

**Títol del treball:**

Efecte de la radiació i la disponibilitat hídrica en la descomposició microbiana de fullaraca de *Phillyrea angustifolia* i *Arbutus unedo*

---

Estudiant: MARTA SATORRES SALVADÓ

Grau en BIOLOGIA

Correu electrònic: martasatsal@gmail.com

Tutor: ANNA MARIA ROMANÍ CORNET

Cotutor\*:

Empresa / institució:

Vistiplau tutor (i cotutor\*):

Nom del tutor: Anna Maria Romaní Cornet

Nom del cotutor\*:

Empresa/institució:

Correu(s) electrònic(s): anna.romaní@udg.edu

\*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

23 DE MAIG DE 2018

EFECTE DE LA RADIACIÓ I LA  
DISPONIBILITAT HÍDRICA EN LA  
DESCOMPOSICIÓ MICROBIANA DE  
FULLARACA DE *PHILLYREA*  
*ANGUSTIFOLIA* I *ARBUTUS UNEDO*



MARTA SATORRES SALVADÓ  
UNIVERSITAT DE GIRONA  
Facultat de Ciències

# **ÍNDEX**

<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	1
<b>OBJECTIUS I HIPÒTESIS</b> .....	3
<b>MATERIAL I MÈTODES</b> .....	4
Zona d'estudi .....	4
Disseny experimental .....	5
Matèria orgànica .....	7
Taxa de descomposició .....	7
Biomassa bacteriana .....	7
Biomassa de fongs.....	9
Anàlisi de dades .....	11
Criteris ètics i de sostenibilitat.....	11
<b>RESULTATS</b> .....	12
Pèrdua de pes.....	12
Biomassa bacteriana .....	14
Biomassa de fongs.....	15
Relació entre paràmetres.....	16
<b>DISCUSSIÓ</b> .....	18
<b>CONCLUSIONS</b> .....	21
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	22

## **RESUM**

La descomposició és un procés molt important per la vida, és el pas de matèria orgànica als seus components inorgànics gràcies a l'ajuda de microbiota i altres factors. El canvi climàtic està variant els nivells de radiació ultraviolada i el clima global, per tant, és important estudiar els seus efectes en els processos bàsics de la natura.

L'objectiu d'aquest estudi ha estat determinar l'efecte de la radiació i la disponibilitat hídrica en la descomposició microbiana de fullaraca de *Phillyrea angustifolia* i *Arbutus unedo* i l'efecte en la colonització just després de l'abscisió per part de bacteris i fongs en plantes que han crescut sota els diferents tractaments. També s'ha centrat en analitzar les diferències entre les dues espècies tenint en compte que són espècies mediterrànies i tenen diferents estructures foliars i adaptacions al clima.

Per tal d'analitzar-ho s'han disposat mostres sota els tractaments de radiació UV0, UVA i UVB i de règim hídric "dry" i "water". S'ha calculat el carboni bacterià i fúngic de totes les mostres al llarg de 4 mesos i s'ha calculat el percentatge de matèria orgànica romanent en les mostres.

Els resultats obtinguts ens indiquen que el creixement en diferents tractaments d'aigua i disponibilitat d'aigua comporta canvis en la biomassa microbiana de just després de l'abscisió en les fulles de les dues espècies: *Phillyrea angustifolia* i *Arbutus unedo*. En *Phillyrea* els bacteris prefereixen colonitzar fulles sota tractament de sequera mentre que en *Arbutus* els fongs prefereixen colonitzar fulles sota condicions d'humitat. També que l'exposició a la radiació UV-B redueix la biomassa de fongs i tendeix a reduir la matèria orgànica romanent en el procés de descomposició, especialment en condicions de sequera, mentre que UV-A sembla millorar la colonització microbiana i la pèrdua de pes. També ens indiquen que la baixa disponibilitat d'aigua redueix la colonització microbiana durant el procés de descomposició.

Els resultats també ens indiquen diferències significatives en la colonització microbiana entre les dues espècies. *Phillyrea* mostra una major pèrdua de pes i colonització microbiana que *Arbutus*. Això podria ser causat per les diferències en la seva estructura foliar.

Els resultats que s'han obtingut en aquest treball formen part de la primera fase d'un estudi, que inclou el seguiment de la descomposició durant 12-18 mesos. En estudis posteriors seria interessant que s'investigués l'efecte de la radiació i la disponibilitat hídrica en els nivells de lignina i cel·lulosa d'aquestes dos espècies i la quantitat d'enzims bacterians i fúngics que hi ha a les fulles per veure més clarament com interacciona la microbiota amb els dos tipus d'estructura foliar.

## **RESUMEN**

La descomposición es un proceso muy importante para la vida, es el paso de la materia orgánica a componentes inorgánicos gracias a la ayuda de la microbiota y otros factores. El cambio climático está variando los niveles de radiación ultravioleta y el clima global por lo que es importante estudiar sus efectos sobre los procesos básicos de la naturaleza.

El objetivo de este estudio ha sido determinar el efecto de la disponibilidad de agua y radiación en la descomposición microbiana de la hojarasca de *Phillyrea angustifolia* y *Arbutus unedo* y el efecto sobre la colonización justo después de la abscisión por parte de bacterias y hongos en plantas que han crecido bajo diferentes tratamientos. También se ha centrado en analizar las diferencias entre las dos especies teniendo en cuenta que son especies mediterráneas y tienen diferentes estructuras foliares y adaptaciones al clima.

Para analizarlo se han dispuesto muestras bajo los tratamientos de radiación UV0, UVA y UVAB y de régimen de agua "dry" y "water". Se ha calculado el carbono de hongo y bacterias de todas las muestras en el transcurso de 4 meses y ha sido calculado el porcentaje de materia orgánica restante en las muestras.

Los resultados obtenidos nos indican que el crecimiento en diferentes tratamientos de agua y disponibilidad de agua conlleva cambios en la biomasa microbiana de justo después de la abscisión en las hojas de las dos especies: *Phillyrea angustifolia* y *Arbutus unedo*. En *Phillyrea* las bacterias prefieren colonizar hojas bajo tratamiento de sequía mientras que en *Arbutus* los hongos prefieren colonizar hojas bajo condiciones de humedad.

También que la exposición a la radiación UV-B reduce la biomasa de hongos y tiende a reducir la materia orgánica remanente en el proceso de descomposición, especialmente en condiciones de sequía, mientras que UV-A parece mejorar la colonización microbiana y la pérdida de peso. También nos indican que la baja disponibilidad de agua reduce la colonización microbiana durante el proceso de descomposición.

Los resultados también indican diferencias significativas en la colonización microbiana entre las dos especies. *Phillyrea* muestra una mayor pérdida de peso y colonización microbiana que *Arbutus*. Esto podría ser causado por las diferencias en su estructura foliar.

Los resultados que se han obtenido en este trabajo forman parte de la primera fase de un estudio, que incluye el seguimiento de la descomposición durante 12-18 meses. En estudios posteriores sería interesante que se investigara el efecto de la disponibilidad de radiación y el agua en los niveles de lignina y celulosa de estas dos especies y la cantidad de enzimas de bacterias y hongos de las hojas para ver más claramente cómo interactúa la microbiota con los dos tipos de estructura de las hojas.

## **SUMMARY**

Decomposition is a very important process for life, is the step from organic matter to inorganic components thanks to the help of microbiota and other factors. Climate change is varying the levels of ultraviolet radiation and the global climate so it is important to study its effects on the basic processes of nature.

The aim of this study was to determine the effect of the radiation and water availability in the microbial decomposition of litter of *Phillyrea angustifolia* and *Arbutus unedo* and the effect on colonization just after the abscission by bacteria and the fungus in plants growing under different treatments. Also has focused on analysing the differences between the two species taking into account that they are Mediterranean species and have different leaf structures and climate adaptations.

To analyse it, samples have been prepared under the UV0, UVA and UVAB radiation treatments and the “dry” and “water” water regimes. The carbon of fungus and bacteria of all the samples has been calculated over the course of 4 months and the percentage of organic matter remaining in the samples has been calculated.

The results obtained indicate that the growth in different water treatments and availability of water entails changes in the microbial biomass just after abscission in the leaves of the two species: *Phillyrea angustifolia* and *Arbutus unedo*. In *Phillyrea*, bacteria prefer to colonize leaves under drought treatment while in *Arbutus* fungi prefer to colonize leaves under humid conditions. Also, exposure to UV-B radiation reduces fungal biomass and tends to reduce organic matter remaining in the decomposition process, especially in drought conditions, while UV-A seems to improve microbial colonization and the loss of weight They also indicate that low water availability reduces microbial colonization during the decomposition process.

The results also indicate significant differences in microbial colonization between the two species. *Phillyrea* shows a greater weight loss and microbial colonization than *Arbutus*. This could be caused by the differences in its leaf structure.

The results obtained in this work are part of the first phase of a study, which includes monitoring of decomposition during 12-18 months. In later studies it will be interesting to investigate the effect of the radiation and water availability in the levels of lignin and cellulose in these two species and the amount of bacterial and fungal enzymes in the leaves in order to see more clearly how microbiota interact with both types of leaf structure.

## **INTRODUCCIÓ**

La descomposició és una part molt important en el cicle de la vida, és el pas de matèria orgànica als seus components inorgànics. Es calcula que gairebé el 90% de matèria produïda a la Terra es recicla a través d'aquest procés (Gessner *et al.*, 2010). Els fongs són una part important d'aquesta descomposició ja que secreten enzims que trenquen els components de les plantes. Aquests contribueixen d'un 60-90% de la biomassa dels sòls forestals. Una altra part important són els bacteris, els quals també participen en la degradació de la cel·lulosa, la lignina i la paret cel·lular de les plantes en el procés de descomposició però en baixa activitat (Zimmer, 2008; Robb *et al.*, 1979). Els fongs en general tenen major capacitat de degradació de polímers vegetals i en certa forma proporcionen recursos als bacteris que aquests no poden adquirir pel seu compte (descomposició intermèdia). En canvi, els bacteris tenen un major nombre d'activitats específiques de biomassa per la majoria d'enzim (Romaní *et al.*, 2006). Els bacteris poden augmentar la seva presència en condicions d'estrès pels fongs. Les espores d'aquests dos tipus d'organismes estan a l'aire, l'aigua i a la matèria orgànica morta i viva, de manera que poden arribar a qualsevol lloc amb facilitat, tot i que, a nivell del sòl n'hi ha una major concentració.

Durant el procés de descomposició la fullaraca perd del 30-70% de la seva massa durant el primer any i d'un 20 a un 30% més els següents 5-10 anys. El clima pot influir en la descomposició: entre 6-19°C la descomposició és més lenta i es du a terme per part de fongs i actinomicets; entre 20-44°C la descomposició és més ràpida i es du a terme bàsicament per bacteris. Un excés de temperatura o poca humitat pot reduir la taxa de descomposició. (Zimmer, 2008)

La vegetació del Mediterrani està molt influïda pel tipus de clima que hi trobem, generalment amb un període eixut i calent, l'estiu, i un altre de humit i més aviat fred, l'hivern. A causa de els factors ambientals limitadors de secada estival i fred hivernal trobem vegetació perennifòlia amb adaptacions escleròfil·les, un parènquima en palissada especialment desenvolupat, un alt contingut en materials estructurals forts com la cel·lulosa i la lignina i un nombre reduït d'estomes situats en criptes parcialment ocloses per pèls. Aquestes fulles són poc propenses a perdre aigua per evaporació cuticular, controlen molt efectivament la transpiració i resisteixen bé mecànicament la pèrdua d'aigua i suporten bé temperatures inferiors a 0°C sense patir d'anys. Aquest tipus de fulla són difícils de descompondre ja que es resisteixen a alliberar els pocs nutrients que tenen (la relació ponderal entre lignina i cel·lulosa amb relació a les proteïnes té valors de 230-450 per als esclerofil·les, enfront dels 80-180 dels caducifolis).

Un exemple de formació arbustiva esclerofil·la és l'arboç (*Arbutus unedo*), cas d'estudi en aquest treball. La segona espècie considerada en aquest treball és *Phillyrea angustifolia* també típica del Mediterrani. Aquesta té les fulles més fines que *Arbutus unedo*, tot i així, té una cutícula molt gruixuda i pèls situats en criptes que protegeixen les fulles del clima mediterrani (Rotondi *et al.*, 2003).

Pel que fa a la descomposició, la manca d'aigua limita l'activitat dels descomponedors i la resistència estructural de les restes vegetals provinents dels vegetals esclerofil·les. Bacteris i fongs tenen un màxim d'activitat amb humitats elevades i temperatures entre 25°C i 35°C, condicions que no es troben al Mediterrani. La secada estival atura l'activitat de bacteris i fongs

descomponedors i el fred hivernal també atura l'activitat d'aquests descomponedors així que els seus períodes de màxima presència i activitat són la tardor i la primavera. Així doncs, el clima mediterrani juntament amb les característiques associades dels vegetals alenteixen el procés de descomposició (Camarasa *et al.*, 1993).

El procés de descomposició en el clima mediterrani es pot veure molt afectat pel canvi climàtic i factors antropogènics, com seria les variacions en la radiació i el règim hídric.

Un dels efectes del canvi global és l'augment de la radiació UV en grans regions geogràfiques a causa de l'esgotament de l'ozó estratosfèric; fet que actualment s'observa en les de l'hemisferi sud (Herman, 2010; Williamson *et al.*, 2014). Tot i això s'ha vist que en l'hemisferi nord els canvis en la nuvolositat i les emissions d'aerosols antropogènics han reduït la radiació UV (Calbo *et al.*, 2005; Williamson *et al.*, 2014). S'ha observat un gran increment de la radiació ultraviolada-B (Caldwell *et al.*, 2007).

La radiació UV afecta negativament a la microbiota del sòl (Johnson, 2003) però combinat amb l'augment de la facilitat de biodegradació de la fullaraca, facilitant la feina de la microbiota, no disminueix la taxa de descomposició. L'exposició a la radiació UVA disminueix la taxa de descomposició (Li, 2016) i depenent de la qualitat de la fullaraca la radiació UVB també pot influir en la taxa de descomposició d'aquesta (Wang *et al.*, 2015; Uselman *et al.*, 2011).

S'ha observat que la radiació UVB combinada amb diferents règims hídrics té efectes variables: amb precipitacions molt freqüents (cada 4 dies) i exposició a radiació UVB la descomposició de fullaraca es redueix, en canvi, amb precipitacions menys freqüents (cada 24 dies) la descomposició augmenta fins a un 80% (Smith *et al.*, 2010). Els fongs son especialment sensibles a l'exposició a la radiació UVB, tot i que la comunitat bacteriana en els primers estadis de la descomposició també ho és (Johnson, 2003).

El canvi climàtic és un problema actual del qual se'n tenen evidències, a Catalunya el clima ja està canviant. En general aquest canvi repercuteix en la variació de les temperatures i de les precipitacions però cap d'elles uniformes al llarg de l'any. L'increment de la temperatura mitjana té una tendència més marcada a l'estiu però també s'observa un augment de la temperatura mínima no tant marcat.

Pel que fa a la pluviometria s'observa que hi ha una tendència negativa al conjunt del país però on sobretot han disminuït les precipitacions és al Pirineu i Prepirineu. En general, hi ha un augment de la precipitació per dia de pluja però també en la durada de les ratxes seques, canvis que es noten majoritàriament a l'estiu i es podrien aguditzar en el futur (Duran *et al.*, 2017).

En aquest treball s'estudia com la radiació i la disponibilitat hídrica afecten el procés de descomposició de la fullaraca de dos espècies mediterrànies: l'*Arbutus unedo* i la *Phillyrea angustifolia*. Concretament s'estudia l'efecte en el carboni bacterià i fúngic de la fullaraca i en el percentatge de matèria orgànica romanent al llarg de 4 mesos.



## **OBJECTIUS I HIPÒTESIS**

- ❖ To investigate the effect of radiation and water availability during plant growth on the microbial colonization of *Arbutus unedo* and *Phillyrea angustifolia* leaves just after abscission.  
**Hypothesis:** To grow in different conditions can influence in microbial biomass of the leaves.
  
- ❖ To determine the effect of radiation and water availability on fungal and bacterial biomass and leaf weight loss during decomposition.  
**Hypothesis:** The exposure to UV radiation and the low water availability can reduce microbial colonization and decrease the weight loss during decomposition.
  
- ❖ To analyse the differences between species *Arbutus unedo* and *Phillyrea angustifolia* in response to the water availability and radiation in the decomposition process.  
**Hypothesis:** *Arbutus unedo* will be less affected in response to treatments than *Phillyrea angustifolia* because of its tougher leaf structure.

## MATERIAL I MÈTODES

### Zona d'estudi

Al Mediterrani trobem diferents tipus de zonabiomes, zones climàtiques definides netament pel tipus de diagrama climàtic. La zona d'estudi es troba dins del zonabioma amb hiverns humits i secades estivals amb vegetació zona llenyosa esclerofil·la. Aquest zonabioma es divideix en subzonabiomes i la zona d'estiu es tracta de la de la regió Mediterrània. Aquesta es caracteritza per ciclons que duen pluja a l'hivern i l'anticicló de les Açores que determina temps calent i sec a l'estiu (Walter, 1998).

En la Figura 1 podem observar el diagrama climàtic del Gironès on la precipitació mitjana anual augmenta en sentit SE–NW, registrant-se des de valors entorn als 650 mm fins a precipitacions abundants, prop dels 1000 mm, a l'extrem nord-occidental. La màxima precipitació es dona a la tardor i a la primavera. Només el mes de juliol és àrid. Termomètricament, els hiverns són moderats i els estius calorosos, sent l'amplitud tèrmica entre baixa i mitjana. El període lliure de glaçades va de maig a setembre (Servei meteorològic de Catalunya 2015). Aquest clima i el sòl àcid i pedregós amb gresos fa que sigui l'hàbitat perfecte per l'arboç (*Arbutus unedo*) (Walter, 1998).

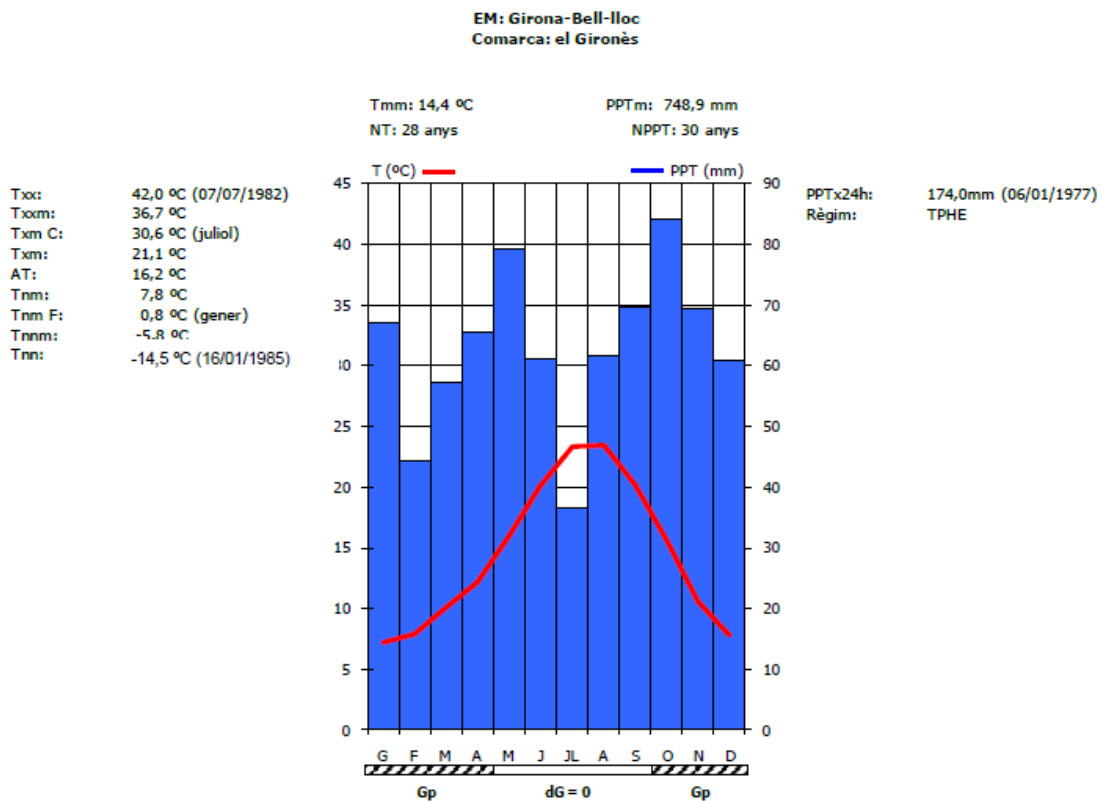


Figura 1. Diagrama climàtic dels anys 1971-2000 del Gironès (Servei Meteorològic de Catalunya 2015)

Les parcel·les que s'analitzen en aquest estudi es troben en una zona arbustiva Mediterrània al Massís de les Gavarres (41° 53' 57" N, 2° 54' 43" E) a prop de Cassà de la Selva (Girona) com es pot observar en la Figura 2. La zona d'estudi està situada al voltant de 250m damunt del nivell del mar amb una vegetació arbustiva dominada per *Erica arbòria*, *Arbutus unedo* i *Phillyrea angustifolia*. La vegetació llenyosa principal està formada per *Quercus súber*, *Calluna vulgaris*,

*Ulex parviflorus*, *Daphne gnidium*, *Viburnum tinus* i *Cistus salbiifolius* i la part herbàcia formada per *Carex oedipostyla* i *Brachypodium retusum*.



Figura 2. Localització de la zona d'estudi. A prop de Cassà de la Selva (Girona).

## Disseny experimental

Les 18 parcel·les (3x3 m) estan distribuïdes en tota l'àrea d'estudi i tenen una alçada d'aproximadament 1,5m i un desnivell de 10°. En aquestes parcel·les es controla tant la radiació com la pluviositat. Per al control de la radiació els filtres col·locats estan fets de diferents materials depenent del tractament, alguns deixen passar tota la radiació solar, altres només UVA i uns altres no deixen passar cap radiació ultraviolada. Aquests filtres també eviten l'aigua de la pluja emmagatzemant tota la que cau en aquella àrea en bidons de 310L situats just al costat, com es pot veure en la Figura 3 proporcionant així la possibilitat de controlar un nou factor, el règim hídric.



Figura 3. Parcel·les i estructures situades a la zona d'estudi amb els seus respectius bidons per recol·lectar l'aigua.

Concretament, l'experiment es va basar en el control de 2 factors:

- La radiació: UVA, UV $\emptyset$  i UVAB
- Règim hídric: Control (W) i reducció del 10% de la precipitació (D)

Cada tipus de tractament està replicat 3 vegades, és a dir, hi ha tres parcel·les diferents per cada tipus de combinació dels factors radiació ultraviolada i règim hídric. A més, a dins de cada parcel·la hem dispostat mostres de dos espècies diferents, *Phillyrea angustifolia* i *Arbutus unedo*.



**Figura 4. Malles amb les mostres situades a les parcel·les de la zona d'estudi.**

El cronograma de l'experiment es resumeix en la **¡Error! No se encuentra el origen de l a referencia..** Durant el Setembre de 2017 es van recol·lectar fulles recent caigudes de les dues espècies per tal d'assegurar que no hagués iniciat el procés de descomposició i es van col·locar al voltant de 4g de fullaraca dins de malles mosquiteres. Aquestes estaven fetes de polietilè d'alta densitat amb una mida de 10 X 10 cm i un porus de 1.39 X 1.39mm com es pot veure en la Figura 4.

El 26 d'Octubre es van col·locar 86 malles dins de les corresponents parcel·les de la zona d'estudi d'on s'havien obtingut les mostres. Les mostres inicials de les dues espècies es van recollir al cap de 24 hores, el 28 d'Octubre de 2017.

La primera recollida es va dur a terme al cap d'un mes, el 28 de Novembre de 2017 i es van recol·lectar només mostres d'*Arbutus unedo* ja que no hi havia suficient mostra de *Phillyrea angustifolia* com per fer-ne tantes recollides i s'havia decidit reduir-les.

La segona recollida va tenir lloc al cap de 4 mesos i es va dividir en dos dies a causa del gran volum de mostres i la dificultat en els anàlisis. Un cop recollides s'ha de tenir cura de pesar, congelar i conservar les mostres ràpidament per evitar-ne la contaminació. Així que el 20 de Febrer de 2018 es van recollir les malles d'*Arbutus unedo* i el 22 de Febrer les de *Phillyrea angustifolia*.

	2017				2018			
	Setembre	Octubre	Novembre	Desembre	Gener	Febrer	Març	Abril
Recollida de fulles i preparació de les malles	■							
Inici experiment		■						
1a recollida de mostres			■					
Anàlisi biomassa de bacteris de mostres inicials i 1a recollida			■	■				
2a recollida de mostres						■		
Anàlisi biomassa de fongs de mostres inicials i 1a recollida						■	■	
Anàlisi biomassa de bacteris de mostres de la 2a recollida						■	■	
Anàlisi biomassa de fongs de mostres de la 2a recollida							■	
Càlculs i anàlisi de dades								■

**Taula 1. Diagrama de Gantt. Distribució de les diferents tasques dutes a terme al llarg del curs 2017-2018.**

Com s'observa en la Taula 1 l'experiment ha durat 6 mesos però forma part d'un experiment que durarà 1 any i mig. El procés de descomposició a l'aire lliure és un procés llarg així que en aquest treball només s'analitzen els primers mesos d'aquest.

## Matèria orgànica

Tots els càlculs de biomassa microbiana i pèrdua de pes es van fer respecte els grams de matèria orgànica de la mostra. Per calcular aquesta dada es van posar les mostres en una estufa a 70°C durant 48 hores per tal de retirar-hi tota la humitat i després es van posar en una mufla a 450°C durant 4 hores fins a quedar reduïdes a cendra. El pes de la cendra es tracta del pes de matèria inorgànica de la mostra. La diferència entre el pes inicial de la mostra (matèria orgànica + matèria inorgànica) i el pes de la cendra (matèria inorgànica) se'n pot extreure el pes de la matèria orgànica de la mostra.

D'aquesta dada se'n va determinar la proporció de pes sec matèria orgànica de cada mostra, la qual es va utilitzar per corregir el pes de totes les mostres.

## Taxa de descomposició

El càlcul de la taxa de descomposició es va fer a partir dels pesos de les recollides de cada mostra respecte els pesos inicials d'aquestes. Habitualment es calcula la taxa de descomposició amb la fórmula  $\frac{M_t}{M_0} = e^{-kt}$ ; on  $M_t$  és la massa de fullaraca en un cert moment,  $M_0$  és la massa inicial de la fullaraca,  $e$  és el número de Euler,  $k$  és la constant de descomposició i  $t$  és el temps que ha passat des de la mesura inicial. Tot i això, en aquest experiment no teníem suficients dades com per aplicar-la així que es va calcular el percentatge de matèria orgànica romanent de la següent forma:  $(Pes\ final - pes\ inicial) \cdot 100$ . Sempre tenint en compte el factor de correcció de la matèria orgànica en cada mostra.

De les mostres de dins de cada malla, després de pesar-les, se'n va treure al voltant de 0.6g per l'anàlisi de biomassa bacteriana i al voltant de 0.250g per l'anàlisi de la biomassa fúngica.

## Biomassa bacteriana

La biomassa bacteriana es quantifica en mg de carboni bacterià en cada gram de pes sec de matèria orgànica. El recompte de bacteris es fa amb el citòmetre de flux.

Per començar es va pesar al voltant de 0.6g de fullaraca seca de cada mostra i es va triturar amb el molí mesclador de boles (MM200 Retsch, Alemanya) durant 2 minuts a 20Hz fins que quedava pols. Com que és una tècnica complicada s'acostuma a perdre part de la mostra, per tant, se'n va pesar 0.5g i es van mesclar amb 125ml de tampó acetat 50mM pH6.2 (el pH del sòl).

D'aquests se'n van agafar 10ml i es van mesclar amb 100µl de formol per tal de conservar la mostra. Per tal de fer-ne el destacament, separar els bacteris de les partícules de les fulles i disgregar la mostra, es van agafar 0.5ml de mostra i es van posar amb 1.5ml de solució B (NaCl 130mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7mM, NaHPO<sub>4</sub> 3mM, formaldehid 35% pH7, Pirofosfat de sodi x10H<sub>2</sub>O 99% i tween20



detergent), es va agitar, sonicar i es va deixar en repòs per tal de fer sedimentar les impureses. Per purificar la mostra se'n va agafar 1ml de sobrenedant i s'hi va afegir 1ml de Nycodenz al fons de l'ependorf amb una agulla. Es va centrifugar a 4°C durant 90 minuts a 13.000rpm i se'n va recol·lectar el sobrenedant. Fins aquí es va fer tot el protocol sota la campana d'ultraviolats per evitar la contaminació amb bacteris de fora de la mostra. Aquest protocol és adaptat del descrit a Amalfitano *et al.* (2008).

Aquesta mostra es va diluir 1:9 amb solució B i per fer-ne la tinció se'n va agafar 400µl on s'hi van afegir 4µl de SYTO 13 (tinció FISHER, 5µm), es va incubar durant 15-30 minuts a les fosques i s'hi van afegir 10µl de solució de beads, partícules d'1µm (10<sup>6</sup>beads/ml, FISHER,). Seguidament se'n va fer la lectura amb el citòmetre de flux (Beckton Dickinson FACSCalibur).

El material necessari per dur a terme aquest anàlisi va ser el següent: solució B explicada anteriorment, eppendorfs, matràs erlenmeyer, vòrtex, mesclador, sonicador, cubetes de citòmetre, tampó acetat 50mM pH6.2 (el pH del sòl), formol, nycodenz (Optiprep, gradient de densitat mitjà), agulles, centrifuga (Thermoelectron LED GmbH LR56495), vials de vidre, Syto 13, solució de beads (10<sup>6</sup>beads/ml, FISHER, 1µm), micropipetes, puntes de micropipeta, campana d'ultraviolats (Grant-Bio DNA/RNA UV-cleaner UVL/T-M-AR), molí mesclador de boles (MM200 Retsch, Alemanya) i el citòmetre de flux (Beckton Dickinson FACSCalibur) equipat amb un làser d'argó de 488nm amb el seu programa informàtic Cell Quest.

Després de passar la mostra pel citòmetre aquest mostra gràfiques i dades com les de la Figura 5. El gràfic FL1-Height ens mostra les partícules amb fluorescència verda i el gràfic FL3-Height ens mostra totes les partícules amb fluorescència vermella. Segons bibliografia es va delimitar dues regions, una per la població total de bacteris (R2) i l'altra per els beads (R1).

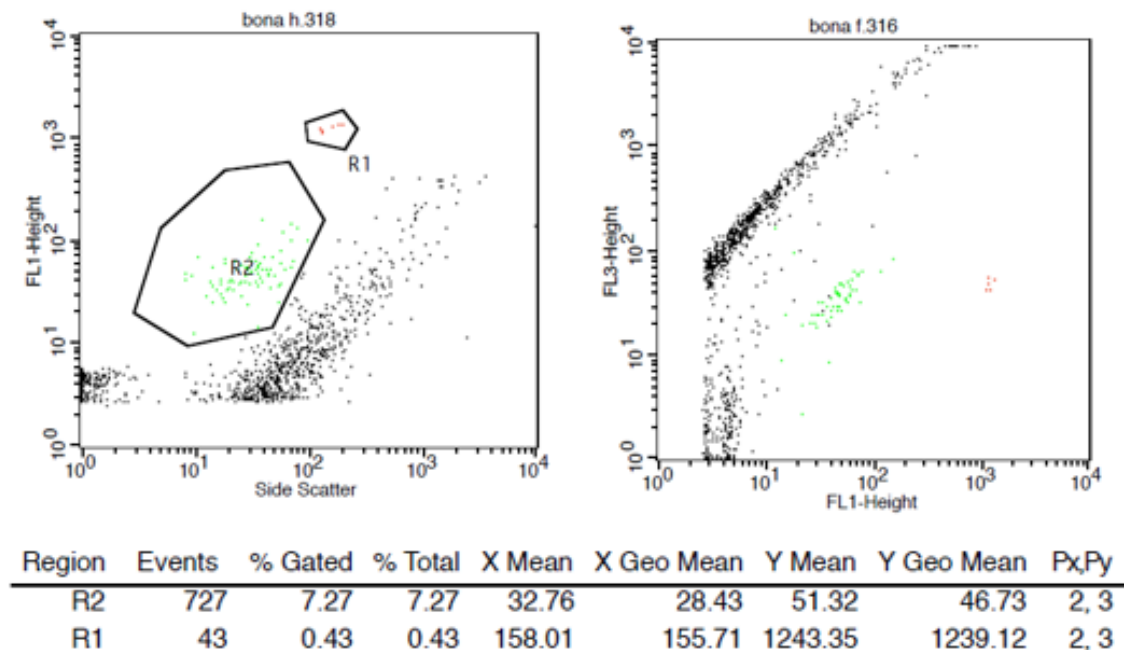


Figura 5. Exemple de gràfic i dades obtingudes després de la lectura de les mostres amb el citòmetre de flux. Es poden observar els beads (R1) en vermell i la població (R2) en verd. Els punts negres són partícules que no són del nostre interès i soroll de fons de la mostra.

A partir de les dades R1 i R2 es va calcular el nombre total de cèl·lules de cada mostra amb la següent fórmula:

$$\text{núm. cèl} \cdot \text{lules} = \left( \frac{\left( R2 \cdot \frac{\text{beads}}{\text{mL}} \cdot V_{\text{beads}} \right)}{R1 \cdot (V_{\text{mostra}} + \text{tint})} \right) \cdot D$$

**R1:** nombre de beads detectats  
**R2:** Nombre de bacteris detectats  
**Beads/ml:** Concentració coneguda de beads  
**V beads:** volum de beads afegits a la mostra (mL)  
**V mostra + tint:** Volum de la mostra final més el volum de tint SYTO 13 afegit per fer la lectura al citòmetre (mL).  
**D:** factor de dilució

A aquests resultats se li van descomptar les cèl·lules/ml de tampó també analitzades pel citòmetre (entre  $2 \cdot 10^4$  i  $8 \cdot 10^4$ ). Després es va calcular el nombre de cèl·lules bacterianes per gram de pes sec de matèria orgànica i es va transformar en mg de C bacterià tenint en compte que el volum que es considera que té un bacteri és de  $0.1 \mu\text{m}^3$  (Theil-Nielsen et al., 1998) i que el carboni que hi ha per  $\mu\text{m}^3$  és de  $2.2 \times 10^{-7}$  (Bratbak, 1985).

$$\frac{\text{mg carboni bacterià}}{\text{g pes sec matèria orgànica}} = \frac{0.1 \mu\text{m}^3}{1 \text{ cèl} \cdot \text{lula}} \cdot \frac{2.2 \cdot 10^{-13} \text{ g Carboni}}{1 \mu\text{m}^3} \cdot \frac{10^3 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$$

## Biomassa de fongs

La biomassa de fongs es quantifica en mg de carboni fúngic en cada gram de pes sec de matèria orgànica a partir de la concentració d'ergosterol de la mostra. L'ergosterol és una molècula que es troba a la membrana cel·lular dels fongs i estructura i impermeabilitza els lípids d'aquesta.

Primerament es va fer l'extracció de lípids en fase sòlida, després es va separar l'ergosterol mitjançant la tècnica de la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC: *High-performance liquid chromatography*). (Gessner et al., 1996) i finalment es va mesurar l'ergosterol per absorbència.

Per començar es van liofilitzar les mostres per tal d'obtenir-ne el pes sec i es van introduir en tubs d'assaig. Després es van afegir 10mL de KOH 0.14M de metanol a cada mostra i es van tapar cautelosament de manera que fos hermètic per evitar-ne l'evaporació ja que el metanol és molt volàtil. A continuació es van introduir els tubs en un bany a  $80^\circ\text{C}$  durant 30 minuts i seguidament es van deixar refredar a temperatura ambient i sense llum. Després es va transferir l'extracte en tubs de 40 mL i es van fer dos rentats amb 5mL de metanol cada un i es van filtrar les mostres amb filtres de fibra de vidre MGC de 47mm de diàmetre i  $1.2 \mu\text{m}$  de porus per evitar els sediments i els residus de fullaraca.

Per tal de realitzar l'extracció en fase sòlida primer es van condicionar els cartutxos (Walters Sep-Pak®, Vac RC, tC 18, 500mg) afegint 7.5ml de metanol pur en cada un d'ells, es van obrir les vàlvules i la bomba de buit per iniciar un flux suau però constant de dissolvent a través d'ells. Seguidament s'hi va afegir 7.5 ml de solució condicionadora acidificant (KOH 0.12M + HCL0.75M; 6:1;  $\text{pH} < 3$ ) i es van tancar les vàlvules quan encara quedava una mica de solució per tal de que no s'assequés la columna.

El següent pas va ser fer l'elució de l'extracte, es van afegir 5mL d'HCl 0.75M a cada mostra i es van transferir als cartutxos en fase sòlida. Es van obrir les vàlvules i amb l'ajuda de la bomba es va fer passar tot l'extracte de cada columna, a més, hi havia un blanc, un cartutx amb una concentració coneguda d'ergosterol diluït en metanol per avaluar la capacitat de retenció de l'ergosterol que es va processar com la resta de mostres. Quan ja havia passat tot es van afegir 2.5ml de KOH 0.4M en metanol per fer un rentat de la columna i després es van deixar assecar els cartutxos durant 60 minut amb les vàlvules i la bomba oberts.

Un cop els cartutxos s'havien assecat es va fer l'elució de l'ergosterol. Es van col·locar vials de vidre per l'HPLC prèviament pesats sota els cartutxos i es van afegir 1.6mL d'isopropanol a cadascun d'ells de manera que els vials van recollir l'elució. Finalment es van pesar els vials plens de l'elució i es van processar les mostres a l'HPLC juntament amb el blanc i una recta patró amb concentracions conegudes d'ergosterol amb isopropanol.

Les dades obtingudes amb l'HPLC van ser de l'alçada i l'àrea dels pics d'absorbància d'ergosterol de les mostres. Després de fer la recta patró es van fer les anàlisis amb la dada que tenia una R<sup>2</sup> més ajustada, l'àrea. Es van utilitzar 3 rectes patrons ja que pel gran volum de mostres es van haver de llegir en 3 moments diferents. La recta patró està basada amb la fórmula  $Y=aX+b$  on Y és l'àrea del pic i X és la concentració d'ergosterol així que es van calcular els µg d'ergosterol en cada gram de pes sec de cada mostra amb les següents fórmules:

$$\frac{\mu g \text{ ergosterol}}{g \text{ pes sec}} = \left( \frac{Y - b}{a} \right) \cdot \frac{\left( \frac{\text{pes mostra}}{\text{densitat isopropanol}} \right)}{\left( \frac{\text{eluit blanc}}{V \text{ blanc}} \right)}$$

Y: àrea del pic obtinguda amb HPLC  
b i a: dades obtingudes de la recta patró  
densitat isopropanol= 0.786g/cm<sup>3</sup>  
pes mostra: (pes del vial + mostra) - pes vial  
V blanc: 300µL d'ergosterol  
Eluït blanc: volum de blanc eluït amb els cartutxos en fase sòlida

Tenint en compte que per cada 5.5µg d'ergosterol es considera que hi ha 1g de biomassa fúngica (Gessner *et al.*, 1993) i que el 43% d'aquesta biomassa es tracta de carboni fúngic (Baldy *et al.*, 1997) s'ha calculat els mg de carboni bacterià per gram de pes sec de matèria orgànica de la següent forma:

$$\frac{mg \text{ carboni bacterià}}{g \text{ pes sec matèria orgànica}} = \frac{\mu g \text{ d'ergosterol}}{g \text{ pes sec}} \cdot \frac{1000 \text{ mg biomassa fúngica}}{5.5 \mu g \text{ d'ergosterol}} \cdot \frac{43 \text{ mg carboni fúngic}}{100 \text{ mg biomassa fúngica}}$$

El material necessari per realitzar aquesta anàlisi va ser: liofilitzador, bany tèrmic (Memmert Schutzzart DIN 40050-IP20), pipetes, matrassos aforats, tubs d'assaig, balança, sistema de buit en fase sòlida, cartutxos per la extracció en fase sòlida (Waters Sep- Pak, Vac RC, tC 18,500 mg), vasos de precipitats, reactius descrits anteriorment, vials de vidre per HPLC, aparell HPLC (Waters 1525; Binary HPLC Pump; 717 plus Autosampler), programa HPLC (Empower) i campana extractora.



Amb els resultats de la biomassa de bacteris i fongs es va calcular la relació del carboni bacterià respecte el carboni total de la microbiota amb el següent càlcul:

$$\frac{\text{carboni bacterià}}{\text{carboni bacterià} + \text{carboni fúngic}} \cdot 100$$

## **Anàlisi de dades**

En aquest estudi s'han tractat les dades obtingudes amb el programa estadístic R, concretament amb el paquet Rcmdr.

Es van realitzar ANOVES d'un i de múltiples factors per comparar els resultats de les variables independents (els tractaments de règim hídric i radiació, l'espècie i les recollides) respecte les variables dependents (% de matèria orgànica romanent, carboni bacterià i carboni fúngic per gram de matèria orgànica i carboni bacterià respecte el total). Per fer aquestes anàlisis es van modificar les dades logarítmicament ja que el test de Shapiro-Wilk fer prèviament indicava que les dades tenien diferències significatives (p-valor < 0.05).

També es van realitzar correlacions de Pearson que estableix la covariància entre dues variables en una distribució bidimensional. És a dir, si els canvis en una de les variables es relaciona amb els canvis de l'altra.

Finalment es va fer un test de Tukey (Post hoc) en algunes de les dades significatives per tal de saber quina de les mitjanes és significativament diferent de la resta.

## **Criteris ètics i de sostenibilitat**

Al llarg de l'experiment s'han tingut en compte criteris ètics i de sostenibilitat per tal de reduir l'impacte ambiental i els residus generats. En el treball de laboratori s'ha tingut en compte el protocol de separació de residus i sempre que ha estat possible la reutilització del material. En el treball de camp s'han realitzat només les manipulacions estrictament necessàries a les parcel·les, sense malmetre l'entorn d'aquestes.

## RESULTATS

### Pèrdua de pes

La reducció de pes de les fulles durant els 4 mesos d'experiment va ser molt petita i fins i tot en el cas d'*Arbutus unedo* es va observar un petit augment de pes (Figura 6). Amb la comparació de les dades de l'última recollida es van observar diferències significatives entre espècies respecte el percentatge de matèria orgànica romanent (Taula 2), degut a que en l'espècie *Arbutus unedo* trobem valors superiors del percentatge de matèria orgànica romanent que en *Phillyrea angustifolia*.

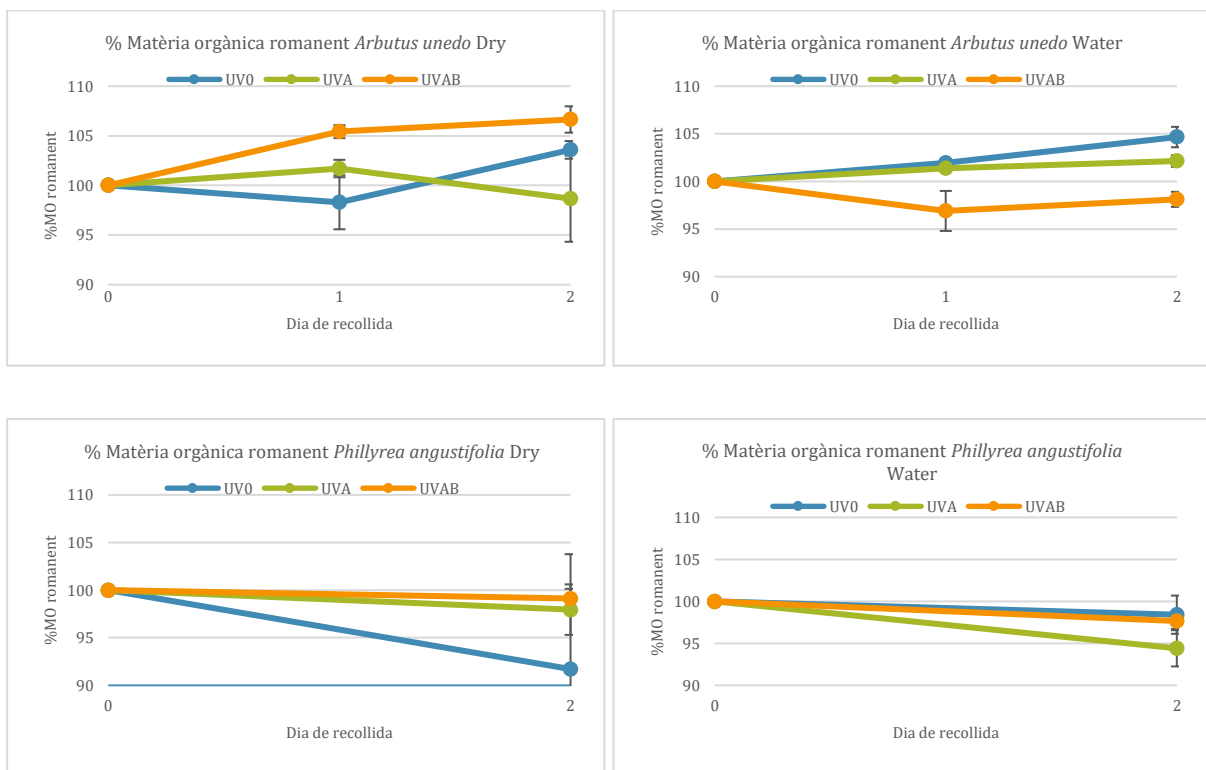


Figura 6. Gràfics del percentatge de matèria orgànica romanent de cada espècie i segons el règim hídric al llarg de les 3 recollides realitzades. La recollida 0 va ser el dia 28 d'Octubre de 2018, la 1a el 28 de Novembre de 2017 i la 2a entre el 20 i el 22 de Febrer de 2018. En blau les mostres amb tractament sense radiació ultraviolada, en verd amb radiació UV-A i en taronja amb radiació UV-A i UV-B. Les barres d'error indiquen l'error estàndard.

p-valors inicials	Carboni bacterià	Carboni fúngic	Biomassa Bacteriana respecte el total	p-valors 2a Recollida	Carboni bacterià	Carboni fúngic	%MO romanent	Biomassa Bacteriana respecte el total
Espècie	0,71126	0,16964	0,15288	Espècie	0,00000017	0,00125	0,02705	0,00010
Radiació	0,14316	0,20114	0,04384	Radiació	0,08471	0,60870	0,79494	0,81887
Règim hídric	0,29088	0,81239	0,81425	Règim hídric	0,47865	0,07380	0,99450	0,44940
Espècie: Radiació	0,53604	0,35690	0,59721	Espècie: Radiació	0,06630	0,90828	0,55286	0,13470
Espècie: Règim hídric	0,07298	0,07467	0,83458	Espècie: Règim hídric	0,80163	0,28965	0,64004	0,15360
Radiació: Règim hídric	0,81700	0,63630	0,07558	Radiació: Règim hídric	0,77560	0,75937	0,31640	0,76895

Taula 2. Resultat de les anàlisis de la variància de tres factors (Espècie, Radiació i Règim hídric) i les seves interaccions per a les dades inicials i les dades de la segona recollida (4 mesos), per a les dues espècies estudiades, *Phillyrea angustifolia* i *Arbutus unedo*. La taula inclou els P-valors: en verd clar estan indicats els p-valors inferiors a 0.05 i en groc els p valors propers a 0.05.

Amb els resultats de totes les recollides d'*Arbutus unedo* es va observar un efecte de la interacció entre radiació : règim hídric i de la recollida: radiació : règim hídric (Taula 3). Es va observar un augment de la matèria orgànica en les mostres sota els tractaments de radiació UV-0 i UV-AB en el règim hídric de sequera i en el règim hídric sense sequera es reduïen, fins i tot el tractament de radiació UV-AB era el que tenia una major pèrdua de MO.

p-valors totes <i>Arbutus</i>	Carboni bacterià	Carboni fúngic	%MO romanent	Biomassa Bacteriana respecte el total
Recollida	0,35590	0,0003377	0,69697	0,00820
Radiació	0,53240	0,09573	0,06033	0,11146
Règim hídric	0,78160	0,0008979	0,20701	0,05198
Radiació: Recollida	0,11070	0,74556	0,23740	0,15825
Radiació: Règim hídric	0,16780	0,14487	0,00043	0,04032
Recollida: Règim hídric	0,76310	0,37096	0,64649	0,26713
Radiació: Recollida: Règim hídric	0,23420	0,53048	0,03125	0,29183

Taula 3. Resultat de les anàlisis de la variància de tres factors (Recollida, Radiació i Règim hídric) i les seves interaccions per a les dades inicials i de les dues recollides d'*Arbutus unedo*. La taula inclou els P-valors: en verd clar estan indicats els p-valors inferiors a 0.05 i en groc els p valors propers a 0.05.

## Biomassa bacteriana

A l'inici de l'experiment no es van observar diferències significatives de biomassa bacteriana entre espècies però sí una lleugera interacció de l'espècie amb el règim hídric (Taula 2,  $p=0.072$ ). Es va observar que en el cas de les fulles de *Phillyrea* hi havia major biomassa bacteriana a les fulles sotmeses al tractament de sequera, en canvi a les fulles d'*Arbutus* el règim hídric sembla no tenir efecte en aquesta colonització bacteriana inicial (Figura 7).

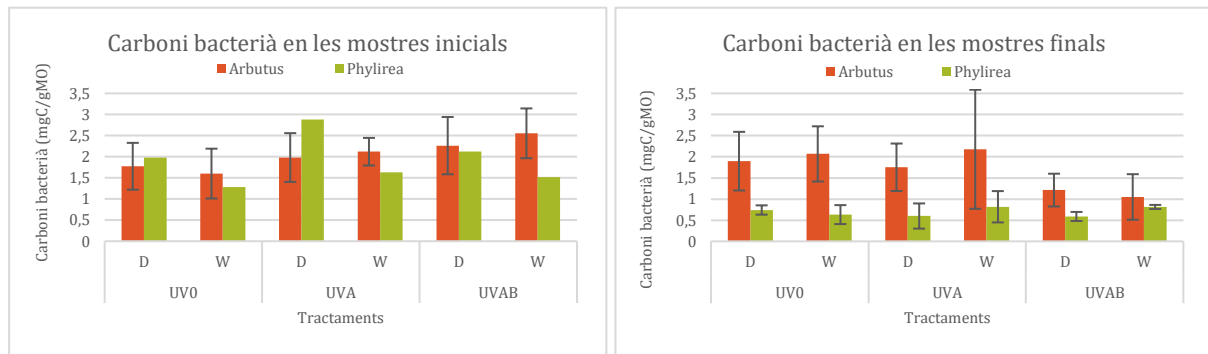
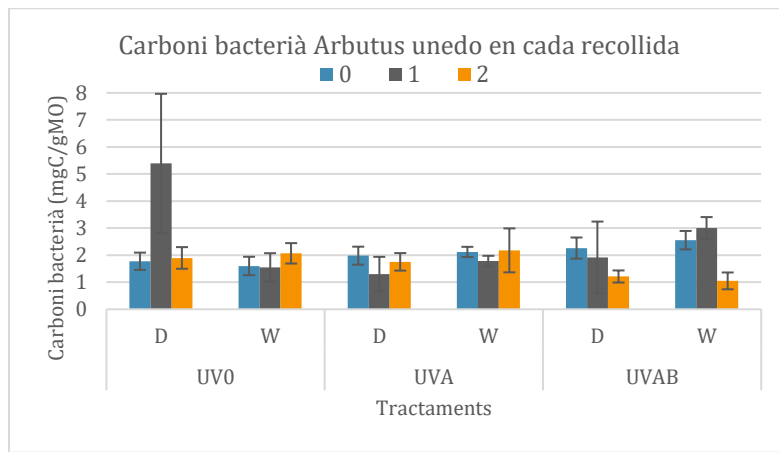


Figura 7. Gràfics del carboni bacterià en les mostres inicials i de la segona recollida en els diferents tractaments. En taronja les dades de l'espècie *Arbutus unedo* i en verd les de l'espècie *Phillyrea angustifolia*. Les barres d'error indiquen l'error estàndard. Les dades inicials de *Phillyrea* es basen en els resultats de només 1 mostra, per això no està indicat l'error estàndard.

Amb les mostres finals es van observar diferències molt significatives en la biomassa bacteriana entre espècies on sembla que *Arbutus* té molt més carboni bacterià que *Phillyrea* (Figura 7, Taula 2;  $p$ -valor 0.00000017). També s'observa la tendència a la disminució del carboni bacterià en el tractament amb radiació UV-AB, especialment per l'espècie *Arbutus* significació propera al 0.05 per la radiació i en la interacció espècie : radiació.

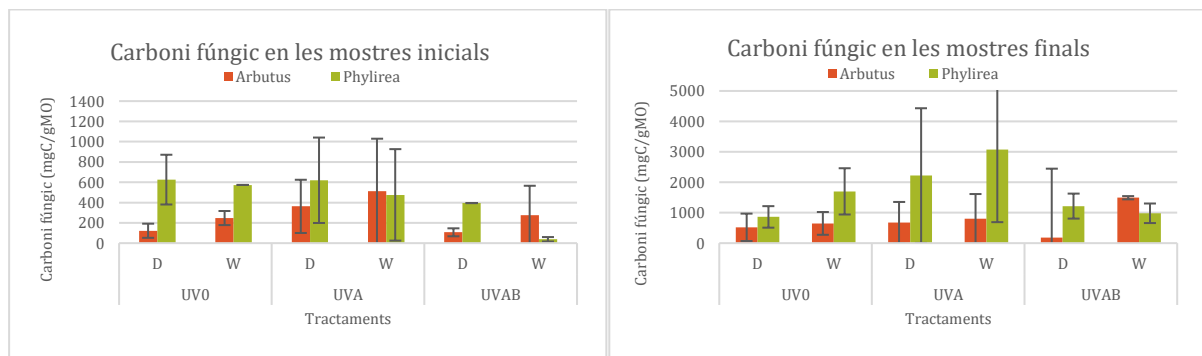
En l'anàlisi dels resultats de l'espècie *Arbutus unedo*, els quals inclouen les dades inicials i les dues recollides, no es van observar diferències significatives en la biomassa bacteriana entre tractaments (Figura 8, Taula 3).



**Figura 8.** Gràfic de la biomassa bacteriana de totes les recollides de l'espècie *Arbutus unedo*. En blau s'indica la recollida inicial, en gris la primera recollida i en taronja la segona. Les barres d'error indiquen l'error estàndard.

### Biomassa de fongs

A l'inici de l'experiment no es van observar diferències significatives de biomassa fúngica entre espècies però sí una lleugera interacció de l'espècie amb el règim hídric (Taula 2,  $p=0.074$ ). Es va observar que en el cas de les fulles de *Phillyrea* hi havia major biomassa de fongs a les fulles sotmeses al tractament de sequera, en canvi a les fulles d'*Arbutus* el règim hídric semblava tenir l'efecte contrari, hi havia major biomassa de fongs a les fulles sotmeses al tractament humit (Figura 9).



**Figura 9.** Gràfics del carboni fúngic en les mostres inicials i de la segona recollida en els diferents tractaments. En taronja les dades de l'espècie *Arbutus unedo* i en verd les de l'espècie *Phillyrea angustifolia*. Les barres d'error indiquen l'error estàndard.

En la Figura 9 s'observen també tendències diferents entre espècies i règims hídrics en les mostres final, *Phillyrea* té més carboni fúngic que *Arbutus* i en general hi ha més carboni fúngic en els tractaments "water" (Taula 2).

En l'anàlisi dels resultats d'*Arbutus unedo* s'observa un fort efecte de la recollida i el règim hídric, indicant una major biomassa de fongs en condicions d'humitat (règim hídric "water" ) que en sequera i una menor biomassa inicial que en les dues recollides. El test de Tukey per les recollides ens indica que la mitjana significativament diferent és la de la recollida inicial. (Figura 10, Taula 2). Es va observar un lleuger efecte de la radiació (Taula 3,  $p=0.09$ ) amb valors més baixos de biomassa fúngica amb la radiació UVAB (Figura 10).

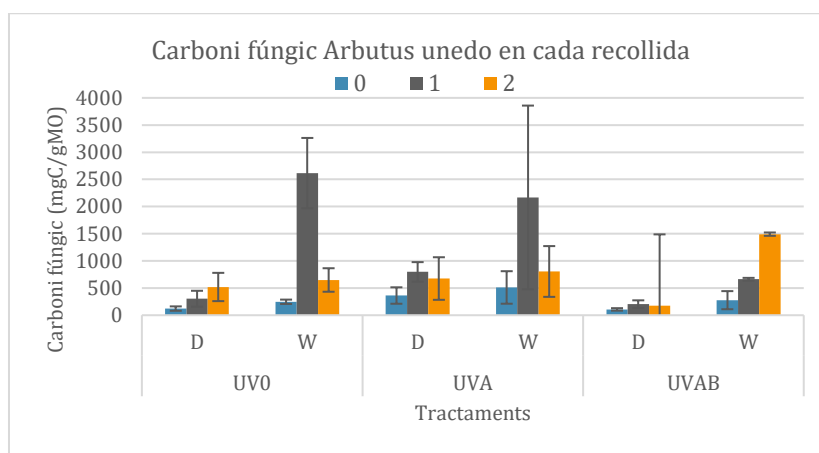


Figura 10. Gràfic de la biomassa fúngica de totes les recollides de l'espècie *Arbutus unedo*. En blau s'indica la recollida inicial, en gris la primera recollida i en taronja la segona. Les barres d'error indiquen l'error estàndard.

### Relació entre paràmetres

Les correlacions entre les variables analitzades es resumeixen a la Taula 4. No hi ha correlació entre els diferents paràmetres, això ens indica que aquests són complementaris i no responen igual als factors estudiats.

n=84	Carboni fúngic (mgC/gMO)	Carboni bacterià (mgC/gMO)	%MO romanent	% Biomassa bacteriana respecte TOTAL
Carboni fúngic (mgC/gMO)	1			
Carboni bacterià (mgC/gMO)	-0,260	1		
%MO romanent	-0,154	0,084	1	
% Biomassa bacteriana respecte TOTAL	-0,274	0,567	0,048	1

Taula de correlacions de Pearson

Taula 4. Taula de correlacions de Pearson amb les dades obtingudes de carboni bacterià, carboni fúngic, percentatge de matèria orgànica romanent i percentatge de biomassa bacteriana respecte el total.

En la relació entre la biomassa bacteriana i la biomassa microbiana total (bacteris + fongs) de totes les dades, a l'inici de l'experiment es va observar un major % de biomassa bacteriana al afegir radiació, sobretot en el tractament de radiació UV-AB (Figura 11, Taula 2; p-valor 0.043). També es va observar que hi ha diferències en la interacció radiació : règim hídric (significació propera a 0.5), en UV-0 hi ha un major % de biomassa de bacteris en el tractament de sequera. A les mostres finals es va observar una diferència molt significativa entre espècies i el % de biomassa bacteriana era superior en *Arbutus*.

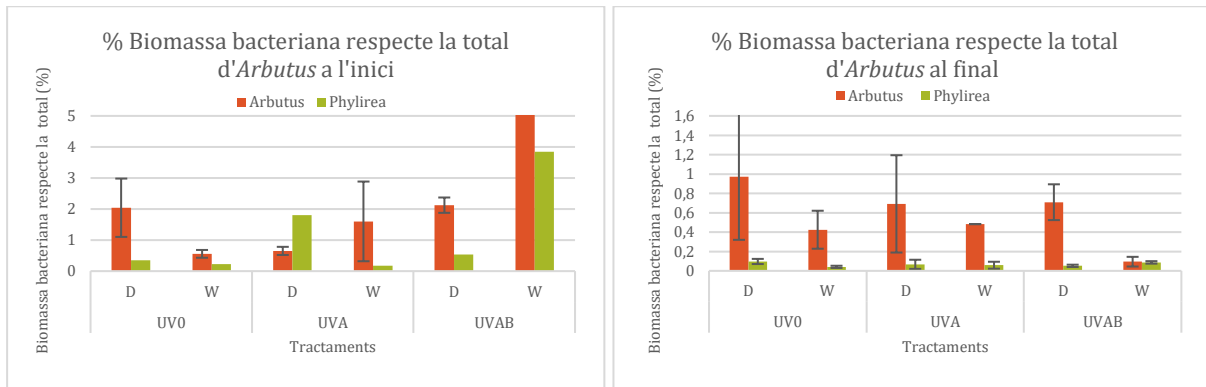


Figura 11. Gràfics del percentatge de carboni bacterià respecte el total de carboni microbià en les mostres inicials i de la segona recollida en els diferents tractaments. En taronja les dades de l'espècie *Arbutus unedo* i en verd les de l'espècie *Phillyrea angustifolia*. Les barres d'error indiquen l'error estàndard. Les dades inicials de *Phillyrea* es basen en els resultats de només 1 mostra, per això no està indicat l'error estàndard.

En l'anàlisi dels resultats d'*Arbutus unedo* es va observar un fort efecte de la recollida i així com de la interacció entre radiació : règim hídric, també una tendència a l'efecte del règim hídric (Figura 12, Taula 3). Això ens indica que hi ha una major proporció de biomassa bacteriana a l'inici de l'experiment. En condicions sense radiació el % de biomassa bacteriana és superior en condicions de sequera, mentre que en condicions de radiació (UV-A i UV-B) el % de biomassa bacteriana és major en condicions d'humitat.

Tot i això, cal remarcar que els percentatges són molt petits, el màxim és del 5% i això ens indica que al llarg de l'experiment hi ha major quantitat de biomassa fúngica que de bacteriana.

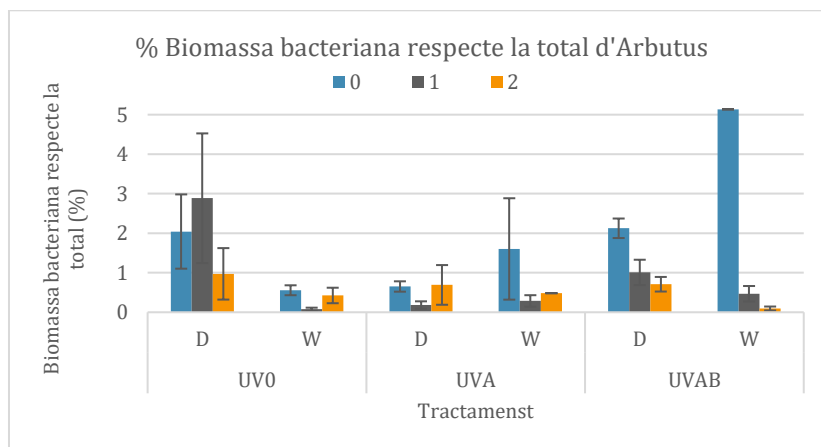


Figura 12. Gràfic del percentatge de carboni bacterià respecte el total de carboni microbià de totes les recollides de l'espècie *Arbutus unedo*. En blau s'indica la recollida inicial, en gris la primera recollida i en taronja la segona. Les barres d'error indiquen l'error estàndard.

## **DISCUSSIÓ**

Les espècies vegetals mediterrànies estan adaptades al clima i tenen adaptacions escleròfiles per sobreviure. No totes tenen el mateix nivell d'adaptació: *Arbutus* té una fulla més escleròfila que *Phillyrea*. Aquestes adaptacions poden afectar la composició de la fulla i la qualitat d'aquesta també afectant la seva descomposició. Bona part de la descomposició la duen a terme bacteris i fongs els quals també són sensibles a la disponibilitat d'aigua i la radiació, les quals poden afectar la colonització microbiana de les fulles en descomposició. Aquest estudi mostra la colonització microbiana i la pèrdua de pes de fulles en descomposició d'aquestes dues espècies i la seva resposta a canvis en la disponibilitat d'aigua i la radiació.

En relació a la colonització inicial, els resultats suggereixen que una reducció de la disponibilitat d'aigua durant el creixement de la planta pot afectar la colonització microbiana en l'inici de la descomposició i que aquest efecte pots ser diferent segons l'espècie vegetal, però cal tenir en compte que l'efecte s'ha observat al límit de la significació (interacció règim hídric : espècie,  $p < 0.1$ , Taula 2). En el cas d'*Arbutus*, el tractament de règim hídric sense sequera hi ha més carboni fúngic, fet que era d'esperar ja que la manca d'aigua és un dels factors limitants per als fongs (Camarasa et al., 1993) i sota tractament d'òptim règim hídric la fulla d'*Arbutus* és més gruixuda que en sequera, per tant, necessita més microbiota per descompondre-la (Díaz, 2017). En el cas de *Phillyrea* hi ha més bacteris en el tractament de règim hídric de sequera. *Phillyrea* és més resistent a la sequera que *Arbutus*, això l'ajuda a no tenir tanta acumulació de compostos fenòlics, els quals són més difícils de trencar pels bacteris (Ogaya et al., 2004).

L'efecte de la radiació i el règim hídric en la colonització microbiana durant el procés de descomposició s'ha pogut estudiar sobretot per a *Arbutus unedo*. S'ha observat que la reducció de la disponibilitat d'aigua, sobretot en el tractament de radiació UV-AB redueix la quantitat de carboni microbià. Aquests resultats els podríem atribuir a l'alta sensibilitat que té *Arbutus* a la sequera, amb la qual acumula compostos fenòlics més difícils de degradar (Ogaya et al., 2004) i també a la sensibilitat de la microbiota a la sequera. A més la comunitat bacteriana en els primers estadis de la descomposició és especialment sensible a l'exposició a la radiació UVB (Johnson, 2003).

Els resultats en *Arbutus* suggereixen que hi ha una forta influència del règim hídric pel que fa al carboni fúngic ( $p$  valor 0.0008, Taula 3). Els fongs prefereixen clarament els tractaments sense sequera (Figura 10). Podríem relacionar la major quantitat de carboni fúngic en els tractaments sense sequera amb el fet que s'hi ha perdut una mica més de matèria orgànica. La humitat afavoreix la presència dels fongs i això provoca una major descomposició. També s'observa que la radiació UV-A incrementa una mica els valors de carboni fúngic però quan hi afegim la radiació UV-B (UV-AB) disminueix. Els fongs son especialment sensibles a l'exposició a la radiació UVB (Johnson, 2003) Hi ha evidències de que el règim hídric de sequera pot contrarestar els efectes de la radiació UV (Verdaguer et al., 2012), en altres casos la radiació UV, sobretot UV-B, combinada amb la sequera pot incrementar els compostos fenòlics de les fulles (Hofman et al., 2003; Caldwell et al., 2007) els quals poden atenuar l'activitat dels organismes descomponedors alentint el procés de descomposició (Formçanek et al., 2014). L'increment del percentatge de carboni bacterià



respecte el total en les mostres amb tractament amb radiació es podria explicar de la mateixa forma.

Aquestes diferències de colonització entre fongs i bacteris en els diferents tractaments les podríem atribuir a les diferències entre aquests. Els fongs prefereixen ambients humits i són força estrictes pel que fa a les condicions ambientals. La seva quantitat disminueix en els tractaments de radiació UVAB i/o “dry”, condicions desfavorables. Quan aquests disminueixen els bacteris aprofiten per guanyar terreny, tot i que en general la sequera és desfavorable per a tots dos.

Els resultats de la pèrdua de pes de la fullaraca indiquen que estem encara en les fases inicials de la descomposició. S’han obtingut valors molt petits pel que fa a la reducció de MO de les mostres però s’ha de tenir en compte que les mostres d’aquest estudi s’han recollit només amb 4 mesos de diferència. Només el 30-70% de la descomposició té lloc el primer any i en aquest estudi no s’ha arribat ni a l’any. Això pot explicar perquè el percentatge de matèria orgànica romanent gairebé no ha disminuït. A més, l’època de l’any en que s’ha realitzat, l’hivern, és una de les que tenen menor activitat de descomposició juntament amb l’estiu. En el cas d’*Arbutus* fins i tot hi ha un augment del pes romanent que pot estar causat per la colonització microbiana inicial i, en canvi, una pèrdua de pes pràcticament inexistent. Tot i això s’observa que la radiació i el règim hídric afecten la reducció de la matèria orgànica (interacció radiació : Règim hídric, p valor =0.00043). Sota el tractament de sequera i UV-AB hi ha la menor reducció de MO (matèria orgànica) que com s’ha dit anteriorment la combinació d’aquests dos factors pot atenuar l’activitat dels organismes descomponedors. En canvi, en el tractament sense sequera UV-AB té la major reducció de MO. Aquests resultats juntament amb els observats per a la colonització fúngica suggereixen que la radiació UV-A podria beneficiar la descomposició dels teixits vegetals i la colonització microbiana i, en canvi, la radiació UV-B podria tenir un efecte inhibidor sobre els microorganismes.

L’exposició a radiació UV –A i UV-B estimula la fotodegradació i la mineralització fotoquímica de la matèria orgànica, associada a la reducció de la concentració de lignina en la fullaraca (Day *et al.*, 2007; Henry *et al.*, 2008; Dirks *et al.*, 2010) facilitant la degradació per part de la microbiota descomponedora però per altra banda la radiació ultraviolada és perjudicial per la microbiota. Aquest fet podria explicar perquè en algunes mostres, com les dades de carboni fúngic, hi ha un increment de carboni en el tractament amb radiació UV-A i una reducció en el tractament amb radiació UV-AB. Podria ser que tenir una part de radiació ajudi a la descomposició però quan n’hi ha un excés amb UV-AB aquesta afecti la microbiota. També es podria relacionar amb els diferents efectes de UV-A i UV-B. Sembla que UV-B té més influència en la microbiota que UV-A, tot i això, la radiació UV-A no està molt estudiada.

L’espècie *Arbutus* té una fulla més esclerofil·le que *Phillyrea* i tenen diferents estructures, per exemple *Phillyrea* té més quantitat de carboni en la fulla i *Arbutus* té més compostos fenòlics (Díaz, 2017). Aquestes diferències podrien explicar perquè el resultat ens suggereixen que hi haurà un efecte dels tractaments de radiació i règim hídric diferent en la descomposició d’aquestes dues espècies però amb les dades de només 4 mesos no es pot afirmar. La qualitat de la fullaraca també afecta a la descomposició (Gaxiola *et al.*, 2015) però no tenim dades d’aquest tipus i no ho podem

comprovar. Per tal de comprovar-ho s'hauria de mirar la quantitat de lignina i cel·lulosa de les mostres i mirar si hi ha correlació.

En fulles més esclerofil·le s'hi espera major quantitat de carboni fúngic ja que tenen major capacitat de degradació de polímers vegetals com la lignina i la cel·lulosa però no ha sigut així, hi ha major quantitat de fongs en les fulles de *Phillyrea* i major quantitat de bacteris en *Arbutus*. Aquest fet el podríem atribuir al diferent estat de descomposició en que es troben les dues fulles. En el procés de descomposició els primers a colonitzar sobretot són els bacteris, després actuen els fongs. Les fulles d'*Arbutus* tenen una menor pèrdua de MO i això ens indica que va per unes fases més inicials del procés de descomposició, per tant, fongs encara no hi ha pogut acabar d'arribar. També ho podem relacionar amb el tipus de fulla d'*Arbutus*, com que és més escleròfil·la el seu procés de descomposició és més lent. Això també podria explicar perquè s'observa una major quantitat de biomassa bacteriana respecte el total en la recollida inicial.

Com era esperable la biomassa fúngica és molt més important que la bacteriana (el carboni bacterià és com a màxim un 5% de la biomassa microbiana total), fet que concorda amb els dades obtingudes en altres estudis (0.08%; Mora, 2014 ) però hi ha diferències entre espècies.

El clima Mediterrani és un dels altres factors que poden haver influït en els resultats. L'hivern del 2017-2018 ha nevat, ha plogut i ha fet molt fred. El procés de descomposició s'atura en aquestes condicions i pot afavorir o desfavorir els bacteris i els fongs descomponedors variant-ne així la quantitat trobada en les mostres. En algunes mostres hi ha un augment de la microbiota en la 1a recollida, en que encara no feia molt fred i una disminució en la segona que podria estar influïda pel fred hivernal dels mesos previs i del moment de la recollida.

Seria interessant que el estudis futurs s'investigués l'efecte de la radiació i la disponibilitat hídrica en els nivells de lignina i cel·lulosa en aquestes dos espècies per tal d'estudiar com varia la microbiota descomponedora segons la descomposició de la fulla. A més, també seria interessant estudiar la quantitat d'enzims bacterians i fúngics sota els mateixos tractaments i per aquestes dues espècies per veure més clarament com interacciona la microbiota amb els dos tipus d'estructura foliar.

Els resultats que s'han obtingut en aquest treball , com ja s'ha indicat a l'apartat de mètodes, formen part de la primera fase d'un estudi, que inclou el seguiment de la descomposició durant 12-18 mesos. Els resultats obtinguts amb les dades dels primers 4 mesos indiquen ja un efecte de la radiació i el règim hídric en la colonització microbiana i descomposició, especialment en *Arbutus* i per tant, suggereixen que les dades que s'obtinguin de tot l'experiment permetran també observar els efectes sobre *Phillyrea* i corroborar o reafirmar algunes de les conclusions obtingudes en aquests treball i per tant obtenir conclusions sòlides.

## **CONCLUSIONS**

From this study, we can conclude:

- ✓ To grow in different water availability treatments can influence in microbial biomass just after abscission of the leaves in *Phillyrea angustifolia* and *Arbutus unedo*. In *Phillyrea*, bacteria prefer to colonize leaves submitted to dry why in *Arbutus* fungi prefer to colonize leaves submitted to wet conditions.
- ✓ The exposure to UVB radiation reduces fungal colonization and tend to decrease the weight loss during decomposition, especially in dry conditions, while UVA seems to enhance microbial colonization and weight loss. The low water availability reduces microbial colonization during decomposition.
- ✓ The results indicate significant differences in the microbial colonization between species. *Phillyrea* showed higher weight loss and microbial colonization than *Arbutus*.

## **BIBLIOGRAFIA**

- \* Amalfitano, S. And Fazi, S. (2008) Recovery and quantification of bacterial cells associated with streambed sediments. *Journal of Microbial Methods*, **75**. 237-243
- \* Baldy V., & Gessner M.O. (1997). Towards a budget of leaf litter decomposition in a first-order woodland stream. *Comptes rendus de l'Academie des Sciences III- Vie* **320**, 747-758.
- \* Bratbak, G. (1985). Bacterial biovolume and biomass estimations. *Applied and Environmental Microbiology*.
- \* Calbo J, Pages D, Gonzalez JA (2005) Empirical studies of cloud effects on UV radiation: a review. *Reviews of Geophysics*, **43**, 1-28.
- \* Caldwell, M. M., Bornman, J. F., Ballar?, C. L., Flint, S. D., & Kulandaivelu, G. (2007). Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **6**(3), 252. <https://doi.org/10.1039/b700019g>
- \* Camarasa, J. M., Di Castri, F., Bertranpetit, J., Folch, R., Fundació Enciclopèdia Catalana, Unesco., & MaB. (1993). *Biosfera : Mediterrànies*. (Vol. 5, pp. 48-55) Barcelona: Fundació Enciclopèdia Catalana.
- \* Day TA, Zhang ET, Rhuhland CT (2007) Exposure to solar UV-B radiation accelerates mass and lignin loss of *Larrea tridentata* litter in the Sonoran Desert. *Plant Ecology*, **193**, 185-194
- \* Díaz L. (2017) Climate Change and Mediterranean Ecosystems: Plant and soil responses to UV radiation and water availability before and after a perturbation. *Doctoral Doctoral programme in experimental sciences and sustainability Universitat de Girona*.
- \* Dirks I, Navon Y, Kanas D, Dumbur R, Grünzweig JM (2010) Atmospheric water vapor as driver of litter decomposition in Mediterranean shrubland and grassland during rainless seasons. *Global Change Biology*, **16**, 2799-2812
- \* Duran, X. et al. (2017). *EL CANVI CLIMÀTIC A CATALUNYA : resum executiu del Tercer informe sobre el canvi climàtic a Catalunya*. (1a edició), 20-22. Barcelona: Institut d'Estudis Catalans
- \* Formánek P, Rejšek K, Vranová V (2014) Effect of elevated CO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> and UV radiation on soils. *The Scientific World Journal*, **2014**, 1-8
- \* Gaxiola, A., & Armesto, J. J. (2015). Understanding litter decomposition in semiarid ecosystems: linking leaf traits, UV exposure and rainfall variability. *Frontiers in Plant Science*, **6**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00140>
- \* Gessner M.O. & Chauvet E. (1993). Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 502-507.

- \* Gessner M.O., Schmitt A.L. (1996). Use of soil-phase extraction to determine ergosterol concentration in plant tissue colonized by fungus. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 415-419.
- \* Henry HAL, Brizgys K, Field CB (2008) Litter decomposition in a California annual grassland: interactions between photodegradation and litter layer thickness. *Ecosystems*, **11**, 545-554
- \* Herman JR (2010) Global increase in UV irradiance during the past 30 years (1979–2008) estimated from satellite data. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, **115**, 1–15.
- \* Hofmann RW, Campbell BD, Bloor EJ, Swinney EE, Markham KR, Ryan KG, Fountain DW (2003) Responses to UV-B radiation in *Trifolium repens* L. – physiological links to plant productivity and water availability. *Plant, Cell and Environment*, **26**, 603-612
- \* Johnson D (2003) Response of terrestrial microorganisms to ultraviolet-B radiation in ecosystems. *Research in Microbiology*, **154**, 315–320.
- \* Li, Y., Huang, H., Wu, G., Yan, S., Chang, Z., Bi, J., & Chen, L. (2016). Under Controlled Laboratory Conditions, **11**, 2568–2582.
- \* Mora J. (2014) Leaf litter decomposition in mediterranean streams: microbial processes and responses to drought under current global change scenario. PhD thesis. *Doctoral programme in experimental sciences and sustainability Universitat de Girona*.
- \* Ogaya, R., & Peñuelas, J. (2004). Phenological patterns of *Quercus ilex*, *Phillyrea latifolia*, and *Arbutus unedo* growing under a field experimental drought. *Écoscience*, **11**(3), 263–270. <https://doi.org/10.1080/11956860.2004.11682831>
- \* Robb, F., Davies, B. R., Cross, R., Kenyon, C., & Howard-Williams, C. (1979). Cellulolytic bacteria as primary colonizers of *Potamogeton pectinatus* L. (Sago Pond Weed) from a Brackish South-Temperate Coastal Lake. *Microbial Ecology*, **5**(3), 167–177. <https://doi.org/10.1007/BF02013524>
- \* Romaní, A. M., Fischer, H., Mille-Lindblom, C., & Tranvik, L. J. (2006). Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: Differential extracellular enzyme activities. *Ecology*, **87**(10), 2559–2569. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[2559:IOBAFO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[2559:IOBAFO]2.0.CO;2)
- \* Rotondi, A., Rossi, F., Asunis, C., & Cesaraccio, C. (2003). Leaf xeromorphic adaptations of some plants of a coastal Mediterranean macrophyte ecosystem. *Ecology*, **4**(3), 25–35.
- \* Servei meteorològic de Catalunya. (2015). *CLIMATOLOGIA. EL GIRONÈS. 1971-2000*. Diagrama climàtic. Extret de [http://static-m.meteo.cat/wordpressweb/wp-content/uploads/2015/08/06103704/el\\_Giron%C3%A8s.pdf](http://static-m.meteo.cat/wordpressweb/wp-content/uploads/2015/08/06103704/el_Giron%C3%A8s.pdf)

- \* Smith, W. K., Gao, W., Steltzer, H., Wallenstein, M. D., & Tree, R. (2010). Moisture availability influences the effect of ultraviolet-B radiation on leaf litter decomposition. *Global Change Biology*, **16**(1), 484–495. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01973.x>
- \* Theil-Nielsen, J., Sondergaard, M. (1998). Bacterial carbon biomass calculated from biovolumes. *Archiv Für Hydrobiologie*, **141**(2), 195–207. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=2178530>
- \* Uselman, S. M., Snyder, K. A., Blank, R. R., & Jones, T. J. (2011). UVB exposure does not accelerate rates of litter decomposition in a semi-arid riparian ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, **43**(6), 1254–1265. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.02.016>
- \* Verdaguer D, Llorens L, Bernal M, Badosa J (2012) Photomorphogenic effects of UVB and UVA radiatiu on leaves of six Mediterranean sclerophyllus Woody species subjected to two diferent watering regimes at the seedling stage. *Environmental and Experimental Botany*, **79**, 66-75
- \* Walter, H. (1998). *Vegetació i zones climàtiques del món: l'estructuració ecològica de la Geobiosfera*. (2a ed. Catalana). Barcelona: PPU.
- \* Wang, J., Liu, L., Wang, X., & Chen, Y. (2015). The interaction between abiotic photodegradation and microbial decomposition under ultraviolet radiation. *Global Change Biology*, **21**(5), 2095–2104. <https://doi.org/10.1111/gcb.12812>
- \* Williamson CE, Zepp RG, Lucas RM et al. (2014) Solar ultraviolet radiation in a changing climate. *Nature Climate Change*, **4**, 434–441.
- \* Zimmer, M. (2008) *Detritus*. *Encyclopedia of Ecology* (eds S.E. Jørgensen & B.D. Fath), 903–913. Elsevier B.V.