



GRADO EN QUÍMICA

Trabajo Fin de Grado



**ACTIVIDAD β -GLUCOSIDASA DE UN SUELO
DE DEHESA EN UN ESCENARIO DE CAMBIO
CLIMÁTICO**

José María Naranjo Pérez

Sevilla, 2019

Agradecimientos

En primer lugar debo mencionar a mis tutores Antonio Jordán y José Antonio González, por permitirme trabajar con en este proyecto. Por supuesto gracias a mis padres, sobretodo a mi madre, por recibirme cada día con una sonrisa y transmitirme su energía positiva en cualquier momento, y a mi padre, porque desde pequeño me ha transmitido que puedes lograr cualquier cosa que te propongas con determinación y sacrificio.

No puedo olvidar a mis amigos, Agustín Casares, Roberto Rodríguez, Carlos Mulero, Andrés Casadon, Carlos Jesús Montero... por darme un apoyo, en esos momentos en los que he necesitado hablar y desahogarme.

Agradezco muchísimo el optimismo que me han transmitido José Luis Millán y Débora Álvarez, por sus constantes palabras de animo.

Ha sido un placer trabajar en el IRNAS haciendo especial mención a Desi, Irene y Jessica.

Y por último, y más importante a Layla San Emeterio, que me ha estado suministrando datos y bibliografía, ayudándome e interesándose por el estado de este trabajo, ya fuera en España o en su estancia en Bristol, y a Sol Santolalla, por escucharme, por aconsejarme cuando estaba un poco perdido, por ofrecerme esos momentos de desconexión tan necesarios, por apoyarme y por haber estado en todo momento ahí.

Muchísimas gracias a todos.

Abstract	1
Resumen	2
1 Introduction	3
1.1 Soil as a carbon sink	3
1.2 Organic matter in Mediterranean soils	3
1.3 Effects of agricultural and livestock practices on the carbon cycle	4
1.4 Microbial diversity and soil quality indicators	4
1.5 β -glucosidase as an indicator of soil quality	6
2 Objetivos	8
3 Material y métodos	9
3.1 Diseño experimental	9
3.2 Área de estudio	11
3.3 Toma de muestras	15
3.4 Procesado de suelo y otros análisis	16
3.5 Análisis de datos	18
4 Resultados	20
4.1 Valores medios de humedad del suelo en relación al tratamiento y hábitat en cada finca	20
4.2 Valores medios de pH en relación a los tratamientos y hábitats en cada finca	22
4.3 Efectos del hábitat y tratamiento sobre los valores de actividad de la β -glucosidasa en el suelo de cada finca	22
4.4 Relación entre la actividad enzimática de la β -glucosidasa en función de la acidez del suelo	26
5 Discusión	28
5.1 Relación de la actividad de la β -glucosidasa con respecto al tipo de hábitat	28
5.2 Relación de la actividad enzimática de la β -glucosidasa con respecto a los tratamientos de simulación de cambio climático	29

5.3	Relación de la actividad de la β -glucosidasa con respecto a los valores medios de pH 30	
5.4	Relación de la intensidad de herbivoría con la actividad de la β -glucosidasa	31
6	Conclusions	32
	Referencias	33

Abstract

In this experiment carried out in Pozoblanco, Córdoba, 3 places located in the Pedroches Valley with herbivory gradient were chosen. In each of them 12 plots were arranged, 6 under tree cover and 6 in grassland. Each plot contained 3 climate change simulation treatments WD (Warming and Dry), W (Warming) and D (Dry), in addition to a box delimited inside it for control, with the aim of checking how they affect the β -glucosidase enzyme activity. Once the soil samples were extracted, they were taken to the laboratory to perform the corresponding analyzes and find out the pH, humidity and enzymatic activity of the β -glucosidase, an enzyme that plays a crucial role in the mineralization of the cellulose present in the soil, hydrolyzing it in β -glucose monomers, easily assimilated by plants. Once the variables were determined, it was concluded that the herbivory, with the data obtained based on the methods performed, could not be included as a faithful parameter in its relation to the activity of the β -glucosidase, and to fully explain the values pH measurements would need to determine the urea content of the soil. However, it was found that the moisture content of the soils maintained an inversely proportional relationship with the activity of the β -glucosidase and that in habitat under a tree, possibly due to the organic matter content due to the presence of litter, the activity of the β -glucosidase was higher. Finally, the mean values of enzymatic activity of soils with WD and D treatments were directly related to the activity of the enzyme, suggesting that β -glucosidase is a possible indicator of the effects of climate change on the soils of the systems of pasture.

Resumen

En este experimento realizado en Pozoblanco, Córdoba, se eligieron 3 fincas situadas en el valle de los Pedroches con gradiente de herbivoría. En cada una de ellas se dispusieron 12 parcelas, 6 bajo cobertura arbórea y 6 en pastizal. Cada parcela contenía 3 tratamientos de simulación de cambio climático WD (Warming and Dry), W (Warming) y D(Dry), además de un cuadro delimitado en el interior de ésta para el control, con el objetivo de comprobar cómo afectan a la actividad de la enzima β -glucosidasa. Extraídas las muestras de suelo, se llevaron al laboratorio para realizar los análisis correspondientes y averiguar los valores de pH, humedad y actividad enzimática de la β -glucosidasa, una enzima que juega un papel crucial en la mineralización de la celulosa presente en el suelo, hidrolizándola en monómeros de β -glucosa, fácilmente asimilable por las plantas. Determinadas las variables, se llegó a la conclusión de que la herbivoría, con los datos obtenidos en base a los métodos realizados, no se podía incluir como un parámetro fiel en su relación con la actividad de la β -glucosidasa, y para explicar por completo los valores medidos de pH necesitaríamos determinar el contenido en urea del suelo. Sin embargo, se halló que el contenido en humedad de los suelos, mantenía una relación inversamente proporcional con la actividad de la β -glucosidasa y que en hábitat bajo árbol, debido al contenido en materia orgánica por la presencia de hojarasca, la actividad de la β -glucosidasa era mayor. Por último, los valores medios de actividad enzimática de los suelos con tratamientos WD y D, estaban directamente relacionados con la actividad de la enzima, pudiendo sugerir que la β -glucosidasa es un posible indicador de los efectos de cambio climático en los suelos de los sistemas de dehesa.

1 Introduction

1.1 Soil as a carbon sink

Soil constitutes the physical environment that makes possible the development of living beings, providing nutrients for the growth of plants, which are essential for animal and human nutrition. From another point of view, soil is also responsible of recycling and detoxification of organic substances, as well as the recycling of gases and nutrients, and acts as a source of raw materials (Bezdicsek et al. 1996; Harris et al. 1996). Soil is widely considered as a non-renewable resource, as natural processes necessary for its formation occur very slowly. It is one of the main carbon sinks, after the oceans. Globally, soil contain approximately 1550 Gt of organic C in the top 1 m (from a total of approximately 2500 Gt C), and soil organic C sequestration is estimated between 0.4 and 1.2 Pg C yr⁻¹, equivalent to 6–20 % of the annual release from fossil fuel combustion (Lal, 2004; Houghton, 2005; Muñoz-Rojas et al., 2012).

Depending on the region, climate change could cause more carbon storage in the soil and plants due to the growth of vegetation, land use change or higher carbon emissions into the atmosphere (Muñoz-Rojas et al., 2011). The study of soil systems and land use policies in rural and urban areas may help us to mitigate and adapt to climate change (Muñoz-Rojas et al., 2012).

Generally, climate change is understood as a phenomenon occurring only in the atmosphere. Plants fix atmospheric carbon during photosynthesis, a mechanism that also affects soil: carbon not used for plant growth above the soil surface is distributed through the roots and, finally, enters the soil. Soil carbon included in stable molecules may stay confined for thousands of years, so contributing to carbon sequestration in the long term. Therefore, healthy soil can contribute to mitigate climate change.

1.2 Organic matter in Mediterranean soils

Soil is constituted by a set of three phases: solid, liquid and gas. The solid phase is formed by both inorganic and organic materials. Buyanovsky et al. (1994) defined this fraction as a “very heterogeneous component that includes numerous carbon compounds, ranging from easily minerabilizable sugars to complex and recalcitrant compounds, which are products resulting from microbial transformations, and whose residence times vary from

a few minutes to hundreds of years". Soil quality is largely governed by its organic matter content, which is a dynamic attribute that responds quickly to changes to impacts as land use change, changes in soil management or soil degradation. Soil organic carbon is a key for maintaining soil quality and ecosystem functionality, with important implications in global carbon cycle (Zhang et al., 2018).

Although there are very few studies providing accurate regional estimates of soil organic C contents in Spain, especially in relation to land cover and land use data (Muñoz-Rojas et al., 2012), some authors, have addressed this question, as Rodríguez-Murillo (2001), Zornoa (2007) and Muñoz-Rojas et al. (2011; 2012). mainly because of practices such as intensive agriculture and anthropic erosion. Agriculture is one of the main factors contributing to decreased soil organic matter contents, which, in many cases, are below the minimum necessary to maintain a healthy, fertile and stable soil (Zornoza 2007). Decreased soil organic matter contents may affect the structure and stability of the soil, the buffer capacity, water retention, biological activity and nutrient exchange.

1.3 Effects of agricultural and livestock practices on the carbon cycle

Climate change is not the only factor that can make soil shift from carbon sink to carbon source. The main alterations observed in the natural balance of a soil are produced by agricultural practices (Kieft et al. 1994), the way we use the soil also influences the amount of carbon that it can retain. Anthropic impacts accelerate decomposition and mineralization of organic matter that is enhanced in Mediterranean soils because they develop under semi-arid conditions, and are more vulnerable to degradation processes (Anderson, 2003). Consequently, it is necessary to characterize and control changes in soil quality, to assess soil quality in order to make realistic estimates of production, monitor changes in order to favour ecosystems sustainability and help public administrations to evaluate and formulate sustainable land use policies (Granatstein and Bezdicek, 1992).

1.4 Microbial diversity and soil quality indicators

Soil quality indicators are parameters that can be measured easily and provide information on soil ability to carry out its environmental functions and agronomic production. There are specific attributes that are more sensitive to management practices that are the most

desirable as indicators (Arshad and Martin 2002). Some of these are microbial diversity and activity.

Microorganisms are essential for soil development and conservation. Their interrelations with the abiotic environment and their participation in different stages of the decomposition of organic residues are part of soil self-regulating processes. The search for adequate quality indicators should include parameters that represent the links between the biotic and abiotic environment (Anderson, 2003). In this sense, indicators related to biodiversity and the structure of microbial communities are specific indicators of the functioning and sustainability of the ecosystem, since they are sensitive and respond quickly and directly to changes in the environment. Some of the most used indicators are related to enzymatic activity.

Enzymatic activity is a determining factor in the nutrient supply of plants and in the decomposition of organic matter, since it provides information on the microbial state and soil physicochemical conditions (Aon and Colaneri, 2001; Baum et al., 2003; Sinsabaugh et al., 2008). Soil enzymes are produced mainly by microorganisms and, to a lesser extent, by plants and animals. Some of them are directly related to microorganisms, while others are synthesized and excreted. β -glucosidase is an extracellular enzyme, secreted by many taxa of bacteria and fungi. It is an important part of the soil matrix, directly related to the proportion of organic carbon (Sinsabaugh and Moorhead, 1994).

The use of extracellular enzymatic activity as a biological indicator of soil quality is of great interest, because it is relatively easy to measure, sensitive to environmental stress and responds quickly to changes in soil management (Yakovchenko et al., 1996; Dick, 1997). The activity of extracellular enzymes may be affected by soil temperature, humidity, pH, concentration of available nutrients and other chemical properties of the topsoil layer, where biological activity concentrates (Sinsabaugh et al., 2008; Baldrian et al., 2012). β -glucosidase (EC 3.2.1.21) plays an important role in the mineralization of soil organic matter because it is responsible for the breakdown of low-molecular weight carbohydrates, producing sugars as a product of their hydrolysis, which are an important source of resources for soil microorganisms (Eivazi and Tabatabai, 1990). This enzyme is very active in the early stages of the degradation of organic compounds. In this case, the molecular size of the organic structures is reduced thus facilitating the future microbio-enzymatic activity (Sardans et al., 2008).

Studies of the activity of the enzyme β -glucosidase has shown that bacteria and fungi concentrate in the first centimeters of soil, decreasing rapidly with depth. Specifically, enzymatic activity is usually higher in the rhizosphere than in soil aggregates as a result of an increase in microbial activity, caused by exudates or enzymes released by the roots (George et al., 2005; Villányi et al., 2006). Changes in the composition of the microbial community can be relatively limited in landscapes with a legacy of intensive agricultural or livestock management (Culman et al., 2010), even in response fertilisation (Williams and Hedlund, 2013). In fact, in cropped soils under intensive management, microbial activity will change more rapidly in response to management (Burger and Jackson, 2003).

1.5 β -glucosidase as an indicator of soil quality

The enzyme β -glucosidase is a glucosidase or glycoside hydrolase, capable of catalyzing the hydrolysis of glycoside bonds to generate lower carbohydrates (Figura 1). It is commonly included in a group of extremely important enzymes in the mineralization and degradation of biomass such as cellulose and hemicellulose. Glucosidases form one of the major catalytic groups in the breakdown of glycosidic bonds, are found in bacteria and prokaryotic cells both in the form of intracellular and extracellular enzymes and are involved in the processes of obtaining nutrients.



Figura 1. Simplified process of hydrolysis reaction.

The activity of β -glucosidase consists in catalyzing the hydrolysis reaction of non-reduced terminal residues of β -D-glucose, releasing β -D-glucose according to Figura 2.

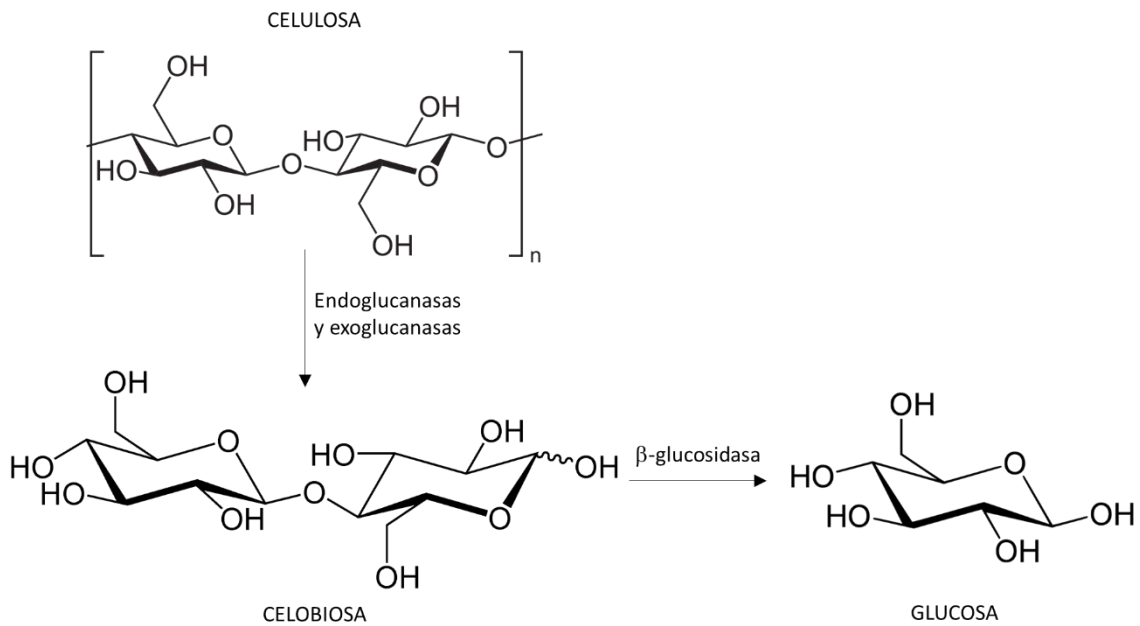


Figura 2. Scheme of enzymatic hydrolysis of cellulose.

The β -glucosidase is involved in the carbon cycle, acting specifically in the hydrolysis of the β -glucosidic bonds of the large carbohydrate chains. Eivazi and Zakariah (1993) demonstrated that the hydrolysis of these substrates play a crucial role in obtaining energy for soil microorganisms. This enzyme may be inhibited in presence of certain elements, toxic components, etc. The activity of β -glucosidase and related enzymes, together with its effect on soil organic matter mineralization may vary strongly among soil layers and vegetation type (Ge et al., 2013).

The chemical, physical and biological characteristics of soil could be studied through different indicators reflecting its state at the time of measurement. The enzymatic activity of β -glucosidase in the soil can be affected by three key factors, habitat type, herbivory pressure and climate change, with a presumably relevant role for the functioning of grasslands. It has been possible to evaluate the role played of β -glucosidase as a catalyst in the hydrolysis of maltose and cellobiose (Eivazi Tabatabai, 1988), these reactions produce different products used by soil microorganisms as energy resources (Tabatabai, 1994; Matsuoka, 2006). The β -glucosidase plays a very important role in the carbon cycle, being also in certain fungi that may be related to soil acidity (Ge et al., 2013; Luo et al., 2019a; Silva Gouveia, 2008).

2 Objetivos

En este trabajo se pretende estudiar la actividad enzimática de la β -glucosidasa en suelos de dehesa bajo clima mediterráneo (i) ante diferentes intensidades de herbivoría y (ii) bajo diferentes escenarios de cambio climático (restricción de precipitaciones, calentamiento y ambos). Se espera que la evaluación de la actividad β -glucosidasa proporcione un indicador válido del impacto del cambio climático en el funcionamiento del sistema suelo.

3 Material y métodos

3.1 Diseño experimental

Para estudiar un gradiente de herbivoría, se eligieron 3 zonas experimentales (ver sección 3.2, página 11, para consultar detalles generales). En cada una de estas zonas se establecieron 12 parcelas de 4 m × 6 m con dos hábitats distintos: 6 situadas bajo cobertura arbórea de encinas (*Quercus ilex*; C) y 6 en pastizal abierto (SC, sin cobertura), sin cobertura arbórea. Dentro de cada parcela se implementaron 3 tratamientos: exclusión de lluvias (D; por *dry*, en inglés), calentamiento (W; por *warming*, en inglés) y exclusión de lluvias y calentamiento (WD).

En el primer caso (D), en cada parcela se instaló una estructura (2.5 m × 2.5 m × 1.5 m – longitud, anchura y altura) que soportaba una serie de canaletas de metacrilato con sección en V (cada una de 11 cm de ancho y con separación entre sí de 36 cm), inclinadas con un ángulo de 20° que hacen fluir hacia el exterior de la parcela aproximadamente un 33% de la precipitación total (Figura 3).

En el segundo caso (W) se simuló el incremento de temperatura en cada una de las parcelas mediante una estructura hexagonal (OTC; por sus siglas en inglés: *open top chamber*) formada por 6 láminas de metacrilato transparente, sin filtro UV, con unas dimensiones de 40 cm (base menor), 50 cm (base mayor, apoyada a una distancia de 5 cm desde la superficie del suelo) y 32 cm (lados derecho e izquierdo) (Figura 4). Cada OTC permaneció abierta por la parte superior para permitir el flujo de aire y la entrada de agua de lluvia (Figura 5). El diseño de las OTC está basado en el descrito por Arft et al. (1999) y Maphangwa et al. (2012).

Con el tratamiento WD se intentaron simular los efectos tanto del calentamiento como de la exclusión de lluvias. Para ello, se instalaron cámaras OTC en el interior de las casetas de exclusión de lluvia (Figura 3). Esta estructura de exclusión permanente de lluvia y aumento de temperatura se ha implementado con éxito en estudios anteriores de simulación de escenarios futuros de cambio climático (por ejemplo: Maestre et al., 2013; Delgado-Baquerizo et al., 2014). Finalmente, un área de cada parcela permaneció sin tratamiento y se utilizó como control (C).

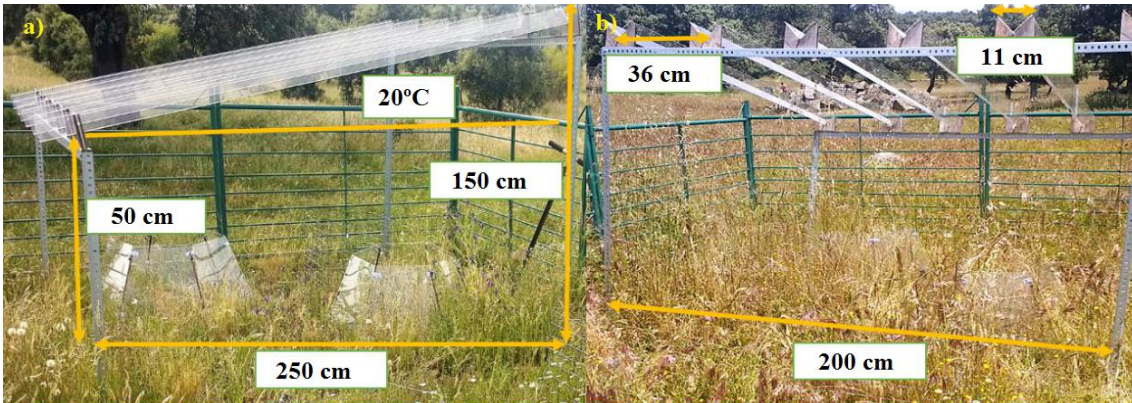


Figura 3. Parte dorsal (a) y frontal del montaje de la estructura del tratamiento de exclusión de lluvia (b).

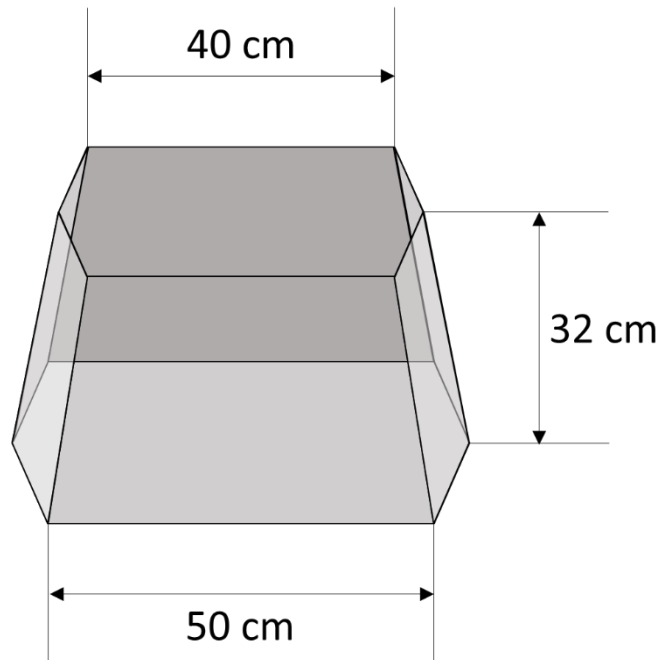


Figura 4. Esquema de la cámara OTC.

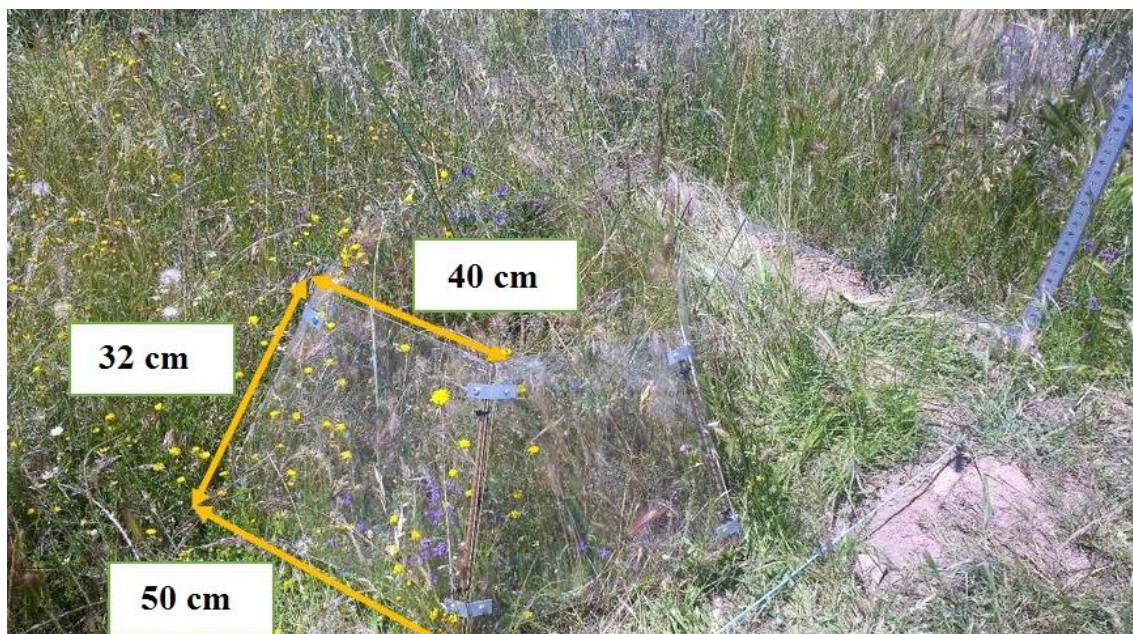


Figura 5. Cámara OTC colocada en el área experimental.

En total, se llevaron a cabo hay 6 repeticiones por cada tipo de tratamiento (D, W, D+W y C), hábitat (pastizal o bajo árbol) y zona experimental (6 repeticiones \times 4 tratamientos \times 2 hábitats \times 3 zona = 144 experimentos). Para conocer el efecto de los tratamientos climáticos en las condiciones micro climáticas, se determinó la humedad del suelo hasta 40 cm de profundidad en cada caso, utilizando una sonda PR2 (Delta-T-Devices) para obtener así un perfil completo de humedad del suelo a diferentes profundidades. Por otro lado, también se instalaron sensores de tipo HOBO Pendant Temp/Alarm (AlphaOmega Electronics) en 24 de las 144 unidades experimentales para cuantificar periódicamente la temperatura del aire y del suelo (en los primeros 10 cm).

3.2 Área de estudio

Para esta investigación se seleccionaron 3 zonas con un marcado gradiente de herbivoría localizadas en el Valle de los Pedroches, en Pozoblanco, Córdoba (Figura 6). En primer lugar, la Finca “La Panadera” (latitud y longitud en grados decimales: 38.37564, -4.83331), donde se ha excluido el ganado desde hace más de 20 años con el objetivo principal de fomentar la recuperación del arbolado (Figura 7). En segundo lugar, la Finca “Fuente La Raya” (38.37668, -4.832792), donde existe una carga ganadera intermedia de

0.64 UGM ha⁻¹ * (Figura 8). Finalmente, la Finca “La Morra” (38.39484, -4.80601) posee una carga ganadera elevada, con un valor de 0.85 UGM ha⁻¹(Figura 9).



Figura 6. Localización de las tres zonas de estudio (La Morra, Fuente La Raya y La Panadera).

El tipo de clima de la zona de estudio es Mediterráneo. Según la estación climática de Pozoblanco (código 4275; Figura 10), la precipitación media está en torno a 512.1 mm anuales, con un máximo en diciembre (62.8 mm) y un mínimo en agosto (7.2 mm). La temperatura media mensual oscila entre 7.2 (enero) y 26.9 °C (julio), con un valor medio anual en torno a 16.1°C. La evapotranspiración potencial oscila entre 12.4 (enero) y 117.4 mm (julio), con un valor medio anual de 655.4 mm. Como consecuencia, el período seco (durante el que la evapotranspiración potencial es mayor que la precipitación) se extiende desde mayo a octubre.

* Unidades de ganado mayor por hectárea.



Figura 7. Vista general de la finca La Panadera.



Figura 8. Vista general de la finca Fuente La Raya.



Figura 9. Vista general de la finca La Morra.

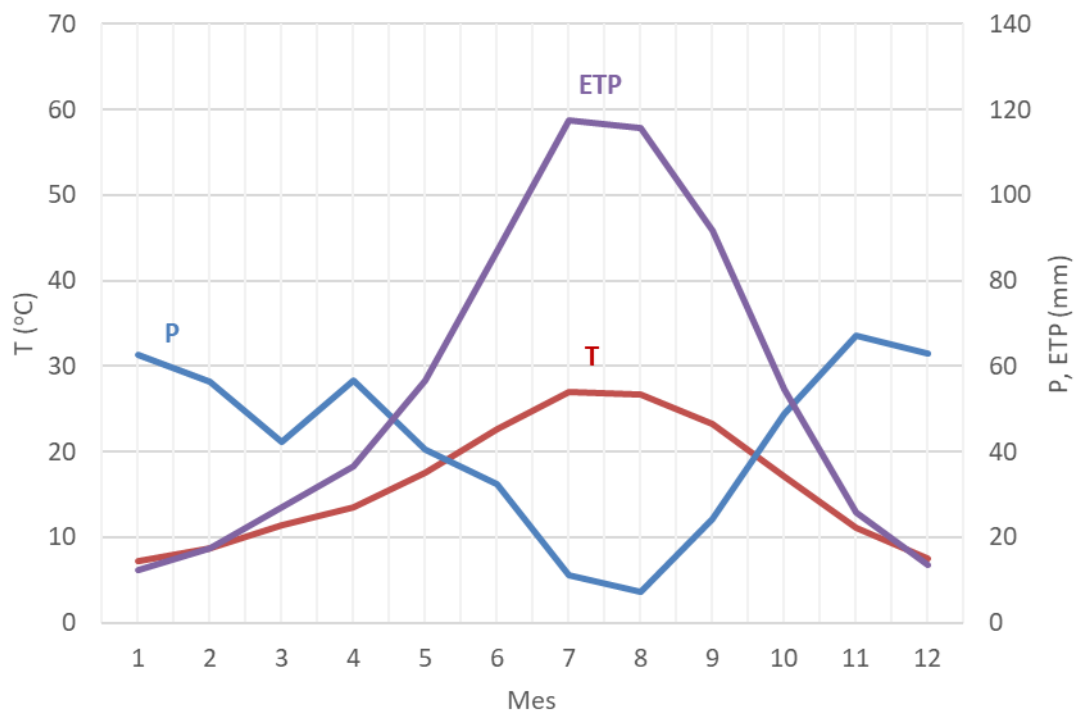


Figura 10. Diagrama ombroclimático correspondiente a la estación Pozoblanco (Código 4275). Leyenda: T, temperatura media mensual (°C); P, precipitación media mensual (mm); ETP, evapotranspiración potencial media mensual (mm).

El uso dominante en el área de estudio es de cultivos herbáceos, alternado con pastizal con quercíneas dispersas (dehesa). El sustrato litológico está formado fundamentalmente por granodioritas, con abundantes diques de rocas ígneas (filones de pórfidos riolíticos, riocácíticos y adamélticos), la mayoría en dirección NE-SO (Quesada, 2008). En general, la elevación es moderada (en torno a 640 msnm). El relieve es suave, de morfogénesis estructural o estructural denudativa, con pendientes entre 0 y 5%. La mayoría de los suelos son de escaso desarrollo, destacando los Cambisoles éutricos y, en menor proporción, Cambisoles háplicos y Leptosoles mólicos en las zonas de mayor intensidad erosiva (Bellinfante et al., 2007). El tipo de suelo dominante es relativamente ácido, pobre en carbono orgánico y presenta una textura arenosa o arenolimososa (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción físico-química del perfil de suelo típico de la zona de estudio, Cambisol éutrico (Bellinfante et al., 2007). CO: carbono orgánico; CIC: capacidad de intercambio catiónico; V: saturación del complejo de cambio.

Horizonte	Profundidad (cm)	pH	CO (%)	N (%)	CO₃Ca (%)	CIC (cmol (+) kg⁻¹)	V (%)	Arena (%)	Arcilla (%)
A	0 – 15	5.8	0.92	0.15	0.00	84.4	100	79.29	0
Bw	15 – 40	5.4	1.23	0.14	0.00	31.4	100	76.8	0
B/C	40 – 85	6.0	0.82	0.65	0.00	78.5	100	81.8	2.5
C	85 – 100	6.1	0.66	0.56	0.00	146.2	100	86.8	2.4

3.3 Toma de muestras

Hacia el final de la primavera (Abril de 2019), con la ayuda de una barrena y un martillo (Figura 11-a y Figura 11-b), se tomaron 4 muestras de suelo a una profundidad de 10 cm (Figura 11-c) en diferentes puntos de cada parcela experimental. Tras ello, las muestras de suelo contenidas en bolsas de plástico herméticamente cerradas y correctamente etiquetadas, se transportaron rápidamente al laboratorio en neveras portátiles y se almacenaron en una cámara refrigerada a 4 °C (para evitar el deterioro de la microbiota del suelo). Antes de los análisis de laboratorio, todas las muestras fueron tamizadas usando un tamiz con una luz de malla de 4 mm. Para evitar la contaminación entre muestras, la barrena fue desinfectada con lejía diluida al 10% al pasar de una unidad experimental a otra.

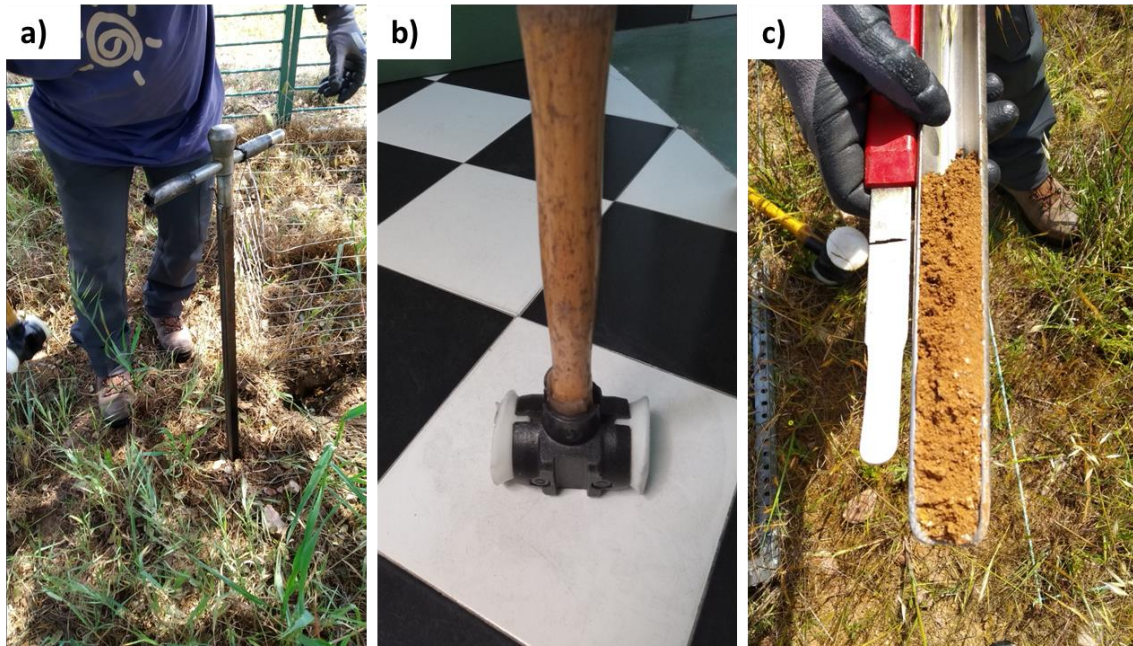


Figura 11. Barrena (a), martillo (b) 7 muestra de suelo de 10 cm de profundidad (c).

3.4 Procesado de suelo y otros análisis

3.4.1 Tamizado

Para obtener una muestra homogénea, eliminando biomasa y pequeñas rocas, el suelo fresco se tamizó (1 mm; Figura 12-a) y se depositó en recipientes de plástico correspondientemente etiquetados con el nombre del proyecto y el código asignado por finca y tratamiento (Figura 12-b). Inmediatamente después, todas las muestras se almacenaron a 4 °C.

3.4.2 Cálculo de la humedad

El suelo fresco se pesó en pequeñas bandejas de cerámica (Figura 12-e), previamente mantenidas durante un tiempo suficiente en estufa para evitar que tomaran humedad del ambiente. Durante este proceso fue necesario utilizar guantes para evitar el contacto directo de las manos con las bandejas y limpiar muy bien la cucharilla o espátula con la que se toma el suelo entre muestra y muestra. Una vez pesadas las muestras de suelo y depositadas en los recipientes, se introdujeron en estufa (24 h, 60 °C). Posteriormente, se pesaron las bandejas de cerámica, y se calculó el porcentaje de humedad del suelo como la diferencia de peso mediante la siguiente fórmula:

$$H = \frac{SH - SS}{SS} \times 100$$

Donde SH es el peso de la muestra de suelo húmedo (g), SS es el peso de la muestra de suelo seco después de 24 h a 60 °C (g) y H es el contenido en humedad (%).

3.4.3 Determinación de la actividad de la β -glucosidasa mediante fluorometría

El estudio de la actividad enzimática de la β -glucosidasa en el suelo se ha llevado a cabo según Domínguez et al. (2017).

Previamente a la determinación analítica fue necesario lavar todo el material con ácido diluido. Después, se preparó una disolución tampón, añadiendo 13.608 g de acetato de sodio trihidrato y ajustando posteriormente con ácido acético glacial hasta pH 5.5. Una vez ajustado el pH, se enrasó a 2 L. Este tampón se colocó en un dispensador (donde puede conservarse en frío hasta una semana, teniendo en cuenta que antes de utilizarlo para el análisis enzimático se debe sacar de la nevera para que alcance una temperatura de 25 °C).

Se realizó una recta patrón a partir de un estándar MUB (4-metil umbeliferona), un sustrato fluorescente que reacciona con la presencia de la enzima β -glucosidasa en la muestra. También se elaboró una solución 1000 μ M (concentrado para que se pueda medir bien en balanza de precisión), diluyéndolo posteriormente hasta 100 μ M y repartiéndolo en varios recipientes de plástico (de unos 10 mL). Posteriormente, se mantuvo a -20 °C hasta su uso. A partir la solución intermedia (100 μ M) se prepararon los patrones para realizar la curva de calibrado (Tabla 2).

Tabla 2. Cálculo de las alícuotas necesarias para preparar la curva de calibrado de actividad β -glucosidasa a partir de una solución de MUB 100 μ M.

Concentración del patrón (μM)	50	25	10	5	2.5	0
Alícuota de MUB 100 μM diluida en 25 mL de H₂O miliQ.	12.5 mL	6.25 mL	2.5 mL	1.25 mL	625 μ L	0 μ L

Para la determinación de la actividad de la β -glucosidasa se utilizó como sustrato específico 4-MUB- β -D-glucósido para β -glucosidasa. Para preparar el sustrato se utilizaron 100 mL de 4-MUB- β -D-glucósido (200 μ M). Este volumen se repartió en recipientes de 10 mL que fueron congelados hasta el momento de su uso (con un tiempo máximo de almacenamiento de 1 mes). Mediante la balanza de precisión se pesaron

0.00677 g de 4-MUB- β -D-glucósido y se depositaron en un vaso de precipitado pequeño. Posteriormente, se añadió H₂O miliQ y se dejó agitando (ya que algunos sustratos son pocos soluble solubles en agua y tardan en disolverse, se puede calentar un poco durante la agitación, pero no más de 50 °C). Posteriormente se enrasó a 100 mL, se repartió la solución resultante en recipientes de 10 mL que se introdujeron en congelador.

Para comenzar la determinación de la actividad enzimática de la β -glucosidasa, en primer lugar, se descongeló un tubo del sustrato 4-MUB- β -D-glucósido, un tubo MUB 100 μ M, y se sacó el tampón de la nevera (o se calienta con agua caliente) hasta que alcanzó una temperatura de 25 °C. Se preparon los esquemas de las microplacas, apuntando en cada caso la muestra correspondiente y los posibles fallos de pipeteo.

Una vez que se preparó todo el material se procedió de la siguiente manera: en un tubo mayor de 100 mL se pesó 1 g de suelo seco y se añadieron 100mL de tampón. El tubo se cerró bien y agitó vigorosamente en el agitador horizontal durante 10 minutos. En una placa Petri con un agitador magnético pequeño, se vertió un poco de la mezcla de suelo/ tampón sin filtrar, colocándolo posteriormente en el agitador magnético. Después, se tomó una parte de suspensión de suelo de la placa con pipeta multicanal (8 puntas) mientras se agita 200 μ L, y se transfirió a una placa de 96 pocillos. Más tarde, se añadieron 50 μ L de sustrato a cada pocillo. En ese momento, se cubrió la placa con lámina de parafina y se aguardó un tiempo de incubación de 1 h. Pasado el tiempo de incubación, se retiró la parafina y se midió en lector OMEGA (Figura 12-d).

3.4.4 Determinación de la acidez

Para determinar la acidez del suelo se introdujeron 5 g de suelo seco en un tubo Falcon (Figura 12-c) con un volumen de 50 mL de agua destilada y se homogeneizó con ayuda de un agitador automático. Una vez homogeneizado, se midió el pH, utilizando un pH-metro (Figura 12-f).

3.5 Análisis de datos

Para cada conjunto de datos de las variables medidas se comprobó la normalidad y homogeneidad de las varianzas mediante los tests de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Una vez que se comprobó que se cumplía la hipótesis nula en cada caso, se utilizaron estadísticos y tests paramétricos para el análisis de datos. Para comprobar diferencias entre grupos se realizó un ANOVA multifactorial. Para encontrar diferencias

significativas entre medias de distintos grupos se llevaron a cabo tests de comparación de medias.

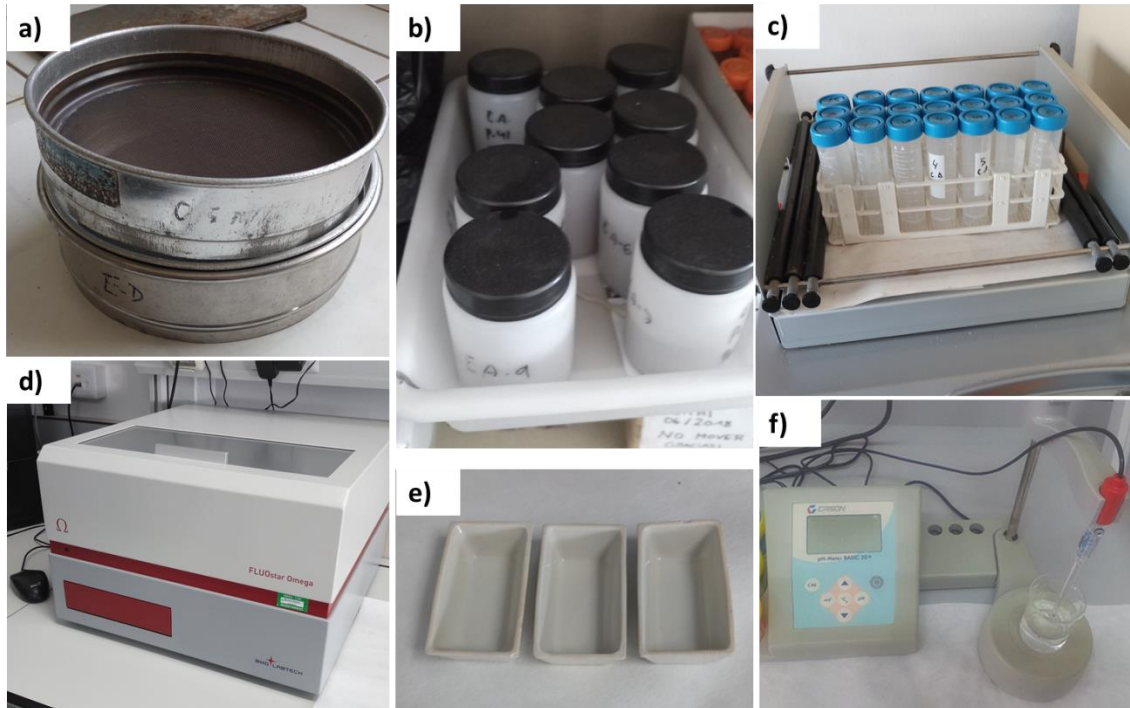


Figura 12. Tamices utilizados en el procesamiento de las muestras de suelo (a); muestras de suelo almacenadas en recipientes de plástico (b); tubos Falcon en agitador automático (c); lector Omega (d); bandejas de cerámica para el cálculo de la humedad (e) y pH-metro (f).

4 Resultados

4.1 Valores medios de humedad del suelo en relación al tratamiento y hábitat en cada finca

La humedad media de los suelos de cada finca fue muy diferente (Figura 13). Tanto en los puntos bajo cobertura arbórea (C) como sin cobertura (SC), los valores medios de humedad más altos se observaron en las muestras control de la finca “La Morra” (9.71 y 12.82%, respectivamente).

En el caso de los suelos de las fincas “Panadera” y “Fuente la Raya” bajo cobertura arbórea (Panadera-C; Fuente la Raya-C) no se observó una relación clara entre el contenido en humedad del suelo y el tipo de tratamiento o el control, mostrándose en todos los casos una distribución irregular. En estos casos, el contenido medio en humedad osciló entre 9.60 y 2.50%, con promedios de 5.74 (Panadera-C) y 6.88% (Fuente La Raya-C). Por el contrario, los valores de humedad de Morra bajo cobertura arbórea (Morra-C) sí mostraron un rango de variación más amplio entre tratamientos, con valores medios entre 6.69 (tratamiento WD) y 9.71% (control).

En el caso de los suelos sin cobertura arbórea, el comportamiento fue similar en las tres zonas experimentales, con valores medios decreciendo según la secuencia $C > W > D > WD$. Este comportamiento fue más acusado en el caso de Morra, donde la presión ganadera es más intensa. En cada una de las fincas, los valores medios de humedad oscilaron entre los de suelo bajo tratamiento WD (5.08%, Panadera-SC; 6.69%, Fuente La Raya-SC; 5.69%, Morra-SC) y el control (9.54%, Panadera-SC; 8.69%, Fuente La Raya-SC; 12.82%, Morra-SC).

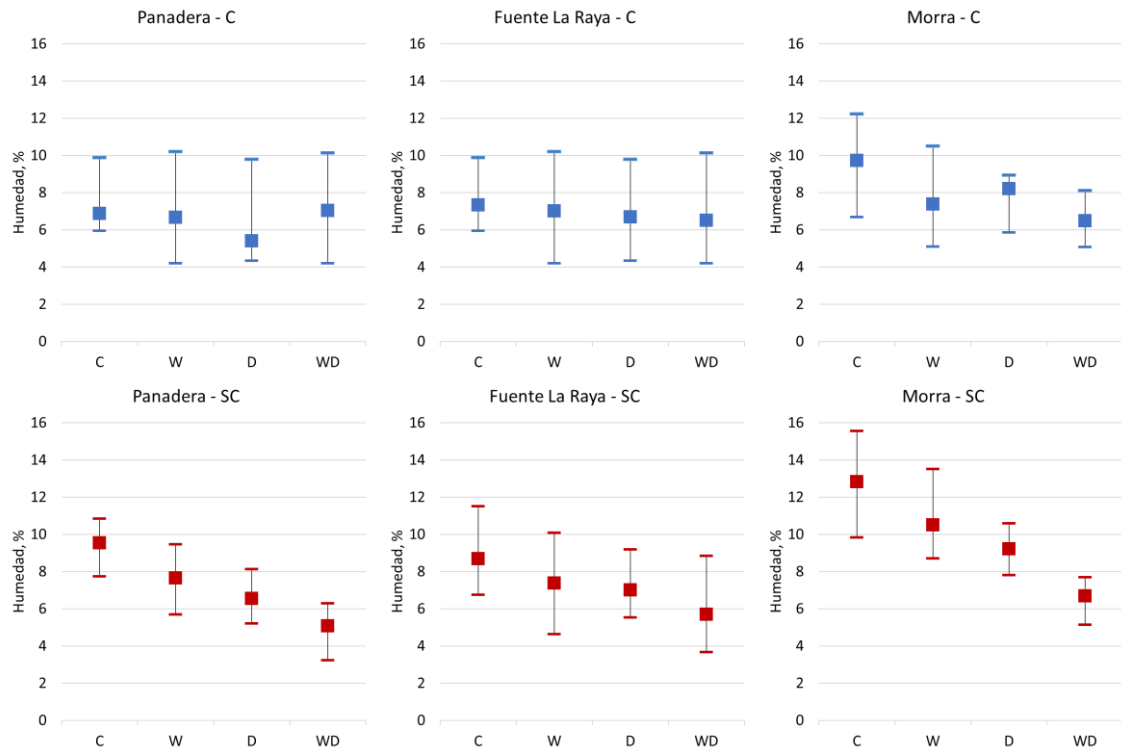


Figura 13. Humedad media de las muestras de suelo en cada finca experimental (Panadera, Fuente La Raya y Morra) por tratamiento (control, C; calentamiento, W; exclusión de lluvia, D; calentamiento y exclusión de lluvia, WD) y hábitat (bajo cobertura arbórea, -C; sin cobertura arbórea, -SC). Las líneas verticales indican el rango de la variable. N = 6 en todos los casos, excepto en Fuente La Raya (N = 5).

Al comparar el contenido en humedad de los suelos sometidos a los diferentes tratamientos (D, W y WD) con el control (C) (Figura 14) se observó que, en general, las pérdidas fueron mayores en las muestras sin cobertura (SC) en todos los casos, resultó, que las muestras de suelo recogidas en la finca “La Morra” fueron las que perdieron mayor contenido en humedad tras el tratamiento. La finca “Fuente La Raya” fue la que menor contenido en humedad perdió tras su análisis en la exposición a los tratamientos.

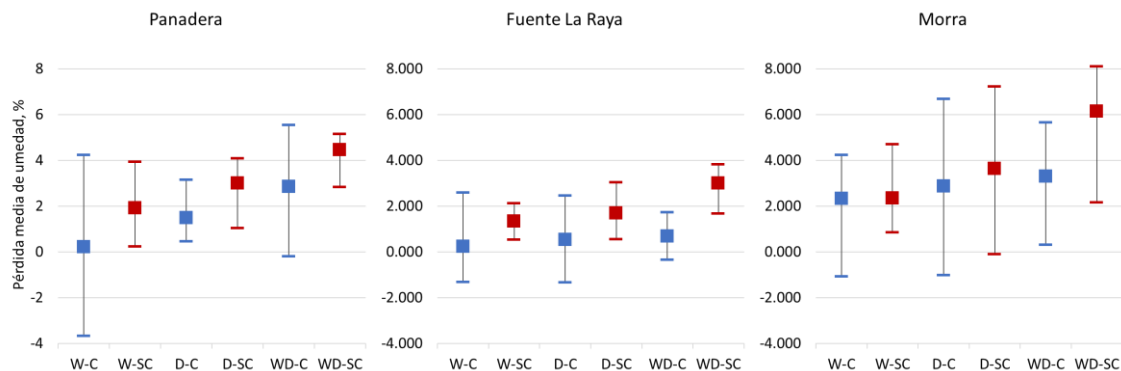


Figura 14. Pérdida media de humedad de las muestras de suelo respecto al control en cada finca experimental (Panadera, Fuente La Raya y Morra) por tratamiento (calentamiento, W; exclusión de lluvia, D; calentamiento y exclusión de lluvia, WD) y hábitat (bajo cobertura arbórea, C; sin cobertura arbórea, SC). Las líneas verticales indican el rango de la variable. N = 6 en todos los casos, excepto en Fuente La Raya (N = 5).

Aunque no hay una clara relación entre los contenidos en humedad del suelo con la intensidad de herbivoría, se puede observar que la pérdida de humedad con los diferentes tratamientos es mayor en el caso de la finca Morra, donde la presión ganadera es mayor.

4.2 Valores medios de pH en relación a los tratamientos y hábitats en cada finca

La acidez del suelo (Figura 15) no mostró gran variación entre distintos tipos de hábitat y tratamiento. Los valores medios de pH oscilaron entre 6.2 y 6.5. El valor más bajo se observó en Morra-C bajo tratamiento D (pH = 5.81) y el mayor en Fuente La Raya-SC bajo tratamiento D (pH = 7.53).

Aunque pueden verse pequeñas diferencias entre los puntos bajo cobertura arbórea y los situados fuera de ella, estas no son significativas ni tienen ningún sentido ecológico en ningún caso.

4.3 Efectos del hábitat y tratamiento sobre los valores de actividad de la β -glucosidasa en el suelo de cada finca

La Tabla 3 muestra los resultados del análisis de normalidad de los datos de actividad β -glucosidasa. En todos los casos, la distribución de datos se ajustó a la normalidad (S-W, $p \geq 0.05$) y las varianzas de cada grupo resultaron homogéneas.

El valor medio de actividad β -glucosidasa fue de 100.132 ± 35.552 nmol MUF $g^{-1} h^{-1}$. Entre zonas experimentales, los valores medios de actividad β -glucosidasa oscilaron entre 95.474 ± 36.494 (Panadera) y 107.742 ± 32.269 nmol MUF $g^{-1} h^{-1}$ (Morra).

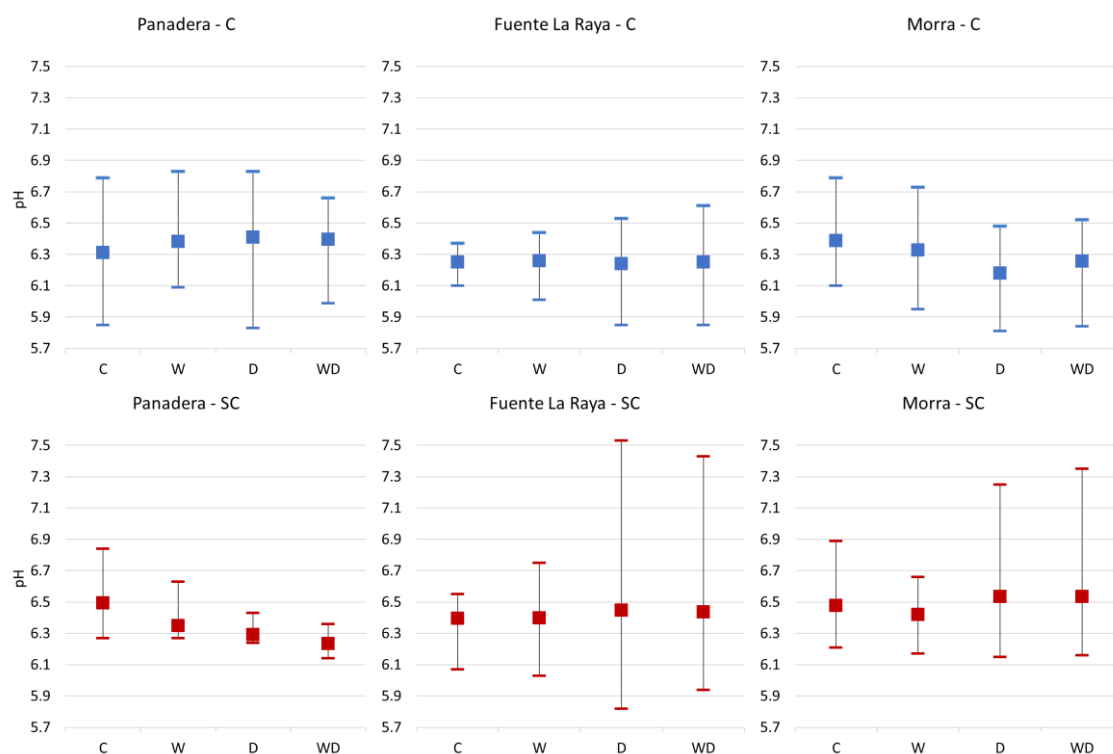


Figura 15. Acidez (valor medio de pH) de las muestras de suelo en cada finca experimental (Panadera, Fuente La Raya y Morra) por tratamiento (control, C; calentamiento, W; exclusión de lluvia, D; calentamiento y exclusión de lluvia, WD) y hábitat (bajo cobertura arbórea, C; sin cobertura arbórea, SC). Las líneas verticales indican el rango de la variable. N = 6 en todos los casos, excepto en Fuente La Raya (N = 5).

Tabla 3. Actividad β -glucosidasa (media; nmol MUF $g^{-1} h^{-1}$), desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV; %), valores mínimo y máximo (nmol MUF $g^{-1} h^{-1}$) y resultados del test de normalidad de Shapiro-Wilk (S-W, p) y homogeneidad de la varianza (Levene, p).

Finca	N	Media	DE	CV	Mínimo	Máximo	S-W, p	Levene, p
Morra	48	107.742	32.269	29.95	45.511	181.813	0.305798	
Panadera	48	95.4744	36.494	38.22	23.656	179.764	0.572070	
Raya	44	96.9123	37.315	38.50	36.255	170.994	0.118265	
Total	140	100.132	35.552	35.50%	23.656	181.813	0.061793	0.550261

Los resultados del ANOVA multifactorial de actividad β -glucosidasa por zona experimental (finca), tipo de hábitat y tratamiento se muestran en la Tabla 4. El test mostró que existen diferencias significativas entre los niveles de actividad enzimática solamente en el caso del tipo de hábitat, sin efectos importantes por zona experimental (finca) o tipo de tratamiento.

Tabla 4. Resultados del ANOVA multifactorial de actividad β -glucosidasa por zona experimental (finca), tipo de hábitat y tratamiento.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Finca	3912.53	2	1956.26	2.04	0.1344
Hábitat	39902.1	1	39902.10	41.56	0.0000
Tratamiento	3810.51	3	1270.17	1.32	0.2696
Residuos	127697	133	960.127		
Total (corregido)	175687	139			

Los valores medios de actividad β -glucosidasa por tipo de hábitat se muestran en la Tabla 5. La actividad enzimática fue claramente superior (prueba t, $p < 0.001$; Tabla 6) en el caso de los puntos bajo cobertura arbórea (117.583 ± 32.418 nmol MUF $g^{-1} h^{-1}$) frente a los puntos sin cobertura (83.651 ± 30.259 nmol MUF $g^{-1} h^{-1}$).

Tabla 5. Valores medios de actividad β -glucosidasa (media; nmol MUF $g^{-1} h^{-1}$), desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV; %) y valores mínimo y máximo (nmol MUF $g^{-1} h^{-1}$) por tipo de hábitat.

Hábitat	N	Media	DE	CV	Mínimo	Máximo
Cobertura	68	117.583	32.418	27.57%	35.122	181.813
Sin cobertura	72	83.651	30.259	36.17%	23.656	149.116
Total	140	100.132	35.552	35.50%	23.656	181.813

La intensidad de la actividad β -glucosidasa en cada una de las zonas experimentales, en función del tipo de hábitat y el tratamiento se muestra en la Figura 16. En cada una de las zonas e independientemente del tratamiento, la actividad β -glucosidasa fue significativamente superior en el caso de los puntos bajo cobertura arbórea que en los puntos sin cobertura (Tabla 6). Del mismo modo que al considerar todos los puntos de forma conjunta, también se observaron diferencias significativas entre la intensidad de la actividad β -glucosidasa de puntos bajo cobertura arbórea o sin cobertura en las tres zonas experimentales. En el caso de puntos bajo cobertura arbórea, los valores de actividad enzimática oscilaron entre 111.090 ± 37.321 (finca Panadera) y 125.628 ± 29.890 nmol MUF $g^{-1} h^{-1}$ (Morra). Del mismo modo, fuera de la zona de cobertura, la actividad enzimática osciló entre 79.859 ± 28.632 (Panadera) y 89.856 ± 23.809 nmol MUF $g^{-1} h^{-1}$ (Morra).

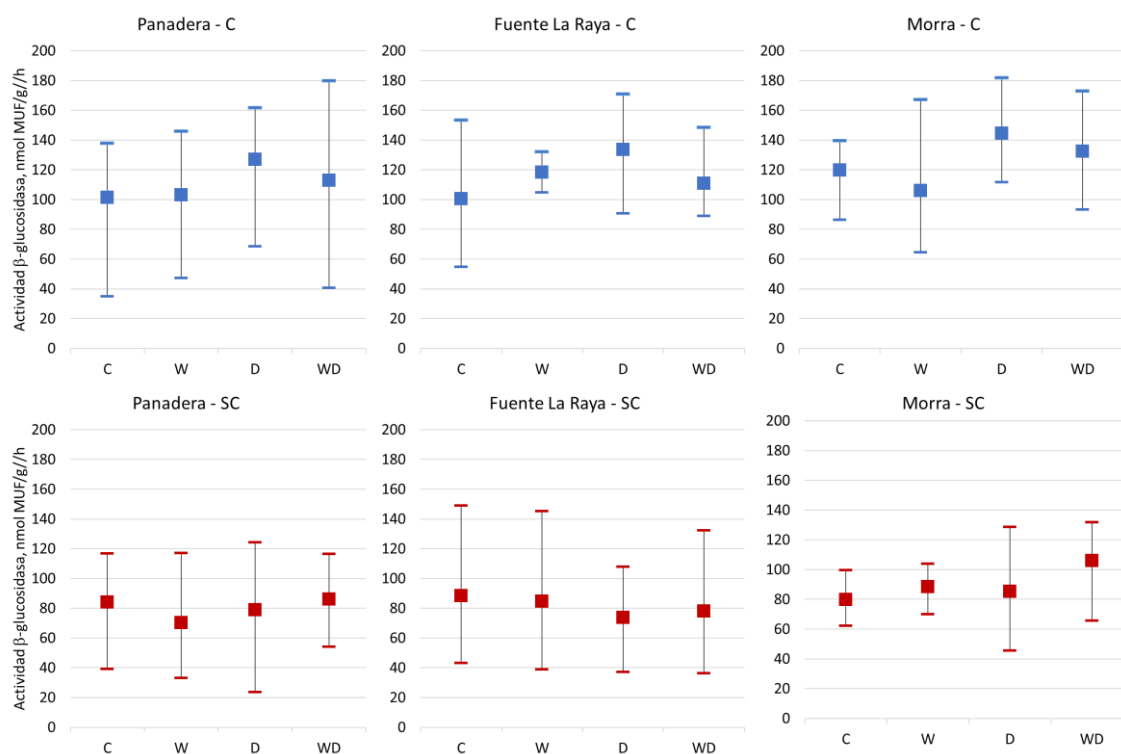


Figura 16. Actividad media de la β -glucosidasa en cada finca experimental (Panadera, Fuente La Raya y Morra) por hábitat (bajo cobertura arbórea, -C; sin cobertura arbórea, -SC) y tratamiento (control, C; calentamiento, W; exclusión de lluvia, D; calentamiento y exclusión de lluvia, WD). Las líneas verticales indican el rango de la variable. N = 6 en todos los casos, excepto en Fuente La Raya (N = 5).

Tabla 6. Resultados del test de comparación de medias (prueba t) de la actividad β -glucosidasa (media; $\text{nmol MUF g}^{-1} \text{h}^{-1}$).

Finca	Hábitat	N	Media	Desviación estándar	t, p
Morra	Cobertura	24	125.628	29.890	0.0000348
	Sin cobertura	24	89.856	23.809	
Panadera	Cobertura	24	111.090	37.321	0.0021452
	Sin cobertura	24	79.859	28.632	
Raya	Cobertura	20	115.723	28.279	0.0014523
	Sin cobertura	24	81.237	37.128	
Todas	Cobertura	68	117.583	32.418	<0.00001
	Sin cobertura	72	83.651	30.260	

Considerando las tres zonas experimentales en conjunto, aunque la actividad β -glucosidasa osciló entre 94.426 ± 33.590 (tratamiento W) y 106.393 ± 40.801 $\text{nmol MUF g}^{-1} \text{h}^{-1}$ (tratamiento D), el ANOVA no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la actividad β -glucosidasa bajo el control y los diferentes tratamientos (Tabla 7). Del mismo modo, aunque el valor medio de actividad β -glucosidasa fue relativamente más

alto en el caso del tratamiento D en las tres zonas experimentales en términos absolutos, el ANOVA no mostró diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los casos (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados del ANOVA de actividad β -glucosidasa (media; nmol MUF $g^{-1} h^{-1}$) para cada tipo de tratamiento (C, control; D, exclusión de lluvia; W, calentamiento; WD, exclusión de lluvia y calentamiento) y finca.

Finca	Tratamiento	N	Media	Desviación estándar	ANOVA, p
Morra	C	12	99.818	25.991	0.2526
	D	12	114.902	41.503	
	W	12	97.095	28.893	
	WD	12	119.153	28.745	
Panadera	C	12	92.811	32.996	0.7204
	D	12	102.860	40.783	
	W	12	86.726	36.032	
	WD	12	99.500	38.363	
Raya	C	11	93.901	41.772	0.9443
	D	11	100.964	42.441	
	W	11	99.915	37.107	
	WD	11	92.869	31.755	
Todas	C	35	95.556	33.075	0.3927
	D	35	106.393	40.801	
	W	35	94.426	33.590	
	WD	35	104.154	34.180	
Total		140	100.132	35.552	

4.4 Relación entre la actividad enzimática de la β -glucosidasa en función de la acidez del suelo

Al considerar en conjunto todos los valores, no se observó ninguna relación entre actividad β -glucosidasa y pH del suelo. El coeficiente R^2 del modelo de regresión lineal obtenido fue 0.517 (Tabla 8). Los resultados del ANOVA para la relación entre la actividad β -glucosidasa y el pH del suelo mostraron que no existe una relación estadísticamente significativa entre ambas variables ($p = 0.3986$; Tabla 9).

Tabla 8. Modelo de regresión lineal entre la actividad β -glucosidasa y la acidez del suelo (pH).

Parámetro	Mínimos cuadrados	Error estándar	t, p	R²
Intercepción	156.669	66.841	0.0205	0.517
Pendiente	-8.884	10.493	0.3986	

Tabla 9. Tabla ANOVA del modelo de regresión lineal entre la actividad β -glucosidasa y la acidez del suelo (pH).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	907.949	1	907.949	0.72	0.3986
Residuo	174779	138	1266.510		
Total	175687	139			

Finalmente, tampoco se observó ninguna relación significativa entre la acidez del suelo y la actividad β -glucosidasa al considerar por separado zonas experimentales, hábitat y/o cobertura.

5 Discusión

5.1 Relación de la actividad de la β -glucosidasa con respecto al tipo de hábitat

Los resultados de este experimento han mostrado cómo la heterogeneidad intrínseca de la dehesa, causada por la distribución de árboles aislados sobre un manto de herbáceas, juega un papel fundamental en la actividad de la comunidad microbiana del suelo y, por tanto, en la actividad de la β -glucosidasa.

Puede sugerirse que la cobertura arbórea contribuye a aumentar del contenido en carbono orgánico del suelo. López et al. (2011) sugirieron que este efecto es debido a los aportes de hojarasca, ya que, en la mayoría de los sistemas boscosos áridos y semiáridos mediterráneos, las hojas de los árboles constituyen la fracción mayoritaria de materia orgánica que retorna al suelo (Gallardo et al. 2009). Esto, además coincide con los resultados de otros trabajos previos en sistemas mediterráneos, que han demostrado un aumento en los niveles de actividad de varias enzimas (en especial las relacionadas con el ciclo de carbono) con el crecimiento del contenido en materia orgánica del suelo (Caravaca et al. 2003; Madejón et al. 2014). Las enzimas hidrolíticas son, en general, las que participan en la descomposición de los residuos orgánicos (Speir, 1977; Luo et al., 2019a). Dentro de este grupo, y relacionada con el ciclo del C, es de gran importancia la actividad de la β -glucosidasa, exoenzima que cataliza la despolimerización de la celulosa originando subunidades de glucosa que pueden ser utilizada por plantas y microorganismos como fuente de energía (Tabatabai, 1994; Burns, 1978; Perucci, 1992; Dick, 1994; Dick et al., 1996; García et al., 1997).

Para profundizar en la investigación de los factores que condicionan la actividad de la β -glucosidasa en las zonas estudiadas en este trabajo, puede sugerirse la utilización del contenido materia orgánica oxidable del suelo. Así podría confirmarse el efecto positivo del contenido en carbono orgánico del suelo sobre la diversidad y abundancia de bacterias y hongos, tal como ha sido sugerido por Maestre et al. (2015) y Delgado-Baquerizo et al., (2016), explicando de esta manera los altos niveles de actividad enzimática en los suelos localizados bajo árbol. Líneas futuras de investigación deberían abordar, por tanto, el estudio del contenido en materia orgánica del suelo y de la diversidad y abundancia microbiana en la zona de estudio.

5.2 Relación de la actividad enzimática de la β -glucosidasa con respecto a los tratamientos de simulación de cambio climático

En este trabajo no se ha determinado ningún impacto significativo del tipo de tratamiento (y por tanto, de los escenarios de restricción de lluvia y/o calentamiento como consecuencia del cambio climático). Este hecho puede explicarse de diferentes formas. Por un lado, es posible que el tiempo de tratamiento no haya sido suficiente para producir cambios significativos en los factores que regulan la actividad microbiana del suelo. De este modo, proseguir el experimento puede permitirnos encontrar respuestas, al menos, a medio plazo. Por otro lado, es posible que la presión ganadera haya enmascarado algunos de los efectos de los diferentes tratamientos. Del mismo modo, prolongar la duración del experimento puede permitir confirmar o desmentir el bajo impacto de las simulaciones de cambio climático sobre la actividad microbiana. Finalmente, sugiero que el estudio de otros indicadores de actividad microbiana (ya sean parámetros relacionados con la abundancia y diversidad microbiana, su dinámica estacional o la consideración de otras enzimas – como la β -glucosaminidasa o la fosfatasa-) puede arrojar más luz sobre este problema.

Ramos et al. (2008) relacionaron la actividad enzimática con la humedad del suelo, concluyendo que aumentaba con la humedad. Sin embargo, en este trabajo no se ha observado ninguna relación entre la actividad β -glucosidasa y la humedad del suelo, así como con otros relacionados con esta última (como el tipo de tratamiento).

Estudios como los de Burton (1986) muestran que la actividad microbiana es relativamente baja en muestras sometidas a bajas temperaturas. Por otro lado, Brzezinska et al. (1998) observaron que la actividad enzimática se incrementa con el contenido en humedad y la temperatura. Dacal et al. (2019) mostraron que las emisiones de CO₂ a la atmósfera procedentes de la respiración microbiana de los suelos de zonas áridas del planeta disminuye conforme aumenta la temperatura. Estas investigaciones están de acuerdo con los valores observados de actividad enzimática en los tratamientos W y WD de nuestro experimento, muy cercanos a los valores del control. En nuestro estudio se observaron variaciones de la actividad de la β -glucosidasa con respecto al aumento de temperatura (tratamientos W y WD), aunque es posible que el aumento de temperatura provocado no fuera suficiente como para influir de una manera drástica en la actividad de la β -glucosidasa.

Para ampliar este estudio se podría medir la tasa de mineralización por medio de la tasa de liberación de CO₂ en los suelos bajo los tratamientos de simulación de cambio climático con respecto a la de los suelos Control, para comprobar si realmente se produce una disminución significativa de la emisión de CO₂ y contrastar nuestros resultados con los de Dacal (2019) y poder relacionar este hecho con los microorganismos y por ende con la actividad de la β-glucosidasa. (Acosta 2006)

5.3 Relación de la actividad de la β-glucosidasa con respecto a los valores medios de pH

Diversos trabajos han mostrado que el uso del suelo puede afectar a la actividad enzimática a través de cambios en la granulometría, el contenido en humedad o la acidez del suelo (Hou et al., 2015; Luo et al., 2019b; Zhang et al., 2018). Por otra parte, se sabe que la acidez del suelo puede influir sobre la actividad enzimática (Ceninini et al., 2016). En general, la actividad enzimática aumenta cuando disminuye la acidez del suelo, aunque los enzimas hidrolíticos son menos sensibles que los oxidativos (Sinsabaugh et al., 2008). En nuestro estudio no se ha observado una relación de la acidez del suelo con la actividad β-glucosidasa. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que el intervalo de valores de pH en las zonas experimentales era muy estrecho, lo que no permite extraer conclusiones en este caso.

Autores como Ceroni et al. (1988) han observado que el pH del suelo puede relacionarse con el desarrollo de la actividad fúngica. Así, durante las primeras fases del crecimiento de algunos hongos precursores de celulasas se producen ácidos orgánicos que contribuyen a un cierto aumento de la acidez del suelo (Peláez et al. 2008). Según autores como Brown y Halstead (1975), Roussos y Raimbault (1982) y Theodorou et al. (1983) especies de *Trichoderma* y otros hongos pueden producir un cierto aumento de la acidez hasta lograr valores de pH comprendidos entre 6.1 y 6.4 durante las primeras fases de su desarrollo, comparables a los valores observados en nuestro caso. Aún así, estudios previos ya han mostrado valores de pH incluso más ácidos en suelos naturales de la zona de estudio (como puede comprobarse en la Tabla 1).

Para explicar mejor la relación entre los valores de pH y la herbivoría se podría realizar un estudio de la tasa de mineralización de nitrógeno en los suelos, para determinar las

concentraciones de amonio y nitrato y poder, entonces, relacionarlos con los valores medios de pH obtenidos en nuestro estudio.

5.4 Relación de la intensidad de herbivoría con la actividad de la β -glucosidasa

Se sabe que la intensidad de herbivoría afecta a las propiedades físico-químicas del suelo, favoreciendo la pérdida de cobertura vegetal, contenido en materia orgánica y degradación física del suelo mediante la aparición de procesos de compactación y erosión debido al pisoteo continuo del ganado (Baridón y Cattani et al. 2015). Nuestros resultados, sin embargo, no han mostrado ningún efecto de la zona experimental (y por tanto, de la presión ganadera) sobre la actividad β -glucosidasa.

Otros cambios relacionados con la intensidad de herbivoría, están relacionados más específicamente con las propiedades químicas del suelo, como la disponibilidad de macro y micronutrientes, o la liberación de carbono de los depósitos de materia orgánica (Basso et al. 2009). Todos estos factores pueden afectar a la fertilidad química del suelo, debido a la interacción con los microorganismos del suelo, los cuales intervienen en el reciclado de nutrientes aportados por residuos vegetales y animales del sistema pastoreado (Ceroni et al. (1988).

Como se ha mencionado anteriormente, el estudio de la tasa de mineralización de la materia orgánica del suelo sería de gran importancia para completar los resultados en lo que se refiere a la relación entre las diferentes variables problema, principalmente, en la relación entre herbivoría, acidez y abundancia y actividad microbiana. De esta manera se podrían estudiar más profundamente los efectos de la presión ganadera sobre el ciclo del nitrógeno (ya sean directos, como el aporte de nitrógeno contenido en las heces y orina al suelo -Hobbs, 1996-, o indirectos, mediados por cambios en la composición vegetal inducidos por la herbivoría que condicionan la cantidad y la composición química de la hojarasca que llega al suelo -Schrama et al., 2013-).

6 Conclusions

We have studied the activity of β -glucosidase, as an index of microbial activity, in three experimental areas (with different intensities of livestock pressure) under different types of habitat (below tree cover and without tree cover) and three types of treatment (drought simulation, warming simulation and both factors together).

No relation has been found between livestock pressure and β -glucosidase activity. It is suggested that the length of the experimental might have masked some impacts. Consequently, it can be stated that (i) one year of treatment does not induce any significant differences among β -glucosidase activity under different intensities of livestock pressure and (ii) further research should address medium- and long-term experiments in order to shed light on this gap.

No relation has been observed between simulated climate-change conditions and β -glucosidase activity. Some reasons for this conclusion may be similar to those immediately above. In contrast, β -glucosidase activity has been found to increase significantly below tree canopy. Among other factors, further studies on diversity and abundance of microorganisms, enzyme activity, soil humidity and organic matter content and dynamics may contribute to clarify some of these results in the future.

Referencias

- Abril, A. 2003. ¿Son los microorganismos edáficos buenos indicadores de impacto productivo en los ecosistemas. *Ecología Austral* 13:195-204.
- Abril, A., Barttfeld, P., Bucher, E. 2005. The effect of fire and overgrazing on soil carbon balance in the Dry Chaco. *Forest Ecology and Management* 206:399-405.
- Anderson, J. 1982. Soil Respiration. En: Page A., Miller R. y Kenney D. (eds). *Methods of soil analysis. Part II. Chemical and microbiological properties*. 2nd ed. American Society of Agronomy. Number 9. Madison, Wisconsin, USA. Pp: 831-871.
- Anderson, T.H. 2003. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 98:285-293.
- Aon, M.A., Colaneri, A.C. 2001. II. Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physicochemical properties in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology*, 18:255-270.
- Arshad, M.A., Martin, S. 2002. Identifying critical limits for soil quality indicators in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 88:153-160.
- Basso, B., Cammarano, D., Chen, D., Cafiero, G., Amato, A., Bitella, G., Rossi, R., Basso, F. 2009. Landscape position and precipitation effects on spatial variability of wheat yield and grain protein in southern Italy. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195:301-3012.
- Bellinfante, N. (coord.) 2004. Levantamiento de información ecológica básica referida a unidades geomorfoedáficas en el ámbito sur-oeste de Huelva, banda-centro de Sevilla, norte y sur de Córdoba. OG-033/04. Universidad de Sevilla, Consejería de Medio Ambiente (Junta de Andalucía). Sevilla.
- Bezdicsek, D.F., Papendick, R.I., Lal, R. 1996. Introduction: Importance of soil quality to health and sustainable land management. *Methods for assessing soil quality*. SSSA Special Publication, Madison, WI. Pp.: 1-8.
- Biederbeck, V., Zentner, R., Campbell, C. 2005. Soil microbial populations and activities as influenced by legume green fallow in a semiarid climate. *Soil Biology and Biochemistry* 37:1775-84.
- Brown, D.E., D.J. Halstaed. 1975. The effect of acid pH on the growth kinetics of *Trichoderma viride*. *Biotechnology and Bioengineering* 199-210
- Burger, M., Jackson, L.E. 2003. Microbial immobilization of ammonium and nitrate in relation to ammonification and nitrification rates in organic and conventional cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 29-36.
- Burns, R.G. 1978. *Soil enzymes*. Academic Press. New York
- Burton, W. 1986. *The Potato*. 3rd Edition. Longman Scientific and Technical. Harlow, UK.
- Buyanovsky, G.A., Aslam, M., Wagner, G.H. 1994. Carbon turnover in soil physical fractions. *Soil Science Society of America Journal*, 58:1167-1173.
- Cannell, R.Q., Hawes, J.D. 1994. Trends in tillage practices in relation to sustainable crop production with special reference to temperate climates. *Soil & Tillage Research*, 30:245-282.
- Caravaca, F., Algacil, M.M., Figueroa, D., Barea, J.M., Roldán, A. 2003. Re-establishment of *Retama sphaerocarpa* as a target species for reclamation of soil physical and biological properties in a semi-arid Mediterranean area. *Forest Ecology and Management* 182:49-58.
- Cenini, V.L., Fornara, D.A., McMullan, G., Ternan, N., Carolan, R., Crawley, M.J., Clement, J.-C., Lavorel, S. 2016. Linkages between extracellular enzyme activities and the carbon and nitrogen content of grassland soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 96:198-206.
- Ceroni, A., Gutiérrez, M. 1988. Producción de celulosa por hongos: estudios cinéticos en hongos silvestres. *Boletín de Lima* 55:13-20.
- Conn, C., Dighton, J. 2000. Litter quality influences on decomposition, ectomycorrhizal community structure and mycorrhizal root surface acid phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 32:489-496.

- Culman, S.W., Young-Matthews, Hollander, A.D., Ferris, H., Sánchez-Moreno, S., O'Geen, A.T., Jackson, L.E. 2010. Biodiversity is associated with indicators of soil ecosystem functions over a landscape gradient of agricultural intensification. *Landscape Ecology*, 25: 1333-1348.
- Dacal, M., Bradford, M.A., Plaza, C., Maestre, F.T., García-Palacios, P. 2019. Soil microbial respiration adapts to ambient temperature in global drylands. *Nature Ecology & Evolution* 3:232-238.
- Daroit, D.J. 2007. Caracterização de uma beta glucosidase de *Monosopuspurpleus*. Programa de pós-graduação microbiologia agrícola e do meio ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRS. Porto Alegre/RS.Març/2007 (Tesis de Maestría).
- Delgado-Baquerizo, M., F. T. Maestre, P. B., Reich, T. C., Jeffries, J. J; Gaitan, D., Encinar, M. B., Campbell, C. D., y Singh, B. K. 2016. Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nature Communications* 7:10541.
- Dick, R.P. 1994. Soil enzyme activities as indicators of soil quality. pp 107-124. *In* J. Doran, W., et al. (ed). *Defining soil quality for a sustainable environment*. SSSA and ASA. Madison, WI.
- Dick, R.P., Brakwell, D.P., Turco, R.F. 1996. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. *En: J. Doran y A. Jones (Eds.), Methods for assessing Soil Quality*. SSSA Special Publication, No. 49. Pp.: 247-271
- Domínguez, M.T., Holthof, E., Smith, A.R., Koller, E., Emmett, B.A. 2017. Contrasting response of summer soil respiration and enzyme activities to long-term warming and drought in a wet shrubland (NE Wales, UK). *Applied Soil Ecology*, 110:151-155.
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A. 1988. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 20:601-606.
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A. 1990. Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 22:891-897.
- FAO. (2006). La ganadería amenaza el medio ambiente. Obtenido de <http://www.fao.org/Newsroom/>.
- Ferraz, R.A., Naves, E., Mota, R. 2015. Soil quality: Enzymatic activity of soil β -glucosidase. 2437-1858.
- Gallardo, A., Covelo, F., Morillas, L., Delgado, M. 2009. Ciclos de nutrientes y procesos edáficos en los ecosistemas terrestres: especificidades del caso mediterráneo y sus implicaciones para las relaciones suelo-planta. *Ecosistemas*, 18:4-19.
- García, C., et al. 1997. Biological and biochemical indicators in derelict soils subjected to erosion. *Soil Biology and Biochemistry*, 29:171-177.
- Ge, X., Wu, L., Tang, L. 2013. Review on research progress of relationships between enzyme and litter decomposition. *World Forestry Research*, 26:43-47.
- George, T.S., Richardson, A.E., Simpson, R.J. 2005. Behaviour of plant-derived extracellular phytase upon addition to soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 37:977-988.
- Granatstein, D., Bezdicsek, D.F. 1992. The need for a soil quality index: Local and regional perspectives. *American Journal of Alternative Agriculture*, 7:12-16.
- Heanes, D. L. 1984. Determination of total organic C in soils by an improved chromic acid digestion and spectrophotometric procedure. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 15:1191-1213.
- Hobbs, N.T. 1996. Modification of ecosystems by ungulates. *The Journal of Wildlife Management*, 60:695-713.
- Hou, E.Q., Chen, C.G., Wen, D.Z., Liu, X. 2015. Phosphatase activity in relation to key litter and soil properties in mature subtropical forests in China. *Science of The Total Environment*, 516:83-91.
- Houghton, R. A. 2005. The contemporary carbon cycle, in: *Biogeochemistry*, edited by: Schlesinger, W. H., Elsevier-Pergamon, Oxford. Pp.: 473-513.
- Kieft, T.L., Ringelberg, D.B., White, D.C. 1994. Changes in ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:3292-3299.
- Lal, R. 2004. Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma*, 123:1-22.

- Luo, X., Hou, E., Zhang, L., Zang, X., Yi, Y., Zhang, G., Wen, D. 2019a. Effects of forest conversion on carbon-degrading enzyme activities in subtropical China. *Science of The Total Environment*, 696: 133968.
- Luo, X.Z., Hou, E.Q., Zang, X.W., Zhang, L.L., Yi, Y.F., Wen, D.Z. 2019b. Effects of elevated atmospheric CO₂ and nitrogen deposition on leaf litter and soil carbon degrading enzyme activities in a Cd-contaminated environment: a mesocosm study. *Science of The Total Environment*, 671:157-164.
- Maestre, F. T., C. Escolar, M. L., Guevara, J. L. et al. 2013. Changes in biocrust cover drive carbon cycle responses to climate change in drylands. *Global Change Biology*, 19:3835-3847.
- Matsuoka, M. 2006. Atributos biológicos de solos cultivados com videira na Região da Serra Gaucha. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Tesis de Maestría.
- Muñoz-Rojas, M., De la Rosa, D., Zavala, L.M., Jordán, A., Anaya-Romero, M. 2011. Changes in land cover and vegetation carbon stocks in Andalusia, Southern Spain (1956–2007). *Science of the Total Environment*, 409:2796-2806.
- Muñoz-Rojas, M., Jordán A., Zavala, L.M., De la Rosa, D., Abd-Elmabod, S.K., Anaya-Romero, M. 2012. Organic carbon stocks in Mediterranean soil types under different land uses (Southern Spain). *Solid Earth*, 3: 375-386.
- Paul, E., Clark, F. 1989. *Soil Microbiology and Biochemistry*. San Diego: Academic Press.
- Peláez, A., Meneses, M., Mirando, L., Magias, M., Bárcena, R., Loera, O. 2008. Ventajas de la fermentación sólida con *Pleurotus sapidus* en ensilajes de caña de azúcar. *Archivos de zootecnia*, 57:25-33.
- Perucci, P. 1992. Enzyme activity and microbial biomass in a field soil amended with municipal refuse. *Biology and Fertility of Soils*, 14:54-60.
- Roussos, S. M., Raimbault. 1982. Hydrolise de la cellulose par les moisissures. II.- Producción de cellulases de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu liquide. *Annales de Microbiologie* 133.B:465-418.
- Sardans, J., Peñuelas, J., Estiarte, M. 2008. Changes in soil enzymes related to C and N cycle and in soil C and N content under prolonged warming and drought in a Mediterranean shrubland. *Applied Soil Ecology*, 39:223-235.
- Schrama, M., P. Heijning, J. P., Bakker, H. J., Wijnen, M. P., Berg. 2013. Herbivore trampling as an alternative pathway for explaining differences in nitrogen mineralization in moist grasslands. *Oecologia* 172:231-243.
- Silva J.C., et al. (2008) Algumas propriedades de endoglucanases produzidas por *Streptomyces* spp. em meio à base de bagaço de cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 2:60-70.
- Sinsabaugh, R.L., Lauber, C.L., Weintraub, M.N., Ahmed, B., Allison, S.D., Crenshaw, C., Gartner, T.B. 2008. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology letters*, 11: 1252-1264.
- Sinsabaugh, R.L., Moorhead, D.L. 1994. Resource allocation to extracellular enzyme production: a model for nitrogen and phosphorus control of litter decomposition. *Soil Biology & Biochemistry*, 26:1305-1311.
- Sinsabaugh, R.L., Lauber, C.L., Weintraub, M.N., Ahmed, B., Allison, S.D., Crenshaw, C.L., Zeglin, L.H. 2008. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology Letters*, 11: 1252-1264.
- Speir, T.W. 1977. Studies on a climosequence in soils in tussock grasslands. Urease, Phosphatase and sulfatase activities of topsoils and their relationships with other properties including plant available sulphur. *N New Zealand Journal of Science*, 20:159-166
- Tabatabai, A. 1994. Soil enzymes. En: Weaver RW, Angle JS, Bottomley PS (Eds.), *Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties*. 2nd Ed. SSSA. Madison, WI. Pp.:775-833.
- Theodorou, M.K., Bazin, M.J., et al. 1983. Growth of *Trichoderma reesei* on glucose-mineral salts media containing ammonium sulphate or urea as the sole source of nitrogen. *Microbios*, 36:157-167.

- Vance, E. D., et al. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology & Biochemistry*, 19:703-707.
- Williams, A., Hedlund, K. 2013. Indicators of soil ecosystem services in conventional and organic arable fields along a gradient of landscape heterogeneity in southern Sweden . *Applied Soil Ecology*, 65:1-7.
- Williams, Yakovchenko, V., Sikora, L.J., Kaufman, D.D. 1996. A biologically based indicator of soil quality. *Biology and Fertility of Soils*, 21:245-251.
- Zhang, Q., Feng, J., Wu, J., Zhang, D., Chen, Q., Li, Q., Long, C., Feysa, A., Cheng, X. 2018. Variations in carbon-decomposition enzyme activities respond differently to land use change in central China. *Land Degradation & Development*, 30:459-469.
- Zornoza, R. 2007. Tesis doctoral. Título: Evaluación de la calidad ambiental en suelos de la provincia de Alicante: Desarrollo y aplicación de diferentes técnicas. Universidad Miguel Hernández, Elche.