

3. RÉGIMEN DE EXPOSICIÓN A SO₂ Y A O₃. VARIABLES CLIMÁTICAS

3.1. INTRODUCCIÓN

Con la detección de daños en bosques europeos, atribuidos a factores ambientales y a contaminantes atmosféricos transportados a larga distancia y a través de varios países, se inician en Europa una serie de negociaciones internacionales destinadas a la limitación y gradual reducción de la emisión de contaminantes atmosféricos. Ante la necesidad de un programa conjunto de gestión ambiental de ámbito internacional, que permitiera el establecimiento de políticas de estrategias armonizadas en el ámbito de las Naciones Unidas, se suscribió en Ginebra en 1979 el Convenio sobre Transporte a Larga Distancia y Transfronterizo de Contaminantes Atmosféricos (UN/ECE LRTAP). Este convenio, conocido como “Convenio de Ginebra”, fue ratificado por España en 1982. El Convenio de Ginebra define las políticas y estrategias de reducción de emisiones de contaminantes atmosféricos. En el Workshop de Bad Harzburg en 1988 el Convenio adoptó la metodología de los niveles críticos. Este procedimiento permite valorar la planificación de la reducción diferenciada para cada país (frente a unos porcentajes de reducción arbitrariamente uniformes) sobre la base de valores críticos obtenidos científicamente (Bull, 1991).

Esencialmente, el concepto de nivel crítico asume que, para proteger al receptor, la exposición a los contaminantes no debe exceder un cierto umbral de concentración o nivel. En el contexto de los efectos sobre la vegetación, los niveles críticos se pueden definir como las concentraciones de contaminantes atmosféricos por encima de las que se pueden producir efectos directos adversos en los receptores, tales como plantas, ecosistemas o materiales, de acuerdo con los conocimientos actuales (Nilsson, 1989). El concepto de carga crítica está basado en el de dosis-respuesta, ampliamente usado para abordar problemas de contaminantes. En una fase posterior, mediante la incorporación de funciones de costes de emisión, es posible su optimización hasta llegar a un equilibrio entre los costes ambientales y los económicos.

En el Workshop de Bad Harzburg se definieron por primera vez los niveles críticos para algunos tipos de vegetación. Posteriormente se han ido revisando estos niveles en diversos workshop. Los niveles críticos de SO₂ se revisaron en el Workshop de Egham (1991), donde se recomendó para la protección de los bosques

un nivel crítico de $20 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ (unas 8 ppb) como promedio anual (Ashmore, 1994), aunque este nivel es variable en función de las características climáticas del área. En el caso del ozono, se introdujeron niveles críticos a largo plazo, expresados mediante el índice de exposición acumulado AOT40 (*Accumulated exposure Over a Threshold of 40 ppb*). La AOT40 no tiene en cuenta los valores por debajo de 40 ppb de O_3 , y se calcula como la suma de los valores horarios que están por encima de ese nivel considerado como crítico. Para los bosques europeos se propuso en el Workshop de Kuopio (1996) un nivel crítico provisional a una AOT40 de 10 ppm·h calculado para 24 horas en el período de seis meses de máxima sensibilidad del receptor. Sin embargo, los niveles críticos se encuentran en continua revisión, debido a la limitación de datos disponibles (Skärby y Karlsson, 1996; Manninen *et al.*, 1997; Grunhage *et al.*, 1999; Manninen y Huttunen, 2000), particularmente en el ámbito mediterráneo (Ashmore *et al.*, 1990; Matyssek y Innes, 1999). Por otra parte, la ocurrencia de concentraciones fitotóxicas de más de un contaminante complica el establecimiento de niveles críticos con significado (Ashmore *et al.*, 1990).

Además del índice de exposición acumulada AOT40, para caracterizar el régimen de exposición a O_3 se emplea también por multitud de autores el promedio de 24 horas (Blank *et al.*, 1990; Seufert *et al.*, 1990; Adaros *et al.*, 1991a; Holland *et al.*, 1995). Para recoger las concentraciones altas de ozono que suelen ocurrir durante las horas de mayor radiación solar y de sensibilidad de las plantas, se utiliza asimismo el promedio durante 7, 8, 10 o 12 horas diurnas (p.e., Fuhrer *et al.*, 1989; Mortensen *et al.*, 1989; Edwards *et al.*, 1991; Lefhon *et al.*, 1992; Pleijel *et al.*, 1992; Sanders *et al.*, 1992). Para caracterizar el régimen de exposición a SO_2 el promedio de 24 horas es el índice más comúnmente utilizado (Garsed y Rutter, 1984; Leininger *et al.*, 1991; Holland *et al.*, 1995).

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

El sistema de adquisición de datos almacena la medida instantánea de los analizadores de SO₂, O₃ y NO_x descritos en el apartado 2.2, que muestrean en continuo el aire de los 18 puntos de muestreo (15 cámaras y 3 parcelas ambiente). La medida se puede visualizar en tiempo real en la pantalla del ordenador. El programa calcula y almacena automáticamente los promedios horarios para cada uno de los 18 puntos de muestreo. Periódicamente se realiza una copia de seguridad de los datos instantáneos y de los promedios horarios.

Diariamente se anotaron en el campo experimental aquellas incidencias que facilitarían más adelante la depuración de los datos: cortes de tensión por tormentas o fallo de equipos, exceso de tensión, condiciones meteorológicas (viento, lluvia, etc.), labores de mantenimiento (calibración de equipos, purga de controladores máxicos de caudal...), inmisión de contaminantes. Los cortes de tensión una vez superada la autonomía del sistema de alimentación ininterrumpida son importantes, ya que al reconectarse los analizadores tras el corte, se realiza automáticamente una calibración de 0 y span, lo que puede falsear los datos reales. Las velocidades de viento altas y las precipitaciones pueden producir una dilución de la concentración de contaminantes dosificados. Periódicamente se realiza una purga manual de los MFC y una calibración dinámica de los analizadores, lo que también puede inducir a error a la hora de analizar los datos.

La depuración de los datos se realizó mensualmente, una vez impresos los listados numéricos de los promedios horarios de los tres contaminantes y representados gráficamente los resultados, teniendo presentes los registros diarios de las incidencias. Se eliminaron aquellos datos que no respondían al análisis real de los contaminantes del aire muestreado.

Sobre la base de los promedios horarios se calcularon más adelante los promedios mensuales para cada gas y cámara. Los resultados que se presentan a continuación corresponden a promedios para cada tratamiento (por tanto, son promedio de tres cámaras). En el caso del O₃ se calcularon además los perfiles diarios de la concentración del contaminante, siendo el valor horario mostrado el promedio mensual de la concentración para esa hora concreta. También se calculó la AOT40 (*Accumulated exposure Over a Threshold of 40 ppb*) como la suma de los valores horarios por encima de 40 ppb. Los valores de óxidos de nitrógeno se

mantuvieron en la mayoría de las ocasiones por debajo del nivel de precisión de los analizadores, y no se muestran en la presente Memoria.

La medida de los datos climáticos en una cámara o parcela ambiente perteneciente a cada tratamiento, realizada en continuo por los sensores descritos en el apartado 2.2, también se puede observar en tiempo real en pantalla. El software calcula y almacena automáticamente los promedios horarios en una base datos. Periódicamente se realiza una copia de seguridad de los promedios horarios. Mensualmente se representan gráficamente esos promedios, realizándose un seguimiento de la fiabilidad de los sensores. La medida de los sensores de temperatura de subsuelo no se presentan, debido a que presentaron un funcionamiento general defectuoso.

A partir de los promedios horarios de temperatura y humedad relativa del aire se calcularon los máximos, mínimos y promedios mensuales y los valores medios diarios que se presentan a continuación. Los valores horarios de radiación fotosintéticamente activa se sumaron para obtener la radiación diaria y mensual.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Régimen de exposición a SO₂

La exposición a SO₂ se inició el 29/02/96 y finalizó el 27/10/97. El valor de consigna fue de 20 ppb en continuo. En la figura 3.1 se muestran los valores medios diarios de la concentración de SO₂ alcanzada a lo largo de la experimentación en el tratamiento de aire filtrado y en el de SO₂. Las disminuciones bruscas observadas en los tratamientos con SO₂ se debieron a labores de mantenimiento general de la instalación. Las interrupciones de la fumigación y monitorización de contaminantes (espacios en blanco de la misma gráfica) fueron ocasionados por fallos en el suministro eléctrico. Los aumentos respecto al valor de consigna obedecieron en general a entradas de aire ambiente enriquecido en SO₂ en el interior de las cámaras, más importantes durante las épocas estivales (ver la figura 3.1 y la tabla 3.1 para el tratamiento de aire ambiente, AA).

Las concentraciones medias de SO₂ para cada uno de los meses de fumigación se presentan en la tabla 3.1. En esa tabla se muestran los datos para los tratamientos con SO₂ (SO₂ y SO₂+O₃) y sin SO₂ (aire filtrado y O₃), además de las concentraciones de SO₂ medidas en las parcelas ambiente y en las cámaras de aire no filtrado. Se consiguió una buena regulación de la dosificación de SO₂ y se alcanzaron valores muy próximos a los de consigna. Como se puede observar en la tabla, la concentración real promedio de SO₂ en los tratamientos con SO₂ fue de 18 ppb a lo largo de la experimentación.

Tabla 3.1. Promedios mensuales y promedio bianual de la concentración de SO₂ (ppb) en cada tratamiento: AF, aire filtrado; AA, aire ambiente; ANF, aire no filtrado. Los promedios bianuales se han expresado también en µg m⁻³ para 20 °C y 1 bar.

Año	Mes	Tratamiento					
		AF	SO ₂	O ₃	SO ₂ +O ₃	AA	ANF
	Mar	2	18	1	18	3	3
	Abr	0	19	0	19	1	1
	May	2	15	2	14	5	3
	Jun	3	16	4	15	8	6

— Aire filtrado
 — SO₂

	Jul	3	16	3	16	6	5
	Ago	3	11	4	12	8	7
	Sep	1	10	1	11	2	3
	Oct	0	19	0	19	1	0
	Nov	1	20	1	19	1	1
	Dic	0	18	0	18	1	1
	Ene	0	18	0	19	1	0
	Feb	0	19	0	18	1	1
	Mar	2	20	1	20	5	3
	Abr	2	19	2	19	6	5
	May	2	20	2	21	6	4
	Jun	2	18	2	18	5	4
	Jul	4	23	4	23	7	5
	Ago	2	21	2	22	5	4
	Sep	2	23	3	23	9	5
	Oct	1	18	1	19	2	2
Promedio bianual							
(ppb)		2	18	2	18	4	3
(µg m⁻³)		5	47	5	47	10	8

Régimen de exposición a O₃

La concentración media mensual (promedio de 24 h) de ozono en los tratamientos así como en el aire ambiente y en el aire no filtrado se muestran en la tabla 3.2. En esa misma tabla se presentan también el promedio diario durante las 8 horas de máxima concentración de O₃ (entre las 11h y las 18h, ambas inclusive, en nuestra zona de estudio), así como el índice AOT40. En la figura 3.2 se muestran los perfiles diarios de concentración de ozono para cada mes en los tratamientos que se indican.

Se observaron típicos ciclos diarios en la concentración de ozono, como se observa en la figura 3.2. La concentración media de ozono en el aire ambiente fue mínima en los meses de invierno (enero y marzo), aumentando hasta los valores máximos en primavera (abril y mayo), y manteniéndose en valores altos durante los meses de verano, particularmente en julio. Durante la mayoría de los meses la concentración de O₃ estuvo muy por encima del valor guía propuesto por la UE para la protección de la vegetación, establecido en 65 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ (unos 33 ppb) (DOCE del 13/10/92). Paralelamente a esos cambios en los valores promedio de la concentración ambiente, la amplitud de las oscilaciones diarias fue en aumento desde los meses de invierno hasta los de primavera, manteniéndose elevada durante el verano y disminuyendo en otoño. Este comportamiento fue similar al del año anterior (1996) en lo que se refiere a valores altos de concentración de fondo de O₃ en verano y valores mínimos en otoño e invierno, pero en 1996 los valores medios máximos se registraron en junio. Además los valores máximos horarios registrados en 1996 fueron de 60 ppb (junio), mientras que en 1997 los valores máximos fueron de 50 ppb (abril). Por tanto, existe una variación intraanual en la magnitud y el patrón de comportamiento de las concentraciones de ozono en el ambiente, relacionada sin duda con variaciones climáticas.

Los perfiles diarios de concentración de ozono parecen ser característicos de cada área. Nuestra zona de estudio, situada a una altitud de 700 m, puede

Tabla 3.2. Promedios mensuales (24 h y 8 h) de la concentración de O₃ (ppb) y AOT40 (ppb·h) mensual en cada tratamiento en 1997. AF, aire filtrado; AA, aire ambiente; ANF, aire no filtrado. Los promedios anuales se han expresado también en µg m⁻³ para 20 °C y 1 bar.

Tratamiento															
AF			SO ₂			O ₃			SO ₂ +O ₃			AA			
h	8 h	AOT40	24 h	8 h	AOT40	24 h	8 h	AOT40	24 h	8 h	AOT40	24 h	8 h	AOT40	24 h
	15	0	13	14	0	24	25	697	22	23	412	25	26	0	23
	18	0	15	17	0	25	36	3491	32	34	2792	30	34	63	27
	22	59	21	24	99	45	42	12016	38	39	7269	38	42	2025	36
	26	182	22	25	168	47	47	21299	46	47	16404	42	46	6058	38
	21	236	21	23	220	51	49	29268	51	48	24385	39	40	8394	37
	15	237	15	16	221	45	47	34683	46	47	29478	35	34	9258	31
	18	241	16	18	225	47	52	40839	47	53	35569	38	39	11744	34
	17	243	14	17	226	51	65	50231	50	65	45043	36	41	13629	30
	17	243	14	16	226	49	64	58064	48	63	52411	34	39	15045	29
	16	243	14	15	226	41	50	61826	40	50	52411	30	32	15401	25
	18		17	18		44	48		42	47		35	37		31
	36		34	36		88	96		84	94		70	74		62
		243			226			61826			52411			15401	

IOZO

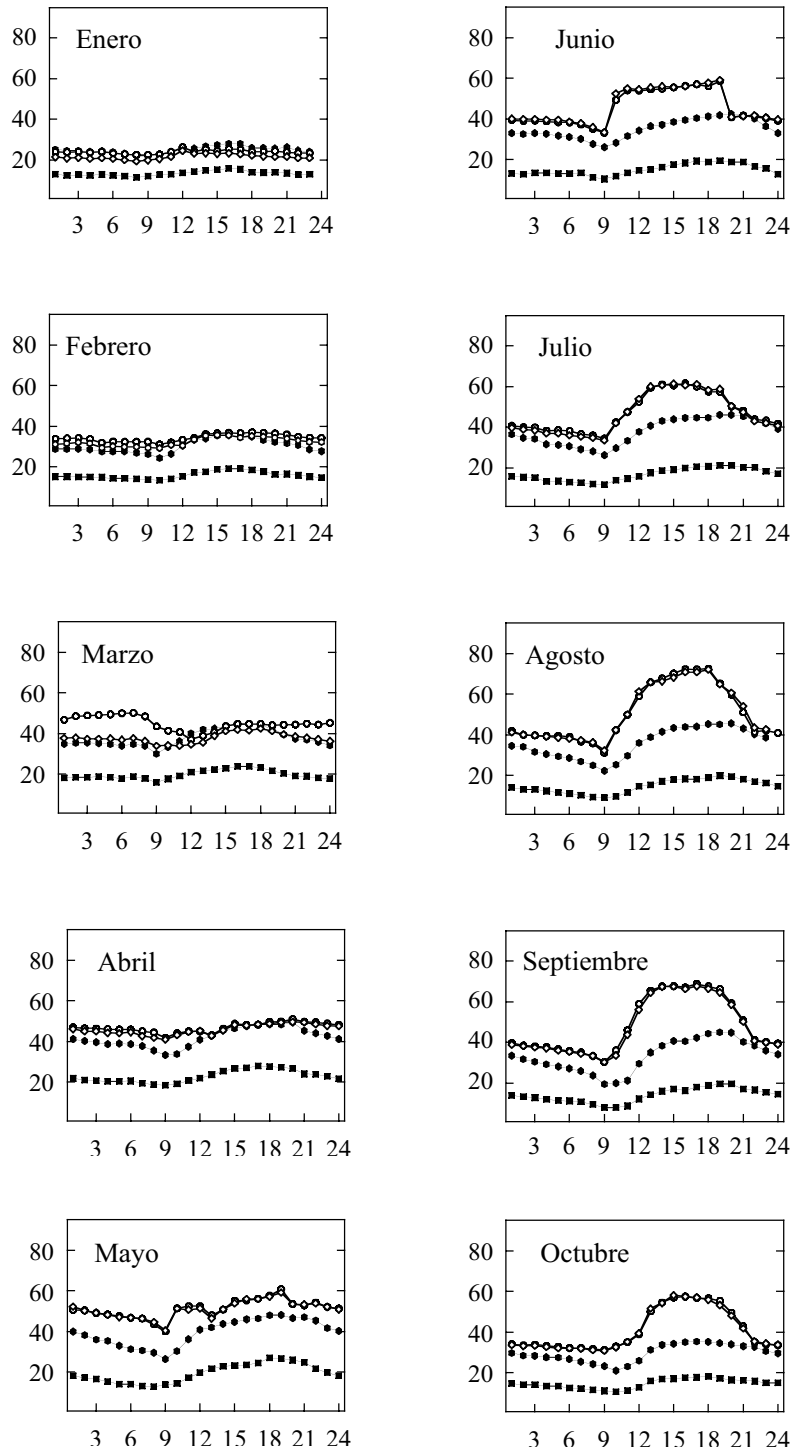


Figura 3.2. Perfiles diarios de concentración de ozono en cada tratamiento y mes en 1997. Los valores horarios resultan del promedio mensual para esa hora en cada tratamiento.

considerarse un área rural aunque con cierta influencia industrial, y el perfil diario de ozono responde, entre otras características, a esos rasgos, con unos valores mínimos horarios hacia las 9 h, y unos valores máximos entre las 16 y las 21 h. Los valores máximos horarios están desplazados respecto a otras áreas como el Delta del Ebro, a nivel del mar, con unas concentraciones horarias máximas registradas antes de las 17 h (Elvira, 1996). Los valores de concentración media de ozono en aire ambiente registrados en nuestro estudio fueron comparables a los obtenidos por otros autores en la cuenca Mediterránea (Millán *et al.*, 1991, 1996; Velissariou *et al.*, 1992; Gimeno *et al.*, 1995; Elvira, 1996).

La dosificación con ozono comenzó el 15/01/97 y finalizó el 27/10/97. Las concentraciones horarias de ozono en los tratamientos con O₃ fueron similares a las registradas en el aire ambiente durante los meses de enero, y solamente a partir de abril fueron sustancialmente superiores al AA (figura 3.2 y tabla 3.2). A partir de ese mes, se fumigó en las horas de máxima concentración de ozono en el ambiente (entre las 11 y las 18 horas, aproximadamente) con entre 20 ppb (en abril) y 48 ppb (en agosto) por encima de las concentraciones registradas en el aire filtrado. A lo largo de la experimentación con O₃ se alcanzaron en promedio (8 h) unas 30 ppb por encima de la concentración de ozono en el aire filtrado, lo que resultó en alrededor de 1.3 veces la concentración ambiente (tabla 3.2). Lógicamente los promedios de 8h, al estar calculados en las horas de máxima concentración de O₃, superan a los de 24 h.

El índice de ozono acumulado por encima de 40 ppb (AOT40) alcanzado al final del experimento fue de 57 ppm·h (promedio entre los tratamientos de O₃ y de SO₂+O₃), es decir, casi seis veces el nivel crítico de 10 ppm·h establecido por la UN/ECE (Führer y Acherman, 1994).

Variables climáticas

En la figura 3.3 y tabla 3.3 se muestra un resumen de las condiciones de temperatura y humedad relativa del aire y de la radiación fotosintéticamente activa a lo largo del período de experimentación. Las tres medidas mostraron ciclos anuales típicos del clima mediterráneo con características continentales. Las temperaturas máximas mensuales se registraron en 1996 entre junio y agosto; en 1997, entre julio y septiembre. Las temperaturas mínimas mensuales se registraron en 1996 en febrero y diciembre, y en 1997 en enero y diciembre. Los valores mínimos de humedad relativa del aire se registraron en julio de 1996 y marzo de 1997.

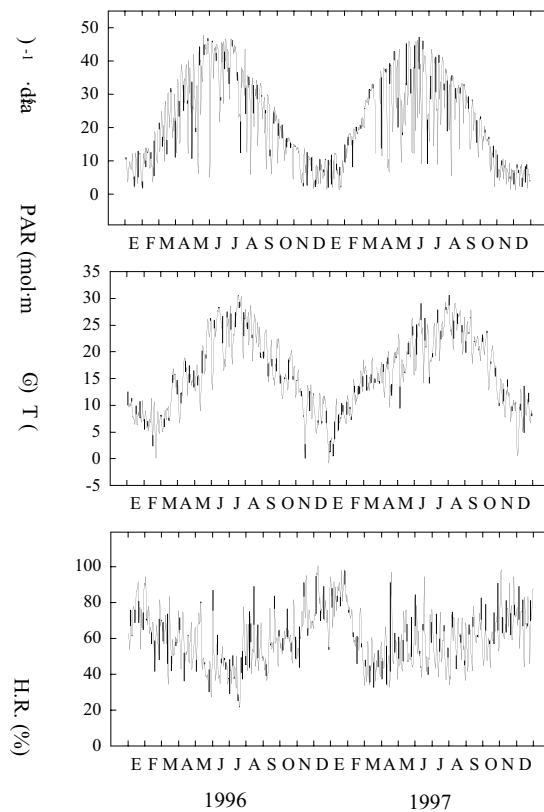


Figura 3.3. Radiación fotosintéticamente activa (PAR) diaria, temperatura y humedad relativa del aire medias diarias a lo largo del período de experimentación.

Tabla 3.3. Promedios mensuales de la temperatura, humedad relativa del aire y radiación fotosintéticamente activa (PAR) acumulado a lo largo de cada mes durante el período de experimentación.

Año	Mes	T (°C)			H.R. (%)			PAR (mol·m ⁻² ·mes ⁻¹)
		Media	Máx.	Mín.	Media	Máx.	Mín.	
1996	Ene	8.8	13.7	5.3	73.9	87.5	54.7	247
	Feb	6.4	13.2	1.7	64.3	84.3	40.3	329
	Mar	10.3	19.1	4.7	58.4	80.2	33.8	673
	Abr	14.2	23.6	7.2	55.9	79.9	30.0	854
	May	18.4	27.5	11.2	50.0	74.7	26.7	1095
	Jun	23.4	33.1	14.9	47.6	74.5	24.1	1127
	Jul	25.7	35.9	16.8	41.6	67.6	21.3	1135
	Ago	23.6	32.9	16.6	55.5	80.3	31.0	912
	Sep	19.0	28.2	12.5	55.6	77.9	30.9	662
	Oct	15.7	25.0	9.7	57.9	79.3	32.8	508
	Nov	10.8	17.0	6.2	68.3	85.6	47.7	293
	Dic	7.7	12.7	4.3	78.6	91.1	59.5	196
1997	Ene	7.0	12.3	3.1	83.6	96.6	63.7	235
	Feb	12.0	22.7	5.3	61.8	84.1	31.5	484
	Mar	15.6	27.8	6.5	43.8	69.8	20.6	709
	Abr	16.4	25.6	8.7	52.6	77.9	31.5	823
	May	19.4	28.5	11.8	55.0	81.0	29.9	964
	Jun	22.0	31.7	14.5	57.2	83.4	32.6	947
	Jul	24.0	33.6	15.7	53.8	81.8	30.4	984
	Ago	26.0	36.2	17.9	56.2	84.1	30.3	921
	Sep	22.2	32.4	15.0	61.4	86.3	35.3	706
	Oct	18.6	27.9	12.1	59.8	81.4	33.5	481
	Nov	11.0	18.3	6.5	73.2	91.7	47.5	210
	Dic	8.3	14.8	4.3	71.2	87.7	50.2	185

En la figura 3.4 se representa el efecto de la cámara en las variables climáticas. La estructura de la cámara interceptó entre un 11 y un 45 % del PAR incidente, con un promedio del 26 %. Por tanto, dentro de las cámaras se obtuvo el 74 % del PAR incidente fuera de ellas, en promedio.

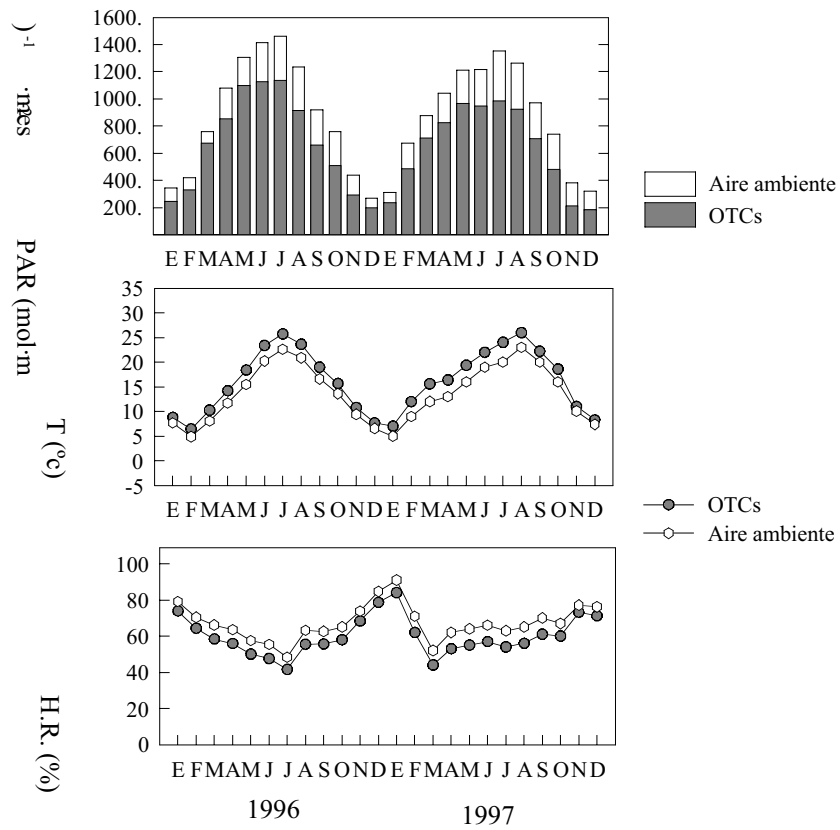


Figura 3.4. Efecto de la cámara en la radiación fotosintéticamente activa (PAR) acumulada mensualmente, la temperatura media mensual y la humedad relativa media mensual.

La temperatura media fue en promedio 2.4 °C mayor dentro de las cámaras que fuera de ellas. Las diferencias fueron mínimas en invierno (0.9 °C en noviembre de 1997) y máximas en verano (4.0 °C en julio de 1997). La humedad relativa media fue un 11 % menor dentro de las OTC, siendo las diferencias mínimas de nuevo en invierno (un 5 % en noviembre de 1997) mientras que las diferencias máximas se registraron en marzo de 1997, con un 16 %.

La incidencia de la lluvia en el interior de las cámaras es menor que en el exterior (en un ensayo se recogió dentro de las OTCs un 35 % menos agua de lluvia que fuera de ellas), por lo que las plantas se irrigaron durante todo el período de experimentación, particularmente en verano y primavera. Además, las plantas en el interior de las cámaras estuvieron sujetas a una velocidad constante de viento procedente de los ventiladores, mientras que las plantas situadas en el exterior estuvieron sometidas a vientos variables en dirección y velocidad, de hasta 58 km·h⁻¹.

Esos “efectos de cámara” en el microclima son comunes en todos los diseños de OTCs, como han señalado multitud de autores (Adaros *et al.*, 1989; Sanders *et al.*, 1991; Führer, 1994; Elvira, 1996; Rebbec, 1996). Sin embargo, pueden tener repercusiones en la ecofisiología de las plantas (Bytnerowicz *et al.*, 1990; Sanders *et al.*, 1991; Takemoto *et al.*, 1997), por lo que se consideró importante disponer de un tratamiento de control sin cámara (“aire ambiente”, AA) que permitiera caracterizar esos efectos.

4. EFECTOS DEL SO₂ Y DEL O₃ SOBRE LA CONCENTRACIÓN FOLIAR DE NUTRIENTES

4.1. INTRODUCCIÓN

El análisis del contenido de los nutrientes más importantes en las hojas proporciona una buena medida del estado general de los árboles, y se ha venido empleando durante mucho tiempo para identificar las causas de daño encontrados en bosques de Europa y Norteamérica (Cape *et al.*, 1990). La influencia de contaminantes gaseosos como el SO₂ y el O₃ en el estado nutricional de las plantas ha recibido una gran atención como un factor de contribución al declive de los bosques. Ahora bien, los cambios en el estado nutricional parecen obedecer a dos fenomenologías distintas, implicadas en tipos de procesos bien diferenciados:

a) Efectos indirectos del SO₂, fundamentalmente a través de cambios en la química del suelo y ligados al aumento de la deposición ácida: acidificación del suelo con disminución generalizada de la disponibilidad de nutrientes, incremento de la lixiviación (K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺) y daño en el sistema radicular de las plantas (Weikert *et al.*, 1989; Schätzle *et al.*, 1990; Tjoelker y Luxmoore, 1991). Se ha detectado este tipo de efectos por ejemplo en áreas centroeuropeas caracterizadas por suelos con baja capacidad de tamponamiento de cambios de pH. Los efectos de los contaminantes atmosféricos están mediados por deficiencias de nutrientes en las plantas, fundamentalmente de Mg²⁺ (Lange *et al.*, 1987c, 1989; Oren y Schultze, 1989; Weikert *et al.*, 1989; Oren *et al.*, 1993), con algunos casos puntuales de liberación de iones tóxicos como el Al³⁺ en el suelo (Ulrich *et al.*, 1980). Estos efectos son reversibles mediante una adecuada fertilización del suelo (Zoetl y Huettle, 1986). Típicamente, las concentraciones foliares de N pueden aumentar, debido a la co-deposición de NH₃ junto al SO₂ (McLeod *et al.*, 1990, 1992) y al aumento de la disponibilidad de iones NO₃ a través de la acidificación producida por el SO₂ (Abrahamsen, 1980). El prototipo de zona que responde a esta sintomatología es el “Fichtelgebirge”, en el NE de Bavaria, y alrededor de esta problemática se han desarrollado, además de los trabajos mencionados, un gran número de estudios (Guderian, 1985; Arndt, 1990; Krupa, 1990; Schätzle *et al.*, 1990; Wedler *et al.*, 1995).

b) Efectos directos del SO₂ en áreas con elevadas concentraciones de fondo de este contaminante, de hasta 50 ppb como promedio anual (Pfanzen y Beyschlag, 1993). Los efectos no están principalmente mediados por cambios en la química del

suelo, sino que son resultado del metabolismo de destoxificación del SO₂ en la planta (Kaiser *et al.*, 1993; Slovik *et al.*, 1996a; Zimmermann *et al.*, 1999). Tampoco se observan deficiencias nutricionales de Mg²⁺ ni otros cationes en las plantas, sino incluso al contrario, acumulación de éstos en las hojas. Las áreas afectadas no se caracterizan necesariamente por tener suelos ácidos, sino que puede ocurrir también en suelos calcáreos. Son zonas representativas de los síntomas descritos las situadas en el Este de Europa, como las “Erzgebirge” en la República Checa. También en torno a esta problemática se han realizado un gran número de estudios, además de los mencionados (Materna, 1981; Pfanzen y Beyschlag, 1993; Slovik, 1996; Slovik *et al.*, 1996b). El presente estudio está enmarcado en el tipo de procesos descritos en este segundo apartado.

El papel del O₃ en estos tipos de síndrome a través de modificaciones en el estado nutricional de los bosques está muy controvertido. Algunos autores han señalado al O₃ como un factor de contribución al declive de los bosques (p.e. Barnes y Davison, 1988) y se ha hipotetizado sobre su posible incidencia incrementando las tasas de lixiviación de nutrientes de las hojas, exacerbando así desequilibrios nutricionales iniciados por la deposición ácida (Keller y Matyssek, 1990). Sin embargo, aún cuando su capacidad fitotóxica es indudable, la mayor parte de los estudios consultados no aportan pruebas que apoyen esta hipótesis (p.e., Westman y Temple, 1989; Keller y Matyssek, 1990; Schätzle *et al.*, 1990; Edwards *et al.*, 1991) ni tampoco efectos directos del O₃ sobre la nutrición foliar (Simmons y Kelly, 1989; Pfirmann *et al.*, 1990; Schätzle *et al.*, 1990; ; Thornton *et al.*, 1990; Ogner, 1993; Shaw y McLeod, 1995; Skeffington y Sutherland, 1995; Wedler *et al.*, 1995; Pfirmann *et al.*, 1996; Sayre y Fahey, 1999).

La concentración foliar de azufre es un buen indicativo de la contaminación por SO₂ (p.e., Pandey y Agrawal, 1994; Polle *et al.*, 1994). Los mecanismos por los que el SO₂ influye de manera directa sobre los cambios en la nutrición de las plantas están relacionados con la acumulación de sulfatos y la acidificación que se produce tras la oxidación del dióxido de azufre (Kropff, 1991). El azufre es un componente esencial de las proteínas y otros compuestos orgánicos, por lo que el S procedente del SO₂ absorbido por las hojas se incorpora hasta cierto punto al metabolismo normal y al crecimiento de las plantas (De Kok, 1990), aunque en especies arbóreas con bajas tasas de crecimiento y baja disponibilidad o requerimientos de N la capacidad de incorporar el azufre al crecimiento está muy limitada (Rennenberg, 1984; Polle *et al.*, 1994; Manninen *et al.*, 1996, 1997). El azufre que no se puede incorporar al crecimiento o destoxificar mediante procesos de reducción química se acumula en forma de sulfatos en la vacuola de las células del mesófilo (De Kok, 1990; Polle *et al.*, 1994; Rennenberg *et al.*, 1996). Ese proceso genera un desequilibrio anio-

catiónico, que es compensado por la acumulación de K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} y otros cationes en las hojas (Kaiser *et al.* 1993; Pfanzen y Beyschlag, 1993; Shaw y McLeod, 1995; Slovik *et al.*, 1996a).

El potasio juega un importante papel en el mantenimiento del equilibrio electroquímico en la célula y la regulación de actividades enzimáticas. Además actúa como regulador osmótico en la apertura y cierre de los estomas. Es el catión más abundante del citoplasma.

Además de su familiar papel como átomo central de la molécula de clorofila, y su función esencial como elemento de agregación de las subunidades de los ribosomas, el Mg^{2+} desempeña, junto con el K^+ , una importante función reguladora del pH en el cloroplasto y el citoplasma. En la vacuola de la célula, el Mg^{2+} actúa como un equilibrador de los aniones orgánicos e inorgánicos allí almacenados. El magnesio interviene también en la acción de diversas enzimas. Aunque una deficiencia fuerte en Mg^{2+} produce habitualmente clorosis (típicamente por debajo de $300-350 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, Lange *et al.*, 1989; Weikert *et al.*, 1989), no existe una relación directa entre la cantidad de magnesio presente en la hoja y la cantidad de éste que se liga a la molécula de clorofila, ya que sólo una pequeña proporción del Mg^{2+} entra a formar parte del pigmento (Marschner, 1988).

El calcio se encuentra en proporciones considerables en la pared de las células vegetales, manteniendo su integridad. También tiene importancia en el metabolismo del nitrógeno y es un activador de ciertos enzimas. El calcio es un elemento muy poco móvil en la planta, tendiendo a quedar acumulado a lo largo del período de maduración de la hoja, por lo que su concentración suele ir en aumento.

Algunos autores han descrito que el SO_2 puede interferir en el metabolismo del nitrógeno mediante inhibición o disminución de la actividad de enzimas implicados en su asimilación (Wellburn *et al.*, 1981; Wolfenden *et al.*, 1991; Van Hove *et al.*, 1992; Pandey y Agrawal, 1994) o inhibición parcial de la síntesis de proteínas Pérez-Soba *et al.* (1994). Es bien conocido el papel del nitrógeno en la fotosíntesis a través de su participación en los complejos pigmento-proteína captadores de luz y en los enzimas de la fase oscura de la fotosíntesis, particularmente en la Rubisco (Field y Mooney, 1986; Evans, 1989; Ellsworth y Reich, 1992), por lo que los efectos del SO_2 sobre la concentración foliar de N pueden tener importantes repercusiones en la capacidad fotosintética y en el crecimiento de las plantas.

Los productos de reacción del O₃ pueden atacar a los aminoácidos y a las proteínas (Wellburn y Wellburn, 1994), lo que explicaría la disminución de la concentración foliar de N observada por diversos autores (Bytnerowicz *et al.*, 1990; Peñuelas *et al.*, 1994; Elvira *et al.*, 1995; Momen *et al.*, 1996; Kellomäki y Wang, 1997). Por otra parte, el ozono produce un daño sobre las proteínas de membrana (Barnes y Davison, 1988; Castillo y Heath, 1990) incrementando su permeabilidad. De hecho, en células aisladas se ha encontrado un aumento de la salida de K⁺ por efecto del O₃ (Chimiklis y Heath, 1975). Esos procesos intervendrían en el aumento de lixiviación de nutrientes observada por Lucas *et al.* (1993) por efecto del ozono. Sin embargo, un elevado número de autores no han observado efecto alguno del O₃ en el estado nutricional de diversas especies de coníferas por lo que en ocasiones se ha cuestionado la importancia de este contaminante en el declive de los bosques (Skefington y Sutherland, 1995; Pfirmann *et al.*, 1996).

Los objetivos del presente capítulo son: valorar los efectos del SO₂ y del O₃ sobre la concentración foliar de los macronutrientes S, N, K, Mg, Ca y P, así como establecer la posible interacción de esos contaminantes. Por otra parte, sugerir mecanismos de acción de los contaminantes que puedan explicar los cambios en la concentración de nutrientes en las acículas. Finalmente, identificar el efecto de la propia cámara en el contenido de nutrientes.

4. 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron 4 muestreos de la concentración foliar de nutrientes a lo largo de cada año de experimentación, coincidiendo con las estaciones del año.

Se muestrearon 6 pinos al azar de cada cámara de manera que se obtuvieron 18 árboles como representación de cada tratamiento. Se seccionó una ramilla de cada individuo, separándose las acículas según clases de edad y analizándose éstas por separado. En el caso de que la muestra extraída a cada árbol fuese insuficiente, se combinaron muestras procedentes de dos o tres individuos. Una vez separadas de la ramilla, las acículas se dejaron secar en estufa a 70°C hasta peso constante. Tras su desecación, se trituraron en un molino Tecator Cyclotec 1093, hasta reducirlas a un polvo lo más fino posible. Posteriormente, la muestra se sometió a dos procesos distintos, según los elementos a analizar.

La determinación del contenido en P, S_{total}, K⁺, Mg⁺ y Ca²⁺ se realizó según el protocolo establecido por Mateo y Sabaté (1993) mediante el procedimiento de digestión ácida. A la muestra triturada y seca se le añadió una mezcla biácida (2 volúmenes de ácido nítrico / 1 volumen de ácido perclórico) y se puso en un baño de arena dentro de un horno microondas durante 20 minutos. La utilización de un microondas en lugar de un método más convencional de calentamiento en baño de arena propició la aceleración del proceso de digestión. Una vez digerida la muestra, se dejó enfriar y se llevó a 20 ml con una solución al 3% de ácido perclórico en agua. La muestra resultante se guardó a 4°C hasta que fue analizada mediante espectroscopía de plasma de emisión (ICP-AES) con sensor multicanal (Term Jarrell Ash Polyscan 61E) en el Servei Científic-Tècnic de la Universidad de Barcelona.

Otra fracción de la muestra triturada y seca se utilizó para la determinación del contenido de N_{total} en las acículas. Para ello se utilizó un analizador Carlo-Erba D-700 del Servei Científic-Tècnic de la Universidad de Barcelona.

A partir de los resultados de la concentración de nutrientes en peso seco y de los valores del área específica de la hoja (capítulo 8) y de la proporción peso fresco/peso seco de las acículas, se calculó la concentración sobre la base del área foliar y del peso fresco, con resultados similares a los que se presentan a continuación, expresados en % del peso seco (salvo en el caso de la concentración foliar de N, que se expresa también sobre la base del área foliar).

Para cada macronutriente, muestreo y clase de edad se promediaron los resultados de los 6 individuos de cada cámara o parcela ambiente. Como existen tres cámaras por tratamiento, el tamaño de muestra fue $n=3$. Cuando el objetivo fue determinar el efecto del SO_2 y del O_3 y su posible interacción, el tratamiento estadístico consistió en un análisis de la varianza de dos factores (SO_2 y O_3) con interacción. En el caso de observarse una interacción significativa entre ambos factores, se procedió a un análisis de la mínima diferencia significativa (LSD) calculada para el nivel del 5 %, con objeto de determinar las diferencias significativas entre los tratamientos. Cuando se compararon solamente dos muestras independientes (por ejemplo el SO_2 con el AF, el AA con el ANF, o dos clases de edad diferentes), se empleó el test de la t-Student. En los resultados que se presentan a continuación se señalan las diferencias significativas para $p<0.05$ y para $p<0.10$.