de acidez o alcalinidad de un suelo. Afecta a la movilidad y disponibilidad de elementos traza y nutrientes, así como a la actividad biológica y la alteración mineral.

Información que proporciona

El pH afecta a numerosos procesos y reacciones químicas y es una medida relativamente fácil de analizar. El pH es un buen indicador de: la presencia o ausencia de determinados constituyentes (en especial de carbonato cálcico que es inestable a pH ácidos), los cationes que previsiblemente habrá en el complejo de cambio (ausencia de aluminio biodisponible a pH superiores a 5,5), la disponibilidad de nutrientes para las plantas, la movilidad de elementos contaminantes, la actividad biológica del suelo, la conveniencia de actuar para corregir una acidez excesiva y de otras funciones potenciales del suelo.

Procedimiento

- 1 - Pesar 10 gramos de suelo previamente secado al aire y tamizado a 2 mm.
- 2 - Añadir 25 ml de agua destilada y agitar unos segundos.
- 3 - Dejar la suspensión suelo-agua 10 minutos en reposo.
- 4 - Medir el pH de la suspensión con un electrodo combinado de pH.



Resulta útil medir también el pH en KCl 1 M. Esta medida se realiza del mismo modo que la medida de pH en agua, pero en este caso en lugar de añadir 25 ml de agua se añaden 25 ml de una disolución 1 M de KCl, se agita y se espera 2 horas antes de medir el pH con el electrodo (agitando cada 15 minutos). El pH en KCl es un buen indicador de la acidez intercambiable o acidez potencial.

3.4.6 Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica (CE) es una medida de la propiedad que poseen las disoluciones acuosas para conducir la corriente eléctrica, que depende de la presencia de iones, su concentración, movilidad y valencia, así como de la temperatura de medición. Es un indicador de la concentración iónica total que posee una disolución.

Información que proporciona

La medida de CE de un suelo informa sobre la cantidad de cationes y aniones (sales) en disolución y, por tanto, es un buen indicador de su salinidad. Todos los suelos contienen de sales, muchas de las cuales son esenciales para el crecimiento de las plantas. Sin embargo, un exceso de sales inhibe el crecimiento de las plantas al afectar el equilibrio suelo-agua-raíz. Un exceso de sales puede derivar de procesos naturales o bien del manejo inapropiado del suelo. Cuanto mayor es la cantidad de sales, mayor es la lectura de la conductividad eléctrica.

Procedimiento

La conductividad eléctrica del suelo se mide en un extracto acuoso de suelo, utilizando una relación suelo:agua de 1:5 (p:v).

- 1 - Pesar 20 gramos de suelo previamente secado a 105 °C y tamizado a 2mm.
- 2 - Añadir 100 ml de agua destilada.
- 3 - Agitar durante 2 horas.
- 4 - Centrifugar y filtrar el extracto obtenido.
- 5 - Medir la conductividad eléctrica del extracto acuoso usando un conductímetro.

Valores de referencia de CE (extracto acuoso 1:5, p:v)		
CE en dS m ⁻¹	Salinidad	Influencia en los cultivos
0 – 2	No salino	Despreciable para la mayoría de los cultivos.
2 – 4	Ligeramente salino	Disminuye el rendimiento de los cultivos muy sensibles
4 – 8	Moderadamente salinos	Disminuye el rendimiento de la mayoría de los cultivos.
8 – 16	Fuertemente salinos	Sólo los cultivos tolerantes dan rendimiento satisfactorio.
> 16	Muy fuertemente salinos	Sólo algunos cultivos muy tolerantes dan rendimiento satisfactorio.

La unidad de medida de la CE en el Sistema Internacional (SI) es el Siemens (S) por unidad de longitud, a 25 °C. Con los suelos generalmente se usan decisiemens por metro (dSm⁻¹) y se refiere a 25 °C.

3.4.7 Contenido total de C y N

Medida del carbono (C_T) y nitrógeno (N_T) totales presentes en una muestra de suelo.

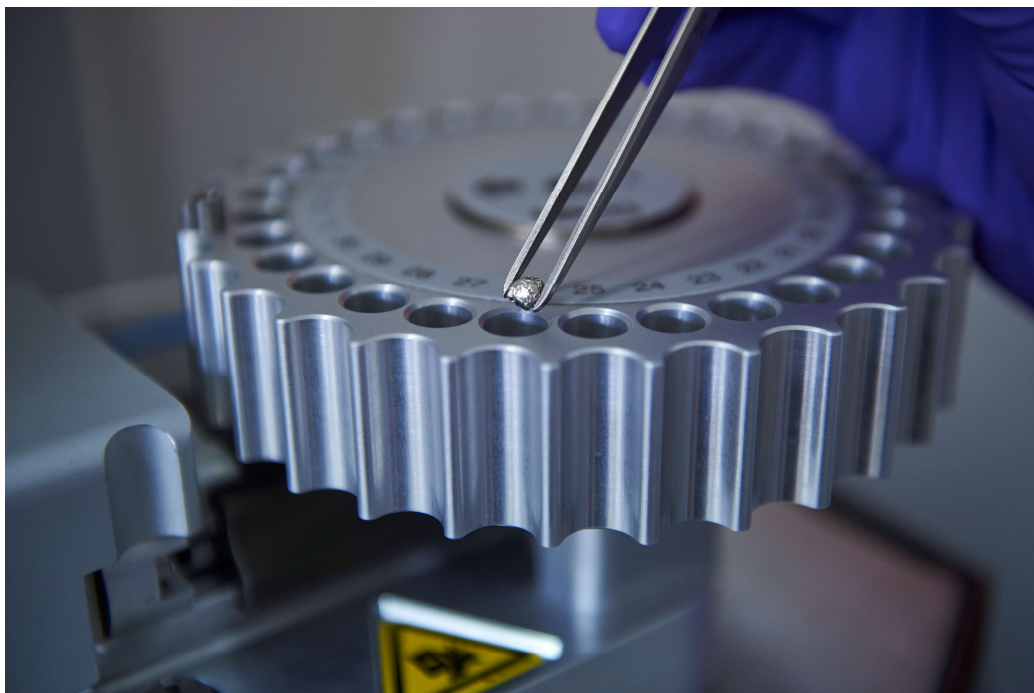
Información que proporciona

El C total del suelo incluye tanto la materia orgánica del suelo como el carbono inorgánico, en forma de carbonatos (un suelo con pH entre 7,5 y 8,5 indica presencia de carbonatos). En los suelos sin carbonatos, el C_T puede considerarse equivalente al C orgánico. El N_T se corresponde con la suma del contenido de N de nitratos, nitritos, nitrógeno orgánico y nitrógeno amoniacal.

La relación C/N es el resultado del cociente entre el C orgánico total y el N_T del suelo, y nos da una idea de la tasa de mineralización de la materia orgánica del suelo (MOS).

Procedimiento

- 1 – Se pesa 100 mg de suelo seco y molido en una capsula de estaño.
- 2 – La cantidad de C_T y N_T se obtiene por combustión en un analizador elemental.



La relación C/N es un indicador de la tasa de N disponible para las plantas y puede usarse como indicador de la calidad de la materia orgánica del suelo (MOS).

Valores altos de la relación C/N ($C/N >25-30$) indican MOS descompuesta. En suelos de cultivo, la MOS se estabiliza en valores C/N de 10 a 14.

3.4.8 Capacidad de intercambio catiónico

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) expresa la concentración máxima de cationes intercambiables que pueden ser desplazados de los grupos funcionales existentes en las superficies de las partículas coloidales (del suelo en su conjunto, de los minerales de la arcilla, de componentes orgánicos o de otro cambiador) por cationes de una fase líquida desplazante a un pH determinado. el término *complejo de cambio* hace referencia al conjunto de componentes coloidales del suelo (minerales arcilla y componentes húmicos, principalmente) que, debido a su carga eléctrica de superficie, pueden adsorber cationes en forma intercambiable.

La capacidad de intercambio catiónico efectiva (CICE) expresa la concentración máxima de cationes intercambiables que pueden ser desplazados del complejo de cambio al pH del suelo. La CIC y la CICE se expresan en cmolc kg^{-1} de suelo seco (equivalente a $\text{meq } 100 \text{ g}^{-1}$ de suelo seco).

Información que proporciona

La CIC es un buen indicador del estado del complejo de cambio, lo que aporta información acerca de: (1) la fertilidad del suelo y la nutrición de las plantas, (2) la acidez potencial y la necesidad de aportar una enmienda caliza, (3) la actividad biológica, (4) el grado de desarrollo del suelo, entre otros aspectos. La CICE será el valor real de la CIC en condiciones de campo.

Procedimiento 1

- 1 - Pesar 1 gramo de suelo previamente secado al aire y tamizado a 2mm.
- 2 - Añadir 20 ml de $\text{Co (NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 0,05 M (disolución desplazante)
- 3 - Agitar durante 2 h
- 4 - Centrifugar y filtrar el extracto
- 5 - Medir la concentración de Co en el extracto usando AAS o ICP-OES
- 6 - La CICE se calcula mediante la diferencia entre la cantidad de Co añadida y la cantidad que queda en la solución tras la extracción.

Procedimiento 2

- 1 - Pesar 2,5 gramos de suelo previamente secado al aire y tamizado a 2 mm.
- 2 - Añadir 12.5 ml de NH_4Cl 1M (disolución desplazante) y dejar en reposo toda la noche (16 horas).
- 3 - Retirar la disolución desplazante, filtrar y reservar.
- 4 - Añadir 18,5 de NH_4Cl 1 M sobre el mismo suelo. Retirar el extracto, filtrarlo (sobre el mismo filtro) y reservar con el extracto anterior.
- 5 - Repetir el paso 4.

- 6 - Una vez obtenido todo el extracto medir los cationes básicos intercambiables (Ca_2^+ , Mg_2^+ , Na^+ y K^+) usando AAS o ICP-OES.
- 7 - Determinar los cationes ácidos intercambiables (H^+ y Al_3^+) utilizando una disolución de KCl 1 M no tamponada (valoración ácido-base).
- 8 - LA CICE se calcula mediante la suma de los cationes intercambiables:

$$\text{CICE (cmolc kg}^{-1}\text{)} = [\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} + \text{K}^+ + \text{Na}^+] + [\text{H}^+ + \text{Al}^{3+}]$$



Dado que la CIC viene condicionada por diversos factores que varían según la clase de suelo, no resulta posible establecer ni una única definición para la misma, ni un único método de análisis con validez general para determinar la CIC y los cationes intercambiables.

3.4.9 Fósforo disponible (método Olsen)

El fósforo (P) es uno de los macronutrientes esenciales para las plantas. Junto con el nitrógeno (N) y el potasio (K), el fósforo (P) es necesario en cantidades relativamente grandes para el crecimiento saludable de las plantas. Juega un papel crucial en varios procesos biológicos y es fundamental para el metabolismo energético de las plantas.

Información que proporciona

El fósforo disponible (o asimilable) en el suelo se refiere a la fracción de fósforo disponible para ser absorbida y utilizada por las plantas. Esta fracción incluye el fósforo presente en formas solubles y fácilmente intercambiables en el suelo. Existen varios métodos para la determinación del fósforo disponible en el suelo, uno de los más utilizados es el método Olsen (Olsen and Sommers, 1982).

Procedimiento

- 1 - Preparación de la disolución de extracción: Se prepara una disolución de NaHCO_3 0.5 M a pH 8,5.
- 2 - Extracción de fósforo: Se prepara una suspensión con una muestra representativa del suelo y se la disolución de extracción (relación 1:20, p:v). Se agita durante 30 minutos. Se centrifuga y filtra el extracto.
- 3 - Análisis de fósforo: El extracto obtenido se hace reaccionar con una disolución de molibdato amónico/ácido ascórbico para formar un compuesto coloreado y el fósforo de la disolución de extracción se determina mediante método espectrofotométrico. La intensidad del color que se produce en los extractos es proporcional a la concentración de fósforo de la disolución, lo que permite cuantificar el contenido de fósforo disponible.



3.5 Concentración de elementos traza y contaminantes orgánicos

La contaminación de un suelo se produce cuando, como consecuencia de actividades humanas, hay un incremento de la concentración de una o varias sustancias potencialmente tóxicas, ya sean minerales (metales pesados y sus compuestos, materiales radioactivos, asbestos, etc.) u orgánicas (productos xenobióticos, fitosanitarios, dioxinas, hidrocarburos, plásticos, aceites, alquitrán, etc.). La fuente de contaminación puede proceder de residuos industriales, de productos agrícolas o de petróleo, fangos, cenizas industriales, entre otros. Los efectos que tienen sobre la degradación de un suelo dependen de la naturaleza de los contaminantes y de si pueden interferir en los procesos químicos y biológicos normales del suelo, con riesgo de que los elementos contaminantes pasen al sistema acuoso, a la cadena trófica, o haya riesgos por contacto directo con los suelos que lo contengan (Porta et al., 2013). Las propiedades fisicoquímicas del contaminante, las características del suelo, las condiciones climáticas y las prácticas de cultivo determinan el destino del contaminante y sus posibilidades de sufrir procesos de transporte (volatilización, lixiviación, escorrentía, difusión, absorción radicular,...), retención (adsorción, precipitación, absorción, oclusión) o transformación (degradación biótica o abiótica, pudiendo degradarse o dar lugar a productos más peligrosos).

Cuando las sustancias peligrosas o potencialmente tóxicas alcanzan el umbral de toxicidad, pueden tener efectos adversos sobre los organismos del suelo y las plantas y, en consecuencia, sobre la calidad y funcionamiento del suelo. Muchos ET y compuestos orgánicos no degradables son especialmente peligrosos por su tendencia a acumularse en los organismos vivos, proceso conocido como bioacumulación.

La biodisponibilidad es un concepto ampliamente aceptado pero difícil de cuantificar, por lo que han proliferado un gran número de métodos, siendo muy escaso el nivel de estandarización. Se acepta que se puede evaluar por métodos químicos (p.ej., métodos de extracción), que determinan una fracción disponible operacionalmente definida, y/o por métodos biológicos, por exposición de los organismos al suelo o a sus lixiviados. La introducción de métodos estándar viables (internacionales) para la medida de movilidad/biodisponibilidad es la base para obtener resultados comparativos. El proyecto Phy2SUDOE armonizó un protocolo para evaluar el efecto inducido por las prácticas de fitogestión en los suelos contaminados tratados. Este protocolo incluye el análisis del contenido total de los ET y de formas asociadas a distintos componentes edáficos: desde formas solubles, fácilmente lixiviables y rápidamente disponibles para plantas y microorganismos, hasta formas muy estables.

Los emplazamientos estudiados en el proyecto Phy2SUDOE están afectados por la presencia de elementos traza (ET) o contaminantes orgánicos y, en algunos casos, por contaminación múltiple (ET y contaminantes orgánicos). A continuación, se resumen los protocolos para la evaluación de estos compuestos.

3.5.1 Determinación del contenido de elementos traza (ET).

Se denomina **elementos traza (ET)** a un conjunto de metales pesados y metaloides de elevada masa atómica ($>5 \text{ g cm}^{-3}$) como Pb, Cd, Cu, Hg, Sn y Zn, que aparecen, generalmente, en baja concentración en el suelo y pueden provocar toxicidad. Junto a ellos también se consideran otros no-metales como arsénico (As), antimonio (Sb) y selenio (Se). Algunos de ellos son micronutrientes esenciales para plantas, animales y humanos, pero son tóxicos a elevadas concentraciones. Entre ellos, Zn, Ni, Co y Cu son relativamente más tóxicos para plantas y As, Cd, Pb, Cr y Hg lo son para animales. Por su carácter no biodegradable y acumulable en los organismos vivos, los ET son contaminantes muy persistentes, por su naturaleza no biodegradable y acumulable en los organismos vivos.

Debemos tener en cuenta que la meteorización de los minerales del material original del suelo libera elementos metálicos que pasan a formar parte del suelo en contenidos traza y estos contenidos de fondo no deben ser interpretados como una contaminación. Por lo general los suelos, de forma natural, contienen ET en concentraciones bajas, aunque en ocasiones pueden encontrarse suelos con elevadas concentraciones de ET, como es el caso de suelos desarrollados a partir de rocas serpentínicas, ricos sobre todo en Cr, Ni, Cu y Mn.

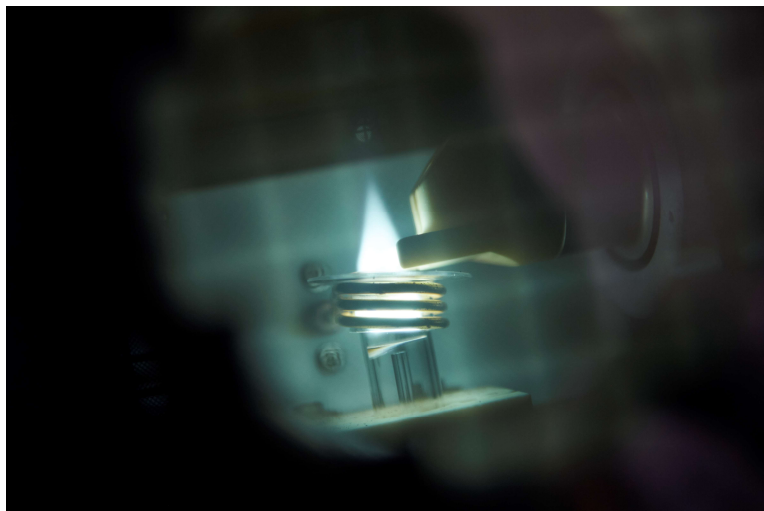
Determinación del contenido pseudo-total de ET

1 - Se realiza una extracción de una cantidad conocida de suelo seco y molido en medio ácido ($\text{HNO}_3:\text{HCl}$ concentrado, en relación 3: 1) en bombas de PFA de alta presión en horno microondas (ETHOS PLUS Milestone ATC-400) según el método EPA 3051A.



2 - El extracto obtenido se filtra y se enrasa a un volumen conocido.

3 – Se miden las concentraciones de los ET de interés en un ICP-OES (o en el equipo disponible: AAS, ICP-MS, ...).



Determinación del contenido biodisponible de ET

Los contaminantes se encuentran en el suelo en distintas formas, con distintos grados de labilidad y disponibilidad para los organismos vivos (biodisponibilidad), que se encuentran en un equilibrio dinámico. En general, los efectos biológicos de los contaminantes no están relacionados con su concentración total, sino con las fracciones móviles/biodisponibles a los distintos organismos. Por ello, la biodisponibilidad es el factor clave a tener en cuenta en las evaluaciones de riesgo y rehabilitación de las funciones edáficas.

Con el fin de realizar un seguimiento de la biodisponibilidad de los ET del suelo se realiza un análisis de la disolución del suelo (o extractos en agua) y extracciones simples no exhaustivas.

Las extracciones realizadas fueron:

- Extracción en agua: Relación suelo:agua 1:5 y agitación durante 2 horas.
- Extracción en NH_4NO_3 1 M: Relación suelo:agua 1:2,5 y agitación durante 2 horas.
- Extracción en NH_4Cl 1 M: Relación suelo:agua 1:20 y contacto suelo:extractante durante toda la noche (puede usarse el extracto obtenido mediante el procedimiento 2 de CIC).
- Extracción en EDTA 0,05 M: Relación suelo:agua 1:10 y agitación durante 2 horas.

Todos los extractos se centrifugan y filtran, y se mide la concentración de los elementos de interés en ICP-OES.

La elevada biodisponibilidad de algunos ET generaba fitotoxicidad en diversos emplazamientos de la red phy2SUDOE, especialmente en los suelos derivados de actividades mineras. Para mejorar las condiciones edáficas y la eficiencia de las fitotecnologías, se utilizaron distintas prácticas agronómicas, como la aplicación de fertilizantes y enmiendas orgánicas, el intercalado de plantas leguminosas con los cultivos de interés y la inoculación de las plantas.

3.5.2 Determinación del contenido de contaminantes orgánicos

Los contaminantes orgánicos son aquellos que tienen enlaces C-H. Su peso molecular y su polaridad determinan el comportamiento de estos compuestos en el suelo y las posibilidades de su eliminación. Mientras los compuestos de bajo peso molecular presentan mayor riesgo de volatilización, los de alto peso molecular son mucho más recalcitrantes y perduran durante más tiempo en el suelo. Los compuestos más polares son más solubles en medio acuoso y, por tanto, presentan mayor riesgo de transferencia a la disolución del suelo y de lixiviación y, por tanto, riesgo de contaminación de aguas subterráneas. Los compuestos con alto peso molecular y carácter no polar constituyen los contaminantes orgánicos más persistentes en el suelo, entre ellos están los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), que son productos cancerígenos y de elevada persistencia.

Para cuantificar el contenido total de contaminantes orgánicos se realiza una extracción de los suelos en un disolvente orgánico adecuado (hexano, hexano:acetona, entre otros); esta extracción puede realizarse utilizando diversos métodos de extracción: Extracción líquido-sólido, extracción asistida por microondas, extracción soxhlet para sólidos, extracción mediante sonicación (EPA 3550B), extracción con fluidos supercríticos (EPA 3560) o extracción acelerada con disolventes (Method 3545A) (usando un equipo ASE®).



El análisis se realiza habitualmente en un cromatógrafo de gases con detector de masas, aunque en muchos casos existe la posibilidad de usar otro tipo de detector o realizar el análisis con un HPLC.



Determinación del contenido de contaminantes orgánicos biodisponibles

Los contaminantes se encuentran en el suelo en distintas formas con distintos grados de labilidad y disponibilidad para ser usados los organismos vivos (biodisponibilidad), que se encuentran en un equilibrio dinámico. En general, los efectos biológicos de los contaminantes no están relacionados con su concentración total, sino con las fracciones móviles/biodisponibles para los distintos organismos. Por ello, la biodisponibilidad es el factor clave a tener en cuenta en las evaluaciones de riesgo y rehabilitación de las funciones edáficas.

Para la evaluación de la biodisponibilidad de contaminantes orgánicos persistentes es común realizar simulaciones de lixiviabilidad en agua de los contaminantes o extracciones con agua o diferentes solventes polares con un extractor ASE[®] (extracción acelerada con disolventes) o usando alguna resina hidrofóbica (como puede ser la amberlita XAD-2).

Existen multitud de métodos de evaluación de la biodisponibilidad de contaminantes orgánicos, dependiendo de su naturaleza, del tipo de suelo, del organismo diana que queramos evaluar, etc.

3.6 Propiedades biológicas y bioquímicas del suelo

Los organismos del suelo juegan un papel importante en descomponer la materia orgánica, reciclar nutrientes, generar humus, estructurar el suelo, fijar nitrógeno, promover el crecimiento de las plantas y controlar plagas y enfermedades.

La actividad biológica (organismos vivos y las transformaciones en las que intervienen) es muy importante en el suelo y varía de unos suelos a otros según las condiciones del medio. Los organismos edáficos intervienen de forma directa e indirecta en muchos de los procesos y en las funciones del suelo. La actividad biológica en el suelo viene controlada por: (1) factores abióticos (estructura, compactación, reacción, régimen de humedad y de temperatura, contenido de oxígeno, contenido de nutrientes, salinidad, etc.) y (2) factores bióticos (componentes vivos que afectan a los organismos del suelo: la vegetación y la interacción entre los propios organismos del suelo). Esos factores determinan la biodiversidad de cada suelo. También se ve afectada por la intervención humana.

Forman parte de los organismos vivos del suelo, por orden de abundancia: bacterias, hongos, microalgas, fauna y la parte subterránea de las plantas. Todos ellos interactúan en el suelo y participan en transferencias mutuas de energía y de masa.

La determinación de los parámetros biológicos y bioquímicos del suelo es muy importante, ya que son esenciales para que el suelo realice sus funciones de manera correcta (Burns 1982, Dick y Tabatabai 1993), por lo que su medida dará idea de la actividad metabólica del suelo y servirá de ayuda para entender la funcionalidad del mismo. En el suelo, la actividad metabólica es la responsable de procesos tan importantes como los de mineralización y humificación de la materia orgánica, los cuales incidirán a su vez en otra serie de procesos donde intervienen algunos elementos fundamentales (C, N, P y S), así como todas las transformaciones en las que intervienen los microorganismos del suelo. La determinación de los parámetros bioquímicos puede ser útil en estudios que se lleven a cabo sobre suelos naturales, donde los procesos microbianos, claves para su conservación, pueden monitorizarse a través de parámetros que reflejen la actividad metabólica de dichos suelos (García y Hernández 2000, Trasar Cepeda et al. 2000). Dichos parámetros también pueden resultar apropiados para estudios relativos a sistemas agrícolas, tanto los de tipo tradicional como aquellos en los que impera un manejo ecológico y sostenible del suelo (Canet et al. 2000). Además, la actividad metabólica que presente un suelo se verá afectada por problemas de contaminación, así como cuando se siga un proceso de descontaminación, pudiendo ser dicha actividad un reflejo de la posibilidad de degradación de compuestos tóxicos para el suelo y que pueden haber sido adicionados al mismo de por diferentes actividades antrópicas (Lobo et al. 2000). Por último, la incidencia que en este tipo de parámetros tiene la adición a los suelos de gran cantidad de materiales orgánicos de diverso origen (desde estiércoles hasta otros materiales orgánicos como los lodos de depuradora), con las connotaciones tan particulares de este tipo de enmiendas (aporte de microorganismos al suelo, con el consiguiente aumento de la biomasa y actividad microbiana, contenidos a veces no deseables de contaminantes como metales pesados, etc.) ha hecho que, en los últimos años, se incremente el número de estudios en los que se determinan los parámetros bioquímicos en suelos con enmiendas orgánicas.

3.6.1 Macrofauna del suelo

La macrofauna (4 – 100 mm) está representada por los anélidos oligoquetos, tales como algunas lombrices de tierra; los moluscos del grupo de los gasterópodos, como las babosas y caracoles; artrópodos, como los miriápodos: ciempiés (clase de los Quilípodos) y milpiés (clase de los Diplópodos); crustáceos; cochinillas de humedad (Isópodos); arácnidos e insectos.

En general, la **fauna** del suelo fragmenta la materia orgánica fresca, mezcla los materiales y favorece la estructuración, mientras que los microorganismos intervienen en la descomposición y evolución (degradación, transformación y neoformación) de moléculas orgánicas.

Debemos tener en cuenta la macrofauna presente en la superficie y también a nivel subterráneo (suelo). En el método utilizado en Phy2SUDOE se ha realizado la recogida de macroinvertebrados autóctonos (lombrices, babosas, caracoles) de los emplazamientos del proyecto para su evaluación y conservación.

Procedimiento

- 1 - Registrar coordenadas y fecha del muestreo.
- 2 - Etiquetar:
 - Localización
 - Especies
 - Especimen
- 3 - Tomar fotos de los ejemplares.
- 4 - Identificar los especímenes (género / especie)

Caracoles: Se pesa el organismo entero, se miden las dimensiones de la concha (anchura, altura, longitud) (figura 3) y, tras separar la concha, se pesa el tejido blando (figura 1B).

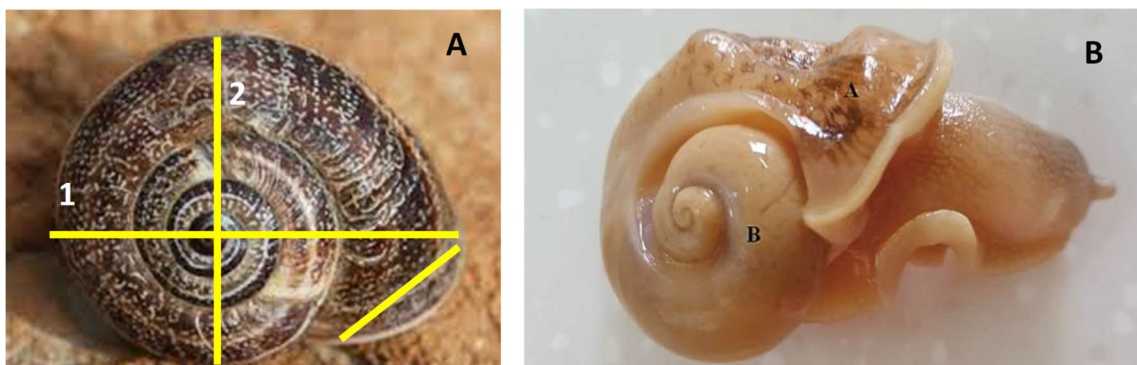


Figura 3- (A) Procedimiento para medir la concha (1-longitud, 2-altura, 3-anchura) y (B) tejidos blandos después de separar la concha.

Lo ideal es recoger 30 especímenes (en el caso de no obtener 30, guardar las proporciones):

- se colocan 10 especímenes sin la concha en fijador, para preservar la estructura celular.
- se almacenan 10 especímenes individualmente en viales a -80 °C.
- los últimos 10 especímenes se conservan a -80 °C como una única muestra.

Lombrices de tierra y otros anélidos: Medir individualmente los pesos y las longitudes máximas. Si hay clitelo, se anotará en observaciones aparte. El cuerpo de los anélidos se dividirá (siempre que sea posible) en 4 porciones para las muestras, que se utilizan para distintos tipos de análisis, tal y como se indica en la figura 4.

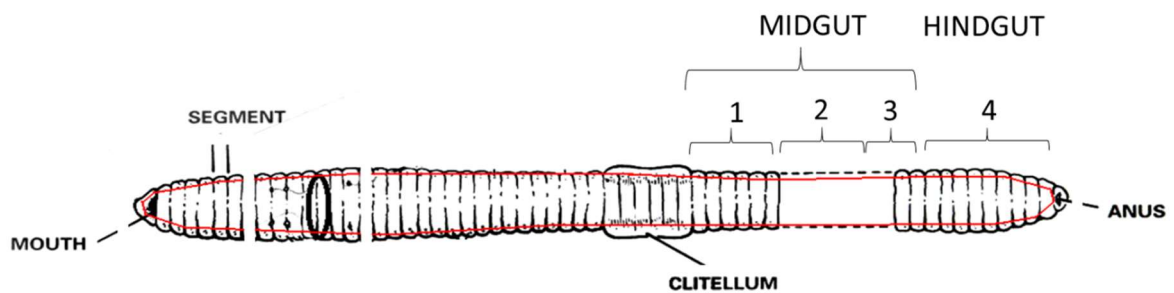
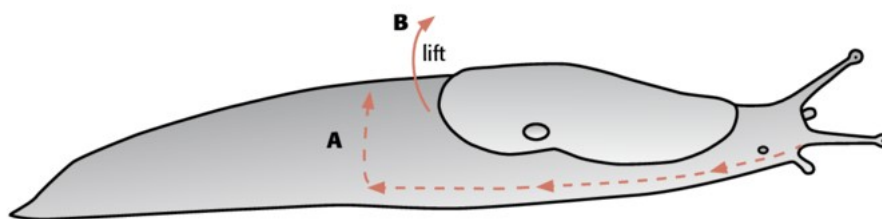


Figura 4.- Disección de lombrices y punto final de la sección. 1. Histología. 2. Bioquímica. 3. Molecular. 4. Química.

Babosas: Se pesarán individualmente y se medirán las longitudes máximas (pinchando el extremo inferior y esperando unos segundos hasta que se estire (ver figura 5). Lo ideal, si se recogen 30 ejemplares, es introducir 10 babosas abiertas (según figura 5) en un recipiente con una solución fijadora (formaldehído 4%), 10 individualmente en viales a -80 °C y el resto (10) juntas a -80 °C en tubos o bolsas *zip*. Si hay entre 15 y 30 individuos, se deben de guardar las proporciones. Si hubiera menos de 15, hay que asegurar 5 para la histología y 10 para la analítica.



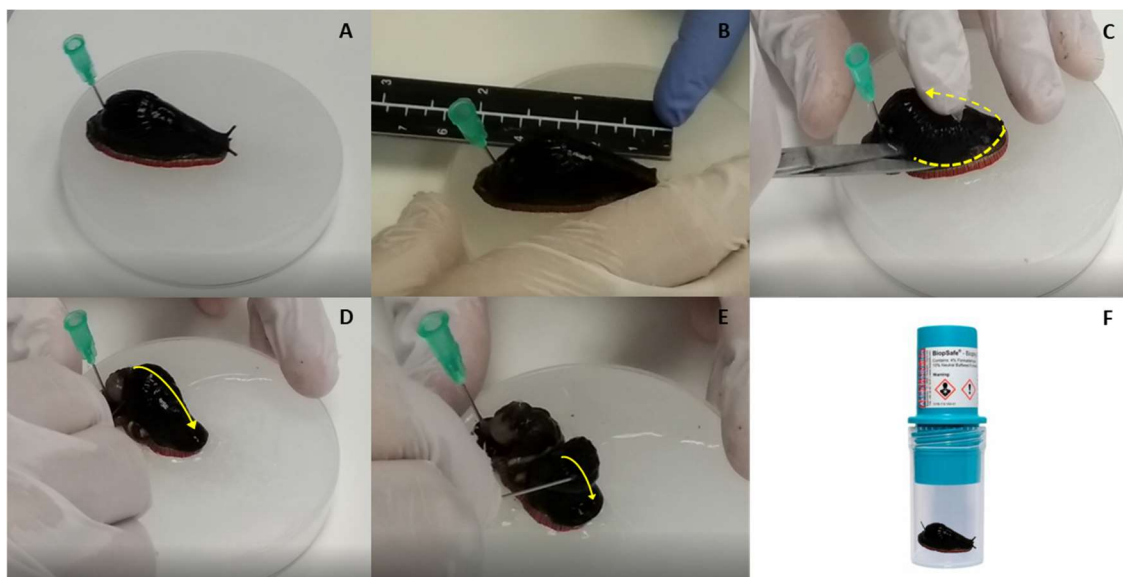


Figura 5.- Disección de la babosa. Cada letra corresponde a: (A) inmovilización desde el extremo del pie, (B) medición de la longitud máxima, (C) corte perimetral, (D-E) levantamiento de la parte dorsal y (F) fijación en un recipiente de formaldehído neutralizado Biopsafe® (20 ml) o similar.

Las muestras se procesan para diferentes estudios: histológicos (muestras fijadas para el microscopio), bioquímicos (muestras congeladas para análisis histoquímicos/bioquímicos), biología molecular (extracciones de ADN y ARN de muestras almacenadas posteriormente en ARN) y análisis químicos.

Muestras histológicas: las muestras se colocan en frascos herméticos (etiquetados) con una solución de formaldehído al 4 %. Pueden utilizarse kits comerciales de fijación con formaldehído neutralizado [Biopsafe® (20 ml) o similar]. Tras 24 h de fijación, transferir a alcohol de 70º y conservar.

Bioquímica/Biología molecular (criofijadas): las muestras se colocan en frascos etiquetados y se congelan en nitrógeno líquido para conservarlas a -80 ºC. Si no se dispone de nitrógeno líquido, se congelan a la temperatura más baja posible.

Química analítica: Las muestras se colocan en tubos o bolsas etiquetadas y se conservan a -80 ºC.

En el caso de las muestras de Phy2SUDOE procesadas para su almacenamiento, éste se ha llevado a cabo en el Banco de Bioespecímenes Ambientales del Golfo de Vizcaya (BBEBB) perteneciente a la UPV/EHU. La UPV/EHU dispone de instalaciones para almacenar los especímenes con la máxima calidad de conservación. Todas las muestras tendrán un número y una ficha con información detallada, como: fecha de muestreo, localización, descripción de la especie, tamaño, peso, etc., que se incorporará a la base de datos del banco (UPV/EHU).

Para el envío de las muestras a su destino final debe garantizarse su integridad y temperatura. Las muestras congeladas se envían en hielo seco con contenedores *ad hoc* y las muestras de histología se envían en alcohol de 70º.

Otras posibles formas de realizar una toma de muestras de macrofauna son:

A través de trampas de fosa (Pitfall): Se instalan trampas a ras de suelo y después de unos días se retiran para identificar y contar las capturas.

A nivel subterráneo: Con ayuda de una pala plana se extrae un bloque cúbico de suelo (25 cm x 25 cm, por ejemplo) y se examina, primero la superficie y después desmenuzándolo manualmente, y luego se cuentan los diferentes tipos de macrofauna presentes.

3.6.2 Respiración basal del suelo

La respiración basal del suelo es una medida de monitorización de la actividad de descomposición de la materia orgánica del suelo, que puede variar de forma natural según la disponibilidad del sustrato, humedad, temperatura, etc. La mineralización de la materia orgánica del suelo conlleva el reciclado de ciertos nutrientes ligados a la fertilidad del suelo. Un aumento de la respiración hace disminuir la cantidad de la MOS; por el contrario, condiciones de anaerobiosis favorecen la acumulación de materia orgánica poco descompuesta.

La actividad metabólica de los microorganismos del suelo se puede medir a través del CO₂ desprendido o del O₂ consumido durante el proceso de respiración.



Procedimiento

Se describe el método de determinación de actividad metabólica empleando la medida del CO₂ desprendido por una cantidad conocida de suelo, incubada bajo condiciones óptimas de temperatura (25 °C) y a la humedad del suelo en el momento del muestreo (Gutián y Carballas, 1976).

Incubación: En un recipiente de vidrio de boca ancha con cierre hermético y 25 ml de agua destilada en su fondo (para mantener las condiciones de humedad) se introduce un vaso de polipropileno con 25 g de suelo húmedo y un vial con 10 ml de NaOH 1 M, que se carbonatará en presencia del CO₂ liberado por la respiración del suelo. Los recipientes, cerrados herméticamente, se mantienen en estufa a 25 °C durante 10 días. Transcurrido ese tiempo se retiran los viales con NaOH, tapándolos inmediatamente para evitar que el NaOH se carbonate con CO₂ atmosférico no procedente de los suelos, lo que produciría errores en las determinaciones. Preparar también un blanco de la misma forma, pero sin muestra de suelo.

Determinación del CO₂ desprendido: El CO₂ desprendido por las muestras de suelo se combina con el NaOH del vial, formando carbonatos. Para determinar la cantidad de CO₂ absorbido, se valora, en cada vial, la cantidad de NaOH que no ha reaccionado. Se añade 1 ml de BaCl₂ al 20 % para precipitar los posibles carbonatos solubles que puedan interferir en la medida. La valoración del NaOH se realiza con HCl 1 M con valorador automático hasta un punto final de pH de 9,5, para minimizar la solubilización de dichos carbonatos.

El CO₂ desprendido por el suelo se calcula por diferencia entre el valor de titulación del blanco sin suelo y el de cada muestra. Los resultados se expresan como mg C-CO₂ emitido kg⁻¹ suelo seco 10 días⁻¹.

3.6.3 Actividades enzimáticas

La mineralización de la MOS es catalizada por enzimas, proteínas con actividad catalítica, producidas y liberadas al ambiente por organismos vivos que median en la mayoría de los procesos del suelo. Las enzimas más estudiadas son las oxidoreductasas (catalizan reacciones de oxidación-reducción) y las hidrolasas (catalizan reacciones de hidrólisis). La actividad de estas proteínas o **actividad enzimática** se encuentra relacionada con los principales ciclos biogeoquímicos del medio, como el ciclo del nitrógeno donde intervienen enzimas como las proteasas y la ureasa; el ciclo del fósforo, con enzimas como las fosfatasa; el ciclo del carbono, donde actúan carbohidrasas y glucosidasas; y el ciclo del azufre, mediante enzimas como la arilsulfatasa. Algunas enzimas de tipo oxidoreductasa, como la deshidrogenasa y la catalasa, se relacionan con la actividad microbiana general del suelo, ya que son enzimas intracelulares y su medida permite tener una idea global de los procesos microbianos que se producen en un suelo.





Procedimientos de determinación de las actividades enzimáticas:

Todas las actividades enzimáticas se midieron al pH óptimo, asegurándose que el pH de la mezcla de reacción (suelo-tampón-sustrato) esté a dicho pH. Todas las actividades enzimáticas se determinaron por triplicado (réplicas técnicas), por lo que los valores reportados son las medias de tres réplicas técnicas y 3-4 réplicas de cada tratamiento.

Actividad deshidrogenasa

La medida de esta actividad proporciona información sobre la actividad oxidativa global del suelo. El método empleado para la determinación de la actividad deshidrogenasa en suelos se basa en la medida del iodonitrotetrazolio formazán (INTF) formado tras la reducción del 2-*p*-iodofenil-3-*p*-nitrofenil-5-feniltetrazolio (INT), que actúa como receptor artificial de electrones, cuando el suelo es incubado con INT 0,5 % en medio tamponado (tampón TRIS-HCl 1 M pH 7,5) y en oscuridad durante 1 h a 40 °C (Camiña et al., 1998). La cantidad de INTF formado se calcula por referencia a rectas de calibración realizadas con suelo y diferentes cantidades de INTF. La actividad deshidrogenasa (DH) se expresa en $\mu\text{moles de INTF formado g}^{-1} \text{ suelo seco h}^{-1}$.

Actividad catalasa

Se considera que la actividad de esta enzima es un indicador de la actividad de los microorganismos aerobios del suelo, aunque se ha visto que algunas veces la descomposición del H_2O_2 se produce por una catálisis abiótica, causada por algunos componentes orgánicos e inorgánicos del suelo.

La medida de la actividad de esta enzima en el suelo se basa en la estimación del H_2O_2 residual tras la incubación del suelo con H_2O_2 . Posteriormente, el H_2O_2 residual se estima mediante colorimetría después de que tenga lugar una reacción enzimática en la que interviene la peroxidasa (POD) y que descompone el peróxido de hidrógeno residual, liberando oxígeno. Este oxígeno liberado oxida la 4-

aminoantipirina (4-AAP), que reaccionando con el fenol genera un complejo coloreado, que se puede medir espectrofotométricamente a 505 nm (Trasar Cepeda et al., 1999). La actividad catalasa (CAT) se expresa en mmoles de H_2O_2 consumidos g^{-1} suelo seco h^{-1} .

Actividad proteasa-caseína

El método empleado se basa en la determinación colorimétrica (utilizando el método de Folin-Ciocalteu) de los aminoácidos liberados tras la incubación del suelo a 50 °C durante 2 h, con una solución de caseína al 1 % en medio tamponado con tampón Tris-HCl 0,05 M de un pH tal que permita mantener el medio de reacción a pH 8,10 (esto dependerá de las características del suelo), óptimo de la actividad de esta enzima [Ladd y Buttler (1972), modificado por Nannipieri et al. (1979)]. La actividad proteasa-caseína (CAS) se expresa en μ moles de tirosina liberada g^{-1} suelo seco h^{-1} .

Actividad ureasa

El método utilizado para la determinación de la actividad de esta enzima se basa en la medida del amonio liberado por las muestras de suelo tras ser tratado con urea 1065,6 mM e incubado a 37 °C durante 1,5 h en medio tamponado con tampón fosfato 0,2M a un pH tal que mantenga la mezcla de reacción a pH 7,00, óptimo de esta actividad (Nannipieri et al., 1980). El amonio liberado se determina mediante electrodo selectivo de amoníaco, tras añadir KCl 2 M (para asegurarse de que el amonio se mantiene en la solución) y NaOH 1 M (para elevar el pH por encima de 11-12 y asegurarse de que todo el amonio se encuentra en forma de amoníaco). La actividad ureasa (URE) se expresa en μ moles de NH_3 liberados g^{-1} h^{-1} .

Actividad fosfomonoesterasa ácida y alcalina

Normalmente, en suelos de pH ácido predomina la fosfomonoesterasa ácida y en suelos de pH básico la fosfatasa alcalina. Dada la gran variedad de pHs de los suelos de Phy2SUDOE, en todos los casos se determinaron ambos tipos de actividad, la fosfatasa ácida a pH 6,0-6,5 (dependiendo de las muestras) y la alcalina a pH 10,0.

El método utilizado (Tabatabai y Bremner, 1969; modificado por Saá Set al. 1993), se basa en la extracción y determinación colorimétrica del *p*-nitrofenol (PN) liberado tras la incubación del suelo (30 min) a 37 °C con una solución de *p*-nitrofenil-fosfato (PNP) 16 mM en medio tamponado con tampón MUB; para asegurarse de que la mezcla de reacción suelo-tampón-sustrato está al pH deseado (6,0-6,5 o 10,0), se siguió el procedimiento descrito por Trasar-Cepeda et al. (1985). Tras la incubación, el PN liberado se extrajo con NaOH 0,2 M, después de añadir $CaCl_2$ 2 M (para prevenir la dispersión de las arcillas y evitar la extracción de la materia orgánica). La cantidad de *p*-nitrofenol liberado se estimó por referencia a rectas de calibración preparadas con suelo y diferentes cantidades de PN (Trasar-Cepeda et al. 1988). La actividad fosfomonoesterasa (MONO) se expresa en μ moles de *p*-nitrofenol (PN) liberado g^{-1} suelo seco h^{-1} .

Actividad invertasa

El método empleado se basa en la determinación cuantitativa y colorimétrica de los azúcares reductores liberados durante la incubación del suelo a 50 °C durante 3 h con una solución de sacarosa 35,06 mM en medio tamponado con tampón acetato 2 M a pH 5,5 (Schinner y von Mersi, 1990). La actividad invertasa (INV) se expresa en μ moles de glucosa liberada g^{-1} suelo seco h^{-1} .

Actividad β -glucosidasa

El método utilizado se basa en la extracción cuantitativa y determinación colorimétrica del *p*-nitrofenol liberado tras la incubación del suelo con una solución de *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (PNG) según el método de Eivazi y Tabatabai (1988), modificado siguiendo lo indicado por Saá et al. (1993) para la fosfomonoesterasa, en la que también se mide el *p*-nitrofenol liberado. El procedimiento utilizado fue el mismo que para la fosfomonoesterasa pero con las siguientes diferencias: el sustrato era PNG 25 mM, la incubación es de 1 h, la actividad se determinó a pH 6,0 y el PN liberado se extrajo con THAM-NaOH 0,1 M a pH 12,0. La actividad β -glucosidasa (GLU) se expresa en μ moles de *p*-nitrofenol (PN) liberado g^{-1} suelo seco h^{-1} .

Actividad arilsulfatasa

El método empleado se basa en la determinación colorimétrica del *p*-nitrofenol liberado tras la incubación del suelo a 37 °C durante 1 h con una solución de *p*-nitrofenil-sulfato 5 mM en medio tamponado con tampón acetato 0,5 M de pH 5,8 [Tabatabai y Bremner (1970), modificado según las indicaciones señaladas por Saá et al. (1993) para otras enzimas en las que se determina el *p*-nitrofenol liberado]. El procedimiento es igual que el utilizado para medir la fosfomonoesterasa, excepto que se utiliza un sustrato y un tampón diferentes y el tiempo de incubación es de 1 h en vez de 30 min. La actividad arilsulfatasa (ARIL) se expresa en μ moles de *p*-nitrofenol (PN) liberado g^{-1} suelo seco h^{-1} .

Todas las determinaciones se realizan por triplicado y añadiendo los blancos adecuados en cada caso.

Todas las determinaciones se realizan mediante espectrofotometría visible excepto en el caso de la proteasa-BAA y ureasa que se realizan con un electrodo selectivo de amonio.

3.6.4 Análisis de perfiles fisiológicos a nivel de comunidad microbiana

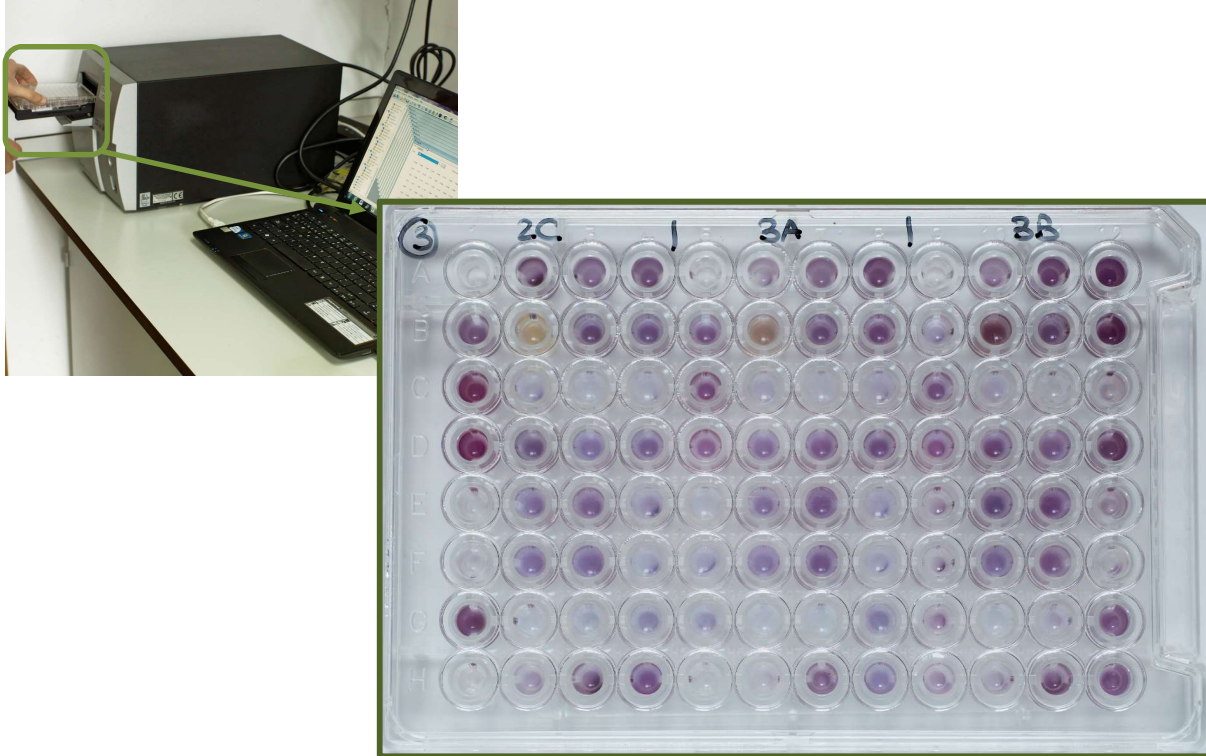
Los perfiles fisiológicos a nivel de comunidad microbiana (siglas en inglés *Microbial CLPPs*, de: *Microbial community-level physiological profiles*) se determinan utilizando Biolog EcoPlates™ (Biolog Inc., Hayward, CA) que contienen 31 fuentes de carbono diferentes, más un control de agua.

El ensayo mediante placas Biolog™ permite la estimación de la diversidad metabólico-funcional de la comunidad microbiana cultivable a partir de la evaluación de la capacidad de la misma para la utilización de distintos sustratos de carbono.

Procedimiento:

Se prepara una suspensión de suelo en una solución estéril 0,85 % de NaCl (relación suelo: extractante 1:9), se agita 1 h en un agitador orbital y, a continuación, se deja reposar durante 30 min. Posteriormente, se preparan diluciones 1:100, se inoculan alícuotas de las mismas en los pocillos de los EcoPlates y éstos se ponen a incubar en una estufa de incubación a 28 °C. El desarrollo de color se determina durante 7 días, midiendo cada 24 h la absorbancia a 590 nm en un lector de microplacas. Los valores de absorbancia obtenidos después de 120-144 h (dependiendo de la curva de desarrollo de

color) se utilizan para calcular el AWCD (siglas en inglés de *Average Well Colour Development*, o promedio de desarrollo de color en cada pocillo), el índice de riqueza microbiana (R) y el índice de diversidad Shannon (H).



Los valores AWCD se determinan según la fórmula (Garland y Mills, 1991):

$$AWCD = \Sigma(C - S)/31$$

donde S es el valor de escala del pocillo de control (sin fuente de carbono) y C es el valor de escala de la única fuente de carbono de cada una de las 31 fuentes.

Los valores R se calculan como el número de sustratos de carbono utilizados con $DO > 0,25$ (también podría considerarse un umbral de 0,15 y comparar los valores R obtenidos con los que utilizan un umbral de 0,25).

H se calcula según la fórmula:

$$H = -\Sigma p_i (\ln p_i)$$

donde p_i es el valor relativo entre el valor de absorción y la suma de todos los pocillos positivos (pocillos con absorción > 0).

3.6.5 Test de ecotoxicidad

Los test de ecotoxicidad permiten evaluar la concentración a la que se manifiestan los efectos adversos de un contaminante determinado.

Ensayos de germinación y elongación radicular para evaluar la toxicidad del suelo

La germinación de las semillas es un proceso crucial para las plantas. Este proceso puede verse afectado por numerosos tipos de estrés ambiental, incluyendo contaminantes. La elongación del hipocótilo tras la germinación es un proceso rápido y muy sensible a los contaminantes, por lo que resulta muy adecuado para estimar la fitotoxicidad de un suelo. El ensayo de elongación radicular es uno de los ensayos más útiles para estimar la fitotoxicidad de los suelos, por su sencillez, rapidez, coste y sensibilidad. Los ensayos de elongación radicular permiten la detección temprana de la toxicidad del suelo, antes de que se manifieste en el crecimiento y la salud de los cultivos utilizados en fitorremediación. Esto nos permite evaluar y ajustar las estrategias de fitorremediación y evitar mayores daños a las plantas.

Para evitar factores endógenos que causan una germinación deficiente y/o muy variable, se usa un bioensayo de elongación de raíces pregerminadas. El protocolo básico para realizar el bioensayo de elongación radicular es el siguiente:

- 1 – Por un lado, se colocan muestras de suelo seco y tamizado en placas Petri, se humedecen con agua destilada y se homogenizan.
- 2 – A continuación, se cubren los suelos con un filtro negro que absorbe los elementos en solución (contaminantes, entre otros).
- 3 - Al mismo tiempo, se germinan semillas de pepino (*Cucumis sativus* L.) en placas Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada.

Se incuban todas las placas Petri (las que contienen suelo y las que contienen semillas) en una cámara de germinación (Sanyo Environmental Plant Growth Chamber) durante 48 h. Transcurrido este tiempo, las raíces que han alcanzado los 5 mm se colocan sobre el papel de filtro en las placas que contienen suelo.

A continuación, se incuban las placas Petri que contienen suelo y semillas pre-germinadas en una cámara de crecimiento durante 72 h (Figura 4). Las placas se fotografían a tiempo 0 y después de 72. Se usa un programa informático de tratamiento de imágenes para detectar el desarrollo anormal de raíces, medir la longitud del hipocótilo y calcular el porcentaje de inhibición.

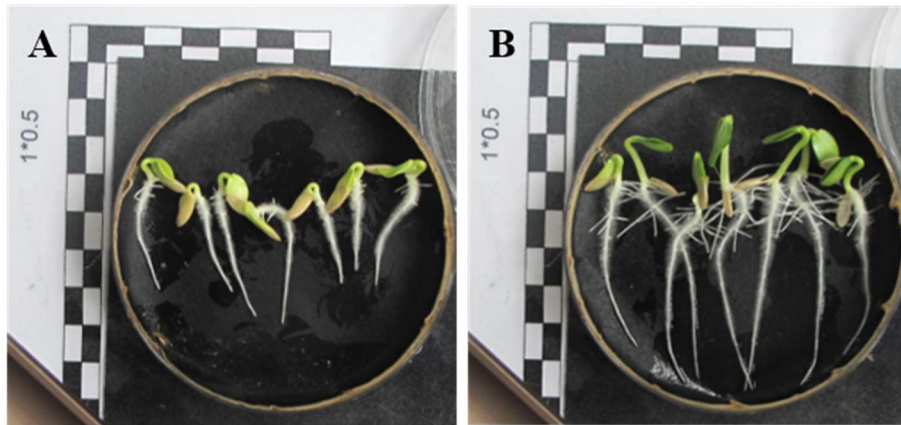


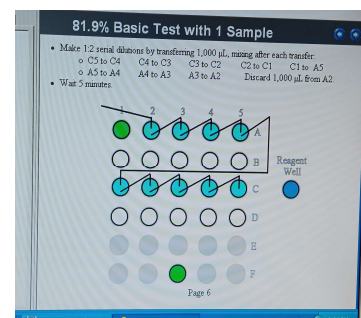
Figura 4. Bioensayos de elongación radicular realizados (A) con suelos contaminados y (B) con suelos control.

Bioensayo de luminiscencia

Este ensayo se lleva a cabo en extractos acuosos del suelo obtenidos mediante el método DIN 38 414-S4 (1984) (se preparan los extractos en agua desionizada en una proporción sólido-líquido de 1:10 (p/v), 24 h en agitación constante a temperatura ambiente y filtrado de los extractos).

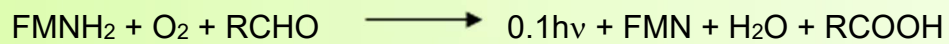
El bioensayo de inhibición por luminiscencia de *Vibrio fischeri* se realiza conforme a la norma ISO 11348-2 (1998), utilizando el Kit BioTox™. Los extractos de suelo se diluyen con una solución de NaCl (2% p/v) en el rango: 3.13%, 6.25%, 12.5%, 25,0% y 50,0% (v/v). Se mide la disminución de la luminiscencia después de 15/30 minutos de contacto de un volumen dado de la muestra a con una suspensión de bacterias luminiscentes a 15 ± 1 °C.

Las medidas se realizan por duplicado utilizando un luminómetro y con los resultados obtenidos se calcula el porcentaje de inhibición de la luminiscencia y la concentración efectiva que produce efecto tóxico/letal en el 50% de las bacterias luminiscentes (EC_{50}).



La reacción de emisión de luz de la bacteria *Vibrio fischeri* está basada en la oxidación de un FMNH₂ procedente de la cadena transportadora de electrones y un aldehído de cadena larga por acción de una luciferasa bacteriana. La estrecha relación existente entre el mecanismo de emisión de luz y el metabolismo celular es el fundamento del test de toxicidad. Cualquier sustancia presente en el medio que pueda alterar (intoxicar) el metabolismo celular, va a inducir una caída en la emisión de luz de la bacteria.

La reacción de oxidación entre FMNH₂ y el aldehído es:



3.7 Análisis de vegetación

La biodiversidad de la vegetación y salud de las plantas son esenciales para la implementación de estrategias de fitogestión. Las plantas pueden influir en los procesos físicos y químicos del suelo y afectan la actividad microbiana y funcionalidad del ecosistema. De hecho, la presencia de plantas puede favorecer la biodiversidad, conectividad de hábitats y secuestro del carbono, contribuyendo al valor ecológico de un lugar. El éxito de cualquier estrategia de fitogestión depende de la preparación del suelo, la implementación de prácticas agrícolas para el desarrollo de plantas saludables que pueden tolerar la contaminación del suelo y cuando posible, adsorber y/o degradar los contaminantes. Indicadores biométricos y bioquímicos de plantas son, por lo tanto, económicos y esenciales para determinar el rendimiento de las plantas y la ecotoxicidad del suelo. Determinando los indicadores durante las diferentes fases de un programa de fitorremediación permite evaluar la eficacia de las estrategias implementadas, identificar los factores limitantes, optimizar el proceso de remediación y adaptar gestión sostenible del suelo. Además, los parámetros de plantas sirven de indicadores de calidad del suelo y de servicios ecosistémicos.

3.7.1 Diversidad vegetal

La diversidad vegetal y su biomasa se analiza recogiendo los ejemplares de diferentes plantas que se encuentran dentro de un cuadrante de 50 x 50 cm.

En el laboratorio, se identifica y separa el material recogido de las distintas especies, se cuentan los individuos de cada especie y se determina su biomasa. Esta cuantificación permite estimar la diversidad de especies vegetales y calcular índices de biodiversidad ecológica, como el índice de Shannon (H'). Esta cuantificación mediante el índice de Shannon permite la comparación entre diferentes parcelas. Dado que la diversidad vegetal está estrechamente relacionada con la diversidad microbiana y animal del suelo, las alteraciones en la composición florística pueden mostrar posibles alteraciones en la salud del suelo y del ecosistema.

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

Donde:

S – Número de especies

p_i – Proporción de individuos de cada especie respecto al total: n_i/N

n_i – Número de individuos de la especie i

N – Número de individuos de todas las especies

H' – Resultado de la ecuación que normalmente varía entre 0,5 y 5. Menor a 2 es bajo y superior a 3 es alto en relación con la biodiversidad.

3.7.2 Parámetros biométricos de plantas

El crecimiento y desarrollo de las plantas es un indicador importante de su salud. La medida de los parámetros biométricos es sencilla y la toma de muestras y su interpretación no requieren que sea realizado por expertos. Además, son económicamente poco costosos y reflejan fielmente los efectos de estrés biótico y abiótico sobre el crecimiento y el desarrollo vegetal. El seguimiento a largo plazo de los parámetros biométricos en sitios fitogestionados puede utilizarse como indicador indirecto de la eficacia de la estrategia y del secuestro de carbono en la vegetación, por lo que siempre debería ser objeto de seguimiento. La biomasa seca puede utilizarse para analizar los niveles de concentración de contaminantes en los brotes y así evaluar la fitoextracción de metales, el índice de bioconcentración, el índice de bioacumulación y la reducción total de la contaminación del suelo.

Biomasa seca de vegetación herbácea

La producción de biomasa seca es un indicador de crecimiento y productividad vegetal. Las plantas con mayor producción de biomasa tendrán una mayor capacidad para inmovilizar y/o absorber contaminantes del suelo, además de proporcionar un sistema radicular más desarrollado que puede estabilizar la estructura del suelo y evitar su degradación.

La producción de biomasa seca **vegetal** se determina en especies herbáceas.

- 1 - Se colocan marcos de 50 x 50 cm (Figura 1) al azar o en áreas representativas de la parcela objeto de estudio.
- 2 - Se recoge la vegetación dentro de cada marco.
- 3 - Se pesa la biomasa fresca
- 4 - Se seca la biomasa a 70 °C durante 48 h en una estufa con ventilación.
- 5 - Una vez seca, la biomasa se pesa para determinar la producción total en peso seco.



Es importante determinar la producción de biomasa en peso seco, ya que el contenido de agua de las distintas especies puede variar debido a diversos factores (p.e., estación del año, sequía o inundaciones) y comprometiendo los resultados.

Altura, diámetro del tronco y número de ramas de los árboles

En los programas de fitorremediación a menudo se usan árboles como los álamos y los sauces por su gran porte y sus extensos sistemas radiculares, que ayudan a estabilizar el suelo, aumentan las tasas de infiltración y proporcionan almacenamiento de carbono y nutrientes a largo plazo de carbono. La altura del árbol, el número de ramas y el diámetro del tronco son indicadores del crecimiento y salud de los árboles. La medición de la altura de los árboles normalmente se realiza utilizando una cinta métrica durante las etapas juveniles y, cuando los árboles alcanzan la madurez, se realiza utilizando telémetros láser.

Área fotosintética

El área foliar determina la cantidad de luz interceptada por plantas, influye el rendimiento fotosintético y es un factor decisivo para la salud vegetal y la producción de biomasa. En las primeras fases de la plantación de árboles, podemos estimar el área fotosintética total, y en árboles grandes podemos estimar la media del área foliar. La relación entre la masa seca foliar y el área foliar, denominada LMA (masa foliar por área, g m^{-2}), es una característica clave en crecimiento vegetal que responde a factores ambientales y contribuye a la aclimatación y al éxito de las plantas. Es un parámetro importante porque puede reflejar el efecto de los factores climáticos que pueden ser una fuente de error a la hora de evaluar la evolución de las estrategias de fitorremediación implantadas

3.7.3 Parámetros fisiológicos de las plantas

Los parámetros fisiológicos de especies vegetales son una herramienta integradora y fiable para evaluar la salud de las plantas e, indirectamente, la salud de los suelos dónde las plantas están creciendo. La medición fotoquímica de la eficiencia del fotosistema II y la inducción de fluorescencia de la clorofila (OJIP) son medidas rápidas y no-destructivas, mientras que la determinación de los pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores y de los antioxidantes lipofílicos es semi-destructiva (aunque solo necesita una pequeña cantidad de muestra, que no afecta a la salud del individuo que se analice). Todas ellas son medidas relativamente rápidas que permiten determinar con precisión el funcionamiento de los procesos esenciales para el crecimiento de las plantas, como la captación de luz y la producción de energía, tan cruciales para el metabolismo primario de las plantas.

Determinación de pigmentos y antioxidantes

La determinación de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores y de antioxidantes lipofílicos se puede realizar de dos maneras diferentes. Con un método no-destructivo, mediante la toma de datos con un analizador de color (SPAD, MCL502 plus, Konica Minolta, Alemania) y un espectrorradiómetro (SpectraPen LM 510, PSI, República Checa), que utiliza las diferentes bandas de radiación emitidas por las plantas para calcular múltiples índices correlacionados con el estado de la planta. El índice más reconocido científicamente es el NDVI (Índice de vegetación de diferencia normalizada), que, mediante el uso de las bandas rojas e infrarroja cercana, analiza el estado de la planta y su nivel de estrés. Monitorizando el NDVI a lo largo de tiempo permite evaluar los cambios en el crecimiento de las plantas, la producción de biomasa y la eficiencia fotosintética, que pueden reflejar la disponibilidad de nutrientes, agua y luz en el suelo.

La determinación del perfil de pigmentos y del contenido de antioxidantes puede ser semi-destructiva. Para ello, se toman 6 discos de hoja con un diámetro de 2-3 mm. Estos discos se congelan y se transportan al laboratorio para su procesamiento (Figura 6A).

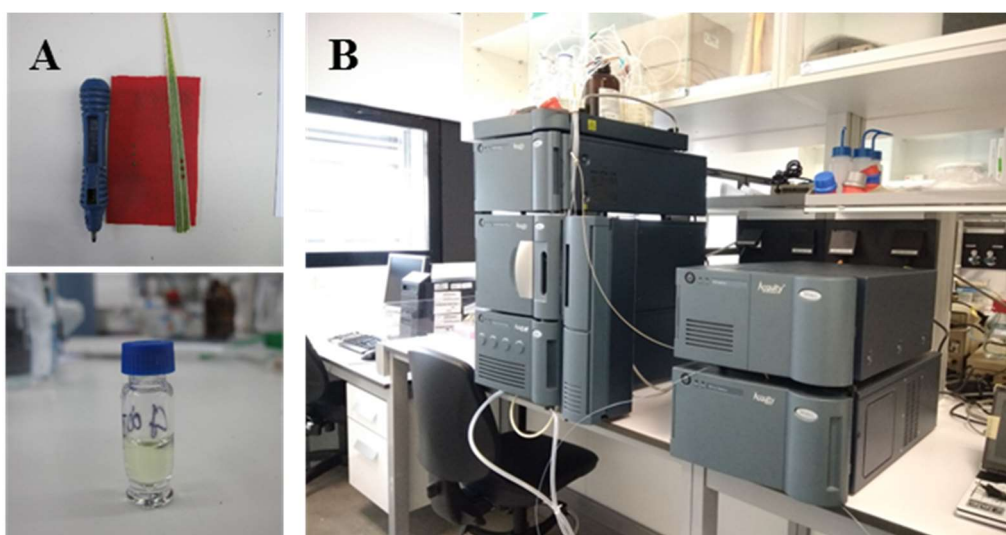


Figura 6. (A) Obtención de los discos de una hoja herbácea y preparación de la muestra (extracción en acetona). (B) Equipo de uHPLC acoplado a un ordenador para el análisis de los datos.

Se realiza una extracción con acetona para aislar los pigmentos y antioxidantes lipofílicos y, tras centrifugación y filtrado, se analizan en uHPLC (Waters, USA) (Figura 6B). Se pueden cuantificar los siguientes pigmentos: xantofilas como la neoxantina, luteína, epóxido de luteína, y las del ciclo VAZ (violaxantina, anteraxantina, zeaxantina), clorofilas a y b, α y β -caroteno y antioxidantes lipofílicos como α -, β - y γ -tocoferol.

El contenido de clorofila indica la capacidad fotosintética y la disponibilidad de nitrógeno, mientras que el contenido de carotenoides and xantofilas del ciclo VAZ refleja los mecanismos fotoprotectores y las respuestas al estrés oxidativo. Del mismo modo, el contenido de tocoferol indica el sistema de defensa antioxidante y la detoxificación de especies reactivas de oxígeno. El monitoreo de los cambios en el

contenido de pigmentos y antioxidantes permite evaluar la aclimatación y adaptación de plantas al suelo e identificar los posibles efectos tóxicos de los contaminantes.

Análisis de la cinética de la fluorescencia de la clorofila

La eficiencia fotoquímica del fotosistema II y la inducción de la fluorescencia de la clorofila (OJIP) es una medida fisiológica no-destruccionista que proporciona información importante sobre los procesos de captación de luz y conversión de la energía luminosa en energía química (carbohidratos). Esta energía se utiliza para producir las moléculas necesarias para el correcto desarrollo vegetal. El proceso para recoger los datos es sencillo. Las hojas pueden adaptarse a la oscuridad en el campo, pero para un mejor control del proceso, se separan las hojas de la planta, se ponen en una bolsa con papel de filtro humedecido y se transportan al laboratorio en condiciones de oscuridad. Las hojas se mantienen en la oscuridad durante al menos 30 minutos para relajar los centros de reacción fotosintética.

A continuación, en un entorno de luz verde, se fija a la hoja un fluorímetro (Fluorpen FP 110-LM/D, PSI, República Checa) para la recogida de datos (Figura 7). El fluorímetro proyecta un haz de luz sobre la hoja y registra la fluorescencia emitida por las clorofilas en respuesta a la luz proyectada. Los parámetros del ensayo OJIP están relacionados con los flujos de energía específicos y los índices de rendimiento, como la eficiencia fotoquímica, la tasa de transporte de electrones, y la disipación de energía, que proporcionan información rápida y precisa sobre el rendimiento fotosintético y la salud de la planta.



Figura 7. Área de trabajo para usar un fluorímetro portátil (en el centro de la imagen).

3.8 Protocolo simplificado: Tarjetas de Salud de los Ecosistemas Agrícolas

Las TSEA o Tarjetas de Salud de los Ecosistemas Agrícolas son manuales prácticos que nos explican de manera sencilla cómo podemos diagnosticar estado de salud de diferentes ecosistemas agrícolas o “agroecosistemas”. Además de conocer su estado actual, las TSEA nos permiten evaluar de forma cuantitativa el impacto que sobre dicha salud puedan tener las actividades humanas (por ejemplo, prácticas agrícolas). Para ello, las TSEA nos detallan qué indicadores de salud podemos medir y proporcionan información práctica sobre cómo hacerlo correctamente, junto con los criterios cualitativos y cuantitativos necesarios para interpretar los datos.

Los indicadores se agrupan en una variedad de servicios ecosistémicos para facilitar su interpretación por parte de los responsables de la toma de decisiones y, sobre todo, para proporcionar estabilidad a los programas de seguimiento a largo plazo frente a cambios en métodos, parámetros, etc. Se incluyen recomendaciones sobre buenas prácticas agrícolas para mejorar la salud de los agroecosistemas.

Suelo	Pág. 16	60 - 30	30 - 10				
3.2. Físico-Tiempo de infiltración (min)	Pág. 17	0 - 10	10 - 20	20 - 40	6		
3.3. Físico-Compactación (cm)	Pág. 18		4,5-5,5	6,6-7	9		
3.4. Químico-Ácidos/Basicidad (pH)	Pág. 19	3-4,5	6-9	4,5-5,5	8	7,3	
3.5. Químico-Materia orgánica (reacción /color)	Pág. 20	Ninguna Pálido	Débil Medio	Fuerte Oscuro	8		
3.6. Químico-Nutrientes minerales (coloración)	Pág. 21	Pálido anormal	Medio	Uniforme y oscuro	6		
3.7. Químico-Pesticidas/contaminantes (uso)	Pág. 22	Ver pág. 21	Ver pág. 23	Ver pág. 23	7		
3.8. Biológico-Actividad (% degradación)	Pág. 24	0 - 15	15 - 35	35 - 50	7		
3.9. Biológico-Lombrices (n°)	Pág. 25	0 - 3 0 - 20	3 - 7 0 - 10-20	7 - 10	8		
3.10. Biológico-Raíces (desarrollo)	Pág. 26	Superficial	Medio	Profundo	7	7,5	
4. Cambio climático	4.1. Materia orgánica (reacción y color)	Pág. 27	Ninguna Pálido	Débil Medio	Fuerte Oscuro	8	
	4.2. Sistema de producción (gana vs. pierda C)	Pág. 28	Ver pág. 29	Ver pág. 29	Ver pág. 29	8	
						Nota Final	
						7,4	

DIAGNÓSTICO BÁSICO

¿Quién puede usar las TSEA?

Cualquier persona puede usar las TSEA, gracias a que incluyen una serie de indicadores denominados “básicos” que se pueden medir e interpretar sin necesidad de una formación específica previa. ¿Cómo podemos medir estos indicadores? simplemente siguiendo el manual y con instrumentos caseros. Con los resultados de estos indicadores podremos diagnosticar el estado de salud de nuestro agroecosistema a nivel básico.

Determinación de la salud de un Agroecosistema

Después de medir cada indicador, debemos comparar nuestros resultados con los valores de referencia de la TSEA, considerados “malos”, “regulares” o “buenos” y así podremos asignarle un valor del 1 al 9 a cada indicador.

Los indicadores básicos están agrupados en varios servicios ecosistémicos, aportados por agroecosistemas sanos, para facilitar su interpretación por los responsables de la toma de decisiones y, sobre todo, para dar estabilidad a programas de seguimiento a lo largo plazo ante cambios en los métodos, parámetros, etc. Los valores medios de todos los indicadores incluidos en un servicio ecosistémico específico indican hasta qué punto nuestro agroecosistema puede proporcionar este servicio (valor del servicio ecosistémico).

Se puede obtener un valor de la salud general de un agroecosistema calculando el valor medio para todos los servicios medidos. Hay que tener en cuenta que un agroecosistema sano debe proporcionar todos los servicios esenciales incluidos en la TSEA. Así, la obtención de una puntuación baja para un servicio específico indicará que el agrosistema no tiene buena salud en general, independientemente del valor medio obtenido de todos los servicios incluidos en la TSEA.

Se pueden realizar los mismos cálculos, aún cuando no es posible medir todos los indicadores enumerados en la TSEA. Sin embargo, esto podría comprometer la fiabilidad del diagnóstico.



Antes de empezar...

Los resultados pueden variar dependiendo del clima y de la forma de hacer las medidas. Es, por lo tanto, muy importante intentar mantener las mismas condiciones durante el diagnóstico. Evitar días muy calurosos, fríos o con mucha lluvia y realizar las medidas antes o después del arado y, cuando sea posible, esperando hasta que el suelo se estabilice. Seleccionar una parcela y realizar el muestreo siempre en la misma parcela. Tomar las muestras de suelo siempre entre líneas de cultivo.

El kit suministrado contiene las siguientes herramientas:

- Termómetro: para medir la temperatura del suelo y la temperatura ambiente.
- Báscula (0-10 kg): para pesar los cultivos (Indicador 1.1).
- Pala plana: para muestrear macrofauna y lombrices (Indicadores 2.3 and 3.1).
- Cilindro (10 cm Ø) y martillo: para medir la capacidad de infiltración del suelo (Indicador 3.2).
- Varilla (8 mm Ø) y metro: para medir la compactación del suelo (Indicador 3.3).
- Tiras indicadoras de pH, vaso y H₂O₂ (110 vol.): para medir pH y materia orgánica.
- Hojas de campo: los 13 indicadores de la salud del suelo están en la tabla agrupados en 4 bloques según los servicios a evaluar (producción de alimentos, conservación de la biodiversidad, cuidado del suelo y mitigación del cambio climático) y una serie de columnas para rellenar. El manual indica como calcular y registrar cada medida en la columna de "Resultados". Para cada indicador se asigna un valor de 0 a 10 en la columna "Puntuación indicador". Finalmente, calcular la media para cada servicio y la media global. Tener en cuenta que un valor por debajo de 5 para cualquiera de los servicios ecosistémicos conduciría a un diagnóstico general de salud del suelo como "malo", aunque el valor final fuera superior a 5 (ya que un ecosistema sano debe proporcionar todos los servicios).



Medida de los indicadores

Los indicadores deben medirse en la misma época del año (mismo mes o estación). Siempre que sea posible, las medidas deben realizarse entre 2 y 5 días después de precipitaciones significativas para evitar que el suelo esté demasiado húmedo o demasiado seco. Es importante evitar días muy calurosos o muy fríos, ya que puede afectar la actividad de los organismos del suelo. Las medidas deben realizarse siempre de la misma manera (misma persona, técnica, hora del día, etc.) para aumentar la fiabilidad del diagnóstico. Si la zona de estudio incluye zonas visiblemente diferentes (en términos de vegetación, pendiente, humedad, etc.), deben evaluarse por separado. No debemos desanimarnos si al principio se obtienen valores bajos de los indicadores ya que dependen principalmente de las condiciones edafoclimáticas concretas de la zona de estudio. Lo verdaderamente importante es observar una evolución positiva de la salud del agroecosistema con el paso del tiempo, como resultado de las buenas prácticas agrícolas, que estará reflejada en valores más altos de los indicadores de la TSEA.



INDICADORES PARA UN DIAGNÓSTICO BÁSICO

1º CONSERVACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD

Número de especies de plantas

Los distintos cultivos generan diferentes nichos ecológicos, tanto en la superficie como en el subsuelo, que pueden ser habitados por multitud de organismos. Debemos fijarnos en el número de cultivos diferentes del emplazamiento, tomando una superficie de área 1 ha como límite. En el caso de que los cultivos formen parte de una rotación estacional, sumar el número total de cultivos diferentes que estarán presentes durante la rotación.



Número de estratos vegetales

Identificar visualmente si en la parcela de estudio hay 1, 2 ó 3 estratos vegetales (herbáceos, arbustivos y arbóreos). Comparar los resultados (número de estratos vegetales) con los valores de referencia de la TSEA:

- 3 estratos = 8 puntos
- 2 estratos = 5 puntos
- 1 estrato = 2 puntos.

Los arbustos y los árboles proporcionan refugio a los animales de pastoreo, creando nuevos nichos ecológicos y hábitats por encima y debajo del suelo.

Número de tipos de macrofauna

Usando una pala plana, se extrae un bloque de tierra (profundidad 30 cm x largo 25 cm x ancho 25 cm). Intenta hacerlo en menos de un minuto para evitar que se escape la macrofauna del suelo. Contar los diferentes tipos de macrofauna (no el número de individuos) presentes en el bloque: para ello, primero examinar la superficie del bloque y después desmenuzalo con la mano. Utilizar las imágenes proporcionadas para facilitar la identificación. Repetir el proceso otras tres veces. Por último, calcular el valor medio (número de tipos de animales de la macrofauna), comparar el valor con los valores de referencia de la TSEA y asignarle un valor entre 1 y 9. La macrofauna del suelo interviene en la

degradación de la materia orgánica y la mineralización de los nutrientes, controlando poblaciones de patógenos, mejorando y manteniendo la estructura del suelo y mezclando la materia orgánica del suelo.



2º CONSERVACIÓN DE SUELO

Número de lombrices

Usando una pala plana, extraer un bloque de tierra (profundidad 30 cm x largo 25 cm x ancho 25 cm). Intentaremos hacerlo en menos de un minuto para evitar que se escapen las lombrices del suelo. Contar el número de lombrices (individuos) del bloque. Repetir el proceso 3 veces más. Después de contar el número lombrices en los 4 bloques, sumar los valores y multiplicar el total por 4 (para obtener el número de lombrices por m²). Comparar los resultados (número de lombrices /m²) con los valores de referencia de la TSEA y asignarle a cada uno una puntuación de 1 a 9.

Las lombrices prefieren suelos neutros y ricos en materia orgánica, dónde favorecen la penetración de las raíces, el agua y el aire a través de sus redes de túneles, reduciendo así los efectos adversos de la compactación del suelo.



Capacidad de infiltración (minutos)

Necesitamos un tubo de acero galvanizado (diámetro interno: 15 cm) (como los que se usan en la construcción) y 10 cm de largo. Cortar uno de los extremos en ángulo para facilitar su introducción en el suelo. Con ayuda de un martillo y un bloque de madera, introducir el tubo en el suelo hasta una profundidad de 2 cm, evitando piedras, raíces grandes, palos y objetos similares. Verter suavemente 0.5 litros de agua dentro del tubo hasta que desaparezca (es decir, hasta que el agua se filtre por el perfil del suelo). Verter otros 0.5 litros de agua dentro del tubo y anotar el tiempo que tarda el agua en desaparecer. Repetir el proceso en otros 3 puntos de la parcela. Por último, calcular el valor medio (en minutos), compararlo con el valor de referencia de la TSEA y asignarle una puntuación de 1 a 9. Si el agua tarda mucho tiempo en desaparecer significa que el suelo es propenso a la escorrentía y a la erosión hídrica.



Compactación

Penetrabilidad (cm): tomar una varilla corrugada (1 m de largo y 8 mm de diámetro), como las que se usan en construcción). Introducirla en el suelo todo lo que sea posible con un esfuerzo modesto y calcular la profundidad (cm) alcanzada. Si la varilla choca contra una piedra, intentarlo de nuevo en un punto cercano. Repetir la operación tres veces más. Por último, calcular el valor medio, compararlo con los valores de referencia de la TSEA y asignarle un valor de 1 a 9.



Estado químico - acidez/alcalinidad del suelo (pH)

La acidez de un suelo viene determinada por su pH, que varía de 0 a 14, considerándose ácidos aquellos suelos con $\text{pH} < 7$ y básicos los suelos con $\text{pH} > 7$. El pH del suelo afecta la disponibilidad de los nutrientes, la actividad de microorganismos y la solubilidad de minerales del suelo, siendo el rango de pH óptimo para la mayoría de los cultivos entre 5.5 y 7. Usar las tiras indicadoras de pH para estimar este parámetro. Tomar una muestra de suelo seco (aprox. 10 g) y añadirle 2.5 veces su volumen en agua (25 ml). Agitar la suspensión, dejar que se estabilice durante 10 minutos y luego introducir la tira indicadora de pH. El color de la tira indica el pH de la solución.

Estado químico – materia orgánica (reacción/color)

La materia orgánica es el almacén de nutrientes del suelo, y gracias a la actividad microbiana (principalmente), se transforma en minerales asimilables por los cultivos. Además, mejora otras propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo (estructura, infiltración, retención hídrica, acidez/basicidad, actividad microbiana, etc). Para estimar el servicio que la actividad microbiana proporciona al cuidado del suelo hay que medir la reacción y el color.

- Reacción: tomar una muestra de suelo (aprox. 10 g), añadir unas gotas de H_2O_2 y observar la formación de burbujas. Cuanta más materia orgánica haya en el suelo, más fuerte será la reacción. Observar la duración de la reacción para obtener información adicional: si la reacción es lenta pero prolongada, significa que la materia orgánica es más estable (tipo humus) y permanecerá más tiempo en el suelo, mientras que una reacción rápida indica un contenido de nutrientes más lábil, que facilita un desarrollo de microorganismos y plantas más rápido.

- Color: debemos fijarnos en el color del suelo. Los suelos ricos en materia orgánica suelen ser oscuros.

- Foto: Usando una pala plana, excavar el suelo exponiendo un perfil vertical de unos 25 cm. Retirar toda la tierra suelta de la base. Colocar la tarjeta de corrección del color en la base del perfil y sacar una foto con un teléfono móvil con el GPS activado. Tomar la foto con el sol de frente para que el perfil no esté en semi-sombra.



Textura del suelo (contenido de arena, arcilla y limo)

La capacidad de un suelo para retener el agua depende en gran medida de su textura.

Tomar una muestra de suelo y añadir un poco de agua hasta formar una masa. Formar un cilindro con la masa, de unos 10 cm y lo más delgado posible.

- Si no es posible hacer un cilindro de al menos 3 mm en diámetro, el suelo es arenoso (más de 80 % arena).
- Si es posible hacer un cilindro de entre 1 y 3 mm en diámetro, el suelo es probablemente de textura media-gruesa (entre 65 y 80% arena).
- Si es posible hacerlo de 3 mm diámetro y formar un anillo sin que se rompa, el suelo es de textura media-fina (entre 40 y 65% arena).
- Si es posible hacer un cilindro de 1mm y al doblarlo formar un anillo sin que se rompa, la textura del suelo es arcillosa (si se agrieta, predomina el limo).

3º MITIGAR EL CAMBIO CLIMÁTICO

El color del suelo

La materia orgánica forma parte del ciclo del carbono y puede mitigar el cambio climático. Al principio del ciclo, el dióxido de carbono (CO_2) atmosférico es usado por las plantas verdes, las algas y algunas bacterias. De este modo, parte de este carbono orgánico permanecerá en el suelo y parte se transforma de nuevo en CO_2 que retornará a la atmósfera al calentamiento global. Por tanto, desde un punto de vista del cambio climático, cuanto mayor sea la cantidad de materia orgánica que logremos introducir y conservar en nuestros suelos, mejor.

Para este indicador, se usa la misma puntuación que para el indicador “Estado químico – materia orgánica (reacción/color)”.



Respiración del suelo

Los microorganismos consumen la fracción orgánica y el oxígeno, liberando CO_2 . La determinación de la cantidad de CO_2 liberado da una idea de la actividad biológica del suelo.

Se coloca una muestra de suelo fresco (20 g) en un bote grande de plástico (250 ml). Usando un vaporizador se añade agua hasta que el suelo esté empapado (pero no encharcado). A continuación, se coloca un frasco mediano de plástico (50 ml) con 10 ml de NaOH 0.1N sobre un trípode de plástico. Se tapa el bote grande y se guarda a temperatura ambiente durante 2 días en oscuridad y sin moverla. La cantidad de CO_2 liberada se puede cuantificar valorando la sosa con una solución de ácido clorhídrico (HCl 0.1N) y con fenolftaleína como un indicador ácido-base de la reacción. Se abre el bote grande, con una jeringuilla se coge 1 ml del frasco mediano y se añade la solución a un frasco pequeño (25 ml). Se añaden 2 gotas de fenolftaleína con un cuentagotas (el color de la solución cambia a violeta). Con otro cuentagotas se añade HCl 0.1N, gota a gota. Cuando la solución cambia de color (se vuelve transparente), se anota el número de gotas añadidas.

3. Referencias

- Becerra-Castro C, Prieto-Fernández Á, Kidd PS, Weyens N, Rodríguez-Garrido B, Touceda-González M, Acea MJ, Vangronsveld J (2013). Improving performance of *Cytisus striatus* on substrates contaminated with hexachlorocyclohexane (HCH) isomers using bacterial inoculants: Developing a phytoremediation strategy *Plant Soil* 362:247-260
- Bhargava A, Carmona FF, Bhargava M, Srivastava S (2012). Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *J Environ Manage*, 105:103-120. dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.04.002.
- Burges A, Alkorta I, Epelde L, Garbisu C (2018). From phytoremediation of soil contaminants to phytomanagement of ecosystem services in metal contaminated sites. *Int J Phytoremediation*, 20:384-397 doi:10.1080/15226514.2017.1365340.
- Burns RG (1982). Enzyme Activity in Soil: Location and a Possible Role in Microbial Ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, 14:423-427. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(82\)90099-2](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(82)90099-2).
- Camiña F, Trasar-Cepeda ., Gil-Sotres F, Leirós C (1998). Measurement of dehydrogenase activity in acid soils rich in organic matter. *Soil Biol Biochem* 30, 1005-1011.
- Canet R, Albiach R, Pomares F (2000). Los índices de actividad biológica como herramienta de diagnóstico de la fertilidad del suelo en agricultura ecológica. En: García, C., Hernández, M.T. (Eds), *Investigación y Perspectivas de la Enzimología de Suelos en España*. CEBAS-CSIC, 11-39.
- Chaney RL, Angle JS, Broadhurst CL, Peters CA, Tappero RV, Sparks DL (2007). Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. *J Environ Qual*, 36:1429-1443 doi:10.2134/jeq2006.0514.
- Cundy AB, Bardos, RP, Puschenreiter, M, Mench, M, Bert, V, Friesl-Hanl, W, Müller I, Li XN, Weyens N, Witters N, Vangronsveld J (2016). Brownfields to green fields: realising wider benefits from practical contaminant phytomanagement strategies. *J Environ Manage*, 184, 67-77. doi:10.1016/j.jenvman.2016.03.028.
- Dary M, Chamber-Pérez MA, Palomares AJ, Pajuelo E (2010). "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *J Hazard Mater*, 177:323-330. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.12.035.
- Dick WA, Tabatabai MA (1993). Significance and potential uses of soil enzymes. En: Metting, Jr., F.B. (Ed), *Soil microbial ecology: application in agricultural and environmental management*. Marcel Dekker, New York, 95-125.
- Eivazi F, Tabatabai MA (1988). Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(5), 601-606.
- FAO (Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación), 2006. *Guía para la descripción de suelos*, 4th Edition. Roma.
- García C, Hernández T (2000). *Investigación y Perspectivas de la Enzimología de Suelos en España*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Centro de Edafología y Biología Aplicada del

- Segura. I.S.B.N.: 84-605-9821-7. Depósito legal: MU-458-2000. Imprime: Tipografía San Francisco, S.A. 15-23.
- Gutián F y Carballas T (1976). Técnicas de análisis de suelos. Pico Sacro. Santiago de Compostela.
- ISO 11348-2 (1998). Determination of Inhibitory Effect of Water Samples on the Light Emission of *Vibrio Fischeri* (Luminescent Bacteria Test). Part 2: Method Using Liquid-dried Bacteria. International Organization for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- Kidd P, Mench M, Álvarez-López V, Bert, V, Dimitriou I, Friesl-Hanl W, Herzig R, Janssen JO, Kolbas A, Müller I, Neu S, Renella G, Ruttens A, Jaco Vangronsveld J, Puschenreiter M (2015). Agronomic practices for improving gentle remediation of trace element-contaminated soils. *International Journal of Phytoremediation*, 17:1005-1037. doi:10.1080/15226514.2014.1003788.
- Ladd JN and Butler JHA (1972). Short-Term Assays of Soil Proteolytic Enzyme Activities Using Proteins and Dipeptide Derivatives as Substrates. *Soil Biology and Biochemistry*, 4:19-30. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(72\)90038-7](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(72)90038-7).
- Lobo MC, Sastre I, Vicente MA (2000). Las enzimas como medida del impacto ambiental en los suelos. En: García C, Hernández MT (Eds), *Investigación y Perspectivas de la Enzimología de Suelos en España*. CEBAS-CSIC, pp. 297-352.
- Mench M, Lepp N, Bert V, Schwitzguébel JP, Gawronski S, Schröder P, Vangronsveld J (2010). Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *J Soils Sed*, 10:1039-1070. doi:10.1007/s11368-010-0190-x
- Mench M, Renella G, Gelsomino A, Landi L, Nannipieri P (2006). Biochemical parameters and bacterial species richness in soils contaminated by sludge-borne metals and remediated with inorganic soil amendments. *Environ Pollut*, 144:24-31. doi:10.1016/j.envpol.2006.01.014.
- Nannipieri P, Pedrazzini F, Arcara PG, Piovanelli C (1979). Changes in amino acids, enzyme activities, and biomasses during soil microbial growth. *Soil Science*, 127:26-34.
- Nannipieri P, Ceccanti B, Cervelli S, Matarese E (1980). Extraction of phosphatase, urease, proteases, organic carbon and nitrogen from soil. *Soil Science Society of America Journal*, 44:1011-1016.
- Olsen SR and Sommers LE (1982). Phosphorus. p. 403-430. In A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney (eds.) *Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. 2nd ed. Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI.
- Ruttens A, Colpaert JV, Mench M, Boisson J, Carleer R, Vangronsveld J (2006a). Phytostabilization of a metal contaminated sandy soil. II: Influence of compost and/or inorganic metal immobilizing soil amendments on metal leaching. *Environ Pollut*, 144:533-539. doi:10.1016/j.envpol.2006.01.021.
- Ruttens A, Mench M, Colpaert JV, Boisson J, Carleer R, Vangronsveld J (2006b). Phytostabilization of a metal contaminated sandy soil. I: Influence of compost and/or inorganic metal immobilizing soil amendments on phytotoxicity and plant availability of metals. *Environ Pollut*, 144:524-532. doi:10.1016/j.envpol.2006.01.038.
- Saá A, Trasar-Cepeda C, Gil-Sotres F, Carballas T (1993). Changes in soil phosphorus and acid phosphatase activity immediately following forest fires. *Soil Biology and Biochemistry* 22:511-515.

- Schinner F, Von Mersi W (1990). Xylanase-, CM-cellulase-and invertase activity in soil: an improved method. *Soil Biology and Biochemistry*, 22(4), 511-515.
- Tabatabai MA, Bremner JM (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil biology and biochemistry*, 1(4), 301-307.
- Tabatabai M A, Bremner JM (1970). Arylsulfatase activity of soils. *Soil Science Society of America Journal*, 34(2), 225-229.
- Trasar MC, Gil-Sotres F, Guitián F (1985). Determinacion de la actividad fosfatasa en suelos gallegos: precisiones al método de Sarathchandra y Perrott. *Análes de Edafologia y Agrobiologia*, 44:987-99.
- Trasar-Cepeda MC, Gil-Sotres F (1988). Kinetics of acid phosphatase activity in various soils of Galicia (NW Spain). *Soil Biology and Biochemistry*, 20(3), 275-280.
- Trasar-Cepeda C, Leirós MC, Gil-Sotres F, Seoane S (1999). Defining the validity of a biochemical index of soil quality. *Biology and Fertility of Soils*. 30, 140-146.
- Trasar-Cepeda C, Leirós MC, Gil-Sotres F (2000). Biochemical properties of acid soils under climax vegetation (Atlantic oakwood) in an area of the European temperate-humid zone (Galicia, NW Spain): specific parameters. *Soil Biology and Biochemistry*, 32 (6):747-755. ISSN 0038-0717, [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00196-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00196-0).
- Trasar-Cepeda C, Leirós MC, Seoane S, Gil-Sotres F (2000). Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biology & Biochemistry* 28, 1867-1875.
- Vangronsveld J, Herzig R, Weyens N, Boulet J, Adriaensen K, Ruttens A, Thewys T, Vassilev A, Meers E, Nehnevajova E, van der Lelie D, Mench M (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental science and pollution research international*, 16:765-794. doi:10.1007/s11356-009-0213-6.
- Weyens N, Taghavi S, Barac T, van der Lelie D, Boulet J, Artois T, Carleer R, Vangronsveld J (2009). Bacteria associated with oak and ash on a TCE-contaminated site: characterization of isolates with potential to avoid evapotranspiration of TCE *Environmental Science and Pollution Research* 16:830-843 doi:10.1007/s11356-009-0154-0.
- Wenzel WW (2009). Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant Soil*, 321:385-408.
- Zhang Y, Frankenberger WT (2000). Formation of Dimethylselenonium Compounds in Soil. *Environ Sci Technol*, 34:776-783. doi:10.1021/es990958y.