



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

## **“Diversidad funcional microbiana del suelo en bosques de *Nothofagus pumilio* ubicados a lo largo de un gradiente de precipitaciones”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

### **TRINIDAD MARDONES VERGARA**

Director del Seminario de  
Título:

Dra. Merly de Armas Ricard

Co-Director:

Dr. Oney Oscar Ramírez Rodríguez

Patrocinante:

Dra. Julieta Orlando

Noviembre 2022

Santiago - Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Srta.

**Trinidad Mardones Vergara**

“Diversidad funcional microbiana del suelo en bosques de *Nothofagus pumilio* ubicados a lo largo de un gradiente de precipitaciones”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

*Dra. Merly de Armas Ricard*

**Director Seminario de Título:** \_\_\_\_\_

*Dr. Oney Oscar Ramírez Rodríguez*

**Co-Director Seminario de Título:** \_\_\_\_\_

*Dra. Julieta Orlando*

**Patrocinante Seminario de Título:** \_\_\_\_\_

### **Comisión Revisora y Evaluadora**

**Presidente Comisión:**   Dra. María Cecilia Rojas  

**Evaluador:**   Dra. Katerin Almendras  

Santiago de Chile, .....

## i. Biografía



Nacida el 3 de junio del año 1997 en la pequeña ciudad de Coyhaique, Aysén, Trinidad Mardones Vergara es la hija mayor de Francisco Mardones y Sylvia Vergara. Nacida y criada en la Patagonia, desde pequeña le gustó mucho todo lo que tuviese que ver con la ciencia (jugar con tierra, ver bichitos, etc.) y su interés creció aún más cuando le regalaron un microscopio de juguete en el cual podía observar las alas de moscas o levadura que robaba de la cocina de su madre. Toda su enseñanza básica y media tuvo claro que quería ser científica y finalmente al terminar esta etapa, buscó una carrera que sonara interesante e integrara las ramas de la ciencia que tanto le gustaban. Ahora terminando esta etapa se dio cuenta que escogió bien el camino a seguir, y aun cuando no está segura de cuál será su próximo paso en la vida, está muy emocionada de ser oficialmente científica.

## ii. Agradecimientos

Me gustaría agradecer profundamente a mis padres Francisco y Sylvia junto a mis hermanos por haberme apoyado incondicionalmente estos años universitarios y porque jamás dudaron de las decisiones que tomé en el camino.

A los profesores Merly y Oney, junto al laboratorio de Química y Bioquímica de la Universidad de Aysén, por haberme aceptado en su laboratorio con los brazos abiertos, aun cuando estábamos en la mitad de una pandemia y por brindarme su conocimiento y su ayuda en esta etapa.

A la profesora Julieta junto al laboratorio de Ecología Microbiana (LEMi), por abrirme las puertas de él, incluirme en sus seminarios y actividades y por su ayuda en esta etapa.

Al laboratorio de Fisiología Celular y Metabolismo de la Universidad de Aysén, especialmente al Dr. Fabián Jaña por haberme facilitado el uso del fluorímetro, esencial para esta investigación.

A mis amigas de toda la vida, que me han acompañado desde el jardín de niños hasta el día de hoy, porque aun cuando no nos veamos nunca, el amor es incondicional.

A todos los amigos que hice acá en la universidad, que sería un poco largo nombrarlos a todos, pero ustedes saben quiénes son. Gracias por las incontables risas, trabajos en grupo y sesiones de estudio, sin ustedes este viaje habría sido muy pesado.

Finalmente agradecerle a mi Tía Maruja, que sin ella no habría sobrevivido los dos primeros años viviendo en la capital.

**Financiamiento:** Proyecto VIDCA-INS-INV-2020-28-UACH. "Potencial metabólico y genético de las comunidades microbianas de suelos de bosques de *Nothofagus pumilio*", Merly de Armas Ricard.

### iii. Índice de Contenidos

i.	Biografía.....	2
ii.	Agradecimientos.....	3
iii.	Índice de Contenidos.....	4
iv.	Índice de Figuras.....	6
v.	Índice de Tablas.....	7
vi.	Lista de Abreviaturas.....	8
1.	RESUMEN.....	9
2.	ABSTRACT.....	11
3.	INTRODUCCIÓN.....	13
3.1	<i>Nothofagus pumilio</i> .....	13
3.2	Suelo y comunidades microbianas.....	14
3.3	Actividad enzimática en suelos.....	15
3.3.1	Enzimas $\beta$ -glucosidasa, celobiohidrolasa y lacasa.....	16
3.3.2	Enzima fosfatasa ácida.....	19
3.3.3	Enzima arilsulfatasa.....	21
4.	OBJETIVOS.....	23
4.1.	Objetivo General.....	23
4.2.	Objetivos Específicos.....	23
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
5.1.	Muestras de suelo:.....	24
5.2.	Determinación de parámetros edáficos:.....	24
5.2.1.	pH, contenido de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ):.....	24
5.2.2.	Contenido hídrico:.....	25
5.2.3.	Porcentaje de materia orgánica y fósforo en suelo:.....	25
5.3.	Determinación de actividad enzimática:.....	25
5.4.	Análisis estadístico:.....	26
6.	RESULTADOS.....	27
6.1.	Determinar parámetros edáficos de suelos de bosques de <i>N. pumilio</i> con diferente nivel de precipitación:.....	27
6.2.	Determinar la diversidad funcional microbiana del suelo en bosques de <i>N. pumilio</i> con diferente nivel de precipitación:.....	30
6.3.	Relacionar los parámetros edáficos y las funciones microbianas del suelo en bosques de <i>N. pumilio</i> ubicados a lo largo de un gradiente de precipitación:.....	32

7. DISCUSIÓN Y PROYECCIONES.....	37
8. CONCLUSIONES.....	44
9. BIBLIOGRAFÍA.....	45
10. ANEXO.....	51
10.1. Coeficientes de correlación de Pearson .....	51

#### iv. Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representación de la reacción de hidrólisis de la celulosa catalizada por la enzima $\beta$ -glucosidasa. ....	16
<b>Figura 2.</b> Representación de la reacción de hidrólisis de la celulosa catalizada por la enzima celobiohidrolasa. ....	18
<b>Figura 3.</b> Representación de la reacción de oxidorreducción catalizada por la enzima lacasa. ....	19
<b>Figura 4.</b> Representación de la reacción de hidrólisis catalizada por la enzima fosfatasa ácida. ....	20
<b>Figura 5.</b> Representación de la reacción de hidrólisis catalizada por la enzima arilsulfatasa. ....	22
<b>Figura 6.</b> Mapa de la provincia de Coyhaique y área de estudio, junto con fotografías de cada uno de los sitios. ....	24
<b>Figura 7.</b> Parámetros edáficos, para cada uno de los bosques de <i>Nothofagus pumilio</i> ; Coyhaique Alto (CA), Reserva Nacional Trapananda (RNT) y Lago Largo (LL).. ....	29
<b>Figura 8.</b> Cuantificación de actividad enzimática en cada uno de los sitios estudiados; Coyhaique Alto (CA), Reserva Nacional Trapananda (RNT) y Lago Largo (LL). ....	31
<b>Figura 9.</b> Gráficos de correlación de Pearson. ....	35
<b>Figura 10.</b> Análisis de componentes principales de los tres sitios de estudio. ....	36

## v. Índice de Tablas

### ANEXO.

<b>Tabla I.</b> Valores de los coeficientes de correlación de Pearson para el análisis de los tres sitios en conjunto. ....	51
<b>Tabla II.</b> Valores de los coeficientes de correlación de Pearson para el sitio Coyhaique Alto. ....	51
<b>Tabla III.</b> Valores de los coeficientes de correlación de Pearson para el sitio Reserva Nacional Trapananda. ....	51
<b>Tabla IV.</b> Valores de los coeficientes de correlación de Pearson para el sitio Lago Largo. ....	52



## vi. Lista de Abreviaturas

- 4-MUB: 4-metilumbeliferona
- ABTS: ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico
- CA: Coyhaique Alto
- LL: Lago Largo
- RNT: Reserva Nacional Trapananda
- C: carbono
- P: fósforo
- S: azufre

## 1. RESUMEN

La actividad enzimática en suelos tiene un rol fundamental en el ecosistema ya que las enzimas se ven involucradas en diversos procesos, incluyendo pasos fundamentales en los ciclos biogeoquímicos. Dentro de este grupo de enzimas se encuentran las extracelulares microbianas, las cuales suelen ser sintetizadas a modo de respuesta frente a diferentes perturbaciones en el suelo. Es por esto que estas actividades son de gran interés como indicador biológico de la calidad del suelo y nos entregan información de los diferentes procesos que ocurren en él.

*Nothofagus pumilio* (Lenga) es una de las especies de árbol caducifolio con mayor extensión en la zona sur y austral de Chile. Estos bosques han sido estudiados bajo el punto de vista ecológico, pero se han registrado pocos estudios sobre la diversidad de microorganismos que se asocian a ellos, por esta razón es de gran relevancia describir y comprender su diversidad funcional microbiana.

El objetivo de este estudio fue caracterizar la diversidad funcional microbiana en suelos de tres bosques de *Nothofagus pumilio*, los cuales se encuentran ubicados a lo largo de un gradiente de precipitaciones, mediante ensayos de fluorimetría y espectrofotometría. Se midieron las actividades de cinco enzimas que participan en los ciclos biogeoquímicos del carbono, fósforo y azufre; estas corresponden a  $\beta$ -glucosidasa, celobiohidrolasa, lacasa, fosfatasa ácida y arilsulfatasa. Se usaron herramientas de análisis bioestadístico para encontrar cómo correlacionan las actividades enzimáticas, los parámetros edáficos y el gradiente de precipitaciones.

Se reportaron correlaciones estadísticamente significativas entre las precipitaciones y las actividades enzimáticas cuantificadas. A excepción de la actividad  $\beta$ -glucosidasa, los sitios que presentaron un mayor nivel de precipitación exhibieron una

mayor actividad de las enzimas estudiadas. La enzima  $\beta$ -glucosidasa mostró actividades similares en los sitios de mayor y menor nivel de precipitación.

Los análisis de correlación de Pearson para todos los sitios en conjunto mostraron correlaciones estadísticamente significativas entre el contenido hídrico y la actividad de cuatro de las cinco enzimas estudiadas (celobiohidrolasa, lacasa, fosfatasa ácida y arilsulfatasa). Se encontraron también correlaciones significativas entre las actividades de las enzimas fosfatasa ácida y arilsulfatasa con el pH del suelo. Sin embargo, no se registraron correlaciones estadísticamente significativas entre la actividad  $\beta$ -glucosidasa y los parámetros edáficos analizados, ni entre la actividad de las enzimas estudiadas y el contenido de materia orgánica. Además, se hicieron análisis de correlación para cada uno de los tres sitios por separado, en este caso se destacaron correlaciones entre la actividad  $\beta$ -glucosidasa y el pH, el contenido hídrico y la materia orgánica. En conjunto, los resultados mostraron una separación de los tres sitios en función del nivel de precipitación, los parámetros edáficos y el potencial metabólico. Sin embargo, al analizar solamente el potencial metabólico se observó que, si bien los tres sitios poseen la misma funcionalidad, esta se expresa en niveles diferentes, destacándose el sitio con mayor precipitación (Lago Largo) como el que posee un mayor nivel.

## 2. ABSTRACT

Soil enzymatic activity has a fundamental role in the ecosystem since it is involved in various processes, including the fundamental steps of biogeochemical cycles. Within these group of enzymes are microbial extracellular enzymes, which are usually synthesized as a response to different disturbances in the soil, which is why these activities are of great interest as an indicator of the biological quality of the soil and provide us with information about the different processes that occur in it.

*Nothofagus pumilio* (Lenga) is one of the deciduous tree species with the largest extension in the southern and southern parts of Chile. These forests have been studied from an ecological point of view, but few studies have been made on the diversity of microorganisms that are present and associated with these forests, which is why it is of great relevance to describe and understand their microbial functional diversity.

The objective of this study was to characterize the microbial functional diversity in soils of three forests of *Nothofagus pumilio*, which are located along a precipitation gradient, by essays of fluorimetry and spectrophotometry. The activities of five enzymes involved in the carbon, phosphorus, and sulfur biogeochemical cycles were measured:  $\beta$ -glucosidase, cellobiohydrolase, laccase, acid phosphatase, and arylsulfatase. Biostatistical analysis tests were used to find correlations between enzyme activities, edaphic parameters, and precipitation gradients.

Significant correlations were reported between the precipitation gradient and quantified enzymatic activities. With the exception of  $\beta$ -glucosidase, the highest

precipitation level site had the highest enzyme activity of all enzymes studied.  $\beta$ -glucosidase showed similar activities at the sites of higher and lower precipitation levels.

Pearson correlation analyses were performed for the sites as a whole. Significant relationships were observed between water content and four of the five enzymes studied (cellobiohydrolase, laccase, acid phosphatase, and arylsulfatase). There were significant correlations between acid phosphatase and arylsulfatase enzymes and soil pH. It is worth noting that no significant correlations were found between  $\beta$ -glucosidase and any of the edaphic parameters, nor between enzymes and organic matter content. Correlation analyses were also performed separately for each of the three sites, which revealed correlations that differed from those observed in the overall analyses; these revealed correlations between the enzyme  $\beta$ -glucosidase and pH, water content, and organic matter. Overall, the results showed a separation of the three sites according to precipitation level, edaphic parameters and metabolic potential. However, when analyzing only the metabolic potential, it was observed that, although the three sites have the same functionality, this is expressed at different levels, with the site with the highest precipitation (Lago Largo) standing out as the one with the highest level.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Nothofagus pumilio

La Lengua o *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser es una de las especies de árbol caducifolio más representativas de la zona sur y austral de Chile. Esta crece desde la región del Maule hasta la región de Magallanes y corresponden a los bosques más abundantes en la Patagonia (tanto chilena como argentina) (Loewe Muñoz, V. y cols., 1998). En la región de Aysén los bosques de lengas cubren una superficie aproximada de 1,5 millones de hectáreas (Salinas y col. 2019; Soto y col. 2020) y crecen a lo largo de un gradiente de precipitaciones que va desde los 1500 mm hasta los 500 mm de costa a cordillera, respectivamente (Soto y col., 2021). Los bosques de Lengua pertinentes a este estudio se encuentran en la región de Aysén. Estos bosques han sido estudiados desde un punto de vista ecológico, pero hasta el día de hoy existen escasos estudios sobre la diversidad de microorganismos que se asocian a ellos, es por esto que es de gran relevancia poder comprender y describir la diversidad funcional microbiana en ellos. En bosques dominados por esta especie se ha descrito la diversidad de hongos micorrícicos (Marín y col., 2018) y la diversidad de bacterias asociadas a líquenes (Almendras y col., 2019), sin embargo, aún son escasos los estudios que aborden el potencial metabólico microbiano en estos suelos.

### **3.2 Suelo y comunidades microbianas**

El suelo posee una gran diversidad de microorganismos los cuales participan activamente en los ciclos biogeoquímicos y mantienen el correcto funcionamiento del ecosistema. La composición de plantas y las variables edáficas y ambientales influyen en la estructura de las comunidades microbianas del suelo; es por esto que estas comunidades son consideradas indicadores potenciales del funcionamiento y sostenibilidad del ecosistema, ya que son sensibles y responden de forma rápida y directa a los cambios ambientales (Fierer y col., 2003; de Armas-Ricard y col. 2016; Zheng y col., 2019).

Los microorganismos responden al estrés ambiental en diferentes formas, en función de su genética y su capacidad metabólica, siendo esta última la característica menos explorada del microbioma del suelo. Actualmente, es escaso el conocimiento de los mecanismos a escala microbiana que participan en las respuestas de los ecosistemas a perturbaciones; por esto la comprensión del papel de las comunidades microbianas del suelo en respuestas adaptativas a gran escala es un importante desafío (Baldrian, 2017, Jansson y Hofmockel, 2020).

La diversidad funcional de los microorganismos presentes en el suelo puede abordarse determinando tanto los diferentes microorganismos que componen los gremios participantes de los ciclos biogeoquímicos, como también la capacidad metabólica de las diversas comunidades microbianas que están presentes, y como estos influyen en el ecosistema (Arteaga-Garibay, R. I., 2018; Escalas, A. y cols., 2019). En este seminario de título se evaluó el potencial metabólico para determinar la diversidad funcional microbiana en suelos de bosque de *Nothofagus pumilio*.

### **3.3 Actividad enzimática en suelos**

Las enzimas del suelo son sintetizadas fundamentalmente por microorganismos y, en menor medida, por las plantas. Estas enzimas pueden ser de origen intracelular, asociadas a las paredes celulares de microorganismos o bien, ser secretadas hacia el medio. Estas últimas se denominan enzimas extracelulares y son secretadas para funcionar como enzimas libres en el suelo, o bien pueden asociarse a la capa externa de las raíces, siendo parte de la rizósfera de diferentes plantas (Jaskulak, M., & Grobelak, A., 2020).

Estas enzimas juegan un rol fundamental en el ecosistema ya que, se ven involucradas en diferentes procesos, desde reacciones bioquímicas en plantas, animales y microorganismos hasta la descomposición y transformación de materia orgánica. Junto con esto, son las principales responsables de la transformación y liberación de nutrientes en forma biodisponible para las plantas y otros organismos (Jaskulak, M., & Grobelak, A., 2020; Sharma, N., & Sharma, S., 2022).

La actividad enzimática extracelular en suelos es de gran interés como indicador biológico de la calidad de este, ya que es relativamente sencilla y rápida de determinar, es sensible al estrés ambiental, por lo que puede dar indicios de diferentes perturbaciones en el ecosistema, ya sean a causa de manejo antropogénico o contaminación y pueden indicarnos la capacidad que tiene el suelo para llevar a cabo diferentes reacciones biogeoquímicas y ayudarnos a identificar variaciones en las propiedades químicas, biológicas y físicas del suelo (Yakovchenko y col., 1996; Killham, K., 2002; Nannipieri, P. y cols., 2018; Sharma, N., & Sharma, S., 2022).

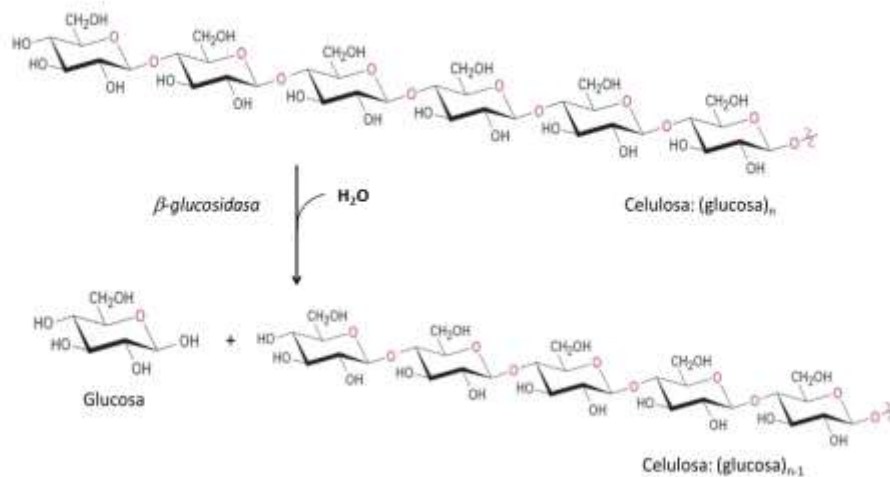
Como se mencionó anteriormente, las enzimas extracelulares se ven involucradas en los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno, fósforo y azufre principalmente, transformando moléculas complejas a otras más simples, permitiendo el



flujo de estos elementos esenciales (Sharma, N., & Sharma, S., 2022). En este seminario se estudiaron 5 enzimas que participan activamente de los ciclos del carbono, fósforo y azufre. A continuación, se describen sus principales características.

### 3.3.1 Enzimas $\beta$ -glucosidasa, celobiohidrolasa y lacasa

En el ciclo del carbono, las comunidades microbianas se encargan de descomponer la materia orgánica (ya sea de origen animal o vegetal) y la transforman a compuestos más simples (Sharma, N., & Sharma, S., 2022). Dentro de las enzimas extracelulares más comunes y abundantes en el suelo se destaca la  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21) que cataliza la hidrólisis de residuos terminales  $\beta$ -D-glucosídicos no reductores de sustratos derivados de la degradación de la celulosa, con la consiguiente liberación de D-glucosa (Tabatabai, M. A., 1994; Jaskulak, M., & Grobelak, A., 2020). En la figura 1 se muestra la reacción de hidrólisis de la celulosa catalizada por esta enzima.

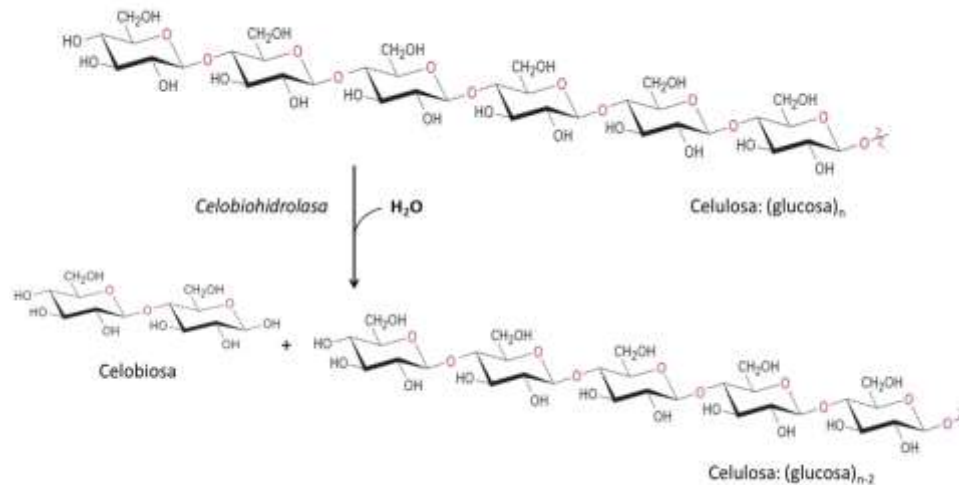


**Figura 1.** Representación de la reacción de hidrólisis de la celulosa catalizada por la enzima  $\beta$ -glucosidasa.

Los productos de su catálisis corresponden a importantes fuentes de carbono

para diferentes microorganismos en el suelo. Esta enzima es principalmente producida por bacterias y hongos y su presencia y actividad es utilizada como bioindicador de la calidad de los suelos (Jaskulak, M., & Grobelak, A., 2020). Se ha determinado que la actividad de esta enzima es altamente sensible a las variaciones de pH y que también se ve relacionada con el contenido hídrico del suelo y la materia orgánica (Eivazi y Tabatabai, 1990; Acosta-Martínez, V., & Tabatabai, M. A., 2000; Zhang, Y. y cols., 2011; Rahul, R. y cols., 2022). Los investigadores Eivazi y Tabatabai (2000) condujeron un estudio en suelos agrícolas de Estados Unidos y observaron que a medida que el contenido de materia orgánica disminuye, la actividad  $\beta$ -glucosidasa era menor. Un estudio similar se llevó a cabo en China por Zhang, Y. y cols. (2011), donde se estudió la correlación de esta enzima con el contenido hídrico, en este se determinó que, a mayor humedad del suelo, existía una mayor actividad enzimática, debido a una mejor difusión de los sustratos en el suelo.

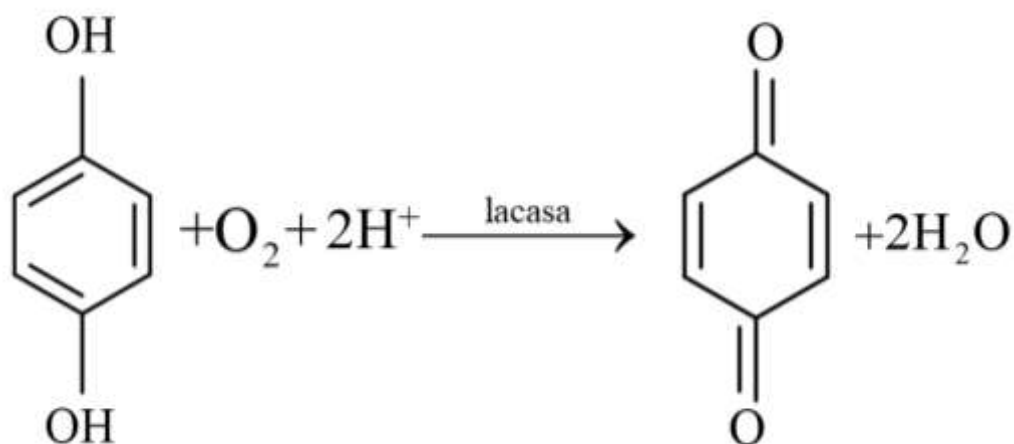
Otra enzima que participa activamente en el ciclo del carbono es la celobiohidrolasa, también denominada exocelulasa (EC 3.2.1.91). Esta enzima cataliza la hidrólisis de enlaces  $\beta$ -(1-4)-D-glucosídicos en la celulosa, liberando celobiosa de los extremos no reductores de las cadenas (Sinsabaugh, R. L. y cols., 2008; Zimmer, M., 2020). En la figura 2 se ve representada la reacción catalizada por esta enzima.



**Figura 2.** Representación de la reacción de hidrólisis de la celulosa catalizada por la enzima celobiohidrolasa.

Esta enzima es producida por muy pocos géneros de bacterias y también por hongos, principalmente de los grupos basidio y ascomicetes (Jaskulak, M., & Grobelak, A., 2020; Zimmer, M., 2020). Se ha descrito que esta enzima también se correlaciona de manera importante con el contenido hídrico del suelo, pero que no es extremadamente sensible a los cambios de pH (Sinsabaugh, R. L., 2008; Zhang, Y. y cols., 2011). Zhang y cols. (2011) determinaron que a medida que aumenta el contenido hídrico en el suelo, la actividad enzimática aumenta debido a un mejor movimiento de las enzimas y sustratos en este.

Otra enzima esencial en el ciclo del carbono corresponde a la lacasa (EC 1.10.3.2), la cual es miembro de la familia de las enzimas oxidoreductasas. Son enzimas con actividad fenoloxidasas, es decir, oxidan compuestos fenólicos usando el oxígeno como aceptor final de electrones para finalmente liberar dos moléculas de agua (Thurston, C. F., 1994; Sinsabaugh, R. L., 2008; Blánquez, A., 2015; Sharma, N., & Sharma, S., 2022). En la figura 3 se representa la reacción catalizada por esta enzima.



**Figura 3.** Representación de la reacción de oxidorreducción catalizada por la enzima lacasa.

Es una de las principales enzimas responsables de degradar lignina, la cual proviene de restos vegetales, siendo esta su principal sustrato natural que se encuentra en bosques (Kotroczó, Z. y cols., 2014; Jaskulak, M., & Grobelak, A., 2020; Janusz, G. y cols., 2020). Estas enzimas son secretadas principalmente por hongos y es considerada una de las respuestas más básicas de estos organismos frente a toxinas, metales y otros microorganismos (Baldrian P., 2006; Janusz, G. y cols., 2020; Sharma, N., & Sharma, S., 2022).

### **3.3.2 Enzima fosfatasa ácida**

El fósforo es un elemento esencial para la vida de diferentes organismos y puede ser encontrado en dos formas, orgánica e inorgánica. El movimiento del fósforo en el suelo depende principalmente de su mineralización y redistribución. Al menos un 50% de esta transformación lo llevan a cabo un grupo de enzimas denominadas fosfatasas (Jaskulak, M., & Grobelak, A., 2020; Sharma, N., & Sharma, S., 2022), es por esto que se cree que estas enzimas juegan un rol crucial en el ciclo del fósforo y por ende en el

ecosistema (Bakshi, M. & Varma, A., 2010; Jaskulak, M. & Grobelak, A., 2020; Rahul, R. y cols., 2022). La enzima fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2), también denominada fosfomonoesterasa ácida, es una de las enzimas más abundantes en el suelo y cataliza la hidrólisis de ésteres de fosfato, causando la liberación del grupo fosfato al medio; el principal sustrato natural de estas enzimas son compuestos orgánicos que contienen fósforo, provenientes de plantas y otros microorganismos, como pueden ser mononucleótidos y fosfatos unidos a carbohidratos, entre otros (Tabatabai, M. A., 1994; Acosta-Martínez V & Tabatabai M.A., 2011; Nannipieri, P. y cols., 2011). En la figura 4 se detalla la reacción catalizada por esta enzima.



**Figura 4.** Representación de la reacción de hidrólisis catalizada por la enzima fosfatasa ácida.

Estas enzimas provienen mayoritariamente de microorganismos como bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* y hongos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* (Nannipieri, P. y cols., 2011; Yokoyama, D. y cols., 2017; Jaskulak, M. & Grobelak, A., 2020); y en menor medida pueden originarse de células vegetales en la rizósfera (Nannipieri, P. y cols., 2011; Yokoyama, D. y cols., 2017; Sharma, N., & Sharma, S., 2022).

Como el nombre lo sugiere, la actividad de esta enzima depende altamente del pH del suelo, reportándose un intervalo de pH óptimo entre 4 y 6,5 (Niemi & Vepsäläinen, 2005). Otros factores que afectan directamente la actividad de esta enzima son el

contenido hídrico y de fósforo del suelo (Sinsabaugh, R. L., 2008; Zhang, Y. y cols., 2011). Esta enzima es considerada un buen indicador de la fertilidad de los suelos y se encuentra estrechamente relacionada con el correcto crecimiento de las plantas (Acosta-Martínez V & Tabatabai M.A., 2011; Jaskulak, M. & Grobelak, A., 2020; Sharma, N., & Sharma, S., 2022). Los estudios realizados por Acosta-Martínez V & Tabatabai M.A (2011) indican que una alta actividad de esta enzima está relacionada con una mayor fertilidad del suelo, esto debido principalmente a que estas enzimas son las encargadas de mantener el fósforo biodisponible en suelos.

### **3.3.3 Enzima arilsulfatasa**

El azufre corresponde a un nutriente esencial requerido tanto por microorganismos como por las plantas, y su destino en los suelos depende directamente de la actividad microbiana en estos (Sharma, N., & Sharma, S., 2022). La biodisponibilidad de este nutriente es regulada por la movilización o mineralización desde ésteres de sulfato aromáticos, donde su sustrato natural en bosques deriva de restos de plantas y otros microorganismos como pueden ser algunas biomoléculas (Tabatabai, M. A., 1994; Inamdar, A. y cols., 2022; Rahul, R. y cols., 2022). La enzima arilsulfatasa (EC 3.1.6.1) es una de las principales enzimas participando del ciclo del azufre, catalizando la hidrólisis de cualquier arilsulfato (Tabatabai, M. A., & J. M. Bremner., 1970; Tabatabai, M. A., 1994; Acosta-Martínez, V. & Tabatabai, M. A., 2000; Germida, J. J. y cols., 2021). En la figura 5 se representa la reacción catalizada por esta enzima.



**Figura 5.** Representación de la reacción de hidrólisis catalizada por la enzima arilsulfatasa.

La síntesis de esta enzima en suelos es inducida por comunidades microbianas en condiciones limitantes de azufre (Sharma, N., & Sharma, S., 2022) y entre los principales factores que afectan su actividad está el pH, la materia orgánica y la contaminación con metales pesados (Tabatabai, M. A., 1994; Acosta-Martínez, V. & Tabatabai M. A., 2000; Rahul, R. y cols., 2022; Sharma, N., & Sharma, S., 2022). Acosta-Martínez y Tabatabai (2000) junto con Rahul y cols (2022) plantean que la contaminación de suelos con metales pesados estaría afectando el pH de este, alterando así la actividad enzimática de la arilsulfatasa. También otros estudios de Tabatabai (1994) indicaron que a medida que el contenido de materia orgánica en suelo disminuye, la actividad de esta enzima es menor.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Caracterizar la diversidad funcional microbiana del suelo y su relación con las variables edáficas en bosques de *Nothofagus pumilio* ubicados a lo largo de un gradiente de precipitaciones.

### 4.2. Objetivos Específicos

1. Determinar parámetros edáficos de suelos de bosques de *N. pumilio* con diferente nivel de precipitación.
2. Determinar la diversidad funcional microbiana del suelo en bosques de *N. pumilio* con diferente nivel de precipitación.
3. Relacionar los parámetros edáficos y las funciones microbianas del suelo en bosques de *N. pumilio* ubicados a lo largo de un gradiente de precipitación.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Muestras de suelo:

Se trabajó con muestras de suelos de bosques adultos de *Nothofagus pumilio* de tres sitios ubicados a lo largo de un gradiente de precipitaciones. Estos sitios se clasificaron como húmedo (Lago Largo (LL): 1000 mm), mesobosque o bosque templado (Reserva Nacional Trapananda (RNT): 800 mm) y seco (Coyhaique Alto (CA): 600 mm) (Figura 6), como se describe en Soto y cols. (2021). En cada uno de los sitios se trazaron 4 parcelas y se tomaron de cada una tres muestras de suelo, las cuales posteriormente se mezclaron para obtener una muestra compuesta de suelo por cada parcela.



**Figura 6.** Mapa de la provincia de Coyhaique y área de estudio, junto con fotografías de cada uno de los sitios (Lago Largo, Reserva Nacional Trapananda y Coyhaique Alto) tomadas de Soto y cols. (2021).

### 5.2. Determinación de parámetros edáficos:

#### 5.2.1. pH, contenido de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ):

Se midió pH, contenido de nitrato y amonio de cada parcela mediante potenciometría siguiendo protocolos descritos por Sadzawka (2006) y Black, C. A. y cols (1982). Para cada una de las muestras de suelo se realizaron 3 réplicas técnicas, para luego obtener una medición promedio de cada parcela.

### **5.2.2. Contenido hídrico:**

Se determinó el contenido hídrico por gravimetría, siguiendo el protocolo descrito por Sadzawka (2006), para cada una de las parcelas estudiadas.

### **5.2.3. Porcentaje de materia orgánica y fósforo en suelo:**

El contenido de materia orgánica y de fósforo en el suelo se determinó por espectrofotometría, según los protocolos descritos por Sadzawka (2006). El primero consiste en la oxidación de una masa de suelo con dicromato de sodio en medio ácido. En nuestro caso, se utilizaron 0,2 g de muestra de suelo por reacción. La cuantificación se realizó utilizando una curva patrón de sacarosa. El fósforo fue determinado por el método de Olsen, variando entre 0,5 y 2,5 g de muestra. La cuantificación se realizó utilizando una curva patrón de fósforo preparada utilizando disoluciones estándar de 0 a 5 mg/L de fósforo, según se indica en el protocolo anteriormente mencionado.

### **5.3. Determinación de actividad enzimática:**

Se determinaron las actividades  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21), celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91), arilsulfatasa (EC 3.1.6.1) y fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2) mediante fluorimetría según describen Vepsäläinen y cols. (2001) y Marx y cols. (2001) con algunas modificaciones. Se extrajeron las enzimas a partir de 1 g de suelo en tampón acetato de sodio 50 mM pH 5,0. En una placa de 96 pocillos para fluorescencia, se mezclaron 160  $\mu$ L del extracto anterior con 40  $\mu$ L de cada sustrato (4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-celobiósido, 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucopiranosido, sulfato de 4-metilumbeliferilo y fosfato de 4-metilumbeliferilo) para una concentración final de 500  $\mu$ M de cada uno de ellos. La formación del producto, 4-metilumbeliferona (4-MUB), se registró cada 5 min en un

fluorímetro a 30°C durante 2 horas, donde la longitud de onda de excitación fue 346 nm y la longitud de onda de emisión 447 nm. Para cuantificar el producto de las reacciones se hizo una curva patrón utilizando 4-MUB (3,5-100  $\mu$ M) y se empleó el tampón acetato de sodio 50 mM pH 5,0 como blanco. Se realizaron mediciones por triplicado para cada muestra de suelo. Las actividades enzimáticas se expresaron como la concentración de 4-MUB obtenida (nM) por minuto por gramo de suelo seco (nM/min/g).

Se determinó la actividad lacasa (EC 1.10.3.2) mediante espectrofotometría según describen Bourbonnais y Paice (1990) y Štursová y Baldrian (2011), con algunas modificaciones. Se pesaron 0,5 g de suelo y se mezclaron con 20 mL de tampón acetato de sodio 50 mM pH 5,0 y 7 mM de ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). La reacción se agitó durante 1 hora a 150 rpm y 25°C, al finalizar el tiempo de incubación de la reacción, se filtró por gravedad. Posteriormente, se registró la oxidación del ABTS a 420 nm. La actividad lacasa se expresó como la concentración de ABTS oxidado ( $\mu$ M) por minuto por gramo de suelo seco ( $\mu$ M/min/g).

#### **5.4. Análisis estadístico:**

Se utilizó el programa "Graphpad Prism 6" para realizar el análisis estadístico, usando ANOVA de una vía y la prueba de Tukey para las comparaciones entre sitios. Las correlaciones entre las variables edáficas y las actividades enzimáticas se hicieron usando el procedimiento de Pearson y se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para determinar la influencia de las variables en los diferentes sitios junto con un test ANOSIM, usando el programa "Past4".

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Determinar parámetros edáficos de suelos de bosques de *N. pumilio* con diferente nivel de precipitación:

En la figura 7 se muestran los resultados de las determinaciones de los parámetros edáficos para los tres sitios de interés; Coyhaique Alto (CA), Reserva Nacional Trapananda (RNT) y Lago Largo (LL).

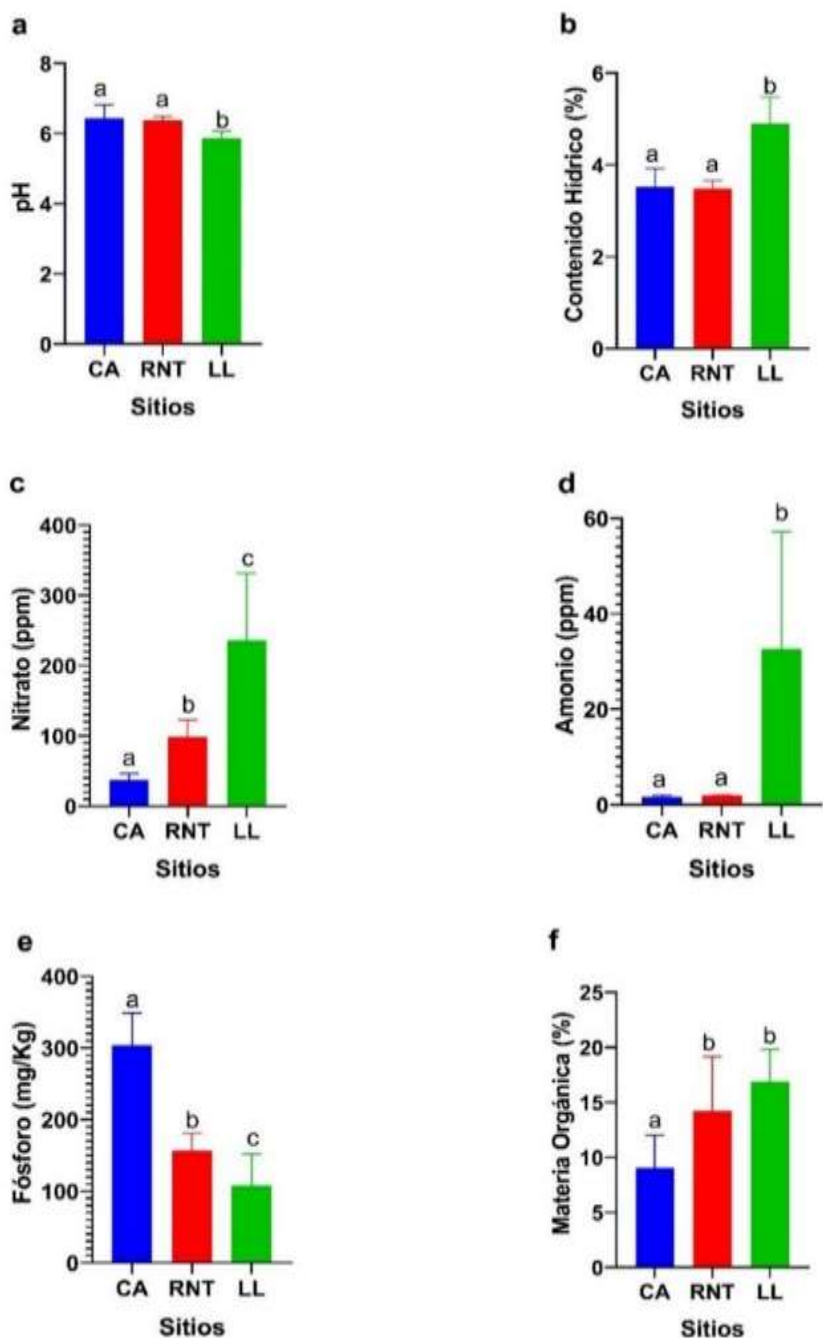
Con respecto al pH, se observó que el valor para LL es significativamente menor que para los sitios Coyhaique Alto y la Reserva Nacional Trapananda. Entre estos dos últimos no existen diferencias significativas, haciendo énfasis en que poseen un pH más básico (Figura 7.a)

El contenido hídrico, la concentración de nitrato y la de amonio en Lago Largo fueron significativamente mayores en comparación a los demás sitios (Figuras 7.b, c y d, respectivamente). Además, se observó que no hay diferencias estadísticas significativas en el contenido hídrico y la concentración de amonio de CA y RNT. A diferencia de esto, se encontró que el contenido de nitrato en suelo presentó diferencias estadísticas significativas en los tres sitios estudiados, destacando que en el sitio que presenta un menor nivel de precipitación (CA) presenta la menor concentración de nitrato, y el sitio que exhibe un mayor nivel de precipitación (LL) presenta una mayor concentración de éste (Figura 7.c). Finalmente, es notoria la diferencia en el contenido de amonio entre LL y los otros dos sitios de muestreo (figura 7.d).

La concentración de fósforo en suelo muestra un comportamiento contrario a lo observado con el nitrato. El sitio con un menor nivel de precipitación (CA) es el que exhibe una mayor concentración de fósforo en suelo (mg de fósforo por Kg de suelo), mientras que Lago Largo es el sitio que presenta la menor concentración de éste. Es

importante destacar que los tres sitios estudiados muestran diferencias estadísticas significativas con respecto a esta variable (Figura 7.e).

El sitio que presentó un menor porcentaje de materia orgánica corresponde al sitio con menor nivel de precipitación (CA) y los sitios Reserva Nacional Trapananda y Lago Largo exhibieron un mayor porcentaje de este parámetro, sin embargo, los valores de estos dos últimos no mostraron diferencias estadísticas significativas entre ellos (Figura 7.f).



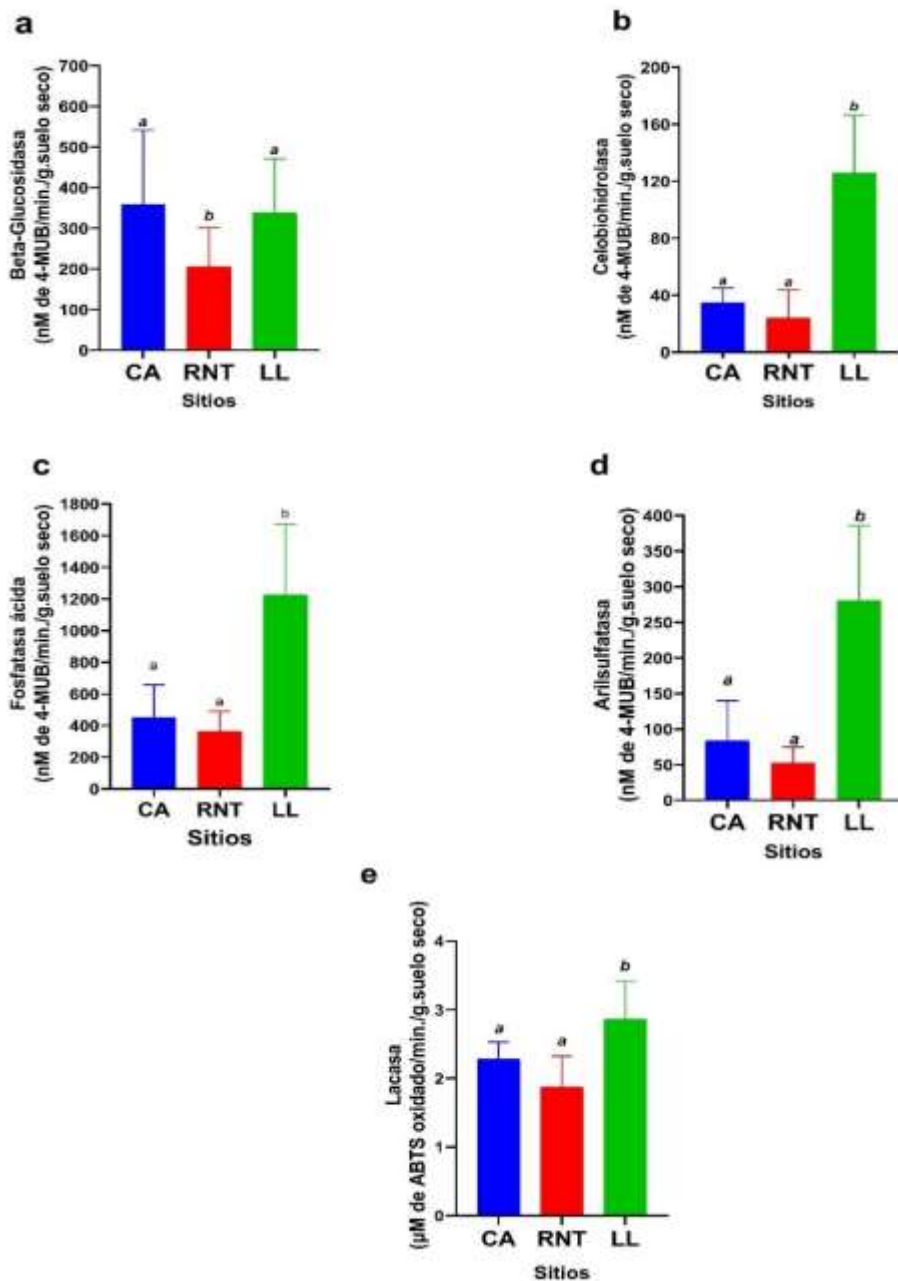
**Figura 7.** Parámetros edáficos, para cada uno de los bosques de *Nothofagus pumilio*; Coyhaique Alto (CA), Reserva Nacional Trapananda (RNT) y Lago Largo (LL). (a) pH. (b) Porcentaje de contenido hídrico en suelo. (c) Contenido de nitrato en suelo, reportado en partes por millón (ppm). (e) Fósforo en suelo, reportado en mg de fósforo por Kg de suelo fresco. (f) Porcentaje de materia orgánica en suelo. Se representan las medias de cuatro réplicas y la desviación estándar. Dentro de cada conjunto de datos se muestran letras, las cuales representan valores significativamente diferentes según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

## **6.2. Determinar la diversidad funcional microbiana del suelo en bosques de *N. pumilio* con diferente nivel de precipitación:**

Para determinar la diversidad funcional microbiana potencial en los suelos de los bosques estudiados, se midieron las actividades de cinco enzimas relacionadas a los ciclos biogeoquímicos en suelos. La actividad de las enzimas  $\beta$ -glucosidasa, celobiohidrolasa, fosfatasa ácida y arilsulfatasa se determinaron utilizando técnicas de fluorescencia y su actividad fue reportada como nM de 4MUB/min/g de suelo seco. La determinación de la actividad de la enzima lacasa se realizó por espectrofotometría y se reportó en  $\mu$ M de ABTS oxidado/min/g de suelo seco.

La actividad de la enzima  $\beta$ -Glucosidasa en Coyhaique Alto (CA) y Lago Largo (LL) es mayor que la registrada en Reserva Nacional Trapananda (RNT), siendo este último sitio el único que se diferencia significativamente (Figura 8.a).

Se observó también que cuatro de las cinco enzimas medidas (celobiohidrolasa, arilsulfatasa, fosfatasa ácida y lacasa) presentaron un comportamiento similar. El sitio que presenta un mayor nivel de precipitación (LL) mostró actividades enzimáticas significativamente mayores que los sitios CA y RNT. Entre estos últimos no se verificaron diferencias significativas en dichas actividades. (Figuras 8.b, c, d y e).



**Figura 8.** Cuantificación de actividad enzimática en cada uno de los sitios estudiados; Coyhaique Alto (CA), Reserva Nacional Trapananda (RNT) y Lago Largo (LL). (a) Actividad  $\beta$ -glucosidasa expresada como nM de 4-MUB/min./g de suelo seco. (b) Actividad celobiohidrolasa expresada como nM de 4-MUB/min./g de suelo seco. (c) Actividad fosfatasa ácida expresada como nM de 4-MUB/min./g de suelo seco. (d) Actividad arilsulfatasa expresada como nM de 4-MUB/min./g de suelo seco. (e) Actividad lacasa expresada como  $\mu$ M de ABTS oxidado/min./g de suelo seco. Se representan las medias de cuatro réplicas y la desviación estándar. Dentro de cada conjunto de datos se muestran letras, las cuales representan valores significativamente diferentes según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).



### **6.3. Relacionar los parámetros edáficos y las funciones microbianas del suelo en bosques de *N. pumilio* ubicados a lo largo de un gradiente de precipitación:**

Con el fin de relacionar los parámetros edáficos y las actividades enzimáticas de todas las muestras de suelo, se utilizó como herramienta bioestadística el coeficiente de correlación de Pearson. En la figura 9 se muestran los resultados de este análisis y los valores de los coeficientes de correlación se muestran en el Anexo.

En la figura 9.a se muestran los análisis de correlación de todos los sitios en conjunto, observándose una correlación positiva significativa entre los niveles de precipitación y las actividades celobiohidrolasa, fosfatasa ácida y arilsulfatasa. Todas las actividades enzimáticas se correlacionaron negativamente con el pH en el rango comprendido entre 5,54 y 6,81 en el cual se encuentran las muestras analizadas. Los mayores coeficientes de correlación se observaron para las enzimas celobiohidrolasa, fosfatasa ácida y arilsulfatasa, mostrando las dos últimas correlaciones estadísticamente significativas. Por otra parte, se observó una correlación positiva de todas las actividades enzimáticas con el contenido hídrico y de nitrato, obteniéndose, en general, para todas las enzimas, excepto para la  $\beta$ -glucosidasa, elevados coeficientes de correlación, la mayoría de ellos estadísticamente significativos.

Las correlaciones entre las actividades enzimáticas y el contenido de materia orgánica y de amonio exhiben un comportamiento similar, ya que todas excepto la  $\beta$ -glucosidasa, mostraron una relación positiva. Sin embargo, sólo las correlaciones entre las enzimas celobiohidrolasa, fosfatasa ácida y arilsulfatasa con el contenido de amonio fueron estadísticamente significativas. A diferencia de los demás parámetros edáficos, no se identificaron correlaciones significativas entre el contenido de materia orgánica de los sitios estudiados con ninguna actividad enzimática.

Finalmente, todas las actividades enzimáticas excepto la  $\beta$ -glucosidasa,

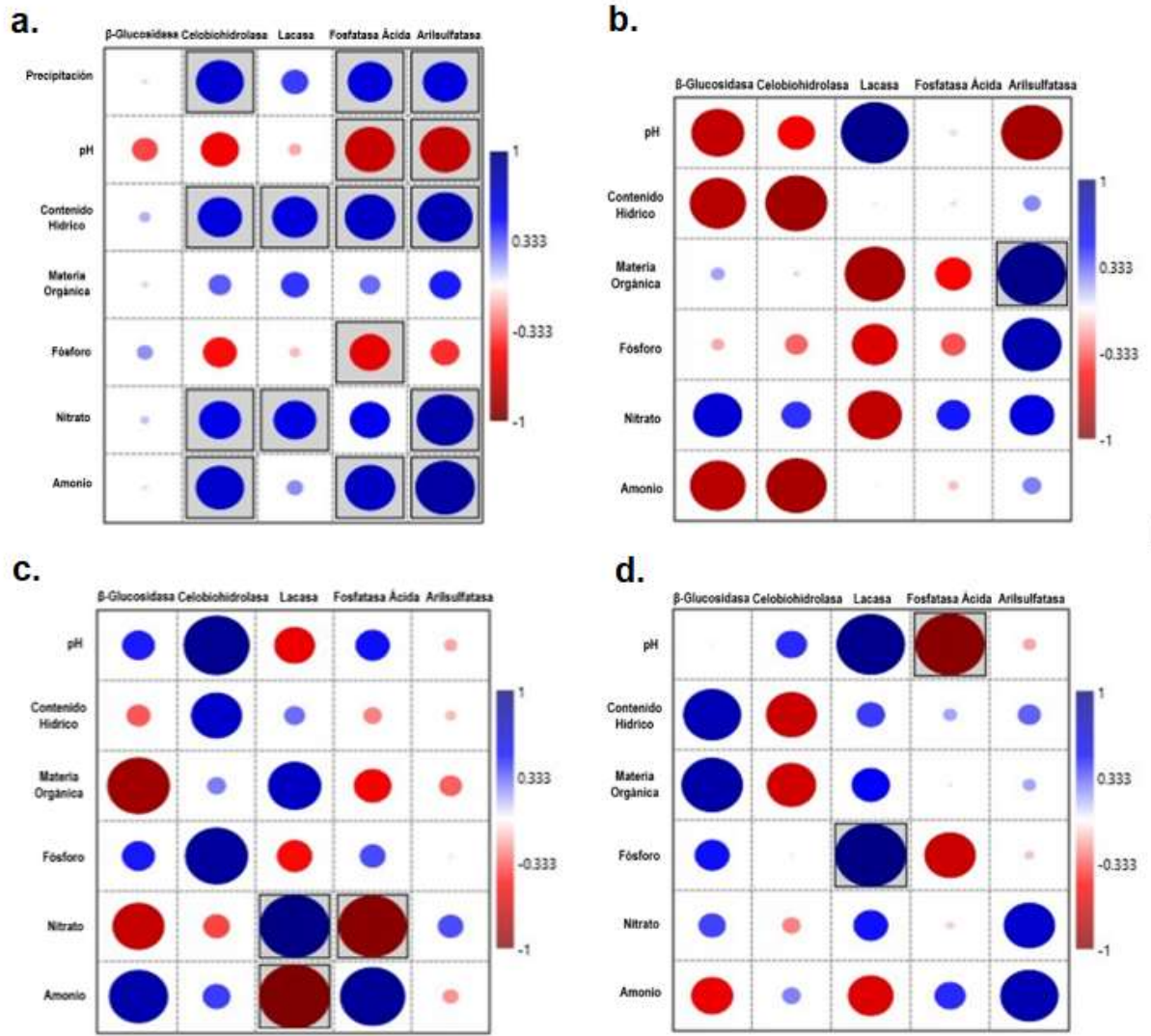
correlacionaron negativamente con el contenido de fósforo, siendo estadísticamente significativa esta relación solamente para la fosfatasa ácida. De acuerdo con el análisis realizado, se observó que, a diferencia de las demás enzimas, la actividad  $\beta$ -glucosidasa no presentó correlaciones significativas con ninguno de los parámetros edáficos estudiados.

Se realizaron también análisis de correlación de Pearson de manera individual para cada uno de los sitios de estudio con la finalidad de observar si las correlaciones entre las enzimas y los parámetros edáficos se comportaban de forma distinta al analizar los sitios por separado (Figuras 9.b, c y d).

De forma general, se pudieron observar varias diferencias entre el análisis conjunto y los análisis individuales. Una de las diferencias más relevantes es que para los tres sitios se observaron coeficientes de correlación altos entre la enzima  $\beta$ -glucosidasa y los distintos parámetros edáficos estudiados, a diferencia del análisis general, el cual no presenta coeficientes de correlación altos. Sucede lo mismo para la materia orgánica, donde en el análisis conjunto no presenta correlaciones significativas con ninguna de las enzimas estudiadas, pero que, al analizar de manera individual cada sitio, se observan coeficientes de correlación altos entre este parámetro edáfico y la actividad de las enzimas; es importante destacar que en el sitio CA se pudo observar una correlación significativa positiva entre este y la enzima arilsulfatasa.

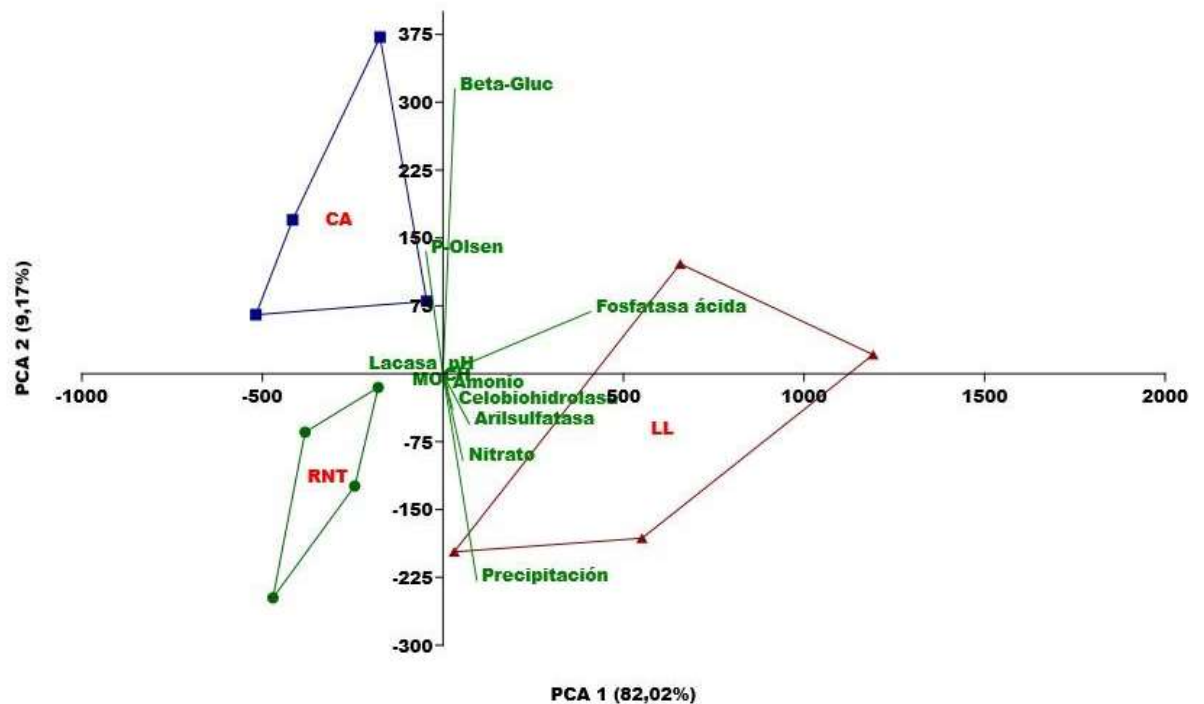
En general, para los tres sitios se observaron correlaciones significativas, algunas distintas a las observadas en la figura 9.a, dando cuenta de variaciones internas relacionadas probablemente con la heterogeneidad inherente de las muestras de suelo. Para el sitio CA, la única correlación significativa es la mencionada anteriormente, mientras que RNT fue el sitio que presentó un mayor número de correlaciones significativas; la enzima lacasa se correlacionó de forma significativa con el amonio y

nitrato, mientras que la enzima fosfatasa presentó correlaciones significativas solamente con el nitrato; la única correlación que corresponde con el análisis conjunto es entre la lacasa y el nitrato. Finalmente, en LL se observaron dos correlaciones estadísticamente significativas; entre la enzima fosfatasa ácida y el pH y entre el contenido de fósforo y la lacasa. Es importante destacar que solo una de estas correlaciones se corresponde con lo observado en la figura 9.a, siendo esta la correlación entre el pH y la fosfatasa ácida.



**Figura 9.** Gráficos de correlación de Pearson. En ellos se comparan los parámetros edáficos (eje vertical) con las actividades enzimáticas (eje horizontal). El diámetro de los círculos representados indica el valor del coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ); el color azul de estos indica una correlación positiva y el color rojo una correlación negativa. Los círculos encerrados en cuadrados de color gris indican correlaciones estadísticamente significativas entre los datos comparados ( $P \leq 0,05$ ). (a) Gráfico de correlación de Pearson para el conjunto de los tres sitios estudiados (CA, RNT y LL). (b) Gráfico de correlación de Pearson para CA. (c) Gráfico de correlación de Pearson para RNT. (d) Gráfico de correlación de Pearson para LL.

Finalmente se realizó un análisis de componentes principales para determinar el efecto de todas las variables analizadas en el agrupamiento de las muestras. En la figura 10 es posible apreciar que los tres sitios estudiados se separan, siendo las variables precipitación y actividad  $\beta$ -glucosidasa las que más influyen en la separación de las muestras a lo largo del eje PCA2; mientras que la actividad fosfatasa es la que explica la separación a lo largo del eje PCA1.



**Figura 10.** Análisis de componentes principales de los tres sitios de estudio. Los cuadrados de color azul representan las cuatro muestras compuestas del sitio Coyhaique Alto (CA), en verde los círculos representando las muestras compuestas del sitio Reserva Nacional Trapananda (RNT) y en rojo los triángulos representando las muestras compuestas del sitio Lago Largo (LL).

Se aplicó el test estadístico ANOSIM de una vía, obteniéndose un valor de p de 0,0002, el cual indicó que los tres sitios (CA, RNT y LL) presentaban diferencias estadísticas significativas.

## 7. DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

Al comparar los resultados obtenidos con la literatura, es posible establecer una relación entre los parámetros edáficos medidos y la caracterización de suelos de los bosques de *Nothofagus pumilio*. El Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) realizó un estudio el año 2014 (Hepp K., Christian y Stolpe B., Neal, 2014), en el cual se caracterizó el suelo en la región de Aysén. En él se realizaron mediciones entre la costa (Puerto Aysén y Puerto Cisnes) hasta la frontera con Argentina, zona en la cual se encuentran los bosques estudiados en este seminario.

El sitio de Lago Largo se encuentra en los sectores más húmedos y cercanos a Puerto Aysén; este fue clasificado como suelos de origen volcánico, específicamente del tipo “Andisols”, los cuales se caracterizan por poseer alto contenido de materia orgánica y una alta capacidad de retención de agua (Nanzyo, M., Shoji, S., & Dahlgren, R., 1993; Hepp K., Christian y Stolpe B., Neal, 2014; Soto y cols., 2021). También se ha descrito que los suelos de origen volcánico presentan una baja disponibilidad de fósforo y muchas veces un pH ácido (Borie, F., & Rubio, R., 2003). Esto se corresponde con los resultados obtenidos donde el sitio LL presenta un alto contenido de materia orgánica y alto contenido hídrico, como también un menor contenido de fósforo y un pH más ácido. En contraste con esto, el sitio de estudio Coyhaique Alto se encuentra próximo a la frontera con Argentina, clasificándose como suelo “Xerolls”, este se identifica como zonas con menos lluvia y más secas, las cuales siguen el régimen de humedad de suelos xéricos (casi completamente secos en verano, y con mayor humedad en invierno) (Fenton, T., 1983; Hepp K., Christian y Stolpe B., Neal, 2014; Soto y cols., 2021). Esto se ve representado también en los resultados obtenidos, en el cual se observa que el sitio de CA presenta menor contenido hídrico.

En este seminario se estudiaron tres sitios bajo un régimen de

precipitación diferente. Con respecto a esto, se ha descrito en la literatura que en los sitios que presentan un mayor nivel de precipitación y por consecuencia un mayor contenido hídrico en suelo, exhiben un aumento en la actividad de enzimas hidrolasas, como lo son celobiohidrolasa,  $\beta$ -glucosidasa, arilsulfatasa y fosfatasa ácida; esto puede deberse al aumento en la difusión de las enzimas y de sus sustratos (Zhang, Y. y cols., 2011; Zhou, X. y cols., 2013). Además, el agua es uno de los sustratos para estas enzimas, por lo que como es de esperar su variación en los suelos afecta directamente la actividad de este tipo de enzimas (Tabatabai, M. A., 1994). Es posible distinguir esto en resultados obtenidos, donde LL es el sitio que presenta una mayor actividad enzimática de fosfatasa ácida, arilsulfatasa y celobiohidrolasa, siendo este sitio el que presenta un mayor nivel de precipitación. También se registraron correlaciones significativas entre las enzimas anteriormente mencionadas y el contenido hídrico en suelo.

Según los resultados obtenidos, las enzimas arilsulfatasa y fosfatasa ácida fueron las que presentaron correlaciones significativas con el pH; como se ha descrito reiteradamente, el pH es uno de los factores determinantes para la actividad enzimática (Tabatabai, M. A., 1994). Se encontró también que pequeños cambios en el pH generan grandes cambios en la actividad arilsulfatasa, siendo el rango de pH en la cual se registra la máxima actividad de 5,5 a 6,2 (Tabatabai, M. A., and J. M. Bremner., 1970; Chen, H., 2019; Germida, J. J., Wainwright, M., & Gupta, V. V., 2021). Niemi y Vepsäläinen, (2005) y Turner, B. L. (2010) indicaron que la enzima fosfatasa ácida en suelos actúa en un rango de pH que va de 4 a 6 y, según el estudio realizado por Herbien, S. A., y Neal, J. L. (1990) determinaron que a medida que el pH aumenta, la actividad fosfatasa disminuye; en este mismo estudio se observó que al medir la actividad de esta enzima a un pH mayor (entre 6,5 y 7) su actividad era 2 veces menor,

confirmando lo anteriormente mencionado. Esto se puede apreciar en los resultados obtenidos, donde existe una correlación significativa negativa entre el pH y las enzimas arilsulfatasa y fosfatasa ácida. Es importante también destacar que el pH promedio medido en los tres sitios (CA 6,42, RNT 6,37 y LL 5,86) se encuentra en un rango cercano al rango de pH óptimo de estas dos enzimas, donde el sitio que posee un pH más ácido es el que presenta una mayor actividad fosfatasa ácida. Por otro lado, se ha descrito que la celobiohidrolasa está débilmente relacionada con el pH del suelo, por lo que su actividad se ve menos afectada frente a la variación de este parámetro edáfico (Sinsabaugh, R. L., 2008). Esto se ve reflejado en los resultados obtenidos, donde no existen correlaciones significativas entre esta enzima y el pH.

Se observó también, que las enzimas celobiohidrolasa, lacasa y arilsulfatasa están correlacionadas significativamente con el contenido de nitrato del suelo. Se ha registrado que la actividad de las enzimas microbianas de adquisición de carbono y fósforo, como lo son celobiohidrolasa,  $\beta$ -glucosidasa y fosfatasa ácida, aumenta a medida que el contenido de nitrógeno en suelo se incrementa (Zhou, X., 2013; Ullah y cols., 2019). Los estudios realizados por Ullah y cols. (2019) indicaron que el aumento de nitrógeno en suelos conlleva a una disminución del pH, teniendo como consecuencia un incremento en la unión de grupos fosfato a minerales presentes en él. La quelación del fósforo produce una disminución del fosfato biodisponible, estimulando así la producción de enzimas de adquisición de fósforo para suplir esta. Además, hay estudios que indican que, a medida que los niveles de precipitación aumentan, los niveles relativos de disponibilidad de nitrógeno en suelos incrementan también (Sinsabaugh, R. L., 2008) correspondiéndose con los resultados obtenidos, donde los niveles de nitrato y amonio en suelo son mayores en LL y menores en CA. Así mismo, Tabatabai, M. A. (1994) observó que la enzima arilsulfatasa está correlacionada con el contenido



de materia orgánica en suelo, donde una disminución de este reduce su actividad; esto se aprecia en los resultados obtenidos, donde en CA existe una correlación significativa entre estos.

Con respecto al fósforo en suelo, la única enzima que presentó una correlación significativa con este parámetro fue la fosfatasa ácida. Se ha estudiado que, en ecosistemas terrestres, existe una relación inversa entre la actividad de esta enzima y la disponibilidad relativa de fósforo en suelo, siendo este un fenómeno común (Sinsabaugh, R. L., 2008). Es posible especular que esta relación observada puede deberse a que esta enzima responde a déficit de fósforo inorgánico en suelo, por lo que, para producir fosfato biodisponible los organismos liberan esta enzima al ambiente dependiendo de su necesidad (Speir, T.W., Cowling, J.C., 1991; Nannipieri, P. y cols., 2011; Sinsabaugh, R. L., & Follstad Shah, J. J., 2012). Junto con esto, Nannipieri P. y cols. (2011) también plantea que se ha estudiado que el fosfato inorgánico inhibe la actividad de esta enzima en suelos, por lo que suelos con un mayor contenido de fosfato inorgánico debiesen presentar una menor actividad fosfatasa. Esto puede apreciarse en los resultados obtenidos, donde los sitios que poseían una mayor actividad fosfatasa presentaban un menor contenido de fósforo.

Con respecto a la capacidad metabólica, los tres sitios estudiados exhibieron el mismo potencial metabólico, pero en diferentes niveles. En base a esto, el sitio que presenta un mayor potencial metabólico es Lago Largo.

Como se mencionó anteriormente, un segundo aspecto que aborda la diversidad funcional microbiana de los suelos corresponde a la composición de los diferentes microorganismos que participan de los gremios solubilizadores y descomponedores de los nutrientes estudiados (Fósforo, P, Azufre, S y Carbono, C).

En el año 2017, Lladó S. y colaboradores realizaron una revisión en la cual se

caracterizaron los principales filos y géneros de bacterias que forman parte de los gremios participantes de los ciclos biogeoquímicos del C y P en suelos de bosques del hemisferio norte. Ellos encontraron que como parte del gremio descomponedor de C, se encuentran esencialmente dos tipos de bacterias, unas celulolíticas y otras lignolíticas. Como parte de la primera se hallan principalmente *Actinobacterias* (géneros como *Cellulomonas* y *Arthrobacter*), *Acidobacterias*, *Bacteroidetes* (géneros como *Mucilaginibacter* y *Pedobacter*) y *Proteobacterias* (*Luteibacter*). Por otro lado, formando parte de las bacterias degradadoras de lignina estarían participando bacterias del filo *Proteobacteria* (géneros como *Sphingomonas*, *Burkholderia* y *Pseudomonas*) y *Actinobacteria* (géneros como *Mycobacterium* y *Streptomyces*), siendo las bacterias del género *Burkholderia* las posibles productoras de la enzima lacasa en suelos de bosques (Štursová, M. y cols., 2012; Lladó S. y cols., 2017).

Como parte de este seminario no se realizaron análisis para determinar la composición de los gremios en los suelos, pero si existe un análisis preliminar de la composición de bacterias en dos de los sitios estudiados, CA y LL (datos no publicados). En ellos fue posible dilucidar que el filo más abundante en ambos corresponde a *Proteobacteria*, seguido de *Actinobacteria*, *Acidobacteria* y *Bacteroidetes*. En este análisis se encontraron géneros de estos filos, los cuales podrían ser parte del gremio descomponedor de C en los suelos estudiados. Entre ellos están *Cellulomonas* y *Arthrobacter* (*Actinobacteria*) y *Mucilaginibacter* y *Pedobacter* (*Bacteroidetes*), siendo estas las principales bacterias productoras de enzimas celulolíticas (como la  $\beta$ -glucosidasa y la celobiohidrolasa). Por otro lado, el género *Burkholderia* estaría participando de la síntesis de lacasa como bacteria lignolítica. Tanto el género *Arthrobacter* como *Mucilaginibacter* y *Pedobacter* fueron identificadas en ambos sitios estudiados, a diferencia de *Cellulomonas* que solo fue encontrado en

el sitio de CA. Esto último podría explicar la similitud del nivel de actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en ambos sitios, ya que estarían presentando diferentes géneros de bacterias contribuyendo de la degradación de la celulosa.

Además, también se han descrito en menor medida filos de bacterias las cuales podrían estar formando parte del gremio solubilizador de P en los suelos, entre ellas están *Actinobacteria*, *Acidobacteria* y *Proteobacteria* (*Alphaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*) (Lladó S. y cols., 2017). Los filos *Actino* y *Acidobacteria* están presentes en ambos sitios (CA y LL) (datos no publicados), dilucidando la presencia del potencial metabólico del P en estos, destacando que el filo *Acidobacteria* tiene una abundancia relativa significativamente mayor en LL, lo que podría relacionarse con la mayor actividad fosfatasa ácida en este sitio.

Finalmente, se han descrito diferentes bacterias que participan del gremio solubilizador de S, entre ellas están *Actinobacteria*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Raoultella* (Inamdar, A., 2022). En el análisis preliminar, están presentes tanto *Actinobacteria* como *Pseudomonas* (datos no publicados) lo que podría relacionarse con la presencia de la actividad arilsulfatasa en ambos sitios.

Continuando con la discusión, los ciclos biogeoquímicos en los que las enzimas microbianas se ven involucradas corresponden a un proceso complejo en el cual participan en cada paso un gran número de estas, es por esto que la interpretación de estas actividades es solamente una mirada a lo que sucede realmente en el ambiente y en estos ciclos (Nannipieri, P. y cols., 2018).

Es importante destacar que, según algunos autores, la actividad enzimática en suelos no proviene únicamente de los microorganismos activos en el momento de la toma de muestras, sino que también se corresponde a enzimas que se encuentran estabilizadas en la matriz del suelo (Nannipieri, P. y cols., 2018). Estos dos tipos de

actividades enzimáticas, en conjunto estarían dando cuenta del potencial metabólico del suelo en el momento en que fueron tomadas las muestras. Tomando en consideración este punto en nuestro trabajo presentamos el potencial metabólico del suelo de los bosques de *Nothofagus pumilio* ubicados en tres sitios con diferente nivel de precipitaciones.

Existen varios estudios que indican que es posible interpretar la calidad del suelo a partir de la caracterización de la diversidad funcional microbiana en estos, esto es debido a que tanto la estructura de las comunidades microbianas como su biodiversidad son potenciales indicadores de cómo funciona y se sostiene el ecosistema en el que se ven envueltos, ya que son sensibles y responden rápida y directamente a los cambios ambientales (Fierer y cols., 2003; de Armas-Ricard y cols., 2016; Baldrian, 2017; Schloter, M. y cols., 2018; Zheng y cols., 2019). Algunas de estas actividades enzimáticas pueden ser utilizadas como marcadores capaces de responder frente a distintas perturbaciones en él, como lo es el estrés ambiental (Arshad y Martin, 2002; Bünemann y cols., 2018). Esta aproximación también puede ser utilizada para evaluar la calidad del suelo en terrenos agrícolas, los cuales son relevantes para la economía regional.

Se ha descrito que la enzima lacasa es capaz de catalizar la degradación de compuestos contaminantes, como lo son los antibióticos y otros desechos industriales (Arregui, L. y cols., 2019) y que su secreción suele estar asociada a la respuesta de microorganismos frente a condiciones antagónicas (Janusz, G. y cols., 2020). Su potencial como biorremediador de aguas podría ser de gran interés, considerando que la industria salmonera es partícipe de la contaminación de masas de agua en el país, sobre todo por la utilización de una gran cantidad de antibióticos y otros compuestos.

## 8. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se pudo apreciar que tanto el nivel de precipitación como los parámetros edáficos tienen influencia en la diversidad funcional microbiana de los bosques de *Nothofagus pumilio* estudiados.

Los tres sitios de estudio presentaron diferencias significativas entre sí. Se observó que existe una correlación entre el nivel de precipitación y las actividades enzimáticas en el suelo, donde el sitio con mayor nivel de precipitación mostró una mayor actividad. Se identificaron también correlaciones significativas entre varios parámetros edáficos y las distintas actividades enzimáticas para los tres sitios de estudio, destacando el contenido hídrico, donde los sitios con mayor contenido de este presentaban mayores actividades en la mayoría de los casos.

Además, fue posible demostrar a partir de los resultados obtenidos que los tres sitios estudiados presentan diferencias significativas entre sí en función del potencial metabólico, los parámetros edáficos y el nivel de precipitación.

Finalmente, se observó para los tres sitios de estudio la misma funcionalidad (mismo potencial metabólico), pero en diferentes niveles; destacando el sitio de Lago Largo el cual exhibió un mayor nivel en comparación a los demás.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- **Acosta-Martínez, V., & Tabatabai, M. A. (2000).** Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils*, 31(1), 85–91. <https://doi.org/10.1007/s003740050628>
- **Acosta-Martínez, V., Tabatabai, M. A., & Dick, R. P. (2011).** *Phosphorus Cycle Enzymes. Methods of Soil Enzymology. SSSA Book Series*, 161–183. <https://doi.org/10.2136/sssabookser9.c8>
- **Almendras K., Leiva D., Carú M. and Orlando J. (2019).** Carbon Consumption Patterns of Microbial Communities Associated with Peltigera Lichens from a Chilean Temperate Forest. *Molecules* 2018, 23, 2746. <https://doi.org/10.3390/molecules23112746>
- **Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., Herrera de los Santos, M., Levin, L., Rojo-Domínguez, A., Romero-Martínez, D., Saparrat, M. C., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2019).** Laccases: Structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial Cell Factories*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0>
- **Arshad, M. A., & Martin, S. (2002).** Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 88(2), 153–160. [https://doi.org/10.1016/s0167-8809\(01\)00252-3](https://doi.org/10.1016/s0167-8809(01)00252-3)
- **Arteaga-Garibay, R. I. (2018).** Diversidad metabólica funcional de comunidades microbianas asociadas a suelo rizosférico de maíz (zea mays l.) Razas amarillo-zamorano y jala. *Agro Productividad*, 9(8). <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/807>
- **Bakshi, M., & Varma, A. (2010).** Soil enzyme: The state-of-art. *Soil Enzymology*, 1–23. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-14225-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-14225-3_1)
- **Baldrian, P. (2006).** Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(2), 215–242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>
- **Baldrian, P. (2017).** Forest microbiome: Diversity, complexity and Dynamics. *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw040>
- **Black, C. A., Evans, D. D., & Dinauer, R. C. (1965).** *Methods of soil analysis. part 2: Chemical and microbiological properties (2nd ed.)*. American Society of Agronomy.
- **Blánquez, A. (2015).** Caracterización y función biológica de la lacasa producida por *Streptomyces ipomoea* CECT 3341. Aprovechamiento de su potencial oxidativo para la degradación de contaminantes ambientales (Tesis), 6-14.
- **Borie, F., & Rubio, R. (2003).** Total and organic phosphorus in Chilean volcanic soils. *Gayana. Botánica*, 60(1). <https://doi.org/10.4067/s0717-66432003000100011>
- **Bourbonnais, R., & Paice, M. G. (1990).** Oxidation of non-phenolic substrates.

- FEBS Letters, 267(1), 99–102. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80298-w](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80298-w)
- **Bünemann, E. K., Bongiorno, G., Bai, Z., Creamer, R. E., De Deyn, G., de Goede, R., Fleskens, L., Geissen, V., Kuyper, T. W., Mäder, P., Pulleman, M., Sukkel, W., van Groenigen, J. W., & Brussaard, L. (2018).** Soil Quality – A Critical Review. *Soil Biology and Biochemistry*, 120, 105–125. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.01.030>
  - **Chen, H., Liu, J., Li, D., Xiao, K., & Wang, K. (2019).** Controls on soil arylsulfatase activity at a regional scale. *European Journal of Soil Biology*, 90, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2018.11.001>
  - **de Armas-Ricard, M., Orlando, J., Bustamante, R., & Carú, M. (2016).** Microbial communities of bulk and *Eschscholzia californica* rhizosphere soils at two altitudes in central Chile. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. <https://doi.org/10.4067/s0718-95162016005000001>
  - **Eivazi, F., & Tabatabai, M. A. (1990).** Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 22(7), 891–897. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(90\)90126-k](https://doi.org/10.1016/0038-0717(90)90126-k)
  - **Escalas, A., Hale, L., Voordeckers, J. W., Yang, Y., Firestone, M. K., Alvarez-Cohen, L., & Zhou, J. (2019).** Microbial functional diversity: From concepts to applications. *Ecology and Evolution*, 9(20), 12000–12016. <https://doi.org/10.1002/ece3.5670>
  - **Fenton, T. E. (1983).** Chapter 4 mollisols. *Developments in Soil Science*, 125–163. [https://doi.org/10.1016/s0166-2481\(08\)70615-9](https://doi.org/10.1016/s0166-2481(08)70615-9)
  - **Fierer, N., Schimel, J. P., & Holden, P. A. (2003).** Influence of drying-rewetting frequency on soil bacterial community structure. *Microbial Ecology*, 45(1), 63–71. <https://doi.org/10.1007/s00248-002-1007-2>
  - **Germida, J. J., Wainwright, M., & Gupta, V. V. (2021).** Biochemistry of sulfur cycling in soil. *Soil Biochemistry*, 1–53. <https://doi.org/10.1201/9781003210207-1>
  - **Hepp K., Christian & Stolpe B., Neal (2014).** *Caracterización y propiedades de los suelos de la Patagonia Occidental (Aysén)*. Coyhaique, Chile: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 298, 70-75.
  - **Herbien, S. A., & Neal, J. L. (1990).** Soil pH and phosphatase activity. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 21(5-6), 439–456. <https://doi.org/10.1080/00103629009368244>
  - **Inamdar, A., Sangawe, V., & Adhapure, N. (2022).** Enzymes in Rhizosphere Engineering. *Rhizosphere Engineering*, 259–272. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-89973-4.00009-0>
  - **Jansson, J. K., & Hofmockel, K. S. (2019).** Soil Microbiomes and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, 18(1), 35–46. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0265-7>
  - **Janusz, G., Pawlik, A., Świdorska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkolazka, A., & Paszczyński, A. (2020).** Laccase properties, physiological

functions, and evolution. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 966. <https://doi.org/10.3390/ijms21030966>

- **Jaskulak, M., & Grobelak, A. (2020).** Soil Enzymes in a changing climate. *Climate Change and Soil Interactions*, 731–749. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818032-7.00025-4>
- **Killham, K., & Staddon, W. (2002).** Bioindicators and sensors of Soil Health and the application of geostatistics. *Enzymes in the Environment*. <https://doi.org/10.1201/9780203904039.ch15>
- **Kotroczó, Z., Veres, Z., Fekete, I., Krakomperger, Z., Tóth, J. A., Lajtha, K., & Tóthmérész, B. (2014).** Soil enzyme activity in response to long-term organic matter manipulation. *Soil Biology and Biochemistry*, 70, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.12.028>
- **Lladó, S., López-Mondéjar, R., & Baldrian, P. (2017).** Forest soil bacteria: Diversity, involvement in ecosystem processes, and response to global change. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(2). <https://doi.org/10.1128/mnbr.00063-16>
- **Loewe Muñoz, V., López L., C., Pineda Bravo, G., y cols (1998).** Monografía de lenga *Nothofagus pumilio*. Santiago, Chile: CONAF : INFOR : FIA.
- **Marín C., Valenzuela E., Godoy R., Palfner G. (2018).** Diversity and growth-effects of ectomycorrhizal fungi of a *Nothofagus pumilio* forest in the Andes of Southern Chile. *Bol. Micol.* 33(1):9-20. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2018.33.1.1164>
- **Marx, M.-C., Wood, M., & Jarvis, S. C. (2001).** A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(12-13), 1633–1640. [https://doi.org/10.1016/s0038-0717\(01\)00079-7](https://doi.org/10.1016/s0038-0717(01)00079-7)
- **Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., & Renella, G. (2011).** Role of phosphatase enzymes in soil. *Soil Biology*, 215–243. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9_9)
- **Nannipieri, P., Trasar-Cepeda, C., & Dick, R. P. (2018).** Soil enzyme activity: A brief history and biochemistry as a basis for appropriate interpretations and meta-analysis. *Biology and Fertility of Soils*, 54(1), 11–19. <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1245-6>
- **Nanzyo, M., Shoji, S., & Dahlgren, R. (1993).** Chapter 7 physical characteristics of volcanic ash soils. *Developments in Soil Science*, 189–207. [https://doi.org/10.1016/s0166-2481\(08\)70268-x](https://doi.org/10.1016/s0166-2481(08)70268-x)
- **Niemi, R. M., & Vepsäläinen, M. (2005).** Stability of the fluorogenic enzyme substrates and ph optima of enzyme activities in different Finnish soils. *Journal of Microbiological Methods*, 60(2), 195–205. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.09.010>
- **Rahul, R., Sharma, P., Singh, A., Singh, J., & Kumar, M. (2022).** Soil enzymes and their role in Soil Health Improvement. *Advances in Agricultural and Industrial Microbiology*, 39–61. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-8918-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-16-8918-5_3)



- **Sadzawka R., A.; Carrasco R., M.A.; Grez Z., R.; Mora G., M.d.I.L.; Flores P., H. & Neaman, A. (2006).** Métodos de análisis recomendados para los suelos de Chile. Revisión 2006; Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Serie Actas INIA no.N° 34: Santiago, 2006.
- **Salinas, S., Riquelme Espergue, F., Acuña Aroca, B., Uribe, M. y col. (2019).** Crecimiento de renovales de Lengua (*Nothofagus pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser) en el sur austral de Chile. *Ciencia e Investigación Forestal*, 25 (3).
- **Sánchez-Ramírez, J., Martínez-Hernández, J. L., Segura-Ceniceros, E. P., Contreras-Esquivel, J. C., Medina-Morales, M. A., Aguilar, C. N. & Iliná, A. (2014).** Immobilization of lignocellulolytic enzymes in magnetic nanoparticles. *Química Nova*, 37(3). <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140085>
- **Schlöter, M., Nannipieri, P., Sørensen, S. J., & van Elsas, J. D. (2018).** Microbial Indicators for Soil Quality. *Biology and Fertility of Soils*, 54(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1248-3>
- **Sharma, N., & Sharma, S. (2022).** Soil enzymes and their role in nutrient cycling. *Structure and Functions of Pedosphere*, 173–188. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-8770-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-16-8770-9_8)
- **Sinsabaugh, R. L., & Follstad Shah, J. J. (2012).** Ecoenzymatic stoichiometry and ecological theory. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43(1), 313–343. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-071112-124414>
- **Sinsabaugh, R. L., Lauber, C. L., Weintraub, M. N., Ahmed, B., Allison, S. D., Crenshaw, C., ... Zeglin, L. H. (2008).** Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology Letters*, 11(11), 1252–1264. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01245.x>
- **Soto Aguirre, D. A., Gysling Caselli, A. J., Kahler González, C., Álvarez González, V., Poblete, P., Pardo, V., Bañados, M., Carlos, J., Baeza Rocha, D., Ávila Campos, A. R. y col. (2020).** Anuario Forestal 2020, Chilean statistical yearbook of forestry 2020. Boletín N°174. Disponible en: <https://wef.infor.cl/publicaciones/anuario/2020/Anuario2020.pdf>
- **Soto, D. P., Donoso, P. J., Zamorano-Elgueta, C., Ríos, A. I., & Promis, Á. (2021).** Precipitation declines influence the understory patterns in *Nothofagus pumilio* old-growth forests in northwestern Patagonia. *Forest Ecology and Management*, 491, 119169. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119169>
- **Speir, T. W., & Cowling, J. C. (1991).** Phosphatase activities of pasture plants and soils: Relationship with plant productivity and soil p fertility indices. *Biology and Fertility of Soils*, 12(3), 189–194. <https://doi.org/10.1007/bf00337200>
- **Štursová, M., & Baldrian, P. (2010).** Effects of soil properties and management on the activity of soil organic matter transforming enzymes and the quantification of soil-bound and free activity. *Plant and Soil*, 338(1-2), 99–110. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0296-3>
- **Štursová, M., Žifčáková, L., Leigh, M. B., Burgess, R., & Baldrian, P. (2012).** Cellulose utilization in forest litter and soil: Identification of bacterial and fungal

decomposers. *FEMS Microbiology Ecology*, 80(3), 735–746.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01343.x>

- **Tabatabai, M. A. (1994).** Soil enzymes. *Methods of soil analysis: Part 2 Microbiological and biochemical properties*, 5, 775–833.
- **Tabatabai, M. A., & Bremner, J. M. (1970).** Arylsulfatase activity of Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 34(2), 225–229.  
<https://doi.org/10.2136/sssaj1970.03615995003400020016x>
- **Thurston, C. F. (1994).** The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140(1), 19–26. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-1-19>
- **Turner, B. L. (2010).** Variation in pH optima of hydrolytic enzyme activities in tropical rain forest soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(19), 6485–6493. <https://doi.org/10.1128/aem.00560-10>
- **Ullah, S., Ai, C., Huang, S., Zhang, J., Jia, L., Ma, J., Zhou, W., & He, P. (2019).** The responses of extracellular enzyme activities and microbial community composition under nitrogen addition in an upland soil. *PLOS ONE*, 14(9).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223026>
- **Vepsäläinen, M., Kukkonen, S., Vestberg, M., Sirviö, H., & Niemi, R. M. (2001).** Erratum to “application of a soil enzyme activity test kit in a field experiment.” *Soil Biology and Biochemistry*, 34(3), 421.  
[https://doi.org/10.1016/s0038-0717\(01\)00200-0](https://doi.org/10.1016/s0038-0717(01)00200-0)
- **Xian, Y., Wang, M., & Chen, W. (2015).** Quantitative assessment on soil enzyme activities of heavy metal contaminated soils with various soil properties. *Chemosphere*, 139, 604–608.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.060>
- **Yakovchenko, V., Sikora, L. J., & Kaufman, D. D. (1996).** A biologically based indicator of soil quality. *Biology and Fertility of Soils*, 21(4), 245–251.  
<https://doi.org/10.1007/bf00334899>
- **Yarwood, S. A. (2018).** The role of wetland microorganisms in plant-litter decomposition and Soil Organic Matter Formation: A Critical Review. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(11). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy175>
- **Yokoyama, D., Imai, N., & Kitayama, K. (2017).** Effects of nitrogen and phosphorus fertilization on the activities of four different classes of fine-root and soil phosphatases in Bornean tropical rain forests. *Plant and Soil*, 416(1-2), 463–476. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3225-x>
- **Zhang, Y., Chen, L., Wu, Z., & Sun, C. (2011).** Kinetic parameters of soil  $\beta$ -glucosidase response to environmental temperature and moisture regimes. *Revista Brasileira De Ciência Do Solo*, 35(4), 1285–1291.  
<https://doi.org/10.1590/s0100-06832011000400022>
- **Zheng, Q., Hu, Y., Zhang, S., Noll, L., Böckle, T., Dietrich, M., Herbold, C. W., Eichorst, S. A., Woebken, D., Richter, A., & Wanek, W. (2019).** Soil multifunctionality is affected by the soil environment and by Microbial Community Composition and diversity. *Soil Biology and Biochemistry*, 136, 107521.

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107521>

- **Zhou, X., Chen, C., Wang, Y., Xu, Z., Han, H., Li, L., & Wan, S. (2013).** Warming and increased precipitation have differential effects on soil extracellular enzyme activities in a temperate grassland. *Science of The Total Environment*, 444, 552–558. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.023>
- **Zimmer, M. (2020).** Cellulases. *Methods to Study Litter Decomposition*, 397–403. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-30515-4\\_42](https://doi.org/10.1007/978-3-030-30515-4_42)

## 10. ANEXO

### 10.1. Coefficientes de correlación de Pearson

**Tabla I.** Valores de los coeficientes de correlación de Pearson para el análisis de los tres sitios en conjunto.

	Coeficiente de correlación de Pearson				
	$\beta$ -Glucosidasa	Celobiohidrolasa	Lacasa	Fosfatasa ácida	Arilsulfatasa
pH	-0.363	-0.54322	-0.17111	-0.7179**	-0.72964**
CH	0.15229	0.63418*	0.65435*	0.72975*	0.7923**
MO	-0.087838	0.31977	0.39837	0.29134	0.44928
P-Olsen	0.21844	-0.47929	-0.13917	-0.58001*	-0.40829
Nitrato	0.11592	0.60051*	0.61287*	0.57582	0.82077**
Amonio	-0.074489	0.69558*	0.22595	0.72838**	0.86147***

**Tabla II.** Valores de los coeficientes de correlación de Pearson para el sitio Coyhaique Alto.

	Coeficiente de correlación de Pearson (CA)				
	$\beta$ -Glucosidasa	Celobiohidrolasa	Lacasa	Fosfatasa ácida	Arilsulfatasa
pH	-0.73084	-0.50997	0.94321	-0.081232	-0.85159
CH	-0.77876	-0.85936	0.041549	-0.070258	0.2296
MO	0.1799	0.072425	-0.83673	-0.49553	0.95*
P-Olsen	-0.16737	-0.30258	-0.62949	-0.33561	0.81972
Nitrato	0.67244	0.4047	-0.74212	0.45565	0.61556
Amonio	-0.77042	-0.83959	0.026685	-0.12467	0.24699

**Tabla III.** Valores de los coeficientes de correlación de Pearson para el sitio Reserva Nacional Trapananda.

	Coeficiente de correlación de Pearson (RNT)				
	$\beta$ -Glucosidasa	Celobiohidrolasa	Lacasa	Fosfatasa ácida	Arilsulfatasa
pH	0.44706	0.9228	-0.56015	0.47079	-0.17406
CH	-0.32727	0.70679	0.28279	-0.24615	-0.13283
MO	-0.87439	0.25298	0.73934	-0.51357	-0.30884
P-Olsen	0.45104	0.87842	-0.48473	0.35317	-0.047078
Nitrato	-0.7223	-0.36161	0.97913*	-0.95847*	0.34824
Amonio	0.8237	0.37897	-0.99787**	0.90994	-0.20927

**Tabla IV.** Valores de los coeficientes de correlación de Pearson para el sitio Lago Largo.

	Coeficiente de correlación de Pearson (LL)				
	$\beta$ -Glucosidasa	Celobiohidrolasa	Lacasa	Fosfatasa ácida	Arilsulfatasa
pH	0.027565	0.41687	0.94196	-0.95354*	-0.17076
CH	0.79342	-0.69534	0.3819	0.17763	0.30624
MO	0.84213	-0.67328	0.51628	0.048529	0.17384
P-Olsen	0.47227	-0.042069	0.98081*	-0.70235	-0.11514
Nitrato	0.3669	-0.24057	0.46804	-0.098292	0.70125
Amonio	-0.56824	0.2446	-0.62085	0.41769	0.79814