

LIMITACIÓN POR P EN PINSAPARES CON SÍNTOMAS DE SATURACIÓN DE N: RESPUESTAS A UN ENSAYO DE FERTILIZACIÓN IN SITU

M^a Carmen Blanes Alberola, Benjamín Viñegla Pérez, Roberto García Ruiz y José Antonio Carreira de la Fuente

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología. Universidad de Jaén. Facultad de Ciencias Experimentales. Campus Universitario Las Lagunillas s/n. 23071-JAÉN (España). Correo electrónico: mblanes@ujaen.es

Resumen

Entradas crónicas de N por deposición atmosférica en ecosistemas forestales pueden derivar en una serie de síntomas de declive que reciben el nombre de “síndrome de Saturación de N”. Aunque los procesos implicados están actualmente bien descritos, existe controversia en relación a cuál es el factor crítico involucrado en la respuesta de umbral que se produce desde el estado de limitación al de saturación de N. Las observaciones previas de síntomas de saturación de N en el bosque de *Abies pinsapo* (Boiss.) de Sierra Bermeja (Málaga), con valores elevados de actividad fosfatasa del suelo y de la relación N/P de las acículas, sugiere que la limitación por P es el mecanismo que desencadena la aparición de los síntomas de saturación de N, por lo que un incremento en la disponibilidad de P en el suelo debería reducir dichos síntomas. Para probar dicha hipótesis se ha realizado experimento *in situ* de fertilización compensatoria con P, en los dos extremos del gradiente altitudinal de distribución del pinsapar de Sierra Bermeja. Los resultados muestran que la fertilización con P ha promovido la movilización de P en el suelo de los pinsapares, aumentando la actividad fosfatasa e incrementando la concentración de las fracciones más lábiles de P. Estas respuestas indican un aumento en la disponibilidad de P en el suelo de los pinsapares, lo que explica que la relación N/P encontrada en los brotes de las parcelas de menor altitud fueran significativamente menores en las parcelas fertilizadas que en las parcelas control.

Palabras clave: *Abies pinsapo*, Actividad fosfomonoesterasa, Limitación por P, Saturación de N

INTRODUCCIÓN

La aparición de ecosistemas saturados por N es el resultado de procesos de deposición crónica asociados al aumento de emisiones derivadas de la actividad antrópica, siendo uno de los principales componentes del Cambio Climático a escala global. En una fase inicial de entrada continua de N, diversos mecanismos de retención de este nutriente promueven un incremento de la produc-

tividad forestal, como respuesta al proceso de “fertilización” con N (VITOUSEK & HOWARTH, 1991). En los casos en que la deposición atmosférica es crónica y de suficiente magnitud, puede alcanzarse una situación en que la disponibilidad de N en el ecosistema exceda a la demanda, iniciándose una fase de saturación de N. Esta fase se caracteriza por un incremento en las tasas de nitrificación y desnitrificación, y por la pérdida del N excedente. Además, puede alcanzarse un

desequilibrio nutricional en los árboles, que acaban mostrando evidentes síntomas de declive.

Existen numerosos estudios que describen detalladamente la serie de respuestas a la deposición crónica de N (ABER et al., 1998; FENN et al., 1998). Sin embargo, no hay ningún acuerdo en relación a cuál es el factor crítico implicado en la respuesta de umbral que se produce en la transición del bosque desde el estado de limitación al de saturación de N. Se conoce que un incremento en la disponibilidad de N lleva asociado un aumento en la demanda de P por los árboles para intentar equilibrar sus relaciones N/P (CARREIRA et al., 2000). Este proceso reduciría las reservas de P disponible en el suelo llegando a modificar las tasas de transformación del P.

Resultados previos (SALIDO, 2007) indican un estado de saturación de N para el pinsapar de Sierra Bermeja, el más próximo de los existentes al polígono industrial del Campo de Gibraltar, probable origen de la contaminación. En dicho pinsapar se han encontrado altas tasas de mineralización, nitrificación y desnitrificación (SALIDO, 2007). Además, existen evidencias de limitación por P en el bosque, como concentraciones muy bajas de P disponible en el suelo, altas relaciones N/P en acículas, crecimiento preferencial de raíces finas en medios fertilizados con P y una elevada actividad fosfatasa (LIÉTOR, 2002). En base a los datos previos, nuestra hipótesis plantea que la limitación por P es el proceso que ha disparado los síntomas de declive en el bosque de *A. pinsapo* sometido a deposición crónica de N y, por tanto, la aplicación de una fertilización compensatoria con P debería reducir los síntomas de saturación de N del mismo. En este trabajo se ha evaluado dicha hipótesis comprobando si se ha modificado el tamaño de las reservas de P en el suelo así como la actividad fosfomonoesterasa y analizando el efecto del incremento de P sobre el desequilibrio nutricional en *A. pinsapo*, particularmente en acículas y brotes.

MATERIAL Y MÉTODOS

La zona de estudio se ha establecido en el pinsapar de Los Reales de Sierra Bermeja, situado en la provincia de Málaga, a 42 Km del polígono industrial del Campo de Gibraltar, fuente

principal del excedente de N. El bosque se encuentra sometido a una estacionalidad climática de tipo Mediterráneo, con una precipitación anual que varía entre 1100 y 2000 mm y una temperatura media de 15°C. Las parcelas se localizan en dos altitudes diferentes: 1200 m (5° 12' 07'' W, 36° 29' 26'' N) y 1400 m (5° 12' 26'' W, 36° 29' 26'' N), presentando una orientación NE y una pendiente media del 40%. El sustrato litológico es ultrabásico y está dominado por serpentinas y peridotitas.

Dentro de la zona de estudio se ha efectuado una fertilización compensatoria con P inorgánico, en parcelas replicadas de 400 m² (n = 3 para controles (C) y tratamientos (F)), en ambos extremos del gradiente altitudinal de distribución del pinsapo en Sierra Bermeja (1200 (BP) y 1400m (B)). En total se han realizado 3 fertilizaciones con P en forma de superfosfato triple al 46% de riqueza, entre octubre de 2005 y octubre de 2006, aplicándose un total de 94 Kg de P.ha⁻¹. En cada parcela se tomaron 3 muestras, compuestas a su vez de tres submuestras independientes, en los primeros 15 cm de suelo. También se tomaron muestras de acículas de pinsapo de un año de edad y de los brotes aparecidos en el año 2006, de cuatro orientaciones diferentes, en 6 árboles elegidos al azar.

Para evaluar los cambios en las reservas de P en el suelo se analizó la concentración de las fracciones más lábiles de P (P extraíble con bicarbonato, *P-bic*, y P extraíble con membranas de intercambio iónico, *P-mem*) aproximadamente 6 meses después de cada fertilización. En el presente trabajo se muestran los valores de estas fracciones 6 meses después del último evento de fertilización, en junio de 2007. Además se evaluó la concentración de P en cada fracción del suelo tras la segunda fertilización. El fraccionamiento se llevó a cabo mediante el método de extracción secuencial de HEDLEY et al. (1982), evaluándose la concentración de fósforo en cada fracción mediante el método colorimétrico descrito por John (1970). La fracción de P microbiano (P-Mic) se obtuvo como la diferencia entre la concentración de P extraíble con bicarbonato en muestras previamente fumigadas con cloroformo y sus duplicados no fumigados.

Como una medida de las tasas de transformación del P se evaluó la actividad fosfatasa ácida

en los primeros 5 cm de suelo tras el tercer evento de fertilización aplicando el método descrito por TABATABAI & BREMNER (1969).

Para el análisis del contenido en P de los brotes y las acículas las muestras fueron secadas en una estufa a 70 °C durante 48h y molidas posteriormente. El P total de estas muestras se analizó con un espectrómetro de masas ICP-MS tras realizar una digestión con ácido nítrico y perclórico. El contenido en C y N (%) se obtuvo con un Analizador Elemental Thermo Finnigan FlashEA1112 CHNS-O.

La significación de los tratamientos se determinó mediante un ANOVA factorial (fertilización y altitud como factores) y un test a posteriori de Fisher ($P < 0.05$). Los análisis se realizaron empleando el programa informático Statistica 7 para Windows.

RESULTADOS

Efectos de la fertilización sobre la reserva y ciclado de P en el suelo de los pinsapares

Como era de esperar, los tres eventos de fertilización han promovido un incremento significativo de la concentración de P lábil en el suelo, tanto para las formas inorgánicas (Figura 1) como para las formas orgánicas de P (Figura 2). Los mayores valores de concentración se dieron

para el P inorgánico, siendo la fracción extraída con bicarbonato la forma más abundante, con valores de hasta 35 $\mu\text{g P g}^{-1}$ suelo seco. Por el contrario, el P orgánico extraído con bicarbonato mostró la menor concentración de todas las formas analizadas, alcanzando 7 $\mu\text{g P g}^{-1}$ suelo seco en el mejor de los casos. En todos los casos los incrementos respecto a los controles alcanzaron un orden de magnitud, excepto en el caso del P orgánico extraído con bicarbonato. El patrón de incremento de la disponibilidad de P en parcelas fertilizadas se mantuvo de forma consistente en los dos extremos del gradiente altitudinal del pinsapar de Sierra Bermeja, aunque con ligeras tendencias que indican que la disponibilidad de P lábil es mayor en la masa de pinsapar situada a 1200 m.

El fraccionamiento de P permitió evaluar los cambios en los niveles totales de P inorgánico y orgánico en relación al tratamiento. No se encontraron diferencias significativas en ningún caso para el P orgánico, mientras que el P inorgánico y total mostraron un claro patrón de incremento en respuesta a la fertilización, con valores en las parcelas fertilizadas que alcanzaron el doble de aquellos encontrados en las parcelas control (Tabla 1).

Los procesos de transformación de P en el suelo del pinsapar se evaluaron través de la medida de la actividad fosfomonoesterasa

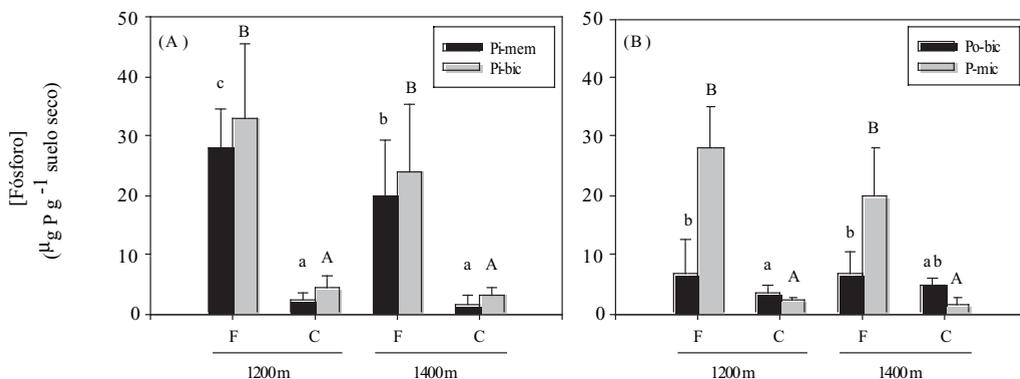


Figura 1. Concentración media en el suelo superficial (0-5 y 5-15cm de profundidad) de las fracciones lábiles de P inorgánico (A, extraído con membranas de intercambio iónico (P-mem) o con bicarbonato (Pi-bic)) y P orgánico (B, extraído con bicarbonato (Po-bic) y P microbiano (P-mic)) para las parcelas fertilizadas (F) y control (C) en los dos extremos del gradiente altitudinal. Las barras indican la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$, ANOVA factorial y test a posteriori Fisher LSD) en minúsculas para Pi-mem y Po-bic y en mayúsculas para Pi-bic y P-mic

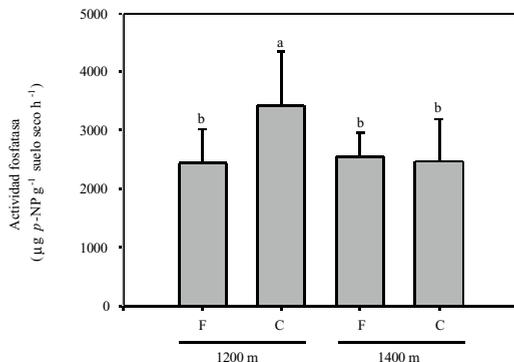


Figura 2. Actividad fosfomonoesterasa en muestras de suelo de parcelas fertilizadas (F) y controles (C) en ambos extremos del gradiente altitudinal de Sierra Bermeja. Las barras representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$, ANOVA factorial y test a posteriori Fisher LSD)

Altitud (m)	Tratamiento	ΣP inorgánico	ΣP orgánico	P total
1200	F	110,0 (40,5) a	116,6 (12,1) a	407,3 (33,5) ab
	C	47,6 (5,9) b	116,2 (27,1) a	347,8 (24,5) b
1400	F	117,0 (51,7) a	113,8 (11,2) a	436,0 (94,1) a
	C	63,1 (6,7) ab	138,9 (8,2) a	283,1 (32,9) b

Tabla 1. Valores de P inorgánico, orgánico y total obtenidos como la suma de las fracciones analizadas en muestras de suelo de parcelas fertilizadas y controles en los dos extremos del gradiente altitudinal del pinsapar de Sierra Bermeja

(Figura 3). Tras el tercer evento de fertilización, se encontraron valores significativamente mayores en el suelo de las parcelas control situadas a 1200 m, con un valor medio en torno a 3500 $\mu\text{g p-NP}\cdot\text{g}^{-1}$ suelo seco/h, mientras en el resto de parcelas el valor varió desde 2440 a 2550 $\mu\text{g p-NP}\cdot\text{g}^{-1}$ suelo seco. h^{-1} en las parcelas fertilizadas a 1400 y 1200 m, respectivamente. Así, existe una cierta tendencia que apunta a la inhibición de la actividad bajo condiciones de mayor disponibilidad de P (valores significativamente menores encontrados en las parcelas fertilizadas a 1400 m). Este patrón, sin embargo no se observó en las parcelas situadas a mayor altitud donde se observaron valores menores de P lábil.

Respuesta del estado nutricional de los árboles al tratamiento de fertilización con P

No se encontraron diferencias significativas en los contenidos de N y P en función del tratamiento de fertilización, la altitud o la edad de la estructura vegetativa (acículas o brotes), excepto en las parcelas situadas a 1200 m, donde se encontraron valores menores del contenido en P

en los brotes de nueva formación, independientemente del tratamiento de fertilización (Tabla 2). De cualquier forma, las ligeras diferencias en los contenidos de N y P permiten que empiecen a observarse efectos de la fertilización sobre el estado nutricional de los nuevos brotes, ya que se encontraron valores significativamente menores de la relación N/P en los brotes de los árboles situados tanto a 1200 como a 1400 m, respecto a sus respectivos controles, aunque este efecto fue claramente más apreciable en las parcelas de mayor altitud, con valores en general menores de dicha relación.

DISCUSIÓN

Efectos de la fertilización sobre las reservas de P y la actividad fosfomonoesterasa ácida

La presencia de P en formas fácilmente asimilables encontrada en el suelo de las masas de pinsapar de Sierra Bermeja es realmente escasa, como corresponde al sustrato litológico en que se sitúan las mismas, además de existir una gran

	Altitud (m)	Tratamiento	N (%)	P (%)	N/P
Acículas	1200	F	0,96 (0,08) a	0,056 (0,003) a	17,1 (2,1) a
		C	0,99 (0,03) a	0,056 (0,004) a	17,9 (1,7) a
	1400	F	0,91 (0,06) a	0,047 (0,008) a	19,6 (2,6) a
		C	0,95 (0,00) a	0,048 (0,013) a	20,8 (5,0) a
Brotos	1200	F	2,95 (0,09) a	0,390 (0,050) ab	7,68 (0,8) b
		C	3,05 (0,21) a	0,310 (0,030) b	9,73 (0,7) c
	1400	F	3,18 (0,42) a	0,480 (0,100) a	6,61 (0,7) a
		C	3,32 (0,28) a	0,480 (0,050) a	6,89 (0,2) ab

Tabla 2. Contenido en N y P y relación entre ambos nutrientes en acículas y brotes de árboles presentes en parcelas de pinsapar fertilizadas (F) y control (C), situadas a 1200 y 1440 m. Letras diferentes en cada columna (acículas o brotes) indican diferencias significativas ($P < 0.05$, ANOVA factorial y test a posteriori Fisher LSD)

capacidad de adsorción de P por parte del suelo junto a la gran demanda de P de los árboles provocada por el exceso de N (CARREIRA *et al.*, 2000). A pesar de que los tres eventos de fertilización han tenido efecto sobre todas las formas de P disponible el incremento en fósforo inorgánico lábil ha sido mucho mayor que el orgánico. Sin embargo, este resultado no se ha correspondido con el obtenido para el total de formas inorgánicas y orgánicas de P, es decir, incluyendo las fracciones más fuertemente unidas al sustrato. De cualquier forma, los cambios en las proporciones de las fracciones más lábiles son los que realmente pueden afectar a todos aquellos procesos biológicos regulados por la relación Po/Pi a corto plazo, lo que implica que se está variando el estado nutricional del suelo de los pinsapares en el futuro más inmediato de cada fertilización.

El incremento de las fracciones de P más lábiles en parcelas fertilizadas tendría como consecuencia un aumento del P microbiano, como se observa en los resultados mostrados. Pero esto parece estar modulado a su vez por las condiciones climáticas, ya que en las parcelas control existe un patrón estacional, que muestra concentraciones menores de P-mic en primavera que en otoño (junio de 2007 respecto a octubre de 2006, datos no mostrados). Dicha diferencia estacional puede deberse a que en primavera, los árboles pasan a un estado de gran actividad y la retirada de nutrientes del suelo se incrementa. Tal vez, esta disminución del P-mic sea el resultado de la competencia por el recurso limitante con las plantas. Por el contrario, en las parcelas fertilizadas el P disponible debe estar en suficiente con-

centración para satisfacer a productores primarios y a microorganismos del suelo.

La adición en grandes cantidades de P inorgánico debería disminuir la actividad fosfatasa, por inhibición de la enzima por producto o por disminución en la liberación de la enzima en el suelo, procedente de los microorganismos y raíces, ya que éstos dispondrían de P lábil suficiente. OLANDER & VITOUSEK (2000), tras fertilizar durante cuatro años un suelo deficiente de P con 100 Kg.ha⁻¹.año⁻¹, encontraron una disminución de la actividad fosfatasa. Sin embargo, a corto plazo no hubo diferencias, atribuyendo la disminución de la actividad no a una inhibición directa sino a una represión en su producción. La medida de actividad es una medida potencial en la que se añade sustrato en exceso, siendo la actividad fosfatasa función principalmente de la concentración de enzimas. La ausencia de diferencias en la actividad entre parcelas fertilizadas y control indicaría, por tanto, que no existen diferencias en su concentración de enzimas. Sin embargo, esto no descarta que existan diferencias en la mineralización real, ya que un aumento en el pool de P inorgánico debería traducirse en un aumento de la inmovilización y del P orgánico. Este incremento en el sustrato de la enzima aumentaría la mineralización neta de las parcelas fertilizadas, pero sólo hasta que la cantidad de P lábil fuera suficiente para que se empezaran a dar mecanismos de feed-back negativo, disminuyendo finalmente dicha mineralización. Los resultados obtenidos apoyan esta hipótesis, mostrando en las parcelas fertilizadas mayores concentraciones de P-mic y de Po-bic (la fracción más fácilmente mineralizable).

Efectos de la fertilización en el balance nutricional de *Abies pinsapo*

Los análisis foliares se consideran un buen indicador del estado nutricional de las plantas y de la saturación de N (ABER et al., 1998). Los valores de N y P observados en las acículas son claramente menores que aquellos encontrados por LIÉTOR (2002) en acículas de *A. pinsapo* de un bosque no saturado por N (Yunqueira, Málaga), lo que sostiene que la saturación de N disminuye el porcentaje de P foliar. La fertilización no provocó ningún efecto sobre el contenido de P ni N en las acículas, posiblemente debido a que las yemas de éstas se preformaron antes de esta fertilización. Sin embargo sí se observó un aumento en el contenido de P en los brotes generados con posterioridad a la fertilización, lo que indica que se está mejorando el balance nutricional en los tejidos con el consiguiente alivio de los efectos causados por el exceso de N en las hojas.

BIBLIOGRAFÍA

- ABER, J.D., MC DOWEL, W.; NADELHOFFER, K.J.; MAGILL, A.; BERNTSON, G.; KAMAKEY, M.; McNULTY, S.; CURRIE, W.; RUSTAD, L. & FERNÁNDEZ, I.; 1998. Nitrogen saturation in temperate forest ecosystems. Hypotheses revisited. *BioScience* 48: 921-934.
- CARREIRA, J.A.; GARCÍA-RUIZ, R.; LIÉTOR, J. & HARRISON, A.F.; 2000. Changes in soil phosphatase activity and P transformation rates induced by application of N- and S-containing acid-mist to a forest canopy. *Soil Biol. Biochem.* 32: 1857-1865.
- FENN, M.E.; POTH, M.A.; ABER, J.D.; BARON, J.S.; BORMANN, B.T.; JOHNSON, D.W.; LEMLY, A.D.; McNULTY, S.G.; RYAN, D.F. & STOTTEMYER, R.; 1998. Nitrogen excess in North American ecosystems: predisposing factors, ecosystem responses, and management strategies. *Ecol. Appl.* 8(3): 706-733.
- HEDLEY, M.J.; STEWART, J.W.B. & CHAUHAN, B.S.; 1982. Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46: 970-976.
- JOHN, M.K.; 1970. Colorimetric determination of phosphorus in soil and plant materials with ascorbic acid. *Soil Sci.* 109: 214-220.
- LIÉTOR, J.; 2002. *Patrones de disponibilidad y limitación por nutrientes como indicadores de estado en masas de pinsapar (Abies pinsapo Boiss.)*. Tesis doctoral. Universidad de Jaén. Jaén.
- OLANDER, L.P. & VITOUSEK, P.M.; 2000. Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. *Biogeochemistry* 49: 175-190.
- SALIDO, M.T.; 2007. *Evaluación del estado de saturación de N en masas de pinsapar (Abies pinsapo Boiss.) del sur de la Península Ibérica: patrones generales de entrada, circulación interna y salida del nitrógeno en el ecosistema*. Tesis doctoral. Universidad de Jaén. Jaén.
- TABATABAI, M.A. & BREMNER, J.M.; 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1: 301-307.
- VÍNEGLA, B.; GARCÍA-RUIZ, R.; LIÉTOR, J.; OCHOA, V. & CARREIRA, J.A.; 2006. Soil phosphorus availability and transformation rates in relictic pinsapo fir forests from southern Spain. *Biogeochemistry* 78(2): 151-172.
- VITOUSEK, P.M. & HOWARTH, R.W.; 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur?. *Biogeochemistry* 13: 87-115.