

# CONSECUENCIAS DE LA DEPOSICIÓN ATMOSFÉRICA DE NITRÓGENO Y FÓSFORO EN LAS COMUNIDADES VEGETALES Y MICROBIOTA DEL SUELO EN ECOSISTEMAS DE ALTA MONTAÑA

CRISTINA ARMAS<sup>1</sup>, FRANCISCO M. USERO<sup>1</sup>, JOSÉ ANTONIO MORILLO<sup>1</sup>,  
SUSANA RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA<sup>2</sup>, SARA SÁNCHEZ-MORENO<sup>3</sup>,  
ALEXANDRA RODRÍGUEZ<sup>2</sup>, RAÚL OCHOA-HUESO<sup>4</sup>, JORGE DURÁN<sup>2</sup>,  
ROCÍO ALONSO<sup>5</sup>, FRANCISCO I. PUGNAIRE<sup>1</sup>, ESTEBAN MANRIQUE<sup>6</sup>

## RESUMEN

Los factores de cambio global con mayor impacto en los ecosistemas de alta montaña son el cambio climático, los cambios de uso del suelo y la deposición de nitrógeno (N) de origen antropogénico. En España, un factor adicional a la deposición de N por sus efectos conjuntos en los ciclos biogeoquímicos, es la deposición de polvo sahariano rico en fósforo (P). Durante tres años hemos simulado deposición de N y P, a través de su adición controlada, en cuatro ecosistemas alpinos de la red de Parques Nacionales de España que siguen un gradiente latitudinal de aridez, analizado sus efectos sobre las comunidades edáficas y vegetación dominante. La abundancia de todos los organismos edáficos y la actividad enzimática microbiana disminuyeron con la aridez del sistema, que también moduló la diversidad de las comunidades edáficas y favoreció una mayor prevalencia del canal de descomposición bacterívoro en la comunidad de nematodos. La adición de P incrementó la abundancia de microorganismos, moduló la composición de las comunidades bacterianas (diversidad  $\beta$ ) y simplificó la red trófica edáfica al aumentar la abundancia relativa de nematodos microbívoros. En cambio, la adición de N tuvo efectos en todos los componentes bióticos, sobre todo en el parque más árido (Teide), favoreciendo una mayor abundancia de hongos y nematodos, un mayor acoplamiento de las actividades enzimáticas e influyó en la diversidad  $\beta$  bacteriana. En el Teide, la fertilización con N también favoreció la productividad, contenido de N en hoja y la eficiencia en el uso de agua del arbusto dominante. Estos resultados muestran como los efectos combinados del enriquecimiento en N y P fueron complejos, y sugieren que el aumento de la aridez y de la deposición de N atmosférico debido al cambio global, unido al potencial aumento de la deposición de P sahariano, podrían tener

<sup>1</sup> Estación Experimental de Zonas Áridas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (EEZA-CSIC). Carretera de Sacramento s/n, 04120 La Cañada, Almería, España. E-mail: cris@eeza.csic.es

<sup>2</sup> Centre for Functional Ecology (CFE). Department of Life Sciences, University of Coimbra. Calçada Martim de Freitas, 3000-456 Coimbra, Portugal.

<sup>3</sup> Departamento de Medio Ambiente y Agronomía. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-CSIC). Carretera de la Coruña km 7.5. 28040 Madrid, España.

<sup>4</sup> Departamento de Biología – Universidad de Cádiz. Avenida del Pueblo Árabe Saharawi, s/n, 11510, Puerto Real, Cádiz.

<sup>5</sup> Ecotoxicología de la Contaminación Atmosférica, CIEMAT, Avenida Complutense 40, Edif.70, CP 28040, Madrid, España.

<sup>6</sup> Real Jardín Botánico, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, c/ Claudio Moyano, 1, 28014 Madrid, España.

efectos a largo plazo en las interacciones planta-suelo y en la composición y funciones ecosistémicas de las redes tróficas edáficas y vegetación de alta montaña.

**Palabras clave:** Bacterias; Cambio Global; Ciclos biogeoquímicos; Ecología de suelos; Ecosistemas alpinos y subalpinos; Hongos; Interacciones planta-suelo; Matorral; Nematodos; Red trófica edáfica; Vegetación.

## EFFECTS OF ATMOSPHERIC NITROGEN AND PHOSPHOROUS DEPOSITION ON PLANT AND SOIL MICROBIOTA COMMUNITIES IN ALPINE SYSTEMS

### ABSTRACT

The main global change drivers with larger impacts on high mountain ecosystems are climate change, land use change and nitrogen (N) deposition. In Spain, an additional factor to N deposition, due to their joint impacts on biogeochemical cycles, is the deposition of Saharan dust rich in phosphorus (P). For three years, we have simulated N and P deposition, through their controlled addition of nutrients, in four alpine and sub-alpine systems of the Spanish National Park Network along an aridity gradient, and analyzed their effects on soil communities and dominant vegetation. The abundance and activity of all soil organisms decreased as aridity increased, which also influenced their biodiversity and functioning, increasing the prevalence of the bacterivorous decomposition channel in the nematode community. Simulated P deposition increased microorganisms abundance, modulated the bacterial community composition ( $\beta$ -diversity) and simplified the edaphic trophic network by increasing the relative abundance of microbivorous nematodes. Simulated N deposition treatments had effects on all biotic components, particularly in the most arid park (Teide), increasing the abundance and biomass of fungi and nematodes, the coupling of extracellular enzymatic activities and affecting bacterial  $\beta$ -diversity. In the most arid park, N enrichment also increased plant productivity, leaf N concentration and water use efficiency of the dominant shrub species. The combined effects of the N and P soil enrichment were complex. Our results indicate that forecasted increases in aridity and atmospheric N deposition, together with the potential increase in Saharan P deposition, should have long-term effects on plant-soil interactions, altering biogeochemical cycles and the structure and composition of soil food webs and plant communities and the ecosystem functions of these high mountain systems.

**Keywords:** Alpine and subalpine ecosystems; Bacteria; Biogeochemical cycles; Fungi; Global Change; Nematodes; Plant-soil interactions; Shrubland; Soil Ecology; Soil food webs; Vegetation.

### INTRODUCCIÓN

Las montañas ocupan alrededor del 25% de la superficie terrestre emergida a nivel mundial, albergan un importante elenco de puntos calientes de biodiversidad y proporcionan hasta el 80% del suministro de agua dulce del mundo (KÖRNER 2007; DONHAUSE & FREY 2018).

Debido a su inaccesibilidad, los ecosistemas alpinos, definidos como aquellos que se encuentran por encima del límite superior de los bosques o *treeline* (NAGY & GRABHERR 2009), también representan algunas de las últimas áreas silvestres prístinas en la Tierra (KÖRNER 2007). Sin embargo, su biodiversidad y funcionamiento están seriamente amenazados por el impacto que tienen distintos factores de cambio global, entre

los que destacan principalmente, los efectos del calentamiento global (por ejemplo, PAULI *et al.* 2012; STEINBAUER *et al.* 2018; y en España, BENITO *et al.* 2011; ESCUDERO *et al.* 2015), los cambios de uso de suelo (NAGY & GRABHERR 2009) y la deposición de nitrógeno (N) atmosférico proveniente de distintas actividades antrópicas (WALKER *et al.* 2001; KÖRNER 2017).

El N es un elemento imprescindible para todas las formas de vida de la Tierra, y su baja disponibilidad en los ecosistemas terrestres limita y regula la productividad primaria (SUTTON *et al.* 2011; GARCÍA-GÓMEZ *et al.* 2017). Sin embargo, en el último siglo se ha producido un fuerte incremento en la producción de nitrógeno reactivo (Nr), que se emplea principalmente como fertilizante en actividades agrícolas, emitiéndose también por la ganadería intensiva y como subproducto del refinamiento y combustión de combustibles fósiles. En términos generales, se estima que la cantidad de Nr depositado en los ecosistemas terrestres se ha incrementado entre 5 a 10 veces a lo largo del siglo XX, alterando el ciclo natural del N, la composición de la biota y diversas funciones clave de los ecosistemas, afectando negativamente al clima, la salud humana y la seguridad alimentaria y energética (GALLOWAY *et al.* 2008; BOBBINK *et al.* 2010; ERISMAN *et al.* 2011; MOORE *et al.* 2020). Una continua deposición de Nr puede ocasionar la eutrofización y acidificación de los ecosistemas edáficos, reducir la diversidad de especies vegetales nativas e inhibir en distinto grado numerosos procesos microbianos, como la descomposición de la materia orgánica, el ciclo del C y otros nutrientes, o las emisiones y asimilación de gases de efecto invernadero (BOBBINK *et al.* 2010; ERISMAN *et al.* 2013; LAFUENTE *et al.* 2020). Los estudios sobre deposición de N realizados en España han sido revisados en un reciente monográfico en la revista *Ecosistemas* (2017, Vol. 1) y en LAFUENTE *et al.* (2020), donde se destaca que (i) los niveles de deposición regional de las distintas formas de Nr son variables, registrándose valores de hasta 23 kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en el noroeste peninsular (GARCÍA-GÓMEZ *et al.* 2017), observándose todavía cierta tendencia general a seguir aumentando, aunque las emisiones se hayan estabilizado o incluso disminuido para algunos compuestos (AVILA & AGUILLAUME 2017; MAPAMA 2017); (ii) los

ecosistemas con más riesgo de verse afectados por estos contaminantes son los sistemas montañosos y ecosistemas alpinos (GARCÍA-GÓMEZ *et al.* 2014 y 2017) y; (iii) es importante analizar el aporte de nutrientes debido a las tormentas de polvo mineral sahariano. Así, aunque los eventos de intrusión de polvo sahariano no contienen Nr, en la actualidad constituyen un vector de captación, transporte y deposición de contaminantes nitrogenados, emitidos principalmente en el noroeste de África debido a su reciente industrialización (refinerías de petróleo e industria de fertilizantes; RODRÍGUEZ *et al.* 2011; AVILA & AGUILLAUME 2017).

Tanto la Península Ibérica como el archipiélago canario se ven sometidos a frecuentes eventos de deposición de polvo sahariano. Este polvo es rico en diversos elementos minerales que son limitantes para el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos y terrestres; entre ellos, destacan el fósforo (P), el calcio (Ca) y el hierro (Fe) (MORALES-BAQUERO *et al.* 2013). El transporte, suspensión en la atmósfera y posterior deposición del polvo sahariano juegan también un importante papel en el clima global, en los ciclos biogeoquímicos y en la productividad de los ecosistemas terrestres y acuáticos (OKIN *et al.* 2004; MAHOWALD *et al.* 2010). Se considera que casi un 50% de todo el polvo mineral emitido a la troposfera (ca.  $0.8 \times 10^9$  T año<sup>-1</sup>) procede del Sahara y el Sahel (QUEROL *et al.* 2019). Además, la cantidad de polvo sahariano exportado a la atmósfera se ha incrementado en las últimas décadas debido al aumento de las sequías en el Norte de África (PROSPERO & LAMB 2003, pero ver AVILA & AGUILLAUME 2017; QUEROL *et al.* 2019) y a los procesos de desertificación inducidos por la actividad humana (MOULIN & CHIAPELLO 2006). En España, entre el 10% (noroeste peninsular) y 31% (sureste peninsular y Canarias) de los días, hay entradas significativas de polvo sahariano (QUEROL *et al.* 2019), estimándose que la deposición de P en los ecosistemas peninsulares está en torno a los 0.1-2 kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, con picos puntuales de hasta 27 kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en el archipiélago canario y Sierra Nevada (QUEROL *et al.* 2019; PÉREZ-MARTÍNEZ *et al.* 2020).

El N y el P son nutrientes esenciales para la productividad del suelo y la vegetal. Su disponibili-

dad y las relaciones estequiométricas entre estos dos elementos esenciales son determinantes en una gran variedad de funciones ecosistémicas, ya que ambos están estrechamente vinculados a través de distintos procesos biogeoquímicos, tales como el reciclado de nutrientes, la fotosíntesis y la productividad vegetal (PEÑUELAS *et al.* 2012). En definitiva, la disponibilidad y la abundancia relativa de N y P se encuentran entre los principales controles del funcionamiento de los ecosistemas terrestres y su biodiversidad (SALA *et al.* 2000; PEÑUELAS *et al.* 2012). Aun así, apenas existen trabajos científicos que hayan analizado los efectos de la deposición conjunta de N y P en la estructura (composición y abundancia de organismos) y respuestas de los ecosistemas españoles de alta montaña. En el proyecto que resumimos en el presente capítulo, nos planteamos dos objetivos principales en cuatro áreas de alta montaña de la red de Parques Nacionales: (i) caracterizar las comunidades de microorganismos (bacterias y hongos) y microfauna (nematodos) edáfica, y (ii) analizar los efectos potenciales de la deposición atmosférica de N (contaminante) y P (origen natural) en la composición y estructura de la microbiota edáfica, en su actividad, en los ciclos de nutrientes y en la respuesta de la vegetación predominante.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Sitios de estudio y diseño experimental

Entre junio y julio de 2016 se seleccionó un área experimental de aproximadamente 25 x 25 m en los sistemas alpinos de cuatro Parques Nacionales (de sur a norte y siguiendo un gradiente de mayor a menor aridez; fotos en la Figura 1): Teide, Sierra Nevada, Sierra de Guadarrama y Picos de Europa. Todas las áreas estaban por encima de los 2000 msnm de altitud, excepto en Picos de Europa (1700 m; límite superior del piso subalpino), siempre por encima del límite de crecimiento del bosque (*treeline*). La vegetación predominante en todas las áreas es un matorral de escasa cobertura disperso en una matriz de suelo desnudo o con algunas especies perennes de muy bajo porte, excepto en Picos de Europa, cuya área experimental está ubicada en un pastizal con 100% de cobertura y colonizado por arbus-

tos de gran porte (Fig. 1). Las especies arbustivas dominantes en cada área experimental eran: *Pterocephalus lasiospermus* Link ex Buch (Teide), *Cytisus galianoi* Talavera & P.E. Gibbs (Sierra Nevada), *Cytisus oromediterraneus* Rivas Mart. *et al.* (Sierra de Guadarrama) y *Genista obtusiramea* J. Gay ex Spach (Picos de Europa).

Dentro de cada área experimental (vallada para evitar la entrada de grandes herbívoros) se establecieron parcelas de fertilización (cada una de 2.5 x 2.5 m y separadas por 1.5 m), siguiendo un diseño factorial de fertilización con fósforo (P) y nitrógeno (N), con los siguientes niveles: P (0 y 10 kg P ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; a partir de ahora P0 y P10, respectivamente) y N (0, 10 y 20 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>; en forma de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; a partir de ahora N0, N10 y N20, respectivamente), con 6 réplicas por nivel, dando un total de 36 parcelas por parque (144 parcelas en total). La fertilización se aplicó durante tres años (2016-2019) en dos tandas anuales, una en primavera tardía (mayo-junio) y la otra a mediados de otoño (octubre-noviembre) y añadiendo solo 1 L de solución por parcela para no modificar de forma significativa la humedad del perfil del suelo. Las fechas concretas de la fertilización se seleccionaron dependiendo de la meteorología (deshielo y comienzo de nevadas) en cada parque.

### Recogida de las muestras del suelo

La toma de muestras se realizó durante la estación de crecimiento vegetal en estos sistemas alpinos (finales de primavera y verano) y antes de la adición de N y P en ese año. En el presente capítulo presentamos los análisis de las muestras recogidas en los años 2018 y 2019, tras dos y tres años desde el comienzo de las fertilizaciones, respectivamente. Se extrajeron perfiles de suelo de 0-10 cm de profundidad en cada parcela de fertilización (36 parcelas por parque y 144 muestras en total). Cada muestra se tomó insertando un anillo de PVC de 25 cm de diámetro en el suelo. Se extrajo todo el contenido de los primeros 10 cm de profundidad en dos tandas sucesivas. La muestra de suelo entre los 0-5 cm de profundidad se dividió en dos partes: unos 300 g se tamizaron *in situ* con un tamiz con una malla de 2 mm de paso; esta muestra sirvió para el posterior análisis de las características físico-químicas del

suelo, actividad enzimática y estructura (abundancia y composición) de las comunidades de microorganismos del suelo (hongos y bacterias). Otra fracción de 200 g de suelo sin tamizar recogida entre los 0-5 cm de profundidad se mezcló con la fracción de suelo extraída entre los 5-10 cm y esta muestra compuesta de suelo (0-10 cm de profundidad) se utilizó para extraer los nematodos del suelo en los siguientes tratamientos: P0-N0, P0-N20, P10-N0, P10-N20. Todas las muestras fueron transportadas en bolsas de plástico selladas y conservadas en frío (~ 4°C); las muestras para extracción de ADN se mantuvieron a -20°C hasta el momento de su procesado. El material para la recolección de los suelos (palas, PVC guía, tamices y cubos) se trató con alcohol de 96° entre cada muestra. La secuencia de muestreo en las parcelas fue en orden ascendente de fertilización; primero se muestrearon las seis parcelas control (P0-N0) y las últimas fueron las parcelas P10-N20.

### Procesado y análisis de las muestras de suelo

*Características físico-químicas.* El pH de las muestras de suelo fue medido con un pH-metro (Crison, Barcelona, Spain) en una solución acuosa 1:2.5 (vol/vol) de suelo:agua. El contenido en carbono (C) y N total fueron estimados utilizando un analizador LECO Truspec (St. Joseph, MI, USA). El C orgánico (SOC) se analizó después de eliminar el C inorgánico de la muestra de suelo utilizando una solución de HCl 2M. El contenido en el resto de elementos y nutrientes se analizó después de una digestión ácida y mediante espectrometría de emisión por plasma (ICAP 6500 DUO Thermo; Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Estos análisis se realizaron en el laboratorio de ionómica del instituto CEBAS-CSIC (Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Murcia). Además, se analizó la cantidad de N ( $\text{NH}_4\text{-N}$  y  $\text{NO}_3\text{-N}$ ) y P ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ) inorgánico de las muestras. Los protocolos de extracción y determinación de estos compuestos (métodos del indofenol para N y azul de molibdeno para P, determinación por colorimetría) se pueden consultar en SIMS *et al.* (1995) y ALLEN *et al.* (1986), respectivamente.

*Actividad enzimática.* Se analizó el efecto de la fertilización en la actividad enzimática ex-

tracelular del suelo siguiendo el protocolo de BELL *et al.* (2013). En total se analizaron ocho actividades enzimáticas, cuatro relacionadas con el ciclo del C ( $\beta$ -1,4-glucosidasa [BG],  $\beta$ -D-celobiohidrolasa [CB],  $\beta$ -xylosidasa [XYL] y  $\alpha$ -1,4-glucosidasa [AG]), dos con el del N ( $\beta$ -1,4-N-acetilglucosaminidasa [NAG] y L-leucinaminopeptidasa [LAP]), una con el del P (fosfatasa [PHOS]) y, finalmente, una con el de azufre (S) (arilsulfatasa [AS]).

*Análisis de las comunidades bacterianas y fúngicas.* Se realizaron análisis mediante técnicas de biología molecular y genética para la determinación de la abundancia microbiana, diversidad y composición taxonómica de las comunidades microbianas edáficas en los suelos recogidos en 2018. En 2019 analizamos de nuevo las abundancias. Para ello, se extrajo el ADN total de cada muestra de suelo usando el kit DNeasy Power-soil® (Qiagen, Inc., Venlo, Netherlands). Este ADN se dividió en dos alícuotas y se conservó a -80°C hasta su análisis. Para estimar la abundancia microbiana, expresada como número de copias de genes marcadores por gramo de suelo, la primera alícuota de cada muestra fue sometida a qPCR (PCR cuantitativa) usando como genes marcadores las regiones V4 del gen rRNA 16S e ITS1 para bacterias y hongos, respectivamente. Se emplearon los siguientes cebadores específicos: 515f (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 806r (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') (WALTERS *et al.* 2016) para bacterias, e ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; GARDES y BRUNS 1993) e ITS5.8S (5'-CGCTGCGTTCTTCATCG-3'; VILGALYS *et al.* 1990) para hongos. Las qPCR se realizaron en un equipo CFX96 TM Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories, USA). Se incluyeron tres réplicas técnicas por muestra de ADN, y la curva estándar fue generada con diluciones de ADN sintético de cada marcador. La eficiencia de las qPCR varió entre el 75% y 95% ( $r^2 > 0.9$ ).

La segunda alícuota de ADN (una por muestra de suelo) se envió a un laboratorio especializado (GENYO, Centro de Genómica e Investigación Oncológica de la Univ. de Granada y Junta de Andalucía) para la amplificación y secuenciación de marcadores microbianos siguiendo el protocolo del "Earth Microbiome Project" (<https://earth->

microbiome.org/). Para analizar la composición bacteriana, se secuenció la región V4 del gen rRNA 16S, usando los cebadores 515f-806r referidos anteriormente. Para el caso de la comunidad fúngica, se secuenció la región ITS1, empleando los cebadores ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') (WALTERS *et al.* 2016). El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se realizó en la EEZA-CSIC usando la plataforma de análisis Qiime2 (<https://qiime2.org/>) mediante el método DADA2 (<https://benjjneb.github.io/dada2/index.html>). Así mismo se usó Qiime2 para calcular los índices de diversidad  $\alpha$  y  $\beta$ . Los detalles metodológicos sobre el procesamiento de ADN, qPCR y análisis bioinformáticos se pueden consultar en USERO *et al.* (2021).

**Comunidad de nematodos:** Aproximadamente 25 g de las muestras compuestas de suelo sin tamizar (0-10 cm de profundidad) fueron utilizados para estimar la humedad relativa del suelo mediante secado en estufa a 70°C hasta peso constante. El resto de la muestra se utilizó para extraer los nematodos del suelo mediante un proceso de lavado, tamizado en húmedo y decantación que permite reducir el volumen de la muestra y extraer todos los nematodos móviles de la misma en embudos de Baermann. Una vez extraídos, todos los nematodos de cada muestra se contaron bajo una lupa binocular, y sus abundancias se expresaron como número de individuos / 100 g de suelo seco. Después, al menos 100 nematodos de cada muestra se identificaron mediante microscopía óptica a nivel de género o familia. Los taxones identificados fueron clasificados en cinco grandes grupos tróficos: herbívoros, fungívoros, bacterívoros, omnívoros y predadores. Basándose en las abundancias de estos grupos funcionales, se calcularon varios índices ecológicos (FERRIS *et al.* 2001) y la biomasa estimada de cada grupo (FERRIS, 2010). Los detalles, interpretación y relevancia de todos estos índices se pueden consultar en SÁNCHEZ-MORENO *et al.* (2021).

## Respuesta de la vegetación

La vegetación de las parcelas experimentales de los Parques Nacionales bajo estudio es un matorral disperso sobre suelo desnudo colonizado por algunas especies perennes subordinadas de escasa cobertura, excepto en Picos de Europa

(Fig. 1). En cada Parque determinamos el crecimiento de las especies arbustivas dominantes y de algunas especies subordinadas relevantes. Para ello, cada parcela experimental contenía al menos un arbusto diana al que se le marcaron los ápices de 2-4 ramas en 2-4 orientaciones cardinales, para seguir su crecimiento anual. Además, en 2018 y 2019 se estimó la biomasa y el contenido en N, P y C en el nuevo crecimiento. En 2019 se estimó la eficiencia en el uso del agua de las plantas a través de la determinación de las proporciones isotópicas del C en las hojas o ramitas.

## Análisis estadísticos

El análisis del efecto de las distintas simulaciones de N y P sobre las características abióticas y actividad de los suelos, las abundancias y diversidad  $\alpha$  de las comunidades de hongos, bacterias y nematodos, así como la respuesta de la vegetación en los distintos parques se realizó mediante modelos lineales. Se analizaron las posibles diferencias usando como factores fijos: Parques Nacionales (4 niveles: Teide, Sierra Nevada, Sierra de Guadarrama y Picos de Europa), la adición de P (dos niveles: P0, P10) y de N (tres niveles: N0, N10, N20) y las interacciones estadísticas entre estos factores. Las asunciones de normalidad y homocedasticidad fueron evaluadas mediante un análisis exploratorio de los residuos. Así, en el caso que fuera necesario, se transformaron las variables, por ejemplo,  $\log_{10}$  (abundancia de organismos edáficos). Además, y por lo general, se incluyó en la modelización la función *varIdent* para el factor Parques para evitar potenciales problemas de heterocedasticidad. La comparación de medias entre tratamientos se realizó mediante el test post-hoc LSD de Fisher y la significación se estableció a  $p < 0.05$ . Además, en el caso de la actividad enzimática, se analizó el grado de acoplamiento de los mismos siguiendo la metodología de OCHOA-HUESO *et al.* (2019); este acoplamiento muestra el grado de disrupción en los ciclos biogeoquímicos en los suelos, pudiendo actuar como una alerta temprana sobre cambios que se están produciendo en el funcionamiento de los ecosistemas. Para el análisis de la diversidad  $\beta$  se construyeron matrices de disimilitud con los índices Unifrac ponderado para bacterias, Bray-Curtis para hongos

Consecuencias de la deposición atmosférica de nitrógeno y fósforo en las comunidades vegetales y microbiota del suelo en ecosistemas de alta montaña

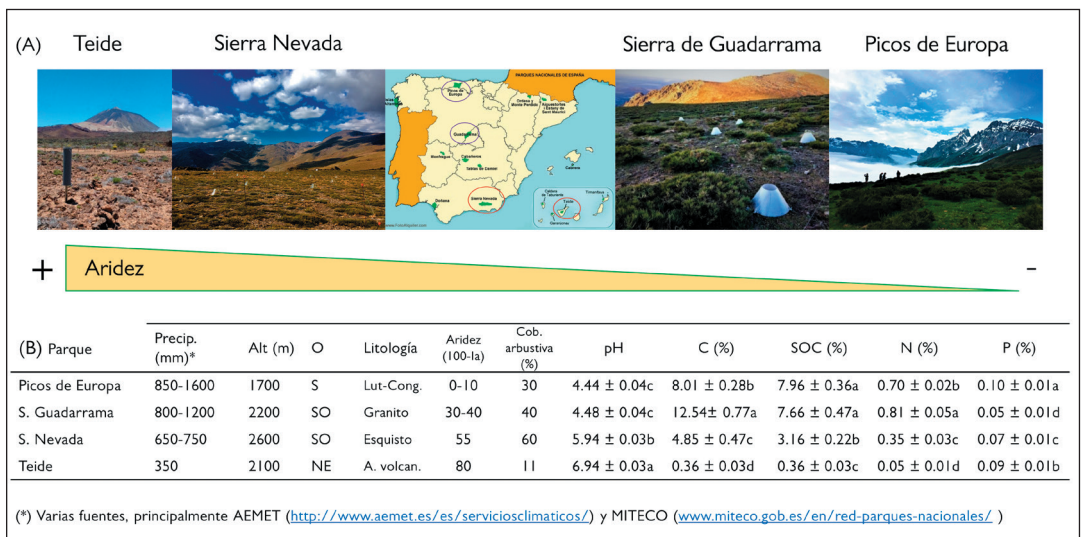
y Jaccard para nematodos y para cada una se realizó un análisis multivariante permutacional de varianza (PERMANOVA) con la función *adonis2* del paquete *vegan*. Todos los análisis estadísticos se realizaron en R v. 3.6.3 (R Development Core Team 2020; <https://www.r-project.org/>).

## RESULTADOS

Los cuatro Parques Nacionales se ubican a lo largo de un gradiente latitudinal de aridez creciente

hacia el sur que determinó la productividad vegetal y el contenido de C orgánico en los suelos (SOC; Figura1). Así, la cobertura vegetal (11%) y el SOC fueron mínimos en el sistema más árido (Teide), mientras que en el más húmedo (Picos de Europa), donde el matorral está inserto en una matriz de pradera con una cobertura del 100%, el SOC es máximo, estando los ecosistemas de los otros dos Parques entre estos dos extremos.

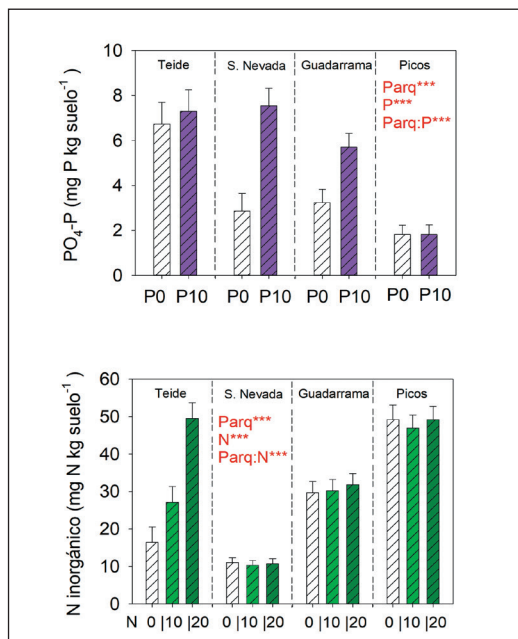
Los tratamientos de deposición simulada de N y P tuvieron efectos en el contenido final (2019) de P ( $PO_4\text{-P}$ ) y N ( $NH_4\text{-N}$  y  $NO_3\text{-N}$ ) inorgánico del



**Figura 1.** Panorámicas de las parcelas de experimentación en los distintos Parques Nacionales (de izquierda a derecha: Teide, Sierra Nevada, Sierra de Guadarrama y Picos de Europa). (B) Características generales de las parcelas experimentales. Se indica el rango de precipitación promedio en el área (de esta se estima que entre un 70 y un 95 % cae en forma de nieve); altitud de la parcela de experimentación; orientación de la ladera principal; litología predominante (lutitas y conglomerados en Picos, arenas volcánicas en Teide); el índice de aridez (modificación del índice de Martonne, siendo  $Ia = P / (10 + T)$  donde P y T son la precipitación y temperatura medias anuales); cobertura arbustiva y; diversas características de los suelos en el año 2019 (0-5 cm; medias ± E. E. n = 36): pH, y contenidos de carbono total (C), carbono orgánico (SOC), nitrógeno total (N), fósforo total (P). Números dentro de cada columna con letras distintas indican diferencias significativas entre parques. No hubo diferencias para los distintos tratamientos de adición de nutrientes dentro de cada Parque excepto para el contenido de P, donde la simulación de deposición P incrementó los valores de este nutriente (y del contenido de fósforo) en todos los parques. Paneles modificados de los publicados en SÁNCHEZ et al. (2021). En este artículo también se incluyen imágenes satelitales de tormentas de polvo sahariano en los años 2016, 2018 y 2020 y modelos espaciales de depósito de Nr en la Península Ibérica.

**Figure 1.** (A) Photos of the experimental plots of the different National Parks (from left to right: Teide, Sierra Nevada, Sierra de Guadarrama and Picos de Europa). (B) Characteristics of the experimental plots: precipitation range: Precip. (mean annual rainfall, between 70 to 95% of the precipitation falls in the form of snow); elevation (Altitude); aspect (Orient.); lithology (shales and conglomerates in PN Picos de Europa; volcanic sands in PN del Teide); a modification of the Martonne aridity index (Aridity;  $Ia = P / (10 + T)$ , where P and T are mean annual values of precipitation and temperature; shrub cover (cobertura arbustiva), and; several properties of soils collected in 2019 (0-5 cm; means ± S.E., n = 36) as pH, total carbon (C), organic carbon (SOC), total nitrogen (N) and total phosphorus (P) contents. Numbers within a column with different letters indicate significant differences across parks for that variable (LDS Fisher post-hoc test;  $p < 0.05$ ). There were no significant differences across the different simulated deposition treatments, except for P content (and phosphate content) that was greater with P addition in all parks. Both panels are modifications of those published in SÁNCHEZ et al. (2021). This manuscript also contains satellite images of Saharan dust storms in 2016, 2018 and 2020, and spatial models of Nr deposition in the Iberian Peninsula.

suelo de las parcelas experimentales (Figura 2), pero el efecto varió entre los diferentes parques y nutrientes considerados. Específicamente, la adi-



**Figura 2. Fosfato y N mineral en los suelos** en las parcelas de experimentación en los distintos Parques Nacionales en el año 2019 ( $n=23$  y 12 por cada nivel de adición de P y N, respectivamente, y parque). Las barras son medias  $\pm$  E. E. El orden de presentación de los parques es: Teide, S. Nevada, S. Guadarrama y Picos de Europa, separados por líneas punteadas. La leyenda de colores (tratamientos de deposición de nutrientes) de las barras son los siguientes: Para el contenido de fosfato, blanco indica sin fertilización con P (P0) y violeta con fertilización con P (P10;  $10 \text{ kg P ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ); para el contenido de N mineral, blanco indica sin fertilización de N (N0), y verde claro (N10;  $10 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) y verde oscuro con fertilización de N (N20;  $20 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). Las letras en rojo indican qué factores fijos tuvieron efectos significativos (Parq-Parques y P y N para deposición de P y N; \*, \*\*, \*\*\* para  $p < 0.05, 0.01, 0.001$ , respectivamente).

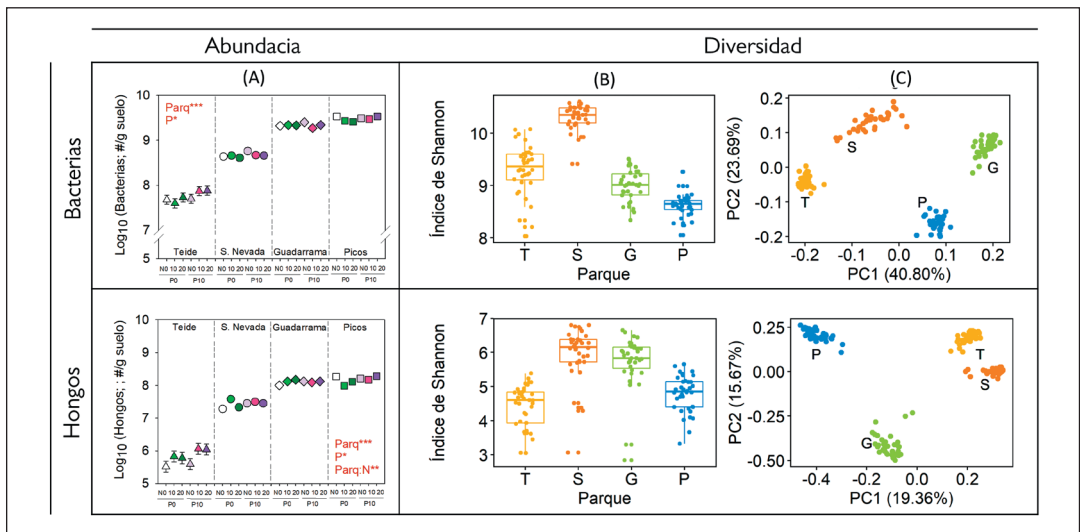
**Figure 2. Phosphate and mineral N in soils** of the experimental plots in the different National Parks in 2019 ( $n = 23$  and 12 for each level of P and N addition, respectively, and park). Bars are means  $\pm$  S. E. The order of presentation of the parks is: Teide, S. Nevada, S. Guadarrama and Picos de Europa, separated by dotted lines. Bars color legends (nutrient deposition levels) are as follows: For phosphate content, white indicates without P fertilization (P0) and violet with P fertilization (P10;  $10 \text{ kg P ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ); for mineral N content, white indicates without N fertilization (N0), and light green (N10;  $10 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) and dark green with N fertilization (N20;  $20 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). The letters in red indicate that fixed factors had significant effects (Parq-Parks and P and N for deposition of P and N; \*, \*\*, \*\*\* for  $p < 0.05, 0.01, 0.001$ , respectively).

ción de P afectó al contenido de fosfatos en los suelos en Sierra Nevada y Sierra de Guadarrama, mientras que la de N afectó al contenido de N mineral solo en el Parque Nacional del Teide.

El grado de aridez fue también uno de los principales determinantes de la abundancia, composición y estructura de las comunidades de microorganismos (hongos y bacterias) y microfauna (nematodos) edáficas y de su actividad, estando todas ellas moduladas también por las características físico-químicas de los suelos y, en menor medida, por los tratamientos de adición de N y P. Así, tanto en 2018 como en 2019, dos y tres años después de comenzar los tratamientos experimentales, las abundancias de bacterias y hongos difirieron entre parques. La abundancia de hongos y bacterias disminuyó con la aridez, pero aumentó en todos los parques con la adición de P, mientras que solo los hongos respondieron a la adición de N y solo en el parque más árido, Teide (Figura 3A).

El índice de diversidad de Shannon  $H'$  (por tanto, muestra la riqueza ponderada por abundancia relativa) reveló unos valores de diversidad  $\alpha$  más altos, tanto para bacterias como para hongos en Sierra Nevada, el sitio experimental a mayor altitud (Figura 3B). Además, hubo una mayor diversidad bacteriana en los parques más áridos y un descenso de la diversidad fúngica en los parques de los dos extremos del gradiente de aridez. Excepto en Sierra Nevada, la diversidad de hongos tendió a aumentar y la de bacterias a disminuir con el aumento en el contenido en C orgánico del suelo (Figura 4), pero la adición de N y P no produjo cambios estadísticamente significativos en la diversidad  $\alpha$  en ninguno de los parques. En cambio, la diversidad bacteriana  $\beta$  sí se vio influida tanto por el origen de los suelos (Parque Nacional; Pseudo-F=181.16;  $p < 0.001$ , Figura 3C), como por los tratamientos de adición de nutrientes (Pseudo-F=2.69 y 2.95 y 2.69 para la adición de N y P, respectivamente;  $p < 0.05$ ), mientras que la diversidad  $\beta$  de las comunidades de hongos solo difirió entre parques (Pseudo-F=42.37;  $p < 0.001$ ; Figura 3C). Estas claras diferencias entre parques en diversidad  $\beta$  se reflejan en una composición taxonómica diferente, con un cambio de orden en la abundancia relativa de algunos de los principales filos bacterianos





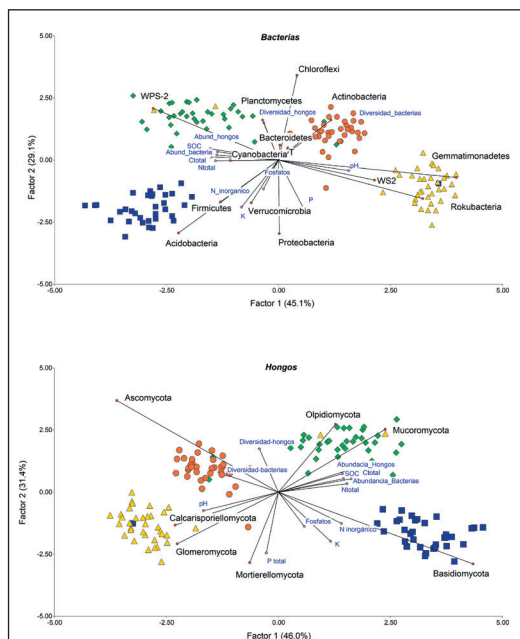
**Figura 3. Abundancia de microorganismos y diversidad  $\alpha$  (índice de Shannon) y  $\beta$  (columna de la derecha) de la comunidad de bacterias (fila superior) y hongos (fila inferior) de los suelos en las parcelas de experimentación (n=36 por parque) en los distintos Parques Nacionales en el año 2018 y 2019 (solo abundancia).** Las abundancias de bacterias y hongos se midieron como el número de copias del gen marcador correspondiente (de hongos o bacterias, ver métodos) por gramo de suelo, siendo la determinación por qPCR. Los símbolos y barras de las abundancias son medias  $\pm$  S. E. La leyenda de formas (parques) y colores (tratamientos de adición de nutrientes) de estos símbolos son los siguientes: triángulos para Teide, círculos para Sierra Nevada, rombos para Sierra de Guadarrama y cuadrados para Picos de Europa; mientras que los colores dentro de cada parque indican los niveles de fertilización con P y N y aparecen por orden de izquierda a derecha como blanco (P0N0, control), verde claro (P0N10), verde oscuro (P0N20), lila claro (P10N0), lila oscuro (P10N10) y violeta (P10N20). Las letras en rojo indican que factores fijos tuvieron efectos significativos (Parq para Parques y P y N para deposición de P y N; \*, \*\*, \*\*\* para  $p < 0.05, 0.01, 0.001$ , respectivamente). La diversidad- $\alpha$  se muestra con diagramas de caja (box-plot) que representan: la mediana (línea interior de la caja); los cuartiles 1<sup>o</sup>-percentil 75- y 3<sup>o</sup>-percentil 25- (límites superior e inferior de la caja); los valores máximo y mínimo (límite de las barras o líneas) y los valores atípicos (puntos). Las letras "T, S, G, P" del eje de las x (diversidad- $\alpha$ ) y leyenda de la diversidad- $\beta$  corresponden, respectivamente, a los parques nacionales de: Teide, Sierra Nevada, Sierra de Guadarrama y Picos de Europa, respectivamente. La diversidad- $\alpha$  bacteriana fue mayor en los parques más áridos (S>T>G>P;  $F_{3,117}=292.26$ ;  $p < 0.001$ ), mientras que la diversidad- $\alpha$  fúngica disminuyó en los dos extremos del gradiente de aridez (S=G>P>T;  $F_{3,119}=37.64$ ;  $p < 0.001$ ).

**Figure 3. Abundance of microorganisms,  $\alpha$ - (left column) and  $\beta$ - (right column) diversity of the soil communities of bacteria (upper file) and fungi (lower file) across the different national parks (n=36 plots per park) in 2018 and 2019 (only abundances).** Bacteria and fungi abundances were measured as marker gene copy numbers per gram of soil (qPCR estimation). Symbols and bars for microbial abundance are means  $\pm$  S. E. The legend for symbol shapes (parks) and colors (nutrient addition treatments) are as follows: triangles (Teide), circles (Sierra Nevada), diamonds (Sierra de Guadarrama) and squares (Picos de Europa); while the colors within each park indicate P and N fertilization levels and appear in order from left to right as white (P0N0, control), light green (P0N10), dark green (P0N20), light lilac (P10N0), dark lilac (P10N10) and violet (P10N20). Red letters indicate which fixed factors had significant effects (Parq for Parks, and P and N for addition of P and N; \*, \*\*, \*\*\* for  $p < 0.05, 0.01, 0.001$ , respectively). Values distribution of  $\alpha$ -diversity within a park is shown with a box-plot that includes the median (line within the box); quantiles Q1 and Q3 -75<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> percentiles- (limits of the box); maximum and minimum values (limits of the whiskers) and outliers (points). The letters "T, S, G, P" in the  $\alpha$ -diversity panels and figure legend ( $\beta$ -diversity) are the National Parks: Teide, Sierra Nevada, Sierra de Guadarrama and Picos de Europa, respectively. Bacterial  $\alpha$ -diversity was highest in the southern and arid parks (S>T>G>P;  $F_{3,117}=292.26$ ;  $p < 0.001$ ), whereas fungal  $\alpha$ -diversity decreases in both ends of the aridity gradient (S=G>P>T;  $F_{3,119}=37.64$ ;  $p < 0.001$ ).

y fúngicos (Figura 4). Así, hubo una tendencia a una mayor presencia relativa de los filos Acidobacteria, Firmicutes y Verrucomicrobia (bacterias) y Basidiomycota (hongos) en el parque con menor aridez (Picos de Europa), mientras que la abundancia relativa del filo Gemmatimonadetes (bacterias) fue mayor en los parques más áridos y con menor SOC, igual que los hongos de los filos

Ascomycota y Glomeromycota. Hubo diversos filos de hongos exclusivos de cada parque, como Calcarisporiellomycota en Teide o Mucoromycota y Olpidiomyocota en la Sierra de Guadarrama.

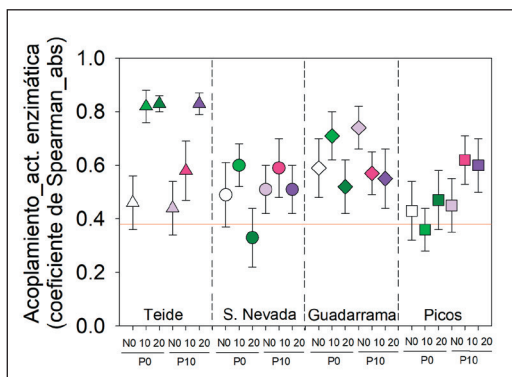
La actividad enzimática extracelular en los suelos difirió notablemente entre parques, pero no así entre tratamientos de adición de nutrientes (DA



**Figura 4.** Regresión PLS mostrando la relación entre las abundancias relativas de los filios dominantes (palabras en negro) de bacterias (panel superior) y hongos (panel inferior) en cada parcela experimental (n=36 por parque) y las distintas características de los suelos, abundancias y diversidad- $\alpha$  de las comunidades de microorganismos (palabras en azul). Las formas y colores de los símbolos representan los distintos parques: triángulos amarillos para Teide, círculos naranjas para Sierra Nevada, rombos verdes para Sierra de Guadarrama y cuadrados azules para Picos de Europa.

**Figure 4.** PLS regression of the relative abundance of dominant phyla (black words) of bacteria (upper) and fungi (lower panel) as a function of soil characteristics and abundance and  $\alpha$ -diversity of each microbial community (blue words). For both panels, symbol color and shape represent parks as follows: yellow triangles (Teide), orange circles (Sierra Nevada), green diamonds (Sierra de Guadarrama) and blue squares (Picos de Europa).

SILVEIRA 2018), siendo, en general, las tasas de actividad más altas en los parques del extremo menos árido del gradiente y en suelos con más SOC y menor pH (Picos de Europa y Guadarrama). Sin embargo, el grado de acoplamiento entre las distintas actividades enzimáticas difirió tanto entre parques como entre tratamientos de adición de N (Figura 5A), siendo el acoplamiento mayor con la adición de N (sobre todo en Teide) sólo o en combinación con la adición de P, mientras que la aplicación de únicamente P no tuvo efectos significativos sobre este acoplamiento. Por último, es interesante destacar las relaciones entre los



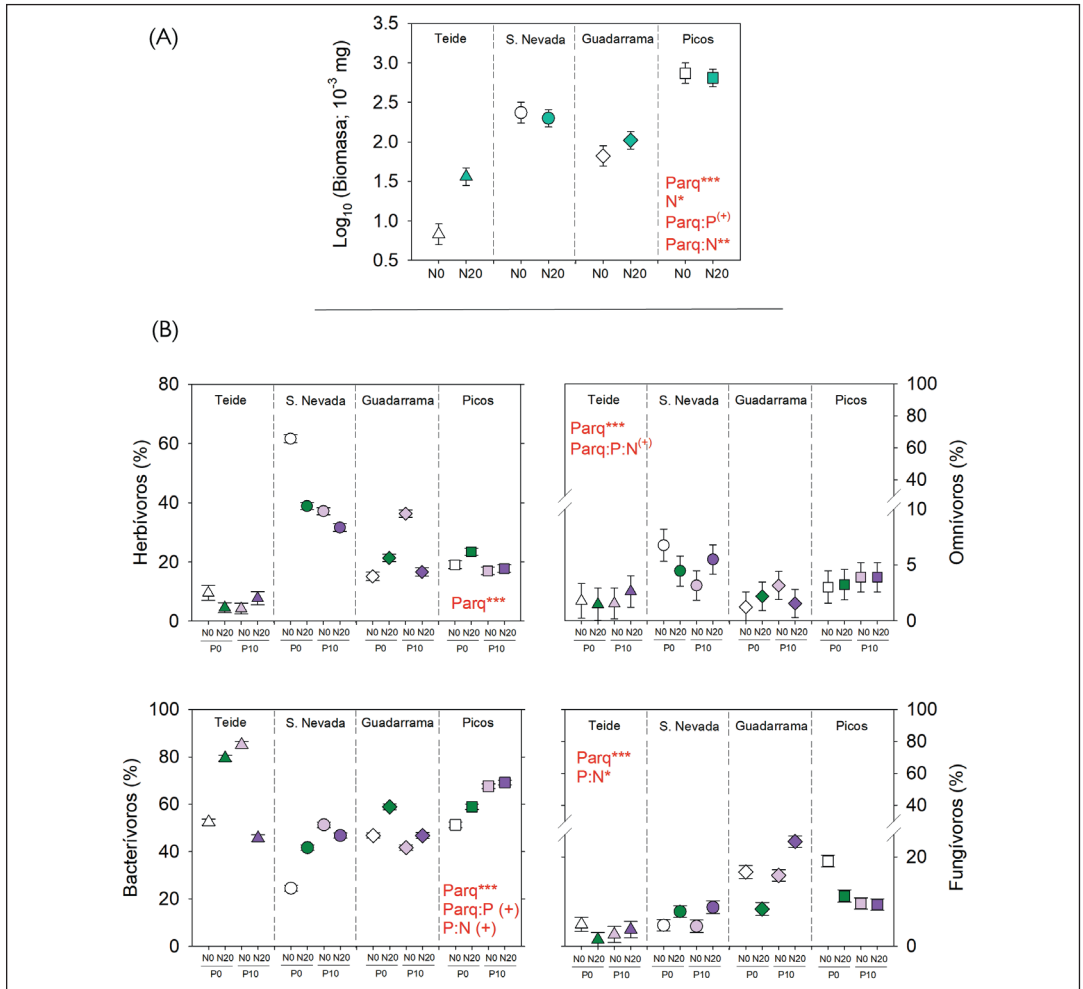
**Figura 5.** Grado de acoplamiento de las distintas actividades enzimáticas en los suelos bajo distintos niveles de deposición simulada de N y P. El coeficiente de correlación de Spearman está en valor absoluto y, por tanto, varía entre 0 y 1; 0 indica una correlación nula (ciclos de nutrientes totalmente desacoplados) y 1 una correlación fuerte (ciclo de nutrientes completamente acoplados). En las actividades enzimáticas, la media del modelo nulo (correlación al azar) es la línea roja. Las barras de error (intervalo de confianza al 95%) que no cruzan con la línea roja suponen que el acoplamiento es significativamente mayor o menor que el azar ( $P < 0.05$ ). Los símbolos diferencian los parques: triángulo (Teide), círculo (S. Nevada); rombo (Guadarrama) y cuadrado (Picos); mientras que los colores distinguen niveles de fertilización de P y N como en los descritos en la leyenda de la Figura 3 para abundancias.

**Figure 5.** Coupling of soil enzymatic activity under different levels of N and P simulated deposition. Spearman correlation coefficient values are in absolute value and, therefore, it varies between 0 and 1; 0 indicates a null correlation (fully uncoupled nutrient cycling), and 1 a strong correlation (fully coupled nutrient cycling). The red line is the mean of the null model (random correlation). Error bars (95% confidence interval) that do not cross the red line denote significant greater or lower coupling than random chance ( $P < 0.05$ ). Type of symbols differentiates the national parks: triangle-Teide, circle-S. Nevada; diamond-S. Guadarrama and square-Picos de Europa; while colors distinguish N and P simulated deposition levels, color legend as in Figure 3 for microbial abundance.

niveles de actividad enzimática y la diversidad y abundancia de bacterias y hongos. Si bien las abundancias de bacterias y hongos estuvieron positivamente correlacionadas con las distintas tasas de actividad enzimática ( $r_{\text{Spearman}} = 0.4-0.9, p < 0.05$ ), la diversidad  $\alpha$  de bacterias solo se correlacionó positivamente con el conjunto de actividades enzimáticas relacionadas con la mineralización del C y N ( $r_{\text{Spearman}} = 0.26, p < 0.001$ ), mientras que en el caso de la comunidad de hongos su diversidad  $\alpha$  se relacionó positivamente con todas las tasas de actividades enzimáticas ( $r_{\text{Spearman}} = 0.3-0.7, p < 0.01$ ).

La abundancia de la comunidad de nematodos también disminuyó con la aridez, y, mientras que la adición de N aumentó su biomasa (Figura 6A) debido al incremento de la abundancia de nematodos bacterívoros, la adición de P incrementó el

porcentaje de microbívoros (fungívoros y bacterívoros), simplificando las redes tróficas (Figura 6B). Los nematodos fungívoros fueron más sensibles que los bacterívoros a los desequilibrios estequiométricos producidos por algunos de los



**Figura 6. Comunidad de nematodos del suelo.** (A) Biomasa total de nematodos en los distintos Parques Nacionales y tratamientos de adición de N (N0 –blanco- y N20 –verde-; medias  $\pm$  E. E.,  $n=12$  por tratamiento y parque). Las letras en rojo indican que factores fijos tuvieron efectos significativos. (B) Abundancias relativas de cada grupo trófico de nematodos en los suelos de los distintos Parques Nacionales y tratamientos de deposición de nutrientes (P y N). Los símbolos y barras son medias  $\pm$  E. E.,  $n=6$ . Las letras en rojo indican qué factores fijos tuvieron efectos significativos (Parq para Parque, y P y N para deposición de P y N; \*, \*\*, \*\*\* para  $p < 0.05, 0.01, 0.001$ , respectivamente (+), significancia marginal a  $p < 0.1$ ). La leyenda de formas de los símbolos y sus colores como en la Figura 3. Ambos paneles y los detalles de los resultados estadísticos pueden consultarse en SÁNCHEZ et al. (2021).

**Figure 6. Soil nematode community** (A) Total biomass of the nematode communities across the different national parks and N addition treatments (N0 –white- and N20 –green-; means  $\pm$  S. E.,  $n=12$  per treatment within each park). Letters in red indicate significant effects of fixed factors on the response variable (Parq for Parks, and P and N for deposition of P and N; \*, \*\*, \*\*\* for  $p < 0.05, 0.01, 0.001$ , respectively (+), marginal significance at  $p < 0.1$ ). Legend of symbol patterns and colors as in Figure 3. Both panels and details on the statistical results are published in SÁNCHEZ et al. (2021).

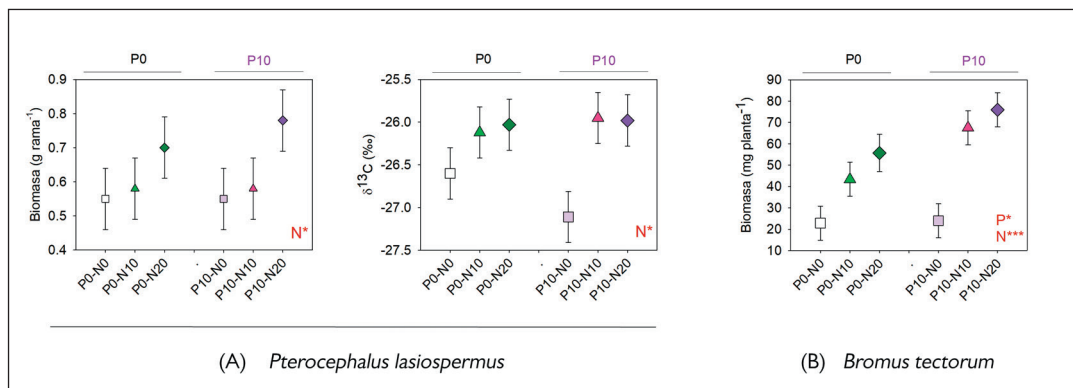
tratamientos de adición de nutrientes (P0N20 y P10N0). En general, las comunidades de nematodos de los sistemas más áridos se caracterizaron por una prevalencia del canal bacterívoro de descomposición de la materia orgánica y por una importancia relativamente baja de la herbivoría subterránea (Figura 6 y consultar detalles en SÁNCHEZ-MORENO *et al.* 2021).

Por último, en cuanto a la vegetación, destacamos aquí los resultados de biomasa del tallo apical (crecimiento de cada año) y contenido de N en hoja (o tallo) de las especies arbustivas dominantes. En los dos parques latitudinalmente más distantes (Picos de Europa y Teide) se produjo un efecto positivo de la fertilización con N en el crecimiento de los arbustos dominantes (significativo para *Genista obtusiramea* en 2017 y 2018 en Picos de Europa, datos no mostrados, y para *Pterocephalus lasiospermus* en 2017 y 2019 en Teide, Figura 7A). Para esta especie endémica del Parque Nacional del Teide, la adición de N se reflejó en un mayor contenido en N en las hojas (Figura 8) y una mayor eficiencia en el uso de agua (Figura 7A). Algo parecido ocurrió en 2018 en el caso de la gramínea *Bromus tectorum*, la única especie subordinada en las parcelas del Parque Nacional

del Teide. Su presencia en el parque está aumentando, sobre todo en las cercanías de los caminos, por lo que su expansión podría estar asociada a un aumento de los niveles de N en el suelo. En concordancia, observamos un aumento significativo de la biomasa de las plantas de *Bromus tectorum* debido, principalmente, a la adición de N, y de modo secundario a la de P (Figura 7B). En los otros dos parques (Sierra de Guadarrama y Sierra Nevada) los patrones de crecimiento de los arbustos dominantes (*Cytisus* sp) han sido complejos y, si acaso, sensibles a la adición de P, que tendió a favorecer el crecimiento de los arbustos y su contenido en N en hoja (significativo en Sierra Nevada, Figura 8), aunque sin diferencias marcadas entre tratamientos y con una respuesta variable en función del año de medida.

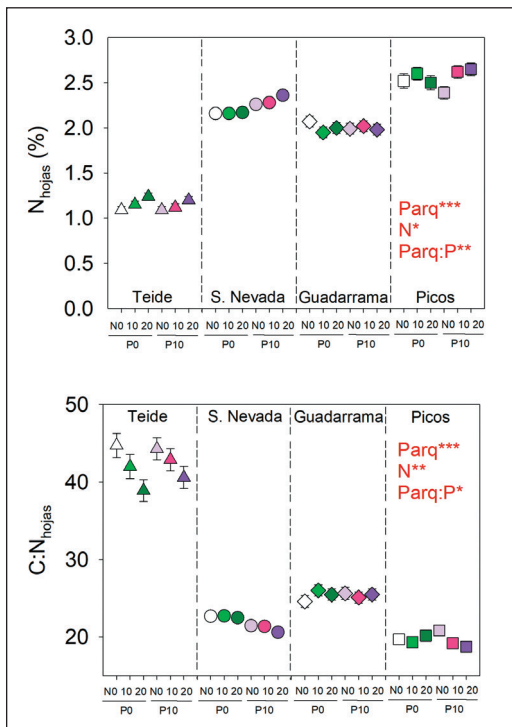
## DISCUSIÓN

En este proyecto hemos analizado la influencia potencial de la deposición atmosférica de N y P sobre las comunidades de suelos y plantas en cuatro ecosistemas de alta montaña españoles que se extienden a lo largo de un gradiente latitudinal y de aridez, los Parques Nacionales



**Figura 7. Crecimiento vegetal** en las parcelas experimentales del Parque Nacional del Teide. Biomasa de la gramínea *Bromus tectorum* y de las ramas apicales de rosalillo (*Pterocephalus lasiospermus*) en 2018 y 2019, respectivamente, y firma isotópica  $\delta^{13}C$  de las hojas de rosalillo en 2019. Esta última variable está relacionada con la eficiencia en el uso de agua (WUE) de la planta, siendo ésta mayor cuanto menos negativo sea el valor de  $\delta^{13}C$ . En todos los casos hay un aumento del crecimiento y WUE de la planta al aumentar la disponibilidad de N en los suelos ( $p < 0.05$ ). Los tratamientos indicados en el eje x muestran los niveles de fertilización de P y N. Los símbolos y barras son medias  $\pm$  E. E.;  $n = 6$ . La leyenda de colores de los símbolos como en la Figura 3.

**Figure 7. Plant growth** in Teide National Park experimental plots. Plant biomass of *Bromus tectorum* grass and biomass of the apical branches of rosalillo shrubs (*Pterocephalus lasiospermus*) in 2018 and 2019, respectively, and  $\delta^{13}C$  leaf isotopic signature (a proxy of plant water use efficiency (WUE); the less negative, the more efficient the plant in its use of water). In all cases, there is an increase in plant growth and WUE as soil N availability increases ( $p < 0.05$ ). Treatments on the x-axis show the P and N deposition levels. Symbol values are means  $\pm$  S. E.,  $n = 6$ . Legend of symbol colors as in Figure 3.



**Figura 8. N en hoja y relación entre C y N en hoja de las especies arbustivas dominantes en los distintos Parques Nacionales y tratamientos de adición de nutrientes (P y N).** Los símbolos y barras son medias  $\pm$  E. E.,  $n=6$ . Las letras en rojo indican que factores fijos tuvieron efectos significativos (Parq para Parque, P y N para deposición de P y N, e interacciones; \*, \*\*, \*\*\* para  $p < 0.05, 0.01, 0.001$ , respectivamente). La leyenda de formas de los símbolos y sus colores como en la Figura 3.

**Figure 8. Leaf N content and leaf C:N relation of the dominant shrub species in each National Park and P and N simulated deposition levels.** Symbol values are means  $\pm$  S. E.,  $n = 6$ . Letters in red indicate significant effects of fixed factors on the response variable (Parq for Parks, P and N for deposition of P and N, and interactions; \*, \*\*, \*\*\* for  $p < 0.05, 0.01, 0.001$ , respectively. Legend of symbol patterns and colors as in Figure 3.

del Teide, Sierra Nevada, Sierra de Guadarrama y Picos de Europa. La aridez, y a través de sus efectos sobre variables como el contenido de C orgánico y de N en el suelo, fue el principal factor que determinó la estructura de las comunidades de microorganismos y microfauna del suelo y de sus respectivas funciones. Todas estas respuestas bióticas estuvieron moduladas por las características físico-químicas particulares de los suelos de cada parque y, en menor medida, por los tratamientos de adición de N y P. A pesar de la corta duración de los tratamientos de adición

de N y P (tres años), las comunidades de bacterias, hongos y nematodos respondieron a dichos tratamientos experimentales. Particularmente destacan las respuestas de las comunidades del suelo y de plantas al aumento experimental de la disponibilidad de N en el Parque Nacional del Teide, el más árido de los cuatro.

En este proyecto nos hemos centrado en el análisis de los microorganismos (bacterias y hongos) y microfauna (nematodos) del suelo porque son las principales comunidades implicadas en funciones clave del ecosistema. Las bacterias y hongos representan el recurso basal en la red trófica del suelo y son los principales organismos implicados en los ciclos biogeoquímicos del suelo e intercambio de gases entre el suelo y atmósfera (además de las plantas). Además, establecen interacciones críticas con la vegetación, pudiendo determinar el devenir de los ecosistemas terrestres (PUGNAIRE *et al.* 2019, LAFUENTE *et al.* 2020). Por ello, la alteración del funcionamiento de estas comunidades puede considerarse una alerta temprana que señala la degradación del ecosistema. Algo parecido ocurre con los nematodos, un grupo clave de la biota edáfica que ocupa múltiples posiciones en la red trófica, desempeña funciones clave en los ecosistemas y son buenos indicadores de la actividad biológica, calidad y estado del suelo (VAN DEN HOOGEN *et al.* 2019). A escala global, se sabe que tanto la abundancia como la diversidad de estos organismos edáficos disminuyen al aumentar la aridez y disminuir el contenido de C orgánico en los suelos (MAESTRE *et al.* 2015; VAN DEN HOOGEN *et al.* 2019). Este patrón se debe principalmente al impacto negativo que tiene la aridez en procesos biológicos como la productividad vegetal y la descomposición de la materia orgánica, principales fuentes de C orgánico y N en los suelos de los ecosistemas terrestres áridos y secos (DELGADO-BAQUERIZO *et al.* 2013). Tres de los cuatro Parques Nacionales estudiados aquí se pueden considerar *drylands* (sistemas secos, semiáridos y áridos) de alta montaña (FAO 2011) y nuestros resultados muestran que la abundancia de los distintos organismos del suelo siguió un patrón similar al encontrado a escala global. Sin embargo, no ocurrió lo mismo con la diversidad. Así, la diversidad  $\alpha$  de las comunidades

de bacterias fue máxima en los parques más áridos y con menor C orgánico (Teide y, sobre todo, Sierra Nevada), mientras que la diversidad de la comunidad de hongos fue mínima en los dos extremos del gradiente de aridez (Teide y Picos de Europa), cuyos suelos tienen un pH y contenidos de C orgánico y N muy dispares, pero similar contenido en P total. Además, la estructura de las comunidades de microorganismos (bacterias y hongos) y microfauna (nematodos), también difirió entre parques, siendo estas comunidades bastante idiosincráticas. Para los tres grupos parece haber una relación entre la diversidad  $\beta$  y el gradiente de aridez, de forma que las comunidades son más distintas cuanto más distinto es el régimen climático, en consonancia con estudios previos (LI *et al.* 2020; RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA *et al.* 2021). Estudios previos han mostrado que la diversidad  $\beta$  de las comunidades microbianas están reguladas por la aridez, el pH y el C del suelo y la vegetación (FIERER *et al.* 2009; TEDERSOO Y BAHRAN 2014), mientras que la de las comunidades de microfauna edáfica responden a variables como la edad del ecosistema, el C del suelo, la productividad primaria vegetal neta y el ratio N:P (JONSSON *et al.* 2016).

Estas diferencias en abundancia y composición de las comunidades del suelo a lo largo del gradiente de aridez se vieron también reflejadas en cambios en su actividad y funciones. Los microorganismos del suelo producen una gran variedad de enzimas extracelulares implicadas en procesos biogeoquímicos críticos para los ecosistemas terrestres, entre los que se encuentran la descomposición de la materia orgánica, el ciclado de nutrientes y la formación de suelo (BURNS & DICK 2002; BELL *et al.* 2013). En este proyecto hemos encontrado que los niveles de actividad enzimática fueron, en general, mayores en los parques en el extremo más húmedo del gradiente, donde los suelos tienen una mayor cantidad de C orgánico y un menor pH. En estas condiciones, la abundancia de bacterias y hongos es mayor, así como la diversidad de hongos. La diversidad  $\alpha$  de bacterias, además, se correlacionó positivamente con las actividades enzimáticas relacionadas con los ciclos de la mineralización del C y N. En el caso de la comunidad de nematodos, esta microfauna fue más abundante y funcional en el Parque Nacional más húmedo

y con más recursos, Picos de Europa (SÁNCHEZ-MORENO *et al.* 2021). En los Parques Nacionales más áridos, tanto la composición como la estructura trófica de la comunidad de nematodos respondieron a esta baja disponibilidad de agua simplificando las redes tróficas y limitando los canales fungívoro y herbívoro (SÁNCHEZ-MORENO *et al.* 2021).

Los efectos de la adición de N y P en los suelos de los parques nacionales estudiados fueron sutiles, posiblemente debido a la escasa duración del proyecto, de apenas tres años. Sin embargo, a pesar del corto periodo de manipulaciones experimentales, los efectos fueron consistentes, y afectaron a todos los componentes del ecosistema analizados, desde las comunidades de microorganismos y microfauna del suelo a la vegetación dominante. Así, la diversidad  $\beta$  bacteriana cambió tanto en respuesta al enriquecimiento con N como P, y tanto las comunidades de bacterias como de hongos aumentaron su abundancia con la adición de P, mientras que solo los hongos incrementaron su abundancia en respuesta a la adición de N. Estos cambios en la estructura de las comunidades microbianas, si bien no produjeron cambios apreciables en las tasas de actividad enzimática, sí que tuvieron efectos en su diversidad funcional, es decir, en las interacciones y grado de acoplamiento entre las mismas. Las parcelas con enriquecimiento en N tuvieron un mayor grado de acoplamiento de los ciclos biogeoquímicos, mientras que las que recibieron P no sufrieron ningún cambio significativo, aunque hubo interacciones positivas al incluir ambos nutrientes de forma simultánea. Este resultado es sorprendente y contrario a las predicciones generales, que sugieren que en los ecosistemas afectados por vectores de cambio global existirá una mayor interrupción de las conexiones ecológicas y un mayor desacoplamiento de los ciclos biogeoquímicos (GILMAN *et al.* 2010; DA SILVEIRA 2018). En todo caso, dada la importancia que tienen las distintas actividades enzimáticas extracelulares en los ciclos biogeoquímicos terrestres, sería relevante hacer un seguimiento futuro de estas tendencias y analizar si se mantienen o varían en el medio plazo.

La adición experimental de N y P tuvo un efecto limitado sobre la estructura de la comunidad de

nematodos, pero la adición de N incrementó su biomasa (y abundancia), particularmente de los nematodos bacterívoros y, sobre todo, en el parque más árido (Teide). Esto concuerda con lo encontrado en sistemas agrarios (SONG *et al.* 2016), donde se ha demostrado que la adición de N induce un enriquecimiento orgánico en el suelo que incrementa la presencia de nematodos bacterívoros oportunistas, fungívoros y herbívoros, reduciendo la complejidad de la comunidad (SHAW *et al.* 2019, LIU *et al.* 2020). En nuestro caso, el efecto positivo de los tratamientos con N sobre la huella metabólica de los bacterívoros no se vio acompañada por un cambio estructural en la comunidad. Sin embargo, la adición de P aumentó la prevalencia de microvóvoros, simplificando las redes tróficas de nematodos, en consonancia con lo encontrado en bosques subalpinos, donde la adición de P al suelo tuvo un efecto negativo sobre la comunidad de nematodos (YANG *et al.* 2019).

Las respuestas de la vegetación arbustiva fueron complejas. Las tres especies dominantes en los parques peninsulares son leguminosas, por lo que son capaces de establecer simbiosis con endobacterias fijadoras de N atmosférico ( $N_2$ ) e incrementar el contenido en N en sus tejidos incluso en suelos pobres en nutrientes. Sin embargo, tanto la nodulación como la fijación de  $N_2$  requieren cierta disponibilidad de P en el suelo, inhibiéndose estos procesos si el P u otros micronutrientes como el K, Si o Mo son limitantes (ZAHN 1999; PEÑUELAS *et al.* 2012; MÍGUEZ-MONTERO *et al.* 2020). El tratamiento de adición de P en Sierra Nevada y Sierra de Guadarrama aumentó el P disponible para las plantas, y posiblemente ésta sea la razón por la que el contenido en N en los tallos de *Cytisus* sp en ambos parques aumentó con la adición de P, sugiriendo que las interacciones planta-microorganismos del suelo podrían estar limitados por P. En cambio, en Picos de Europa, y a pesar de tener suelos con un contenido de P alto, los niveles de fosfatos en el suelo fueron particularmente bajos en todos los tratamientos. Aquí, la leguminosa *Genista obtusifolia* no obtuvo beneficio de la adición de P, pero sí de la adición de N, que favoreció su crecimiento (biomasa). En este último sentido, el arbusto dominante en el Parque Nacional del Teide, la caprifilácea *Pterocephalus lasiospermus*, también respondió a la deposición simulada de N, tal y como ocurrió con el resto de

la biota analizada en este parque. Esto indicaría la saturación del sistema por P en ambos sitios y una fuerte carencia de N en los suelos; en Picos de Europa por el fuerte lavado de nutrientes por las lluvias y en Teide por la escasa capacidad de mineralización de la poca materia orgánica que se produce. Así, el crecimiento de las ramas, la concentración de N en hoja y la eficiencia en el uso de agua fueron mayores con la adición de N, particularmente en el Parque Nacional del Teide. Recientemente, se ha mostrado que el contenido de N en hoja en especies leñosas de ambientes secos se relaciona positivamente con una mayor eficiencia en el uso de agua (ADAMS *et al.* 2016), aunque los mecanismos aún no están claros. Algunos autores postulan que, en plantas de ambientes de secos a áridos, este aporte extra de N permite mejorar el ajuste osmótico de los tejidos al aumentar el contenido de moléculas ricas en N (WINK 2013). Esto aumenta la tolerancia de las plantas a los largos periodos de sequía y reducir sus potenciales hídricos con el fin de obtener agua de suelos secos (MARTÍNEZ-VILALTA *et al.* 2014). Otros autores teorizan que, en estas plantas de ambientes áridos, el N y el agua podrían ser recursos intercambiables a la hora de fijar una cantidad dada de C en la fotosíntesis (teoría del coste mínimo en la fotosíntesis; WRIGHT *et al.* 2003), de tal forma que una mayor cantidad de la enzima fotosintética RuBisCO en hojas ricas en N permite a la planta asimilar más  $CO_2$  sin tener que aumentar sustancialmente la conductancia estomática, aumentando así su eficiencia en el uso de agua. En todo caso, la mayor disponibilidad en N en las parcelas fertilizadas con este nutriente en el Parque Nacional del Teide también favoreció que la gramínea anual y ruderal *Bromus tectorum* adquiriera un mayor tamaño que en las parcelas sin fertilizar. En conjunto, los resultados en el Parque Nacional del Teide sugieren que todas las comunidades bióticas estudiadas, los ciclos biogeoquímicos en las que están implicadas y el funcionamiento del ecosistema están gobernados y limitados por la baja disponibilidad de N en el suelo. De los estudiados, éste es el Parque Nacional que recibe un mayor aporte de polvo sahariano que, aunque no contiene N reactivo de manera original, si lo adquiere durante su desplazamiento por zonas industrializadas del norte de África, actuando como un vector de contaminantes nitrogenados (RODRÍGUEZ *et al.* 2011; AVILA & AGUILLAUME 2017). En definiti-

va, siendo la composición, actividad y funciones de las comunidades bióticas del Parque Nacional del Teide particularmente sensibles a la adición de N, creemos que resulta relevante hacer un seguimiento de este fenómeno en el medio plazo.

Recientemente, GARCÍA-GÓMEZ *et al.* (2014, 2017) realizaron un análisis de riesgo de los efectos del depósito atmosférico de N en el territorio español, utilizando como indicador las cargas críticas empíricas de N reactivo, definidas como el nivel umbral a partir del cual, la adición de más N (o el nutriente estudiado) producirá efectos en el ecosistema. Sin embargo, no se conocen cuáles son las cargas críticas de deposición de P. Los pastizales naturales y los matorrales de alta montaña se encuentran entre los hábitats con mayor sensibilidad al depósito de N (baja carga crítica, ca.  $< 10 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ). Probablemente, los tratamientos que hemos realizado de adición de N y P hayan superado las cargas críticas de los ecosistemas alpinos estudiados en este proyecto. Un resultado importante ya que los modelos de GARCÍA-GÓMEZ *et al.* (2017) muestran que los parques de la Sierra de Guadarrama y Picos de Europa reciben niveles de deposición de N similares a los simulados aquí, entre  $5$  y  $15 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ , mientras que los niveles estimados en Sierra Nevada son mucho más bajos. En todo caso, tanto en las cumbres de Sierra Nevada, como en el Parque Nacional del Teide, habría que añadir a estos modelos los contaminantes nitrogenados transportados por las tormentas de polvo sahariano.

Los distintos escenarios de cambio global predicen un aumento de la aridez y los procesos de desertificación en la cuenca Mediterránea (MULLIN & CHIAPELLO 2006, MedECC Network 2019), la duplicación para el 2050 de los niveles de deposición de N reactivo a nivel mundial con aumentos significativos en la cuenca Mediterránea (GALLOWAY *et al.* 2004; CANFIELD *et al.* 2010) y un aumento de los niveles de N reactivo y P de origen industrial y minero en los eventos de exportación y transporte de polvo sahariano (RODRÍGUEZ *et al.* 2011). El presente trabajo muestra que estos factores de cambio global pueden tener efectos opuestos en la estructura y diversidad de la microbiota y microfauna edáfica y en las funciones ecosistémicas en las que están implicadas. Nuestros resultados sugieren que el aumento de

la aridez podría conducir a una disminución de la abundancia microbiana y a cambios en la estructura de estas comunidades, con efectos negativos tanto en los ciclos biogeoquímicos como en el crecimiento vegetal. Sin embargo, la deposición de N y/o P podría contrarrestar estos efectos estimulando cambios alternativos en la microbiota edáfica y en el crecimiento y resistencia a la sequía de las plantas. Las altas concentraciones de ozono troposférico que se registran en las zonas de montaña (ELVIRA *et al.* 2016) podrían también interactuar con los efectos provocados por el cambio climático y el incremento de depósito atmosférico de nutrientes. En su conjunto, estos cambios pueden alterar sustancialmente los ecosistemas de alta montaña de la red española de Parques Nacionales, con consecuencias difíciles de anticipar actualmente.

## AGRADECIMIENTOS

Al proyecto ref. 1578/2015 financiado por OAPN. Algunos análisis han ido a cargo de los siguientes proyectos: MINECO (RYC-2012-12277), MINECO (CGL2014-59010-R) y CSIC (PIE 202030E071). Los análisis realizados en el Centro de Ecología Funcional (CFE, Portugal) presentados aquí sobre el contenido en fosfatos y N mineral en el suelo, se realizaron con cargo a UIDB/04004/2020 y apoyo financiero de la FCT/MCTES a través de fondos nacionales (PIDDAC). Agradecemos al personal y guardería de los distintos Parques Nacionales su apoyo en las cuestiones administrativas y selección de los sitios de estudio. Mención especial merece D. José Luis Martín Esquivel, Coordinador de Conservación del Parque Nacional del Teide, por su constante asesoramiento científico y ayuda logística a lo largo de todo el proyecto. J.D. and A.R. reconocen el apoyo de la FCT (IF/00950/2014 y SFRH/BDP/108913/2015, respectivamente). Otras personas han contribuido de forma puntual pero relevante en distintas tareas, como Raúl García-Camacho, Miguel Iglesias, Jéssyca G. Da Silveira, el equipo integrante de la Unidad de Modelización y Ecotoxicología de la Contaminación Atmosférica del CIEMAT, Carme Estruch, Christian Kindler, Almudena López-Escoriza, Diego J. Aránega y M<sup>a</sup> José Jorquera. A todos ellos, nuestro agradecimiento.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. A., TURNBULL, T. L., SPRENT, J. I., BUCHMANN, N. 2016. Legumes are different: Leaf nitrogen, photosynthesis, and water use efficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113: 4098–4103.
- AVILA, A., AGUILLAUME, L. 2017. Monitorización y tendencias de la deposición de N en España, incluyendo polvo sahariano. *Ecosistemas* 26: 16-24.
- BELL, C. W., FRICKS, B. E., ROCCA, J. D., STEINWEG, J. M., MCMAHON, S. K., & WALLENSTEIN, M. D. 2013. High-throughput fluorometric measurement of potential soil extracellular enzyme activities. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)* 81: 1-16.
- BENITO, B., LORITE, J., PEÑAS, J. 2011. Simulating potential effects of climatic warming on altitudinal patterns of key species in Mediterranean-alpine ecosystems. *Climatic Change* 108: 471-483.
- BOBBINK, R., HICKS, K., GALLOWAY, J., SPRANGER, T., ALKEMADE, R., ASHMORE, M., EMMETT, B. 2010. Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecological Applications* 20: 30-59.
- BURNS, R. G. & DICK, R. P. 2002. *Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications*. Vol. 86 CRC.
- CANFIELD, D. E., GLAZER, A. N., FALKOWSKI, P. G. 2010. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *Science* 330: 192–196.
- DA SILVEIRA, J. 2018. Consecuencias de la deposición atmosférica de nitrógeno y fósforo sobre el acoplamiento de los ciclos de nutrientes en ecosistemas alpinos. Trabajo de fin del Master en Cambio Global: Recursos Naturales y Sostenibilidad. Universidad de Córdoba.
- DELGADO-BAQUERIZO *et al.* 2013. Decoupling of soil nutrient cycles as a function of aridity in global drylands. *Nature* 502: 672–676.
- DONHAUSER, J., FREY, B. 2018. Alpine soil microbial ecology in a changing world. *FEMS Microbiology Ecology* 94: fty099.
- ELVIRA, S., GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, I., ALONSO, R., SANZ, J., BERMEJO-BERMEJO, V. 2016. Ozone levels in the Spanish Sierra de Guadarrama mountain range are above the thresholds for plant protection: analysis at 2262, 1850, and 995 m a.s.l. *Environmental Monitoring and Assessment* 188: 1-20.
- ERISMAN, J. W., GALLOWAY, J., SEITZINGER, S., BLEEKER, A., BUTTERBACH-BAHL, K. 2011. Reactive nitrogen in the environment and its effect on climate change. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 3: 281-290.
- ERISMAN, J. W., GALLOWAY, J. N., SEITZINGER, S., BLEEKER, A., DISE, N. B., PETRESCU, A. M. R., LEACH, A. M., DE VRIES, W. 2013. Consequences of human modification of the global nitrogen cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 368: 20130116.
- ESCUDERO, A., GARCÍA-CAMACHO, R., GARCÍA-FERNÁNDEZ, A., GIMÉNEZ-BENAVIDES, L., IRIONDO, J. M., LARA-ROMERO, C., & PESCADOR, D. S. 2015. Vulnerabilidad al cambio climático de las plantas de alta montaña mediterránea. *Ecosistemas* 24: 107-113.
- FAO. 2011. *Highlands and Drylands Mountains, a source of resilience in arid regions*. Highlands and Drylands – mountains, a source of resilience in arid regions. Published by FAO, UNCCD, Mountain Partnership, Swiss Agency for Development and Cooperation, and CDE, with the support of an international group of experts. Rome.
- FERRIS, H. 2010. Form and function: Metabolic footprints of nematodes in the soil food web. *European Journal of Soil Biology* 46: 97–104.
- FERRIS, H., BONGERS, T., DE GOEDE, R. G. M. 2001. A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept. *Applied Soil Ecology* 18: 13-29.
- FIERER, N., STRICKLAND, M. S., LIPTZIN, D., BRADFORD, M. A., CLEVELAND, C. C. 2009. Global patterns in below-ground communities. *Ecology Letters* 12: 1238–49.
- GARDES, M., BRUNS, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes -application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113–118.
- GALLOWAY, J. N., TOWNSEND, A. R., ERISMAN, J. W., BEKUNDA, M., CAI, Z., FRENAY, J. R. ET AL. 2008. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320: 889-892.
- GARCÍA-GÓMEZ, H., GARRIDO, J. L., VIVANCO, M. G., LASSALETTA, L., RÁBAGO, I., ÁVILA, A., TSYROD, S., SÁNCHEZ, G., GONZÁLEZ-ORTIZ, A., GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, I., ALONSO, R. 2014. Nitrogen deposition in Spain: Modeled patterns and threatened habitats within the Natura 2000 network. *Science of the Total Environment* 485-486: 450-460.
- GARCÍA-GÓMEZ H., GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ I., VIVANCO M. G., CALVETE-SOGO H., BERMEJO-BERMEJO V., VALIÑO F., RÁBAGO I., ALONSO R. 2017. Depósito atmosférico de nitrógeno en España y evaluación del riesgo de efectos en los hábitats terrestres de la Red de Parques Nacionales. *Ecosistemas* 26(1): 55-65.

- GARCÍA-PALACIOS, P., VANDEGEHUCHTE, M. L., SHAW, E. A., DAM, M., POST, K. H., RAMIREZ, K. S., SYLVAIN, Z. A., TOMASEL, C., WALL, D. H. 2015. Are there links between responses of soil microbes and ecosystem functioning to elevated CO<sub>2</sub>, N deposition and warming? A global perspective. *Global Change Biology* 21: 1590-1600.
- GILMAN, S. E., URBAN, M. C., TEWKSBURY, J., GILCHRIST, G. W., & HOLT, R. D. 2010. A framework for community interactions under climate change. *Trends in Ecology & Evolution* 25, 325-331.
- JONSSON, M., SNALL, T., ASPLUND, J., CLEMMENSEN, K. E., DAHLBERG, A., KUMORDZI, B. B., LINDAHL, B. D., OKSANEN, J., WARDLE, D. A. 2016. Divergent responses of beta-diversity among organism groups to a strong environmental gradient. *Ecosphere* 7: e01535.
- KÖRNER, C. 2017. Alpine Ecosystems. *Encyclopedia of Biodiversity* 2: 148-157.
- LAFUENTE, A., RECIO, J., OCHOA-HUESO, R., GALLARDO, A., PÉREZ-CORONA, M. E., MANRIQUE, E., DURÁN, J. 2020. Simulated nitrogen deposition influences soil greenhouse gas fluxes in a Mediterranean dryland. *Science of the Total Environment* 737: 139610.
- LIU, T., MAO, P., SH, L., WANG, Z., WANG, X., HE, X., TAO, L., LIU, Z., ZHOU, L., SHAO, Y., FU, S. 2020. Contrasting effects of nitrogen deposition and increased precipitation on soil nematode communities in a temperate forest. *Soil Biology and Biochemistry* 148: 107869.
- MAHOWALD, N. M., S. KLOSTER, S. ENGELSTAEDTER, J. K. MOORE, S. MUKHOPADHYAY, J. R. MCCONNELL, S. *et al.* 2010. Observed 20th century desert dust variability: impact on climate and biogeochemistry. *Atmospheric Chemistry and Physics* 10:10875-10893.
- MAPAMA. 2017. Proyecciones de emisiones de gases a la atmósfera. Edición 2015-2050. Sumario de resultados. [https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/sistema-espanol-de-inventario-sei-espana-2017-proyecciones-informeresumen-corregido-junio2017\\_tcm30-378888.pdf](https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/sistema-espanol-de-inventario-sei-espana-2017-proyecciones-informeresumen-corregido-junio2017_tcm30-378888.pdf)
- MAESTRE, F. T. *et al.* 2015. Increasing aridity reduces soil microbial diversity and abundance in global drylands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 15684-15689.
- MARTÍNEZ-VILALTA, J., POYATOS, R., AGUADÉ, D., RETANA, J., MENCUCINI, M. 2014. A new look at water transport regulation in plants. *New Phytologist* 204: 105-115.
- MedECC Network. 2019. Risk associated to climate and environmental changes in the Mediterranean region. [https://ufmsecretariat.org/wp-content/uploads/2019/10/MedECC-Booklet\\_EN\\_WEB.pdf](https://ufmsecretariat.org/wp-content/uploads/2019/10/MedECC-Booklet_EN_WEB.pdf)
- MÍGUEZ-MONTERO, M. A., VALENTINE, A. PÉREZ-FERNÁNDEZ, M. A. 2020. Regulatory effect of phosphorus and nitrogen on nodulation and plant performance of leguminous shrubs. *AoB Plants*, 12, plz047, doi:10.1093/aobpla/plz047.
- MOORE, J. A. M., ANTHONY, M. A. G., PEC, J., TROCHA, L. K., TRZEBNY, A., GEYER, K. M., VAN DIEPEN, L. T. A., FREY, S. D. 2020. Fungal community structure and function shifts with atmospheric nitrogen deposition. *Global Change Biology* doi.org/10.1111/gcb.15444.
- MORALES-BAQUERO, R., PULIDO-VILLENA, E., RECHE, I. 2013. Chemical signature of Saharan dust on dry and wet atmospheric deposition in the South-Western Mediterranean region. *Tellus B: Chemical and Physical Meteorology* 65: 18720.
- MOULIN, C., CHIAPELLO, I. 2006. Impact of human-induced desertification on the intensification of Sahel dust emission and export over the last decades. *Geophysical Research Letters* 33: L18808.
- NAGY, L., GRABHERR, G. 2009. *THE BIOLOGY OF ALPINE HABITATS*. OXFORD UNIVERSITY PRESS, USA. Pp 388.
- OCHOA-HUESO, R., PINEIRO, J., POWER, S. A. 2019. Decoupling of nutrient cycles in a Eucalyptus woodland under elevated CO<sub>2</sub>. *Journal of Ecology* 107: 2532-2540.
- OKIN, G., MAHOWALD, N., CHADWICK, O., ARTAXO, P. 2004. The impact of desert dust on the biogeochemistry of phosphorus in terrestrial ecosystems. *Global Biogeochemistry Cycles* 18: GB2005.
- PAULI, H., GOTTFRIED, M., DULLINGER, S., ABDALADZE, O., AKHALKATSI, M., ALONSO, J. L. B., *et al.* 2012. Recent Plant Diversity Changes on Europe's Mountain Summits. *Science* 336: 353-355.
- PEÑUELAS, J., SARDANS, J., RIVAS-UBACH, A., JANSSENS, I. A. 2012. The human-induced imbalance between C, N and P in Earth's life system. *Global Change Biology* 18: 3-6.
- PÉREZ-MARTÍNEZ, C., RÜHLAND, K. M., SMOL, J. P., JONES, V. J., CONDE-PORCUNA, J. M. 2020. Long-term ecological changes in Mediterranean mountain lakes linked to recent climate change and Saharan dust deposition revealed by diatom analyses. *Science of the Total Environment* 727: 138519.
- PROSPERO, J. M., LAMB, P. J. 2003. African droughts and dust transport to the Caribbean: climate change implications. *Science* 302(5647): 1024-1027.
- QUEROL, X., PÉREZ, N., RECHE, C., EALO, M., RIPOLL, A., TUR, J., PANDOLFI, M. *et al.* 2019. African dust and air quality over Spain: is it only dust that matters? *The Science of Total Environment* 686: 737-752.
- PUGNAIRE, F. I., MORILLO, J. A., PEÑUEKAS, J. REICH, P. B., BARDGETT, R. D., GAXIOLA, A., WARDLE, D. A., VSN DER PUTTEN, W. 2019. Climate change effects on plant-soil feedbacks and consequences for biodiversity and functioning of terrestrial ecosystems. *Science Advances* 5: eaaz1834.

Consecuencias de la deposición atmosférica de nitrógeno y fósforo en las comunidades vegetales y microbiota del suelo en ecosistemas de alta montaña

- RODRÍGUEZ, S., ALASTUEY, A., ALONSO-PÉREZ, S., QUEROL, X., CUEVAS, E., ABREU-AFONSO, J., VIANA, M., PÉREZ, N., PANDOLFI, M., DE LA ROSA, J. 2011. Transport of desert dust mixed with North African industrial pollutants in the subtropical Saharan Air Layer. *Atmospheric Chemistry and Physics* 11: 6663–6685.
- RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA, S., DELGADO-BAQUERIZO, M., MORILLO, J. A., GAXIOLA, A., MANZANO, M., MARQUET, P., GONZÁLEZ, L., CAVIERES, L., PUGNAIRE, F. I., ARMAS, C. 2021. *Azorella* cushion plants and aridity are important drivers of soil microbial communities in Andean ecosystems. *Ecosystems* 24: 1576–1590.
- SALA, O. E. *et al.* 2000. Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287:1770-1774
- SÁNCHEZ-MORENO, S., IGLESIAS, M., USERO, F. M., KINDLER, C. ARMAS, C. 2021. Efecto de la deposición de N y P atmosférico en la microfauna edáfica de sistemas de alta montaña de la red de Parques Nacionales españoles. *Ecosistemas*, en prensa.
- SHAW, E. A., BOOT, C. M., MOORE, J. C., WALL, D. H., BARON, J. S. 2019. Long-term nitrogen addition shifts the soil nematode community to bacterivore-dominated and reduces its ecological maturity in a subalpine forest. *Soil Biology and Biochemistry* 130: 177-184.
- SIMS, G. K., ELLSWORTH, T. R., MULVANEY, R. L. 1995. Microscale determination of inorganic nitrogen in water and soil extracts. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 26: 303–316.
- SONG, M., LI, X., JING, S., LEI, L., WANG, J., WAN, S. 2016. Responses of soil nematodes to water and nitrogen additions in an old-field grassland. *Applied Soil Ecology* 102: 53-60.
- STEINBAUER MJ, GRYTNE JA, JURASINSKI G, KULONEN A, LENOIR J, PAULI H, ET AL. 2018. Accelerated increase in plant species richness on mountain summits is linked to warming. *Nature* 556: 231-234.
- SUTTON, M. A. *et al.* (eds) (2011) *The European Nitrogen Assessment. Sources, Effects and Policy Perspectives*. Cambridge Univ. Press. <http://go.nature.com/5n9lsq>.
- TEDERSOO, L., BAHRAM, M. 2014. Global biodiversity and geography of soil fungi. *Science* 346: 1256681.
- USERO, F. M., ARMAS, C., MORILLO, J. A., GALLARDO, M., RODNEY THOMPSON, R. PUGNAIRE, F. I. 2021. Effects of soil microbial communities associated to different soil fertilization practices on tomato growth in intensive greenhouse agriculture. *Applied Soil Ecology* 162: 103896.
- VAN DEN HOOGEN, J., GEISEN, S., ROUTH, D., FERRIS, H., TRAUNSPURGER, W., WARDLE, D. A., DE GOEDE, R. J. M., *et al.* 2019. Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature* 572: 194-198.
- VILGALYS, R., HESTER, M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238–4246.
- WALKER M. D., GOULD W. A., CHAPIN F. S. 2001. Scenarios of Biodiversity Changes in Arctic and Alpine Tundra. In: Chapin F. S., Sala O. E., Huber-Sannwald E. (eds) *Global Biodiversity in a Changing Environment*. Ecological Studies (Analysis and Synthesis), vol 152. Springer, New York, NY.
- WALTERS, W., HYDE, E. R., BERG-LYONS, D., ACKERMANN, G., HUMPHREY, G., PARADA, A., GILBERT, J. A., JANSSON, J. K., CAPORASO, J. G., FUHRMAN, J. A., APPRILL, A., KNIGHT, R. 2016. Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. *mSystems* 11:e00009-15.
- WINK, M. 2013. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany* 89: 164–175.
- WRIGHT, I. J., REICH, P. B., WESTOBY, M. 2003. Least-cost input mixtures of water and nitrogen for photosynthesis. *American Naturalist* 161: 98–111.
- YANG, B., ZHANG, T., HUANG, J. S., BHUSAL, D. R., PANG, X. Y. 2019. Response of soil nematode community to phosphorus amendment in a subalpine spruce plantation. *Clan Soil Air Water* 47(12): 1970103.
- ZHANG, G., SUI, X., LI, Y., JIA, M., WANG, Z., HAN, G., WANG, L. 2020. The response of soil nematode fauna to climate drying and warming in *Stipa breviflora* desert steppe in Inner Mongolia, China. *Journal of Soils and Sediments* 20:2166-2180.