



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE CIENCIAS AMBIENTALES Y BIOTECNOLOGÍA

“Determinación de parámetros edáficos en sustratos de líquenes *Peltigera* y de suelos aledaños en praderas del Sur de Chile”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Química Ambiental.

FRANCISCA MARÍA HIGUERAS FREDES

Directora de Tesis: Dra. Julieta Orlando

Co-Directora de Tesis: Dra. Katerin Almendras Neira

Co-Directora de Tesis: M. Cs. Mitza González Rojas

Enero 2023
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

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

FRANCISCA MARÍA HIGUERAS FREDES

“Determinación de parámetros edáficos en sustratos de líquenes *Peltigera* y de suelos aledaños en praderas del Sur de Chile”

Ha sido aprobado por la comisión de Evaluación, en cumplimiento Parcial de los requisitos para optar al título de Química Ambiental.

Directora de Seminario de Título
Dra. Julieta Orlando

Co-Directora de Seminario de Título:
Dra. Katerin Almendras Neira

Co-Directora de Seminario de Título:
M. Cs. Mitza González Rojas

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Marcia Cazanga S.
Presidenta Comisión

Dr. Carlos Manzano D.
Evaluador

Santiago de Chile,



Francisca María Higuera Fredes

Nacida en Santiago, desde pequeña me vi motivada por aprender sobre el cuidado del medio ambiente y la naturaleza. Principios de Reducir, Reciclar o Reutilizar se aplicaron siempre en mi hogar, como herencia de mis abuelas. La química fue una decisión definitiva, ya que a esta ciencia le entrego mi corazón y mi sueño. Desde mi enseñanza media, en el Liceo 1 de niñas, supe que química ambiental era la carrera para mí. La ciencia puede ser intensa, seguramente hay caminos más simples de seguir, pero a final de cuentas cada segundo invertido en aprender me hace sentir que esta ha sido una etapa hermosa en mi hasta ahora joven vida, y pienso que, aunque era aún pequeña, he tomado la decisión correcta. Ahora veo pasar los años y me siento satisfecha, aunque ha sido un final de etapa pandémico y alargado, siento que en este tiempo he podido hacer muchas otras cosas que no me hubiese imaginado en un principio, cuando recién entraba ilusionada a estudiar. Estos años de pandemia me vieron llorar partidas, celebrar llegadas, esperar reencuentros; me hicieron dudar para creer en mí con más fuerza, y me hicieron crecer. Hoy puedo decir que he pasado por varios lugares increíbles durante mi estudio, y que quiero ser una profesional de metas claras y convicciones fuertes.

“Que nada nos limite.
Que nada nos defina.
Que nada nos sujete.
Que la libertad sea nuestra propia sustancia”
-SIMONE DE BEAUVOIR-

Este trabajo está dedicado a la Tierra (Pachamama), a quien juré proteger y cuidar, por la cual no bajaré los brazos, y de donde me seguiré impregnando de salud y conocimiento.

AGRADECIMIENTOS

Quiero partir estos agradecimientos pensando en todas las personas que han sido maestras y maestros para mí, mucho más allá del punto de vista académico. Gracias a mis padres, mi hermana y hermanos, mis abuelos; por su amor, su apoyo y ayuda. Agradezco a mis amigas y amigos, profesores, y a todas las personas con quienes pude compartir esta etapa. Quiero agradecer a las primeras personas que confiaron en mis capacidades, y me abrieron las puertas del laboratorio cuando aún me sentía como una niña, curiosa e idealista. Gracias por alentarme a tomar desafíos. Gracias a mis compañeras de mesón en esos tiempos de laboratorio. Quisiera agradecer a los profesores de la U de Aysén, quienes confiaron en mí al cerrar la licenciatura. Gracias también a la pandemia que me presentó muchos desafíos. Agradezco a las personas del diplomado Fungi, a todas y todos quienes fueron parte. Agradezco ahora especialmente a quienes en mi presente me apoyan y ayudan, a quienes confiaron en mí. Todos los caminos recorridos me permitieron llegar a hacer este trabajo de título en un lugar maravilloso, donde me siento feliz, acompañada, desafiada, comprometida y valorada. Gracias a mi profesora guía, directora en este trabajo, la Profesora Julieta Orlando, y también gracias infinitas a mis co-directoras Katerin Almendras y Mitza González, por ayudarme siempre que lo he necesitado, por responder todas mis dudas y por entregar mucho para sacar este trabajo adelante. Gracias a todas por enseñarme con paciencia, y también por estar para perder la paciencia cuando lo ameritaba. Gracias a mis compañeros de laboratorio por su motivación. Gracias especiales a Juanita, por toda su ayuda. Gracias a quienes no he nombrado aquí, pero que fueron parte de este proyecto, con su ayuda para trabajar las muestras, con su compañía y conversaciones. Gracias a la comisión que revisa este

trabajo, y a toda la ayuda entregada por Marisol, nuestra secretaria de carrera, en este proceso. Gracias al financiamiento del proyecto FONDECYT 1181510 para poder realizar este trabajo.

ÍNDICE DE MATERIAS

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Líquenes.....	1
1.2.	Influencia de los líquenes en los ciclos biogeoquímicos	2
1.2.1.	Ciclo del carbono.....	2
1.2.2.	Ciclo del nitrógeno.....	3
1.2.3.	Ciclo del fósforo.....	5
1.3.	Influencia de los líquenes en la formación de suelo	6
1.4.	Cianolíquenes <i>Peltigera</i>	8
1.5.	Determinación de parámetros edáficos	9
1.6.	Objetivo General.....	11
1.7.	Objetivos Específicos	11
II.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1.	Muestreo	12
2.1.1.	Sitios de estudio	12
2.1.2.	Procesamiento de las muestras	13
2.2.	Optimización de las determinaciones analíticas considerando la masa mínima de muestra a utilizar.....	13
2.2.1.	Optimización de pH, amonio y nitrato	14
2.2.2.	Optimización de carbono orgánico	14
2.2.3.	Optimización de fósforo Olsen.....	15
2.3.	Determinación de parámetros edáficos en los sustratos liquénicos y suelos aledaños	15
2.3.1.	Determinación del contenido hídrico.....	15
2.3.2.	Determinación de pH.....	15
2.3.3.	Determinación de carbono orgánico	16
2.3.4.	Determinación de amonio.....	16
2.3.5.	Determinación de nitrato	17
2.3.6.	Determinación de fósforo Olsen	17
2.4.	Análisis estadísticos	18
2.4.1.	Verificación de los supuestos de ANOVA.....	18
2.4.2.	Prueba estadística.....	18
2.4.3.	Análisis multivariados	18
III.	RESULTADOS	19
3.1.	Optimización de las determinaciones analíticas considerando la masa mínima de muestra a utilizar.....	19
3.1.1.	Optimización de pH, amonio y nitrato	19
3.1.2.	Optimización de carbono orgánico	21
3.1.3.	Optimización de fósforo Olsen.....	22
3.2.	Determinación de parámetros edáficos en sustratos liquénicos y suelos aledaños	23
3.2.1.	Determinación del contenido hídrico.....	24
3.2.2.	Determinación de pH.....	25
3.2.3.	Determinación de carbono orgánico	27
3.2.4.	Determinación de amonio.....	29
3.2.5.	Determinación de nitrato	30

3.2.6..Determinación de fósforo Olsen	32
3.3. Análisis multivariados	34
IV. DISCUSIÓN.....	36
4.1. Optimización de las determinaciones analíticas considerando la masa mínima de muestra a utilizar.....	36
4.1.1..Optimización de pH, amonio y nitrato	36
4.1.2..Optimización de carbono orgánico	38
4.1.3..Optimización de fósforo Olsen.....	39
4.2. Determinación de parámetros edáficos en sustratos liquénicos y suelos aledaños	41
4.2.1..Determinación del contenido hídrico.....	42
4.2.2..Determinación de pH.....	43
4.2.3..Determinación de carbono orgánico	45
4.2.4..Determinación de amonio y nitrato	46
4.2.5..Determinación de fósforo Olsen	48
4.3. Factores que influyen sobre las propiedades fisicoquímicas de los sustratos liquénicos.....	50
4.4. Proyecciones.....	52
V. CONCLUSIONES	53
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	54
VII. ANEXO.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de los sitios de muestreo.....	13
Figura 2. Optimización de la determinación de pH en función de la masa de suelo en una relación suelo solución 1:2,5.....	20
Figura 3. Optimización de la determinación de pH en función de la relación suelo solución con una masa de suelo de 0,5 g.....	21
Figura 4. Optimización de la determinación de Carbono orgánico en función de la masa de suelo.....	22
Figura 5. Optimización de la determinación de fósforo Olsen en función de la masa de suelo.....	23
Figura 6. Porcentaje de contenido hídrico en los sustratos de <i>P. antarctica</i> (S-ant), los sustratos de <i>P. rufescens</i> (S-ruf) y los suelos aledaños, para cada sitio de estudio....	24
Figura 7. Porcentaje de contenido hídrico en los sustratos de <i>P. antarctica</i> (S-ant), los sustratos de <i>P. rufescens</i> (S-ruf) y los suelos aledaños, comparando los cuatro sitios de estudio.....	25
Figura 8. pH en los sustratos de <i>P. antarctica</i> (S-ant), los sustratos de <i>P. rufescens</i> (S-ruf) y los suelos aledaños, para cada sitio de estudio.....	26
Figura 9. pH en los sustratos de <i>P. antarctica</i> (S-ant), los sustratos de <i>P. rufescens</i> (S-ruf) y los suelos aledaños, comparando los cuatro sitios de estudio.....	27
Figura 10. Carbono orgánico (%) en los sustratos de <i>P. antarctica</i> (S-ant), los sustratos de <i>P. rufescens</i> (S-ruf) y los suelos aledaños, para cada sitio de estudio.....	28
Figura 11. Carbono orgánico (%) en los sustratos de <i>P. antarctica</i> (S-ant), los sustratos de <i>P. rufescens</i> (S-ruf) y los suelos aledaños, comparando los cuatro sitios de estudio.....	28
Figura 12. Amonio en los sustratos de <i>P. antarctica</i> (S-ant), los sustratos de <i>P. rufescens</i> (S-ruf) y los suelos aledaños, para cada sitio de estudio.....	29
Figura 13. Amonio en los sustratos de <i>P. antarctica</i> (S-ant), los sustratos de <i>P. rufescens</i> (S-ruf) y los suelos aledaños, comparando los cuatro sitios de estudio.....	30
Figura 14. Nitrato en los sustratos de <i>P. antarctica</i> (S-ant), los sustratos de <i>P. rufescens</i> (S-ruf) y los suelos aledaños, para cada sitio de estudio.....	31
Figura 15. Nitrato en los sustratos de <i>P. antarctica</i> (S-ant), los sustratos de <i>P. rufescens</i> (S-ruf) y los suelos aledaños, comparando los cuatro sitios de estudio.....	32
Figura 16. Fósforo biodisponible (P-Olsen) en los sustratos de <i>P. antarctica</i> (S-ant), los sustratos de <i>P. rufescens</i> (S-ruf) y los suelos aledaños, para cada sitio de estudio....	33
Figura 17. Fósforo biodisponible (P-Olsen) en los sustratos de <i>P. antarctica</i> (S-ant), los sustratos de <i>P. rufescens</i> (S-ruf) y los suelos aledaños, comparando los cuatro sitios de estudio.....	33

Figura 18. Análisis de componentes principales (PCA) de las determinaciones de los parámetros edáficos en los sustratos de <i>P. antarctica</i> , los sustratos de <i>P. rufescens</i> y los suelos aledaños, para cada sitio de estudio.	34
Figura 19. Análisis de componentes principales (PCA) de las determinaciones de los parámetros edáficos en los sustratos de <i>P. antarctica</i> y <i>P. rufescens</i> en los cuatro sitios de estudio	35

FIGURAS ANEXO

Figura Anexo 1. Curva de calibración para la determinación de carbono orgánico....	62
Figura Anexo 2. Curva de calibración para la determinación de amonio.	62
Figura Anexo 3. Curva de calibración para la determinación de nitrato.	63
Figura Anexo 4. Curva de calibración para la determinación de fósforo Olsen.	63

TABLAS ANEXO

Tabla Anexo 1. Georreferencia de las muestras de sustratos liquénicos y suelos aledaños utilizadas en este estudio	64
Tabla Anexo 2. Diferencias significativas (p ajustado $< 0,05$) según PERMANOVA y comparaciones pareadas adonis	66

ABREVIATURAS

°C	grados Celsius
µg	microgramo
ADN	ácido desoxirribonucleico
ANOVA	analysis of variance (análisis de la varianza)
C	carbono
cm	centímetro
CH	contenido hídrico
CO	carbono orgánico
COY	Reserva Nacional Coyhaique
CV	coeficiente de variación
e.g.	exempli gratia (dado como ejemplo)
g	gramo
h	hora
i.e.	id est (esto es)
ISE	ion-selective electrode (electrodo selectivo de iones)
ISA	ionic strength adjuster (ajustador de fuerza iónica)
KAR	Parque Natural Karukinka
LC	límite de cuantificación
m	metro
mg	miligramos
mL	mililitro
mm	milímetro
MO	materia orgánica
NAV	Isla Navarino
N	nitrógeno
NH₄⁺ -N	nitrógeno en forma de amonio
NO₃⁻ -N	nitrógeno en forma de nitrato
P	fósforo
PCA	principal components analysis (análisis de componentes principales)
PERMANOVA	permutational multivariate analysis of variance (análisis de varianza multivariado permutacional)
ppm	partes por millón
S-ant	Sustrato de <i>Peltigera antarctica</i>
S-ruf	Sustrato de <i>Peltigera rufescens</i>
TAM	Parque Nacional Patagonia, sector Tamango

RESUMEN

Los líquenes son organismos conformados por la asociación entre un hongo, uno o dos compañeros fotosintéticos y un diverso microbioma. Pueden tener diferentes formas de crecimiento y crecer sobre diversos sustratos, incluidos suelos, rocas y plantas. Dominan hábitats pobres en nutrientes y juegan un rol vital en los ecosistemas, ya que contribuyen a la formación del suelo a través diferentes mecanismos de meteorización física y química, y además contribuyen a la descomposición de la materia orgánica mediante la liberación de enzimas. Diversos estudios asociados a líquenes *Peltigera*, los cuales son abundantes en el sur de Chile y crecen principalmente sobre suelo, han demostrado que las comunidades bacterianas asociadas a los talos son diferentes dependiendo de la especie de micobionte. También se ha reportado que las comunidades bacterianas presentes en los sustratos liquénicos son diferentes a las presentes en suelos aledaños sin influencia del líquen. Se ha propuesto que los líquenes estarían modulando las comunidades bacterianas asociadas mediante la exudación de diversos metabolitos secundarios y, por lo tanto, modificando las condiciones del ambiente. Sin embargo, no existen estudios sobre las propiedades edáficas de estos sustratos liquénicos y suelos aledaños que puedan explicar estos resultados. Las determinaciones de los parámetros edáficos en sustratos liquénicos se ven limitadas por la baja cantidad de muestra que se logra obtener y por las altas masas de suelo que se suelen ocupar en los protocolos estandarizados. Por lo tanto, se hace necesario llevar a cabo optimizaciones de las determinaciones buscando minimizar la masa de muestra a utilizar sin perder la representatividad de los resultados. El objetivo de este Seminario de Título fue la caracterización edáfica de sustratos de líquenes *Peltigera* y suelos aledaños sin influencia del líquen, en ambientes de praderas de cuatro localidades del sur de Chile.

Las optimizaciones de las metodologías requirieron extensos tiempos de trabajo, pero se logró disminuir considerablemente la masa de suelo utilizada en todas las determinaciones sin superar los valores de coeficiente de variación aceptados. Todas las muestras fueron levemente ácidas y contuvieron altos niveles de carbono orgánico, nitrógeno mineral y fósforo biodisponible. Sin embargo, en los sustratos se encontraron mayores niveles de nutrientes que en los suelos. Estas diferencias sugieren que los líquenes estarían alterando las propiedades edáficas de los suelos que habitan, aunque no se encontraron diferencias según la especie. Debido a esto, es probable que los líquenes estén modulando las comunidades microbianas asociadas mediante otros procesos de interacción química entre los simbiosomas todavía desconocidos. Por otro lado, los sitios de la Región de Magallanes presentaron mayores contenidos de nutrientes comparados con los de la Región de Aysén, por lo que el sitio sería un factor determinante de las características fisicoquímicas de los sustratos liquénicos. Estos resultados son el primer reporte de la caracterización fisicoquímica de sustratos de líquenes *Peltigera* y de suelos aledaños del sur de Chile.

ABSTRACT

Lichens are organisms formed by the association between a fungus, one or two photosynthetic partners, and a diverse microbiome. They have different forms of growth and can grow on various substrates, including soil, rocks, and plants. They dominate nutrient-poor habitats and play a vital role in ecosystems, since they contribute to soil formation through different physical and chemical weathering mechanisms, and also contribute to the decomposition of organic matter through the release of enzymes. Diverse studies of *Peltigera* lichens, which are abundant in southern Chile and grow mainly on soil, have shown that the bacterial communities associated with thallus are different depending on the mycobiont species. It has also been reported that the bacterial communities present in lichen substrates are different from those present in surrounding soils without lichen influence. It has been proposed that lichens would be modulating the associated bacterial communities through the exudation of various secondary metabolites and, therefore, modifying the environmental conditions. However, there are no studies on the edaphic properties of these lichen substrates and surrounding soils that can explain these results. The determinations of the edaphic parameters in lichen substrates are limited by the low amount of sample that can be obtained and by the high masses of soil that are usually occupied in standardized protocols. Therefore, it is necessary to carry out optimizations of the determinations to minimize the sample mass to be used without losing the representativeness of the results. The objective of this Seminar of Title was the edaphic characterization of *Peltigera* lichen substrates and surrounding soils without lichen influence, in grassland environments of four locations in southern Chile. The optimizations of the methodologies required extensive work times, but it was possible to considerably reduce the soil mass used in all the determinations

without exceeding the accepted variation values. All samples were slightly acidic and contained high levels of organic carbon, mineral nitrogen, and bioavailable phosphorus. However, higher levels of nutrients were found in the substrates than in the soils. These differences suggest that the lichens would be altering the edaphic properties of the soils they inhabit, although no differences were found according to the species. Because of this, it is likely that lichens are modulating associated microbial communities through other yet unknown processes of chemical interaction between symbionts. On the other hand, the sites of the Magallanes Region presented higher nutrient contents compared to those of the Aysén Region, thus the site would be a determining factor of the physicochemical characteristics of the lichen substrates. These results are the first report on the physicochemical characterization of *Peltigera* lichen substrates and surrounding soils in southern Chile.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Líquenes

Los líquenes son comúnmente definidos como una asociación simbiótica entre un hongo (micobionte) y un compañero fotosintético (fotobionte), ya sea un alga verde, una cianobacteria, o ambas (Nash, 2008). Sin embargo, debido a la reciente evidencia de que los líquenes albergan una gran diversidad de microorganismos, se ha propuesto que la definición de los líquenes debería tener en cuenta también a esta gama de organismos asociados (Aschenbrenner y col., 2016). En esta simbiosis mutualista, el micobionte provee refugio y minerales a sus compañeros, mientras que el fotobionte suministra carbono (C) orgánico por medio de la fotosíntesis y nitrógeno (N) por medio de la fijación biológica de N en caso de ser una cianobacteria (Nash, 2008). También se le ha atribuido al microbioma múltiples funciones que estaría llevando a cabo dentro de la simbiosis, incluyendo el suministro de nutrientes, hormonas y vitaminas, la degradación de partes viejas del talo y la resistencia contra factores de estrés biótico y abiótico (Grube y col., 2015).

La estructura conjunta formada por esta simbiosis, conocida como talo liquénico, es única y una de las estructuras vegetativas más complejas de todo el reino fúngico (Aschenbrenner y col., 2016). La amplia variedad de estructuras del talo liquénico, que están determinadas principalmente por el micobionte, se puede clasificar principalmente en tres tipos de formas de crecimiento: crustoso, folioso y fruticoso. Los líquenes crustosos se caracterizan por estar fuertemente adheridos al sustrato en su superficie inferior y no se pueden separar del sustrato sin destruirlos. Los líquenes foliosos tienen forma de hoja, son planos y solo están parcialmente adheridos al sustrato. Los líquenes fruticosos tienen formas arbustivas y los lóbulos pueden ser planos o cilíndricos, siempre sobresalen de la superficie del sustrato. Los líquenes pueden crecer en la superficie de

una gran variedad de sustratos, incluidos suelos, rocas y plantas, incluso en varias superficies de materiales artificiales (Nash, 2008).

1.2. Influencia de los líquenes en los ciclos biogeoquímicos

Los líquenes crecen en la mayoría de los ecosistemas, dominando aproximadamente el 8% de la superficie terrestre. A menudo dominan hábitats pobres en nutrientes, secos o fríos, y ecosistemas de gran altitud y latitud. Es por esto por lo que juegan un rol vital en los ecosistemas, ya que contribuyen a la fijación atmosférica del C y N, y además a la solubilización de fósforo (P) desde el suelo (Liba y col., 2006, Grube y col, 2015).

1.2.1. Ciclo del carbono

El C orgánico del suelo se considera el indicador primario de salud del suelo ya que regula procesos físicos, químicos y biológicos (Cambardella, 2005). Si bien se puede encontrar de forma inorgánica (como dióxido de carbono o metano), se presenta mayoritariamente en forma orgánica, ya sea como compuestos de bajo peso molecular (ácido cítrico, glucónico, entre otros), pasando por carbohidratos hasta formas polimerizadas (Sparks, 2003; Carter & Gregorich, 2007; Horwath, 2015). El flujo global de C en los sistemas terrestres está determinado por las tasas relativas de fotosíntesis (captación de C) frente a la respiración autótrofa y heterótrofa como consecuencia de la descomposición y otros procesos microbianos que liberan C (Horwath, 2015).

Los líquenes contribuyen significativamente en los flujos de C en los sistemas terrestres. En promedio, aproximadamente del 40 al 50 % de la masa seca de un líquen consiste en C que se fija casi exclusivamente por la fotosíntesis del fotobionte (Nash, 2008). El C fijado por fotosíntesis es transportado como carbohidrato al hongo, el cual es metabolizado como parte, por ejemplo, de la biosíntesis de metabolitos secundarios del líquen. El tipo de carbohidrato suministrado al hongo está determinado por el fotobionte:

en los líquenes que contienen cianobacterias, el carbohidrato liberado y transferido al hongo es la glucosa; mientras que en los líquenes que contienen algas verdes, el carbohidrato liberado y transferido al hongo es un poliol (ribitol, eritritol o sorbitol). Para el almacenaje, el micobionte convierte parcialmente los carbohidratos proporcionados por el fotobionte en manitol a través de la vía de las pentosas fosfato (Grimm y col., 2021). Por otro lado, se ha visto que las comunidades bacterianas asociadas a los líquenes pueden metabolizar una serie de compuestos de C, incluidos algunos compuestos aromáticos que son estables en los suelos y que son difíciles de degradar, para ser usados como fuente de C y energía (Almendras y col., 2018a).

Además, los líquenes producen distintas sustancias químicas y producen diversas enzimas que afectan el proceso de descomposición de la materia orgánica. Es probable que las lacasas y otras sustancias químicas que son importantes en la fisiología de los líquenes también desempeñen un papel importante en la humificación de la materia orgánica (Beckett y col, 2013). Parte de este proceso incluye la producción de una serie de enzimas tales como fenol oxidasas, peroxidasas y celulasas, que están directamente involucradas en la renovación de materia orgánica en hongos saprófitos de vida libre (Kallison, 2021). Estas mismas enzimas también son lixiviadas por hongos liquenizados, y lo más probable es que funcionen de la misma manera que las lixiviadas por sus contrapartes de vida libre.

1.2.2. Ciclo del nitrógeno

El N es un nutriente esencial en el suelo y es posible encontrarlo en diferentes formas químicas, ya sea como N mineral u orgánico (Cantarella, 2007). En ecosistemas naturales, el N puede entrar al suelo por deposición de restos vegetales, de biomasa de microorganismos, o de N atmosférico (St. Luce y col. 2011). La entrada de N orgánico al

suelo ocurre mayoritariamente en forma de polímeros, los cuales deben romperse a unidades más pequeñas, mediante enzimas, para poder ser asimilados por especies vegetales o microorganismos. Algunas moléculas orgánicas de bajo peso molecular derivadas de la acción enzimática pueden ser asimiladas directamente por los microorganismos o pueden ser mineralizadas para ser asimiladas en forma de amonio (Li y col. 2018; Yang y col., 2022). Además, el amonio puede ser oxidado rápidamente a nitrato en suelos bien aireados, mediante nitrificación (Myrold, 1998), y el nitrato puede ser asimilado de esta forma o transformarse mediante desnitrificación (Bottomley & Myrold, 2015). El amonio y el nitrato son las formas de N inorgánico más demandadas, y se ha descrito que cuando el amonio está disponible en altas concentraciones en el suelo, esta es la forma más utilizada por los microorganismos, reprimiéndose las fuentes alternativas de N como son el nitrato o las moléculas orgánicas (Merrick & Edwards, 1995).

Algunas especies de líquenes, como *Peltigera*, al tener cianobiontes del género *Nostoc* como fotobionte principal, tienen la capacidad de reducir el N atmosférico, y así abastecerse de este elemento, lo que les entrega la capacidad de crecer en lugares difíciles de habitar por otras especies, y posteriormente pueden ceder parte del N fijado a su entorno (Millbank, 1984). La fijación de N por parte de los líquenes depende de factores abióticos como el pH, la humedad, la temperatura, el fotoperíodo y la intensidad lumínica (Bermúdez de Castro y col., 1990). Además, las bacterias asociadas a los líquenes también contribuirían en los distintos procesos del ciclo del N. Por ejemplo, en los talos de líquenes *Peltigera* se ha encontrado alta abundancia de genes relacionados a la nitrificación, desnitrificación, reducción desasimilativa de nitrato y mineralización del N orgánico, pertenecientes principalmente a bacterias de los filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidota* (Valenzuela y col., 2022; Serey, 2022).

1.2.3.Ciclo del fósforo

El P se encuentra en el suelo en formas orgánicas e inorgánicas. El P orgánico proviene de compuestos biológicos liberados al suelo como desechos de animales, hojarasca de plantas y microorganismos (Sims & Pierzynski, 2005). Por su parte, el P inorgánico está presente como minerales primarios (aquellos derivados directamente desde el desgaste del material parental), principalmente apatita, y minerales secundarios, aquellos formados por la precipitación del P con aluminio, calcio y hierro (Sims & Pierzynski, 2005). A pesar de que los suelos contienen altos niveles de P, sólo cerca de un 1% de este se encuentra en formas solubles aptas para la incorporación por la biota, i.e. iones ortofosfato (Kishore y col., 2015). Esto se debe a que las formas solubles del P son altamente reactivas a la precipitación insoluble con cationes o a su conversión en complejos orgánicos (Guschina y col., 2003).

Los microorganismos son un componente esencial del ciclo del P en el suelo ya que a través de mecanismos de solubilización y mineralización son capaces de convertir el P orgánico e inorgánico en formas biodisponibles. La solubilización del P inorgánico es llevada a cabo principalmente a través de la producción de ácidos orgánicos, los cuales actúan disminuyendo el pH, incrementando la quelación de cationes unidos al P, formando complejos con iones metálicos asociados a P y compitiendo con el P por la adsorción. La oxidación directa de la glucosa a ácido glucónico y, en algunos casos, a ácido 2-cetoglucónico, mediante la enzima glucosa deshidrogenasa dependiente del cofactor quinona pirroloquinona, es uno de los principales mecanismos reportados (An & Moe, 2016; Sharma y col., 2013; Sindhu y col., 2014). Por otro lado, la mineralización del P orgánico es llevada a cabo por los microorganismos a través de la secreción de varias enzimas, las cuales pueden ser enzimas unidas a membrana o enzimas extracelulares. El P puede ser liberado desde moléculas orgánicas por 3 grupos de

enzimas: (i) fosfatasas no específicas, que llevan a cabo la desfosforilación de enlaces fosfoéster o fosfoanhídrido y, según su pH óptimo, son clasificadas en fosfatasas ácidas (predominantes en suelos ácidos) o alcalinas (predominantes en suelos neutros y alcalinos) (Nannipieri y col., 2011); (ii) fitasas, que liberan P desde la degradación del fitato, la principal forma de P almacenada en semillas y polen de plantas (Sindhu y col., 2014), y (iii) fosfonatasas y C-P liasas, que llevan a cabo la degradación de organofosfonatos, moléculas que contienen enlaces C-P químicamente estables (McGrath y col., 2013).

Diversos estudios de bacterias asociadas a líquenes han demostrado que éstas tienen la habilidad de solubilizar P (Grube y col. 2009; Liba y col. 2006). En los genomas de estas bacterias se han encontrado genes que codifican enzimas involucradas en la solubilización de P inorgánico y orgánico (Sigurbjörnsdóttir y col., 2015; Cernava y col., 2017). Específicamente en líquenes *Peltigera*, se ha observado que las bacterias asociadas tienen un alto potencial de solubilizar P desde fuentes orgánicas, principalmente mediante la acción de enzimas fosfonatasas (Veas-Mattheos, 2022; Serey, 2022). Todos estos antecedentes podrían explicar el crecimiento de muchos líquenes en sustratos extremadamente pobres en nutrientes, en donde la microbiota asociadas a líquenes estaría jugando un importante rol en la simbiosis mediante el suministro de nutrientes esenciales como el P.

1.3. Influencia de los líquenes en la formación de suelo

Los líquenes también tienen un papel clave en la formación del suelo y la colonización del suelo desnudo (Nash, 2008). Una de las principales contribuciones de los líquenes en este proceso es a través de la meteorización física, ya que muchos líquenes tienen rizinas, estructuras similares a raíces que surgen de la superficie inferior del talo para

anclar el líquen al sustrato y que no desempeñan ningún papel directo en la absorción activa de nutrientes. Estas rizinas sondan y exploran la superficie del suelo y de las rocas, se expanden y contraen con la fluctuación de la humedad, lo que contribuye a la desagregación y fragmentación de la superficie rocosa debajo del talo del líquen (Adamo & Violante, 2000). Esta meteorización física también induce y acelera otras formas de meteorización, haciendo que la superficie sea más susceptible a la erosión y otras formas de meteorización química (Chen y col, 2000).

Si bien los líquenes juegan un papel en la meteorización física de su sustrato, son agentes aún más efectivos de la meteorización química (Jackson, 2015). Se ha demostrado que tanto el ácido oxálico como el ácido succínico, subproductos del metabolismo del líquen secretado por el micobionte, inducen la meteorización del granito al promover la liberación de varios iones desde las rocas y aumentar la solubilidad de la superficie (Adamo & Violante, 2000). También se ha demostrado que el ácido carbónico, generado por la reacción entre el dióxido de carbono producto de la respiración, y el agua retenida en el talo, aumenta las tasas de meteorización del sustrato ya que aumenta los procesos de solubilización al disminuir el pH del talo y el ambiente circundante (Chen y col., 2000). Por otro lado, el fotobionte de igual forma puede contribuir a esta meteorización química, mediante la secreción de grandes polímeros biológicos como los mucopolisacáridos ácidos. Es probable que los grupos carboxilos en estos mucopolisacáridos ácidos interactúen con los metales en las rocas, aumentando así la movilidad de los metales para facilitar la quelación por parte del líquen (Barker & Banfield, 1996). En general, los líquenes contribuyen a la formación del suelo a través de la descomposición de varias maneras, incluida la contribución de sus talos como biomasa, lo cual afecta las tasas de descomposición de otra materia orgánica y altera el

proceso de descomposición mediante la secreción de enzimas involucradas en la descomposición (Kallison, 2021).

1.4. Cianolíquenes *Peltigera*

Peltigera es un género de líquenes que pueden ser bipartitos (involucrando al hongo y una cianobacteria del género *Nostoc*) o tripartitos (involucrando al hongo, un alga verde del género *Coccomyxa* como el principal fotobionte y una cianobacteria del género *Nostoc*). Son líquenes foliosos, principalmente terrícolas y muscícolas (i.e. crecen en el suelo o sobre musgos), y se encuentran distribuidos en la mayoría de los continentes (Martínez y col., 2003; Miadlikowska & Lutzoni, 2000). En Chile solo se han reportado especies bipartitas, alrededor de 10 especies, las cuales son altamente abundantes (Chagnon y col., 2019; Orlando y col., 2021). De estas, algunas han sido solo reportadas en Chile y Argentina, tales como *P. frigida* y *P. antarctica*, y otras se han reportado con distribución más amplia, como *P. fuscopraetextata* que también se ha encontrado en América del Norte, y *P. rufescens* que tiene una distribución cosmopolita. Aparte de esto, se ha observado que estas especies crecen en contextos ambientales diferentes, *P. frigida* y *P. fuscopraetextata* crecen abundantemente en bosques de *Nothofagus*, mientras que *P. rufescens* y *P. antarctica* son abundantes en sitios abiertos como praderas, orillas de camino y claros de bosque (Orlando y col., 2021).

Algunos estudios llevados a cabo en líquenes *Peltigera* han demostrado que las comunidades bacterianas presentes en los sustratos liquénicos (i.e. el suelo sobre el cual el líquen crece y que está en íntimo contacto con el talo) son distintas a las comunidades presentes en suelos aledaños sin influencia del líquen (Pezoa, 2021; Muster y col., 2022). Por otro lado, también se ha visto que las comunidades bacterianas asociadas a los talos liquénicos y a sus sustratos son diferentes dependiendo del

contexto ambiental en donde los líquenes crecen, probablemente debido a los distintos niveles de P biodisponible y lábil presentes en los ambientes (Almendras, 2022). Sin embargo, no existen mayores antecedentes sobre los nutrientes y otras características fisicoquímicas de los sustratos liquénicos que se puedan relacionar con los recientes hallazgos relacionados a las comunidades microbianas asociadas a los líquenes. De la misma forma, no existen estudios que incluyan la caracterización de parámetros edáficos en suelos aledaños a los líquenes, que permitan la comparación con los sustratos liquénicos y así estudiar el efecto de la influencia del liquen y su comunidad bacteriana asociada sobre los ambientes.

1.5. Determinación de parámetros edáficos

El suelo posee una alta heterogeneidad, incluso en un área pequeña de influencia (10^{-3} a 10^{-1} m), lo que significa que posee una alta variabilidad intrínseca (Görres & Amador, 2005). Una forma de minimizar esta variabilidad en las determinaciones analíticas es utilizar una alta masa de suelo, ya que esto favorece la representatividad de la muestra y, por lo tanto, la exactitud del resultado (Carter & Gregorich, 2007). Por ejemplo, las determinaciones que más masa utilizan son el contenido hídrico (CH) y el pH, donde se suele usar entre 10 g y 20 g de muestra (Sadzawka y col., 2006). Otras determinaciones como amonio y nitrato suelen requerir entre 5 g y 10 g (Norman & Stucki, 1981; Kandeler & Gerber, 1988; Carter & Gregorich, 2007), mientras que para P Olsen se necesitan 2,5 g (Olsen & Sommers, 1982; Sadzawka y col., 2006). Sólo la cuantificación del carbono orgánico (CO) utiliza una masa de muestra pequeña, la que según el tipo de suelo varía entre 0,1 g a 1 g (Sadzawka y col., 2006; Carter & Gregorich, 2007).

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos de muestreo, la cantidad de sustrato asociado a los líquenes es muy limitada y escasa, en donde se obtienen entre 2 y 10 g de muestra

dependiendo del tamaño del líquen, de la densidad del suelo, de la presencia de raíces y/o piedrecillas, y del uso de la muestra para otras determinaciones como extracción de ADN. Por lo tanto, es muy difícil lograr caracterizar fisicoquímicamente la muestra siguiendo los protocolos estandarizados y se deben plantear alternativas ajustando los protocolos conocidos para lograr trabajar con cantidades reducidas de masa.

De esta forma, este Seminario de Título tiene como objetivo la caracterización edáfica de sustratos de líquenes *Peltigera* y suelos aledaños sin influencia del líquen, en ambientes de praderas de cuatro localidades del sur de Chile. Se plantean determinaciones del pH, contenido hídrico, carbono orgánico, y contenido de amonio, nitrato y fósforo biodisponible, para los cuales primero se deberán optimizar las determinaciones buscando minimizar la masa de muestra a utilizar.

1.6. Objetivo General

Evaluar el efecto de líquenes *Peltigera*, con diferente distribución geográfica, sobre las características edáficas de los sustratos sobre los cuales crecen en praderas de cuatro localidades del sur de Chile.

1.7. Objetivos Específicos

1. Optimizar las determinaciones analíticas considerando la masa mínima de muestra a utilizar.
2. Determinar el pH, contenido hídrico y carbono orgánico, junto con el contenido de amonio, nitrato y fósforo biodisponible, en los sustratos liquénicos y suelos aledaños mediante distintas técnicas analíticas.
3. Comparar los parámetros edáficos cuantificados entre los sustratos liquénicos y los suelos aledaños en praderas de las diferentes localidades del sur de Chile.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestreo

2.1.1. Sitios de estudio

La toma de muestras se realizó en las campañas de terreno de 2019 y 2020 del Laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Se seleccionaron en total cuatro sitios de muestreo en el sur de Chile: (i) Reserva Nacional Coyhaique (Región de Aysén, denominado como COY), (ii) Parque Nacional Patagonia, sector Tamango (Región de Aysén, denominado como TAM), (iii) Parque Natural Karukinka (Región de Magallanes, denominado como KAR) y (iv) Puerto Williams, Isla Navarino (Región de Magallanes, denominado como NAV). En cada uno de los sitios se seleccionaron ambientes de praderas (*i.e.* sin cobertura arbórea), en donde se recolectaron ocho individuos de líquenes *Peltigera antarctica* y ocho individuos de *Peltigera rufescens*, sus correspondientes sustratos (*i.e.* suelo sobre el cual crece el líquen) y ocho muestras de suelos aledaños sin influencia de los líquenes, dando un total de 64 muestras de sustratos y 32 muestras de suelo (Fig. 1, Tabla Anexo 1). Las muestras de sustratos líquénicos corresponden al suelo recolectado directamente debajo de los líquenes a una profundidad aproximada de 2 cm, mientras que para los suelos aledaños se removió el mantillo y se muestreó la capa superficial del suelo a una profundidad aproximada de 5 cm. Las muestras de líquenes y sus sustratos fueron almacenados en bolsas de papel y las muestras de suelos fueron almacenadas en tubos Falcon.

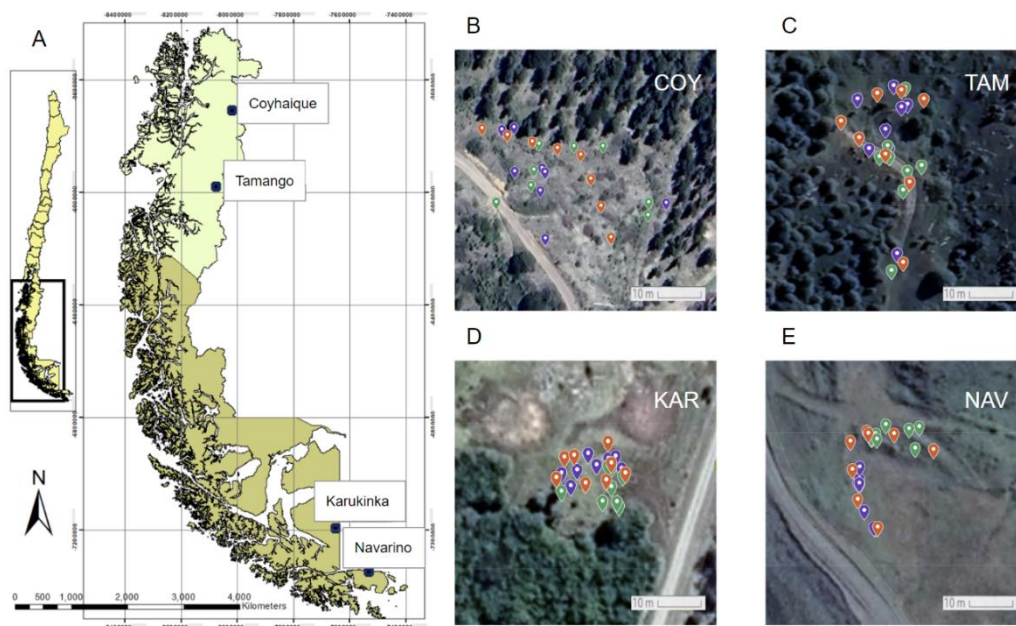


Figura 1. Mapa de los sitios de muestreo. **A:** Distribución geográfica de los cuatro sitios de muestreo. **B:** COY. **C:** TAM. **D:** KAR. **E:** NAV. Las muestras de sustratos de *P. antarctica* se indican en color verde, los sustratos de *P. rufescens* en color morado y los suelos aledaños en color naranja.

2.1.2. Procesamiento de las muestras

Inmediatamente después de la recolección de las muestras, los líquenes y sus sustratos se secaron toda la noche cerca de una fuente de calor (e.g. estufa o cocina a leña) para reducir la humedad y evitar la pudrición de los líquenes. Posteriormente, en el laboratorio, se realizó la separación de los líquenes y los sustratos, con la ayuda de pinzas y brochas. Finalmente, todas las muestras de sustratos y suelos fueron tamizadas (2 mm aprox.) y se almacenaron a -20°C en tubos Falcon hasta su análisis.

2.2. Optimización de las determinaciones analíticas considerando la masa mínima de muestra a utilizar

Debido a que la cantidad de muestra de los sustratos es muy limitada porque sólo se toma el suelo que está en contacto directo con el líquen y a una profundidad máxima de

2 cm, se debieron realizar optimizaciones de las metodologías analíticas para lograr la determinación de los parámetros edáficos utilizando la menor cantidad de muestra posible sin perder representatividad en los resultados.

2.2.1. Optimización de pH, amonio y nitrato

Debido a que se planteó utilizar la misma extracción para medir pH, amonio y nitrato, la optimización del pH considera las otras dos. Primero se evaluó la extracción en agua a partir de distintas masas de suelo (0,25 g; 0,5 g; 1 g y 2,5 g) con una relación suelo:solución de 1:2,5. Para esta optimización se utilizó una muestra de prueba de suelo Santa Rosa (suelo de origen volcánico), analizando dos réplicas biológicas para cada masa de suelo. Una vez definida la masa de suelo más adecuada para realizar esta determinación, se analizaron distintas relaciones suelo:solución (1:2,5; 1:5; 1:10 y 3:50). Para la selección de la masa óptima de suelo y de la relación suelo:solución a utilizar en la extracción, se analizó el valor promedio de pH obtenido, el coeficiente de variación (CV) de los resultados y el volumen de sobrenadante disponible, ya que este debe ser suficiente para la posterior cuantificación de nitrato y amonio.

2.2.2. Optimización de carbono orgánico

La optimización de CO consideró cuantificar el C oxidado a partir de distintas masas de suelo (0,1 g; 0,125 g y 0,15 g), debido a que la metodología plantea que para suelos con CO > 10% se deben usar < 0,2 g de muestra. Para esto se utilizó la muestra de suelo de prueba (Santa Rosa), utilizando dos réplicas biológicas para cada masa de suelo. Además, se incluyó como referencia una muestra de sustrato liquénico de pradera (distinta a las incluidas en este estudio). Para la selección de la masa óptima de suelo a utilizar en las mediciones finales se analizó el valor promedio de CO obtenido y el CV de los resultados.

2.2.3. Optimización de fósforo Olsen

La optimización del fósforo Olsen (P-Olsen) consideró cuantificar el P extraído a partir de distintas masas de suelo (0,1 g; 0,25 g y 0,5 g) para una relación suelo:solución constante de 1:40. Para esto se utilizó una muestra compuesta de sustratos de pradera (distinta a las incluidas en este estudio), utilizando dos réplicas biológicas para cada masa de suelo. Para la selección de la masa óptima de suelo a utilizar en las mediciones finales se analizó el valor promedio de P obtenido y el CV de los resultados.

2.3. Determinación de parámetros edáficos en los sustratos liquénicos y suelos aledaños

2.3.1. Determinación del contenido hídrico

El CH se refiere a la cantidad de agua, expresada en porcentaje (% m/m), que posee cada sustrato liquénico o suelo. Este parámetro se determinó por gravimetría utilizando la metodología descrita por Sadzawka y col., (2006). Para esto se masaron (en balanza analítica con precisión de 0,0001 g) entre 2 g y 2,5 g de muestra y se secaron en estufa a 60°C por 24 h o hasta alcanzar masa constante. Se consideró como masa constante cuando entre dos determinaciones de masa consecutivas de la muestra fría (separadas en una hora de secado), la diferencia entre ambas no excedió el 0,1% de la última masa de suelo determinada.

2.3.2. Determinación de pH

El pH de los sustratos liquénicos y suelos aledaños se determinó en agua desionizada (pH-H₂O) con una relación suelo:solución de 1:10, adaptando la metodología descrita por Sadzawka y col., (2006) y utilizando una masa de 0,5 g de muestra.

2.3.3. Determinación de carbono orgánico

La determinación de CO se realizó adaptando la metodología descrita por Sadzawka y col. (2006), que consiste en una digestión húmeda del suelo en medio ácido en presencia de dicromato de sodio y la posterior cuantificación del ión Cr^{+3} a 600 nm (análisis espectrofotométrico con lector de placas Epoch Micro-Volume, Biotek), utilizando 0,125 g de muestra. En los casos en que la A_{600} estuvo fuera de la curva de calibración, se ajustó la masa de suelo entre 0,11 g y 0,15 g de sustrato o suelo (masados en balanza analítica). Los resultados de esta determinación están expresados en porcentaje (%) en función de la masa de suelo seco a 60°C. Se aplicaron las correcciones recomendadas según el pH cuando fue requerido. Para la cuantificación se construyó una curva de calibración, por duplicado, aplicando el protocolo experimental a 1 mL de una serie de estándares de concentración entre 1,75 y 50 mg C/mL, junto con un blanco que consistió en una muestra que no posee suelo ni solución estándar de C (Fig. Anexo 1).

2.3.4. Determinación de amonio

El N en forma de amonio ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) se determinó a partir de una alícuota de 30 μL del sobrenadante obtenido para la determinación de pH, usando el método descrito por Kandeler & Gerber (1988), midiendo la absorbancia del analito derivatizado a 677 nm (análisis espectrofotométrico con lector de placas Epoch Micro-Volume, Biotek). Para la cuantificación de amonio se construyeron a diario curvas de calibración con una serie de estándares de cloruro de amonio en un rango de 0,5 a 12 $\mu\text{g NH}_4^+\text{-N/mL}$, junto con un blanco sin suelo ni estándar. Los resultados se reportaron en concentraciones de amonio en unidades de [$\mu\text{g NH}_4^+\text{-N/g suelo}$] (Fig. Anexo 2).

2.3.5. Determinación de nitrato

El N en forma de nitrato (NO_3^- -N) se determinó potenciométricamente con un electrodo selectivo de iones (ISE) para nitrato (Oakton), desde una alícuota del sobrenadante obtenido para la determinación de pH. A 2 mL del sobrenadante se le agregaron 40 μL de solución ajustadora de fuerza iónica (ISA), se homogeneizó y se cuantificó con un tiempo de estabilización de la lectura de aproximadamente 15 minutos, para obtener luego las concentraciones de nitrato expresadas en unidades de [$\mu\text{g NO}_3^-$ -N/g suelo]. La calibración del equipo para la determinación de nitrato debió hacerse a diario, con estándares frescos de nitrato de amonio en un rango entre 1 y 100 [$\mu\text{g NO}_3^-$ -N /mL] (Fig. Anexo 3).

2.3.6. Determinación de fósforo Olsen

El método de P-Olsen se puede utilizar como indicador de la fracción de P biodisponible (Carter & Gregorich, 2007; González, 2021). La extracción desde los sustratos líquénicos y suelos se realizó adaptando la metodología descrita por Sadzawka y col., (2006). Se ajustó la cantidad de sustrato a 0,25 g con un volumen de 10 mL de extractante (NaHCO_3 0,5 M pH 8,5), lo que equivale a una relación suelo:solución 1:40. La cuantificación de P-Olsen se realizó a través del método colorimétrico azul de molibdeno de Murphy & Riley, (1962) determinando la absorbancia del analito derivatizado a 882 nm (análisis espectrofotométrico con lector de placas Epoch Micro-Volume, Biotek). Los resultados de este análisis se refieren al peso de suelo seco a 60°C y están reportados en unidades de [$\mu\text{g P}$ /g suelo]. Para la cuantificación se construyó una curva de calibración con estándares de concentraciones desde 0,05 $\mu\text{g P/mL}$ hasta 1 $\mu\text{g P/mL}$, junto con un blanco que tenía solo el extractante (Fig. Anexo 4).

2.4. Análisis estadísticos

Para comparar estadísticamente los resultados de las distintas variables edáficas entre los grupos de muestras, se utilizó el software estadístico R Studio.

2.4.1. Verificación de los supuestos de ANOVA

Desde cada conjunto de datos obtenidos se identificaron los *outliers* con el método ROUT (Q=1%) y estos fueron eliminados de los análisis posteriores. Luego, se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y de homogeneidad de varianzas de Levene para comprobar los supuestos de ANOVA.

2.4.2. Prueba estadística

Debido a que los datos no cumplieron las exigencias para llevar a cabo un ANOVA, se utilizó una prueba no paramétrica. Las diferencias significativas entre los grupos de muestras se determinaron mediante comparaciones pareadas con la prueba de Wilcoxon Mann Whitney (ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

2.4.3. Análisis multivariados

Se llevaron a cabo análisis de componentes principales (PCA) utilizando los datos obtenidos en las determinaciones de los parámetros edáficos. Para evaluar diferencias significativas entre los grupos se realizaron análisis PERMANOVA y comparaciones pareadas Adonis.

III. RESULTADOS

3.1. Optimización de las determinaciones analíticas considerando la masa mínima de muestra a utilizar

3.1.1. Optimización de pH, amonio y nitrato

Para la optimización de la determinación del pH se evaluaron cuatro masas del suelo de prueba Santa Rosa (0,25 g; 0,5 g; 1 g y 2,5 g) con una relación suelo:solución de 1:2,5 (Fig. 2). Se pudo observar que para las cuatro masas de suelo se obtuvieron promedios de pH similares, pero al disminuir la masa de suelo evaluada aumentó el CV de los duplicados biológicos. Las muestras con menor masa de suelo (0,25 g) presentaron el CV más alto (1,55%), mientras que las muestras con 0,5 g y 1 g exhibieron un CV de 0,31%. Finalmente, en las muestras con 2,5 g se observó el menor CV (0,29%). A pesar de que el menor porcentaje de CV se encontró en las muestras con mayor masa de suelo (2,5 g), esta cantidad es muy superior a la cantidad de muestra disponible en este estudio. También se descartó trabajar con 0,25 g debido al limitado volumen de sobrenadante obtenido y que las demás muestras todavía presentaron valores de CV aceptables. De esta forma, se decidió continuar la optimización utilizando 0,5 g, ya que estas muestras presentaron la mejor relación entre la masa mínima y bajos CV.

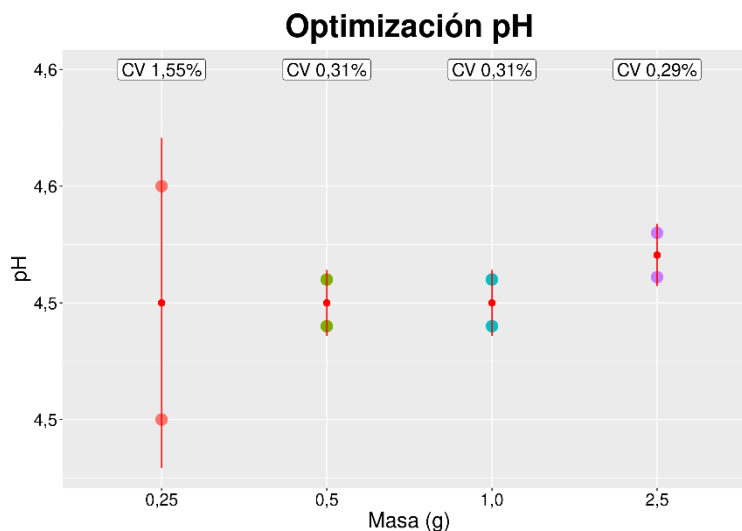


Figura 2. Optimización de la determinación de pH en función de la masa de suelo en una relación suelo solución 1:2,5. El promedio y la desviación estándar de las réplicas se indica con un círculo y línea roja, respectivamente. El porcentaje de CV se indica en las etiquetas.

Debido a que se utiliza la misma extracción para medir pH, amonio y nitrato, es necesario contar con una cantidad de extracto mínima de 2 mL para medir con los electrodos (de pH e ISE) y el amonio colorimétricamente. Para encontrar la relación óptima y obtener un volumen adecuado de sobrenadante, se realizó la extracción de 0,5 g de muestra y se evaluaron distintas relaciones suelo:solución (1:2,5; 1:5; 1:10 y 3:50) (Fig. 3). Los resultados muestran que los valores promedio de pH aumentaron al incrementar la dilución de la extracción. Para las extracciones con una relación de 1:2,5 y 1:10 se encontraron valores de CV cercanos a 1,50%, mientras que para la extracción con 1:5 se encontró un CV de 1,20%. Por último, para la relación 3:50 el CV fue de 0,30%. A pesar de que la relación 3:50 exhibió los menores CV, esta dilución se recomienda sólo para muestras con CO > 20% (Sadzawka y col. 2006), lo que podría no cumplirse para todas las muestras. Además, esta dilución aumenta la probabilidad de que las determinaciones de amonio y nitrato queden debajo del límite de cuantificación (LC) de sus respectivos métodos. Luego, la siguiente extracción con menor CV fue la relación

1:5, pero dado que el volumen de sobrenadante disponible sería muy limitado, también se descartó trabajar con esta cantidad. Finalmente, se decidió utilizar la relación 1:10 para las determinaciones finales de pH, amonio y nitrato, porque presenta un CV aceptable, junto con volúmenes de sobrenadante suficientes para realizar las tres determinaciones aquí planteadas.

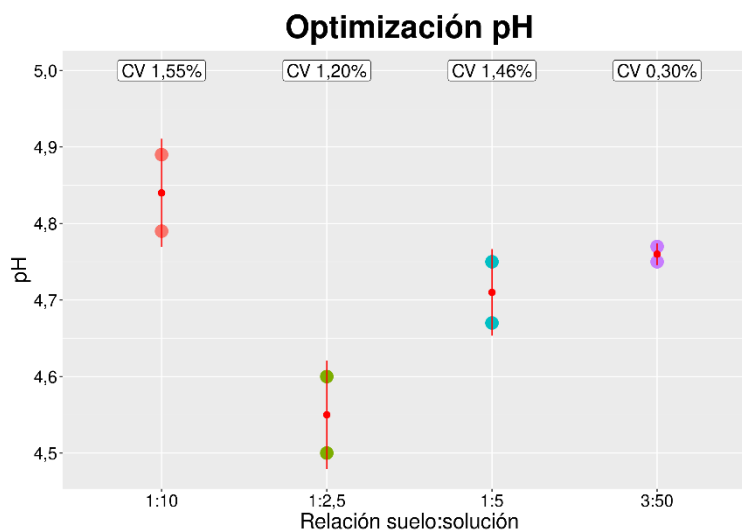


Figura 3. Optimización de la determinación de pH en función de la relación suelo solución con una masa de suelo de 0,5 g. El promedio y la desviación estándar de las réplicas se indica con un círculo y línea roja, respectivamente. El porcentaje de CV se indica en las etiquetas.

3.1.2. Optimización de carbono orgánico

Para la optimización de CO se consideró cuantificar el C oxidado del suelo de prueba (Santa Rosa) y un sustrato liquénico de una pradera de referencia, a partir de distintas masas de muestra (0,1 g; 0,125 g y 0,15 g) (Fig. 4). Se pudo observar que las muestras de Santa Rosa con masas de 0,125 g y 0,15 g alcanzaron valores de CO cercanos al 7%, mientras que con 0,1 g se obtuvo el mayor valor de CO (12,69%). Además, se pudo observar que al disminuir la masa de suelo los porcentajes de CV de los resultados aumentaron. Las muestras de menor masa (0,1 g) presentaron el CV más alto (66,68%), mientras que con 0,125 g se obtuvo un CV de 4,65%. Las muestras con mayor masa

(0,15 g) presentan un CV de 0,74%. Por otra parte, los sustratos liquénicos alcanzaron valores cercanos a 35% de CO, pero debido a la escasez de estas muestras no fue posible realizar duplicados biológicos ni calcular el CV. Considerando que con 0,1 g se obtuvo el valor de CV más alto y que con 0,15 g se corre el riesgo de quedar fuera del límite lineal del método (debido al alto contenido de CO de los suelos de praderas), estas dos masas se descartaron. De esta forma, se seleccionó realizar las determinaciones de CO con 0,125 g de muestra.

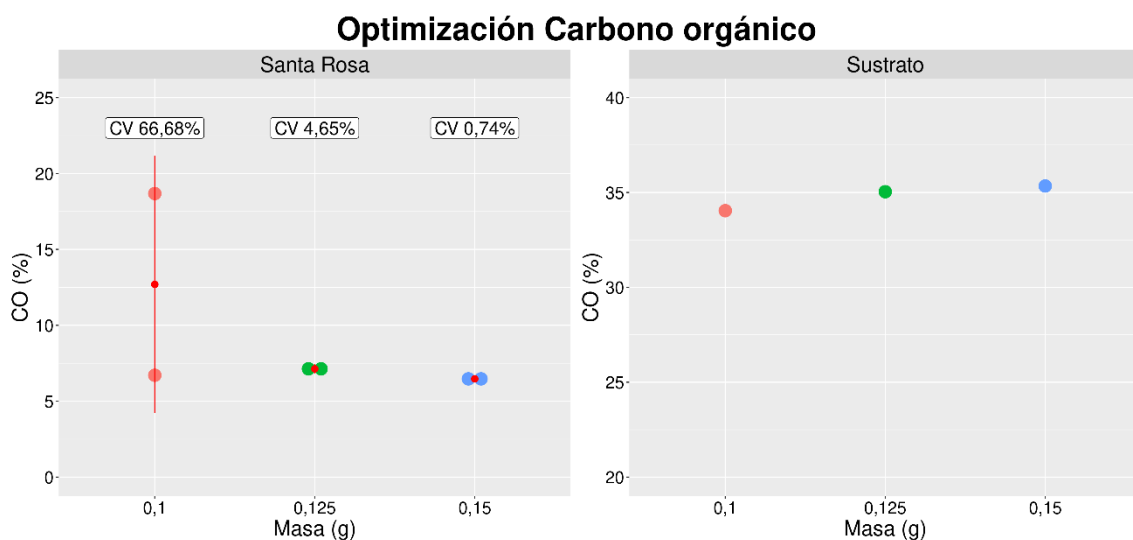


Figura 4. Optimización de la determinación de Carbono orgánico en función de la masa de suelo. El promedio y la desviación estándar de las réplicas se indica con un círculo y línea roja, respectivamente. El porcentaje de CV se indica en las etiquetas. En la muestra de sustrato no se realizaron réplicas.

3.1.3. Optimización de fósforo Olsen

Para la optimización de P-Olsen en función de la masa de suelo, se realizó la extracción con 0,1 g; 0,25 g y 0,5 g de masa de una muestra compuesta de sustratos de praderas (distinta a las incluidas en este estudio) (Fig. 5). Se pudo observar que con 0,25 g y 0,5 g se obtuvieron valores cercanos a 53 $\mu\text{g P/g}$ suelo, mientras que con 0,1 g se obtuvo 55,5 $\mu\text{g P/g}$ suelo. Por otro lado, la masa de suelo y los CV se relacionaron de forma

inversamente proporcional. Las muestras con menor masa (0,1 g) presentaron CV de 9,75%, mientras que las muestras de 0,25 g presentaron CV de 7,17%. La mayor masa (0,5 g) presentó CV de 3,99%. A pesar de que con 0,5 g de suelo se obtuvo el mejor CV, se descartó trabajar con esta cantidad porque representa un porcentaje muy alto de la muestra total disponible. Finalmente, se decidió trabajar con 0,25 g en las determinaciones finales, cantidad que presentó un valor de CV aceptable y a la vez permite disminuir considerablemente la masa de suelo analizada.

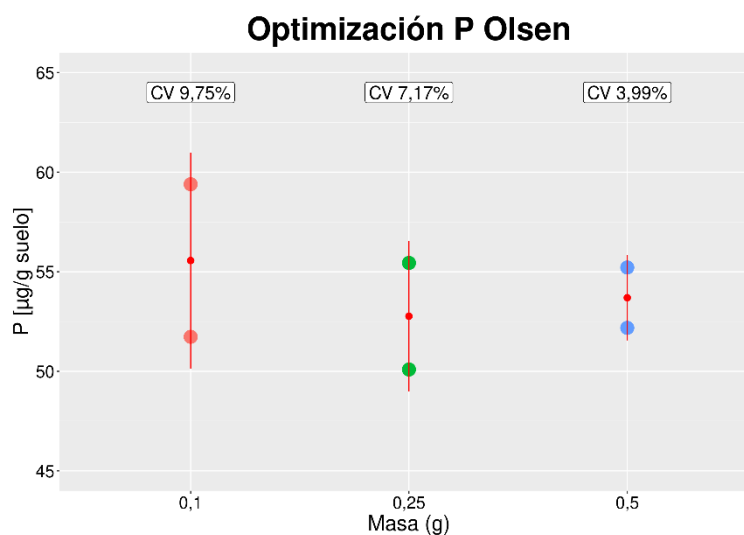


Figura 5. Optimización de la determinación de fósforo Olsen en función de la masa de suelo. El promedio y la desviación estándar de las réplicas se indica con un círculo y línea roja, respectivamente. El porcentaje de CV se indica en las etiquetas.

3.2. Determinación de parámetros edáficos en sustratos liquénicos y suelos aledaños

Una vez seleccionada la masa mínima de muestra a utilizar, se llevó a cabo la determinación de los distintos parámetros edáficos en las muestras de sustratos y suelos (n=96). En cada uno de los sitios hubo tres grupos de muestras: sustratos de *P. antarctica* (S-ant), sustratos de *P. rufescens* (S-ruf) y suelos aledaños (Suelo), las cuales

contaron con ocho réplicas cada una. Sin embargo, debido a la limitada cantidad de muestra, no fue posible realizar duplicados biológicos en las determinaciones.

3.2.1. Determinación del contenido hídrico

En la determinación de CH se encontró que los sustratos no superaron el 10%, mientras que los suelos alcanzaron valores entre 25% a 125% de humedad (Fig. 6). Además, la variabilidad de las muestras de suelos fue mayor a la detectada en los sustratos. Al comparar entre sustratos y suelos, el contenido de humedad de los suelos fue significativamente mayor al de los sustratos (***: $p \leq 0,001$). Sin embargo, al comparar entre los sustratos de las dos especies de líquenes, no se encontraron diferencias significativas, excepto en KAR en donde los sustratos de *P. rufescens* presentaron mayor porcentaje de CH (**: $p \leq 0,01$).

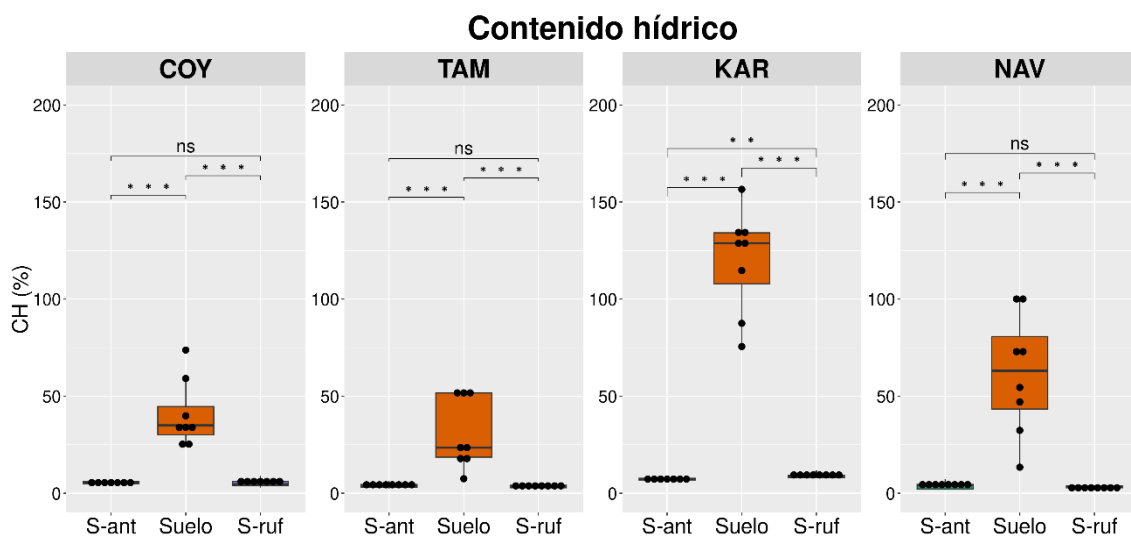


Figura 6. Porcentaje de contenido hídrico en los sustratos de *P. antarctica* (S-ant), los sustratos de *P. rufescens* (S-ruf) y los suelos aledaños, para cada sitio de estudio. Diferencias significativas según la prueba de Wilcoxon Mann Whitney (ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

Al comparar entre sitios, en ambos sustratos se observó que en KAR, seguido de COY, hubo mayor contenido de humedad que en TAM y NAV, estos últimos dos sitios no presentaron diferencias significativas entre sí. Mientras que, los suelos de la Región de

Magallanes (KAR y NAV) fueron más húmedos que los de la Región de Aysén (COY y TAM) (Fig. 7).

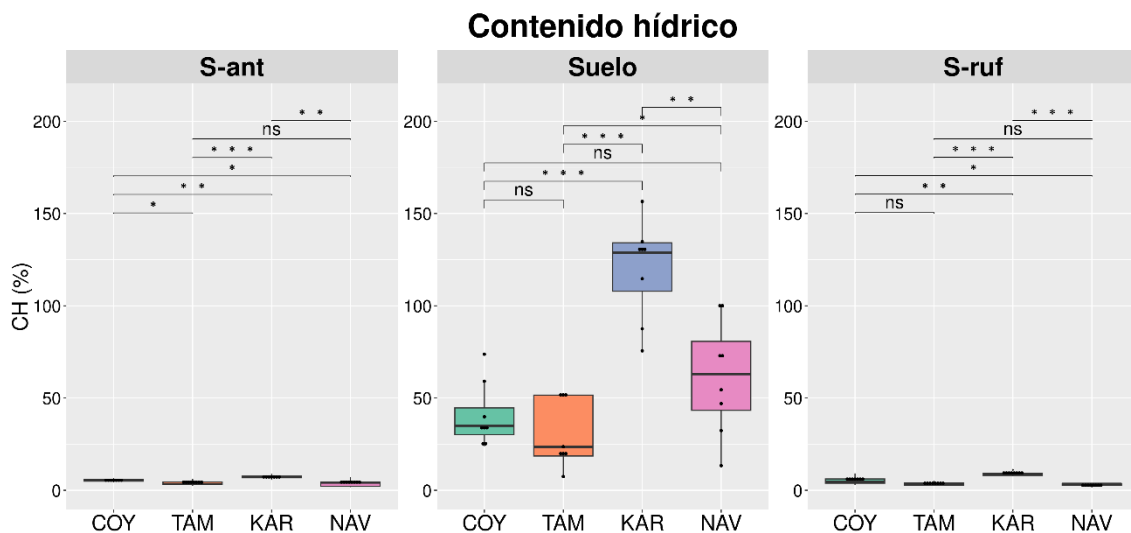


Figura 7. Porcentaje de contenido hídrico en los sustratos de *P. antarctica* (S-ant), los sustratos de *P. rufescens* (S-ruf) y los suelos aledaños, comparando los cuatro sitios de estudio. Diferencias significativas según la prueba de Wilcoxon Mann Whitney (ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

3.2.2. Determinación de pH

Para la determinación de pH se observó que los suelos y sustratos presentaron valores cercanos a la neutralidad (entre 6,5 y 7), excepto en las muestras de KAR, en donde el pH fue ligeramente ácido (entre 5,5 y 6) (Fig. 8). La variabilidad de las muestras de KAR y NAV fue mayor comparada a la detectada en las muestras de COY y TAM. No se encontraron diferencias significativas al comparar los sustratos de las dos especies de líquen con su suelo aledaño, excepto en TAM, en donde ambos sustratos fueron más ácidos que el suelo (*: $p \leq 0,05$). Tampoco se encontraron diferencias significativas al comparar los valores de pH entre los sustratos de las dos especies de líquen ($p > 0,05$).

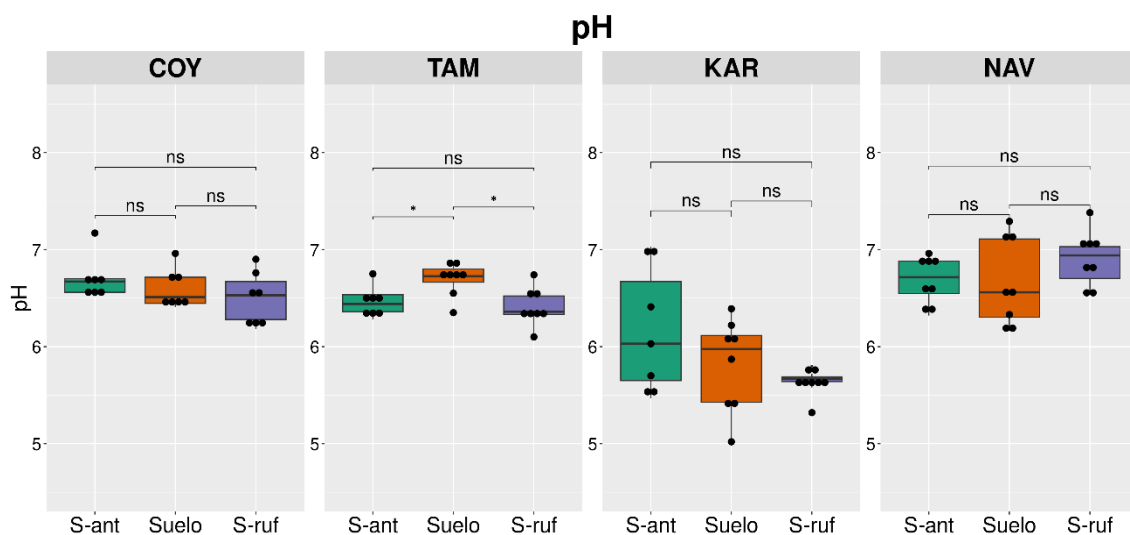


Figura 8. pH en los sustratos de *P. antarctica* (S-ant), los sustratos de *P. rufescens* (S-ruf) y los suelos aledaños, para cada sitio de estudio. Diferencias significativas según la prueba de Wilcoxon Mann Whitney (ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

Al comparar los valores de pH entre los sitios, se observó que en los sustratos de *P. rufescens* y en los suelos, las muestras de KAR fueron más ácidas (Fig. 9). En general, el pH fue similar entre las muestras de los sitios de la Región de Aysén (COY y TAM), pero distintas entre los sitios de la Región de Magallanes (KAR y NAV). En los sustratos de *P. rufescens* se encontraron mayores diferencias al comparar el pH entre los sitios, que en los sustratos *P. antarctica*.

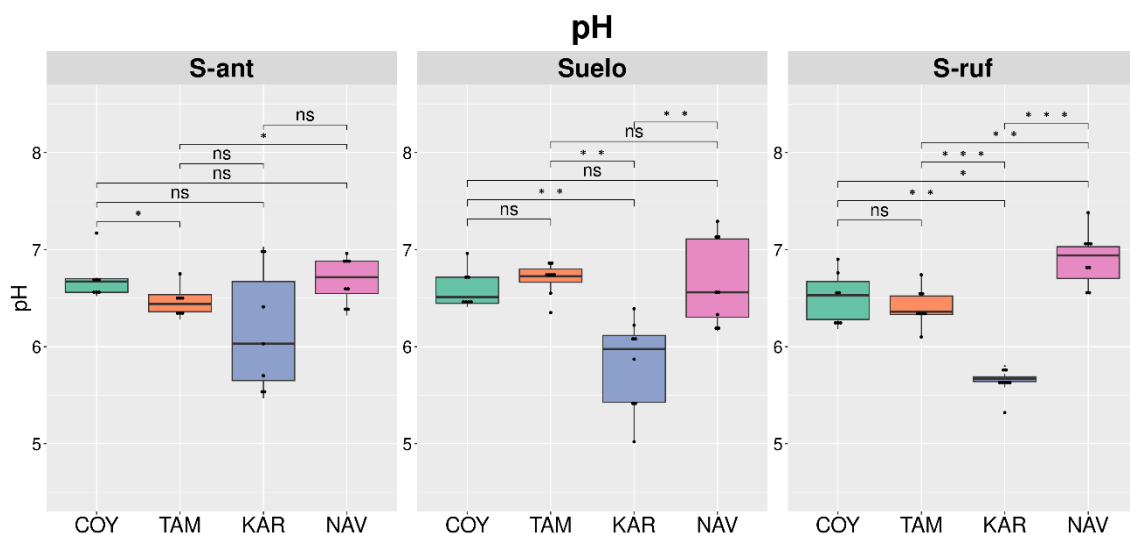


Figura 9. pH en los sustratos de *P. antarctica* (S-ant), los sustratos de *P. rufescens* (S-ruf) y los suelos aledaños, comparando los cuatro sitios de estudio. Diferencias significativas según la prueba de Wilcoxon Mann Whitney (ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

3.2.3. Determinación de carbono orgánico

Para la determinación de CO, en todos los sitios se encontraron valores cercanos al 10%, excepto en KAR, donde hubo valores mayores al 30% (Fig. 10). En cuanto a la variabilidad de las muestras, no se observó una tendencia clara, ya que en KAR la variabilidad fue similar para suelos y sustratos, mientras que, en el resto de los sitios, se encontró que alguno de los grupos presentó una mayor variabilidad (suelo en TAM, S-ruf en COY y S-ant en NAV). A pesar de que no en todos los casos hubo diferencias significativas, se pudo observar que, en los suelos de COY, TAM y NAV hubo un menor contenido de CO en comparación a los sustratos de ambas especies de líquen, donde sólo en COY se encontró que los suelos tuvieron un contenido significativamente menor de CO respecto a los sustratos de *P. antarctica* (*: $p \leq 0,05$). Además, tampoco se encontraron diferencias entre los sustratos de ambas especies.

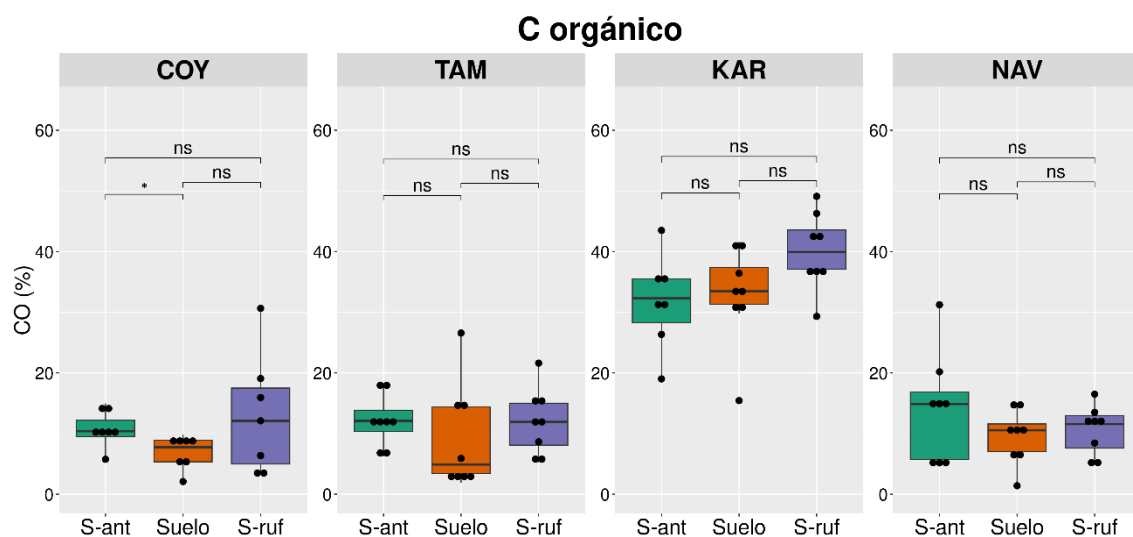


Figura 10. Carbono orgánico (%) en los sustratos de *P. antarctica* (S-ant), los sustratos de *P. rufescens* (S-ruf) y los suelos aledaños, para cada sitio de estudio. Diferencias significativas según la prueba de Wilcoxon Mann Whitney (ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

Al comparar el CO entre sitios, las muestras de KAR tuvieron un contenido de CO significativamente mayor que los demás sitios (***: $p \leq 0,001$), tanto para suelos como sustratos, mientras que no hubo diferencias significativas al comparar entre los demás sitios (Fig. 11).

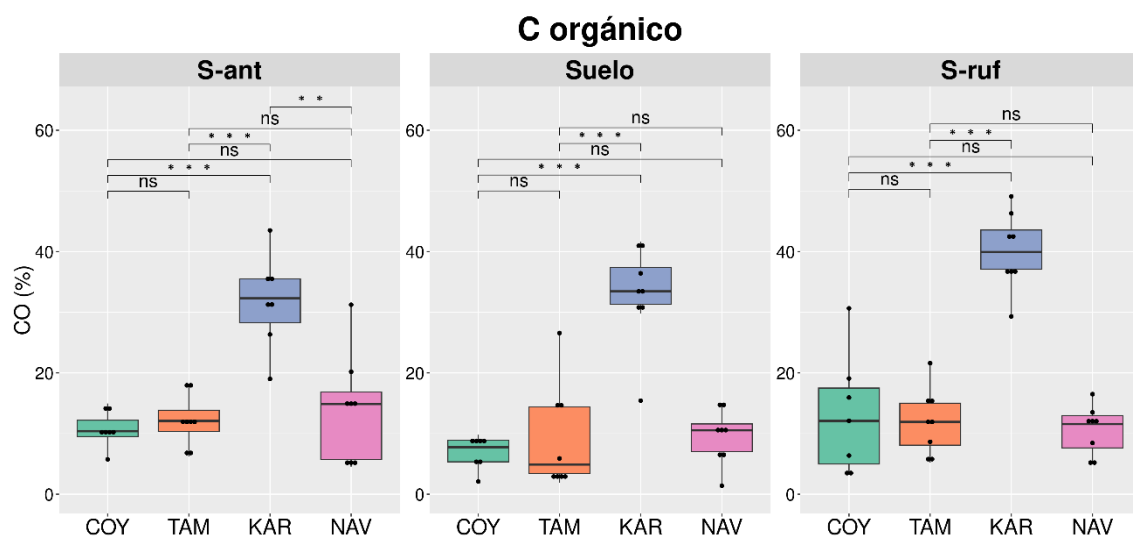


Figura 11. Carbono orgánico (%) en los sustratos de *P. antarctica* (S-ant), los sustratos de *P. rufescens* (S-ruf) y los suelos aledaños, comparando los cuatro sitios de estudio. Diferencias significativas según la prueba de Wilcoxon Mann Whitney (ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

3.2.4. Determinación de amonio

El contenido de amonio para los suelos y sustratos de COY y TAM fue cercano a $10 \mu\text{g NH}_4^+\text{-N/g}$ suelo, mientras que en los sustratos de KAR y NAV se observaron contenidos cercanos a $30 \mu\text{g NH}_4^+\text{-N/g}$ suelo (Fig. 12). En cuanto a los suelos de KAR y NAV se encontraron valores cercanos a 90 y $50 \mu\text{g NH}_4^+\text{-N/g}$ suelo, respectivamente. En cuanto a la variabilidad de las muestras, esta fue baja en suelos y sustratos en casi todos los sitios, excepto por los suelos de KAR y NAV que mostraron mayor heterogeneidad.

Al comparar entre los sustratos y el suelo, se encontró que sólo los sustratos de *P. rufescens* de TAM y KAR presentaron un contenido de amonio significativamente menor respecto a su suelo aledaño (*: $p \leq 0,05$). Además, sólo en TAM se encontraron diferencias significativas entre el contenido de amonio de ambos sustratos liquénicos (*: $p \leq 0,05$), siendo mayor el contenido de *P. antarctica*.

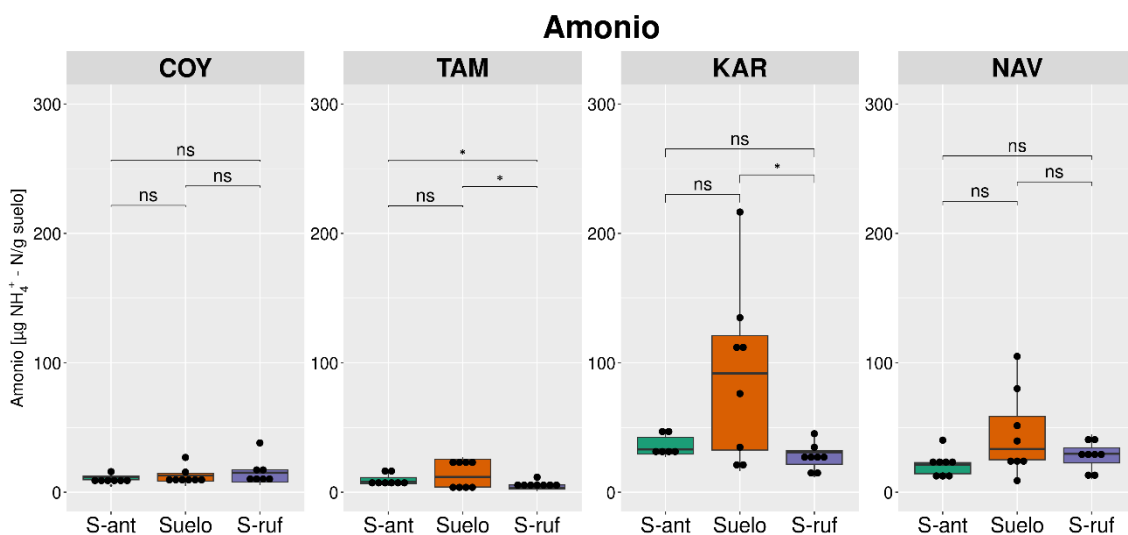


Figura 12. Amonio en los sustratos de *P. antarctica* (S-ant), los sustratos de *P. rufescens* (S-ruf) y los suelos aledaños, para cada sitio de estudio. Diferencias significativas según la prueba de Wilcoxon Mann Whitney (ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

Al comparar el contenido de amonio entre los 4 sitios, se observó en general que los sitios de la Región de Magallanes (KAR y NAV) presentaron valores mayores que los de

la Región de Aysén (COY y TAM) (Fig. 13). En los sustratos de *P. antarctica* se encontraron diferencias significativas entre los sitios de la Región de Magallanes, pero no entre los de la Región de Aysén, mientras que en los sustratos de *P. rufescens* se encontró la tendencia contraria. Finalmente, para las muestras de suelo no hubo diferencias significativas entre los sitios de una misma región.

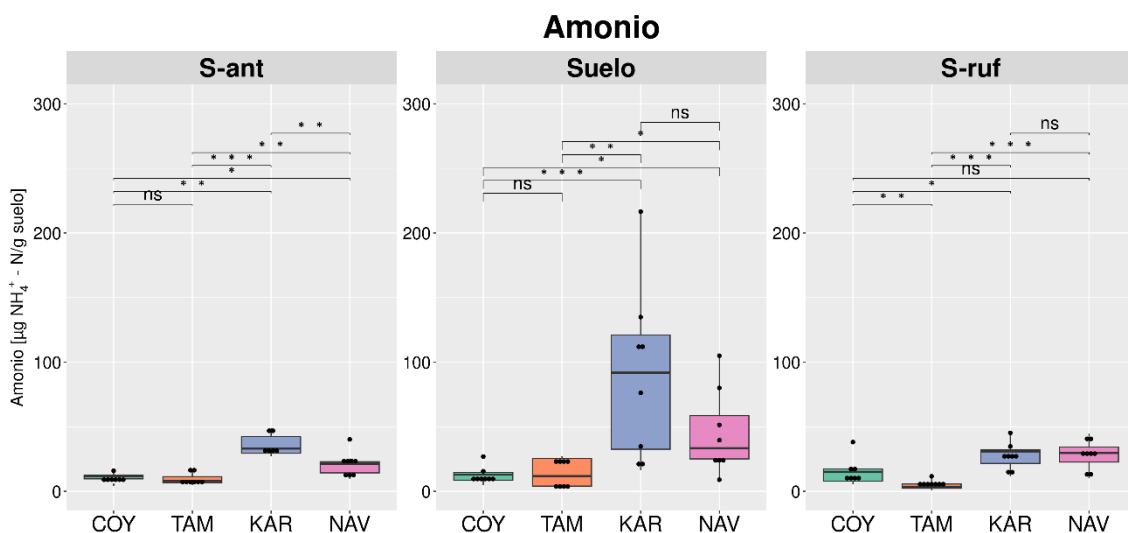


Figura 13. Amonio en los sustratos de *P. antarctica* (S-ant), los sustratos de *P. rufescens* (S-ruf) y los suelos aledaños, comparando los cuatro sitios de estudio. Diferencias significativas según la prueba de Wilcoxon Mann Whitney (ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

3.2.5. Determinación de nitrato

Para el contenido de nitrato, se observó que este varió desde 60 $\mu\text{g NO}_3^- \text{-N/g}$ suelo (sustratos de *P. rufescens* en COY) hasta los 300 $\mu\text{g NO}_3^- \text{-N/g}$ suelo (sustratos de *P. rufescens* en NAV) (Fig. 14). En general, la variabilidad de las muestras de suelo fue mayor a la de los sustratos en KAR y NAV, mientras que en los sitios de la Región de Aysén se observó lo contrario. A pesar de que no hubo diferencias significativas entre los sustratos y suelos, los mayores contenidos de nitrato se encontraron en los sustratos de *P. antarctica* en COY, TAM y KAR, mientras que en NAV los mayores contenidos se observaron en los sustratos de *P. rufescens*.

Al comparar entre sustratos de las diferentes especies de líquen se observaron niveles significativamente mayores (*: $p \leq 0,05$) de nitrato en los sustratos de *P. antarctica* comparado con los de *P. rufescens* en el sitio de TAM, mientras que NAV mostró la tendencia contraria (**: $p \leq 0,01$).

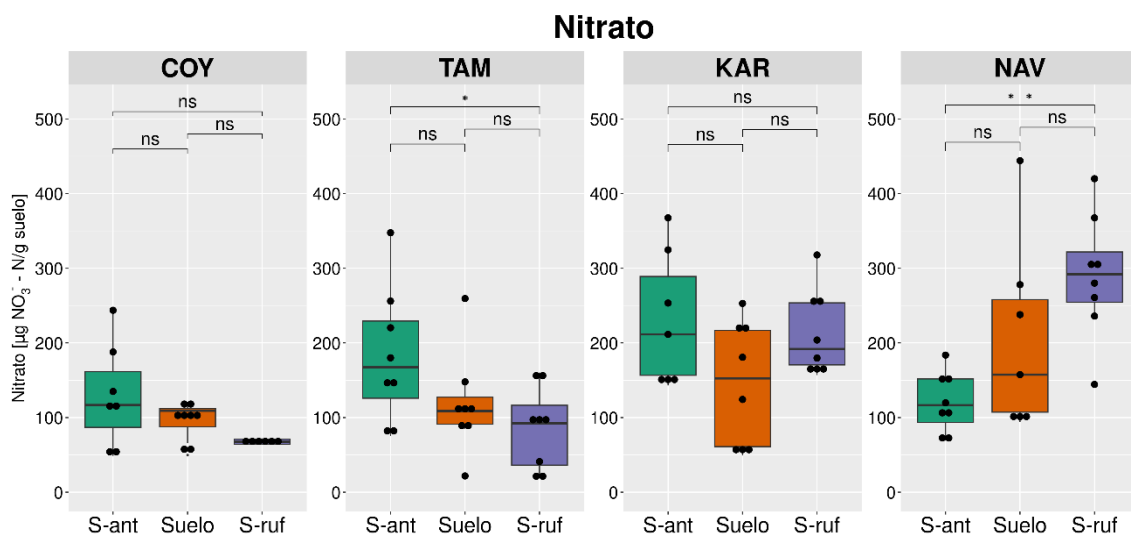


Figura 14. Nitrato en los sustratos de *P. antarctica* (S-ant), los sustratos de *P. rufescens* (S-ruf) y los suelos aledaños, para cada sitio de estudio. Diferencias significativas según la prueba de Wilcoxon Mann Whitney (ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

De la comparación del contenido de nitrato entre sitios, en los suelos no se observaron diferencias significativas (Fig. 15). Sin embargo, el contenido de nitrato en los sitios de la Región de Magallanes (KAR y NAV) fue mayor a los de la Región de Aysén (COY y TAM). Los sustratos de *P. rufescens* siguieron la misma tendencia, pero mostraron diferencias significativas entre los sitios de las Regiones de Magallanes y Aysén. En los sustratos de *P. antarctica*, en KAR hubo niveles significativamente mayores que los encontrados en los sitios de COY y NAV (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$, respectivamente).

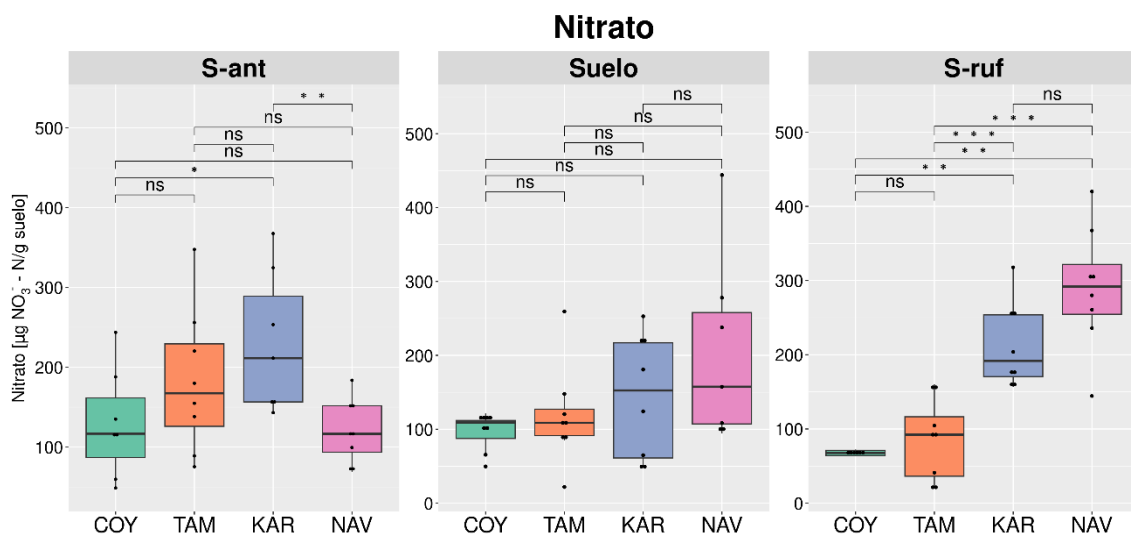


Figura 15. Nitrato en los sustratos de *P. antarctica* (S-ant), los sustratos de *P. rufescens* (S-ruf) y los suelos aledaños, comparando los cuatro sitios de estudio. Diferencias significativas según la prueba de Wilcoxon Mann Whitney (ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

3.2.6. Determinación de fósforo Olsen

Los mayores contenidos de P-Olsen se encontraron en los suelos y sustratos de KAR, con valores promedio cercanos a 100 µg P/g suelo (Fig. 16). En los demás sitios el contenido de P no superó los 50 µg P/g suelo. Las muestras más heterogéneas se encontraron en KAR, siendo el grupo suelo el de mayor variabilidad. Al comparar entre sustratos y suelos aledaños, se observó que sólo en TAM hubo contenidos significativamente mayores en los sustratos de *P. antarctica* comparado con el suelo (*: $p \leq 0,05$). Por otro lado, se pudo observar que no hubo diferencias significativas al comparar entre los sustratos de las diferentes especies de líquen.

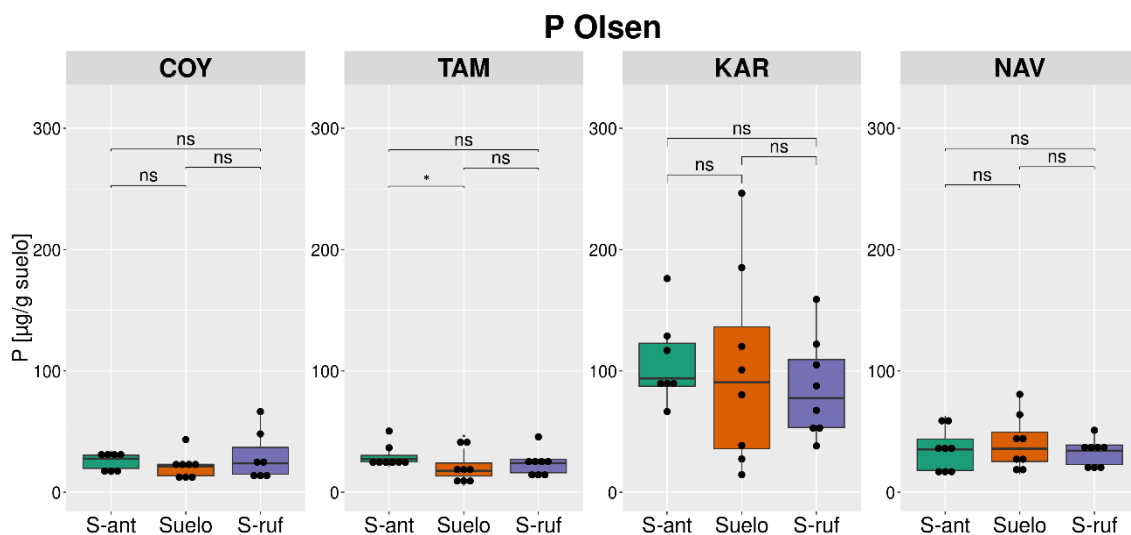


Figura 16. Fósforo biodisponible (P-Olsen) en los sustratos de *P. antarctica* (S-ant), los sustratos de *P. rufescens* (S-ruf) y los suelos aledaños, para cada sitio de estudio. Diferencias significativas según la prueba de Wilcoxon Mann Whitney (ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

Al comparar el contenido de P-Olsen entre sitios, se observó que en ambos sustratos los mayores niveles de P se presentaron en KAR (Fig. 17). En el grupo de los suelos, el contenido de P fue mayor en los sitios de la Región de Magallanes (NAV y KAR) comparado a los de la Región de Aysén (COY y TAM).

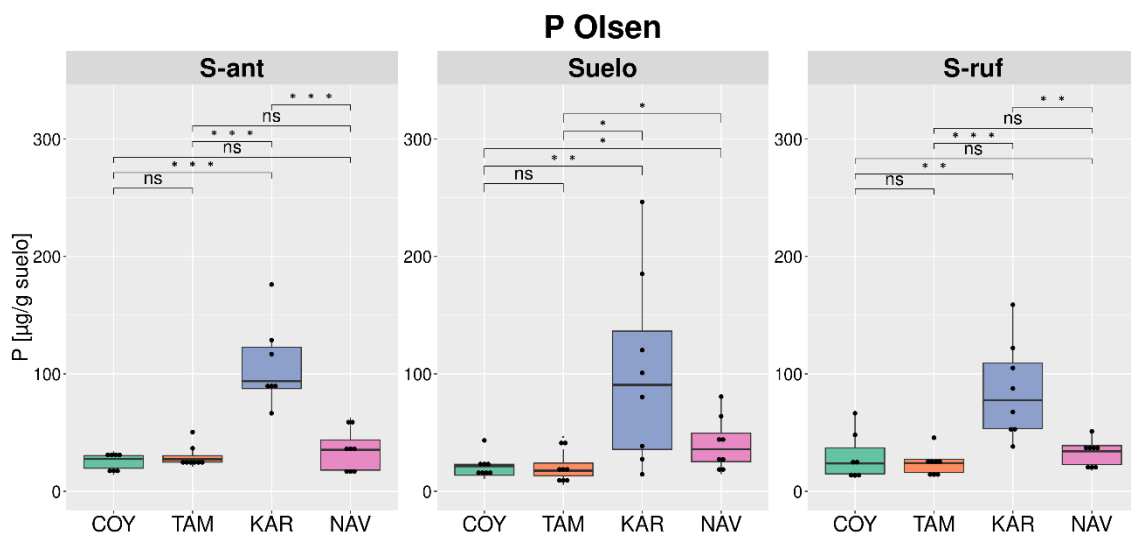


Figura 17. Fósforo biodisponible (P-Olsen) en los sustratos de *P. antarctica* (S-ant), los sustratos de *P. rufescens* (S-ruf) y los suelos aledaños, comparando los cuatro sitios de estudio. Diferencias significativas según la prueba de Wilcoxon Mann Whitney (ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

3.3. Análisis multivariados

Debido a la dificultad de encontrar tendencias claras analizando los resultados de las determinaciones de los parámetros edáficos por separado, se llevaron a cabo análisis multivariados de componentes principales (PCA) con su correspondiente PERMANOVA y comparaciones pareadas. Estos análisis lograron explicar entre un 64,8% a un 70,8% de la varianza dependiendo del sitio. Al analizar las muestras de sustratos líquénicos y suelos dentro de cada sitio se pudo observar que todos los sustratos fueron significativamente diferentes a sus suelos aledaños, excepto en el sitio de TAM (Fig. 18, Tabla Anexo 2). Por otro lado, al comparar entre los sustratos de las dos especies de líquenes, sólo en NAV se encontraron diferencias significativas según la especie, mientras que en el resto de los sitios ambos sustratos fueron similares.

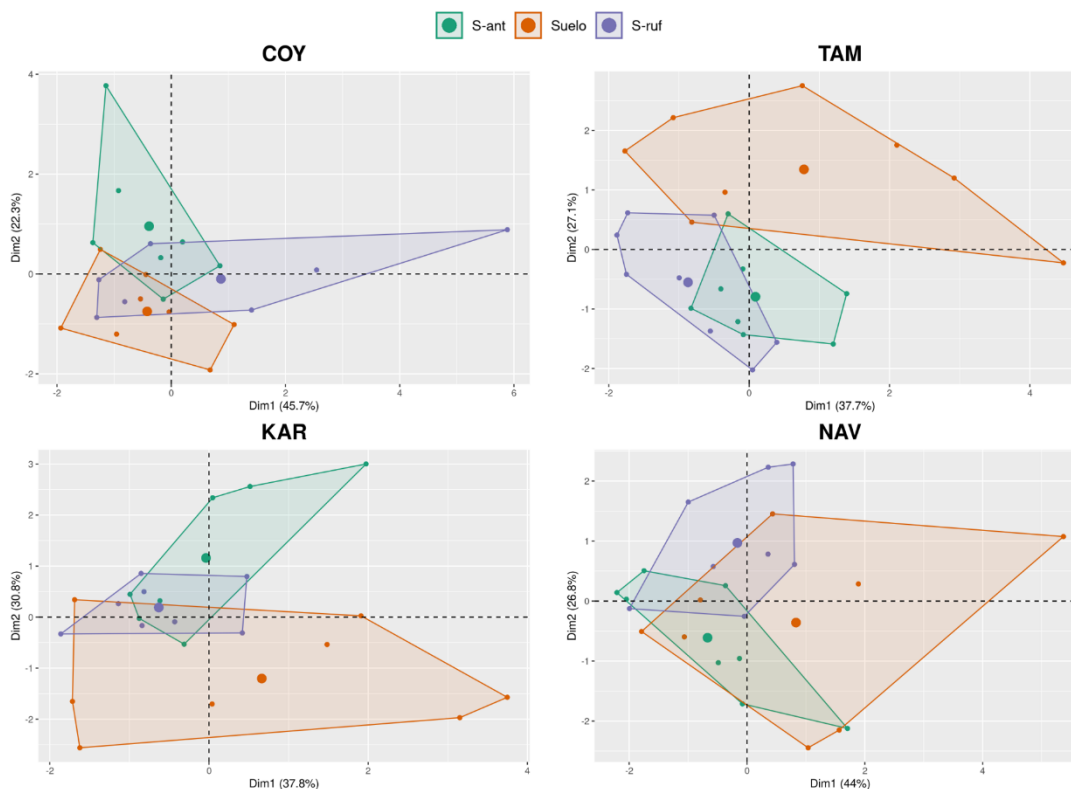


Figura 18. Análisis de componentes principales (PCA) de las determinaciones de los parámetros edáficos en los sustratos de *P. antarctica*, los sustratos de *P. rufescens* y los suelos aledaños, para cada sitio de estudio.

Finalmente, para determinar los factores que estarían influenciando los parámetros edáficos en las muestras de sustratos liquénicos, se llevó a cabo un PCA y PERMANOVA excluyendo las muestras de suelos aledaños (Fig. 19). El análisis explicó un 85,5% de la varianza y se pudo observar que el sitio tuvo un efecto significativo ($p = 0,001$) sobre la separación de las muestras, mientras que el efecto de la identidad del micobionte no fue significativo ($p = 0,621$).

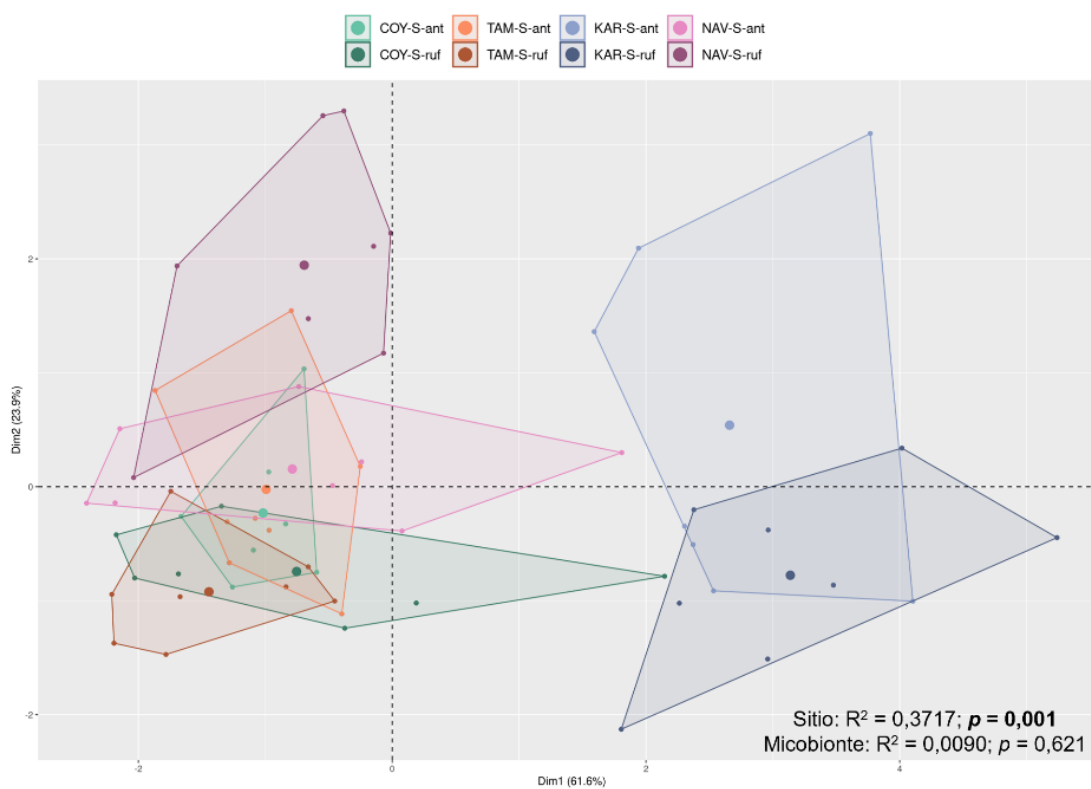


Figura 19. Análisis de componentes principales (PCA) de las determinaciones de los parámetros edáficos en los sustratos de *P. antarctica* y *P. rufescens* en los cuatro sitios de estudio. Se indican los resultados del análisis PERMANOVA.

IV. DISCUSIÓN

4.1. Optimización de las determinaciones analíticas considerando la masa mínima de muestra a utilizar

Los protocolos estandarizados para el estudio fisicoquímico de suelos consideran utilizar masas de muestra que son superiores a 1 g, alcanzando incluso los 20 g en los casos de pH y CH (Sadzawka y col., 2006; Carter & Gregorich, 2007). Esta cantidad es bastante superior a lo que generalmente se obtiene desde microambientes como los sustratos liquénicos, lo que limita la caracterización de este tipo de muestras. De esta forma, para lograr la determinación de los distintos parámetros edáficos se hace necesario disminuir al mínimo la masa de suelo a utilizar sin perder la representatividad de los resultados, lo que constituye un gran desafío.

4.1.1. Optimización de pH, amonio y nitrato

El pH es uno de los parámetros edáficos que requiere mayor cantidad de muestra según los protocolos estandarizados (Sadzawka y col., 2006; Carter & Gregorich, 2007). En esta optimización se evaluó el efecto de la disminución de la masa en el pH (0,25 g; 0,5 g; 1 g y 2,5 g en una relación suelo:solución de 1:2,5) y se observó que al disminuir la masa de muestra hubo un incremento del CV desde 0,29% hasta un 1,55%. A pesar de que esta variabilidad está dentro del rango aceptado para esta determinación (Sadzawka y col., 2006), el uso de la masa mínima probada (0,25 g) se descartó debido a que el limitado volumen de sobrenadante (~0,6 mL) podría generar inestabilidad de la lectura de pH, además de ser un volumen insuficiente para la posterior determinación de nitrato (uso de electrodo ISE de nitrato). Por otro lado, si bien con la mayor masa de muestra (2,5 g) se encontró el menor CV, esta sigue siendo una cantidad de muestra muy alta en relación con el total disponible, por lo que también se descartó. Teniendo en cuenta que

los CV de las determinaciones con 0,5 g y 1 g fueron similares a la de 2,5 g y que se necesita minimizar el uso de muestra, se decidió a utilizar 0,5 g (CV ~ 0,3%) para las siguientes optimizaciones de pH.

Sin embargo, como los extractos obtenidos para la determinación de pH también se utilizarán para las determinaciones de amonio y nitrato, se debe contar con un volumen de extracto mayor a 2 mL. Al trabajar con 0,5 g de muestra en una relación suelo:solución 1:2,5 no se obtiene sobrenadante suficiente, por lo que además fue necesario probar diluciones mayores, que permitieran obtener más volumen de sobrenadante y así también evitar extractos poco homogéneos o daños en el electrodo (Tan, 1993; Millán-Marrero y col., 2018). Dado que el valor de pH en agua depende de la dilución de la muestra (Carter & Gregorich, 2007), también se debió evaluar el efecto de la relación suelo:solución en la determinación de pH. Las relaciones suelo:solución utilizadas fueron 1:2,5; 1:5; 1:10 y 3:50 y se encontró que a medida que aumentó la dilución se produjo un aumento de pH. Esto era esperable ya que la dilución disminuye la concentración de protones y por lo tanto aumenta el pH de la suspensión (Pellegrini y col., 2016). Por otro lado, el CV de las determinaciones estuvo entre 0,3% y 1,55%, por lo que todas las diluciones se mantuvieron dentro del rango de variabilidad aceptado (Sadzawka y col, 2006).

Para la elección de la relación suelo:solución adecuada se deben tomar en cuenta varias limitantes. No es recomendable diluir demasiado la suspensión ya que se podría subestimar la acidez y además aumentan las probabilidades de que las cuantificaciones de amonio y nitrato se encuentren bajo el LC de sus respectivos métodos. Debido a esto, y a que las diluciones de 3:50 se recomiendan sólo para suelos con CO > 20% (Sadzawka y col, 2006), lo que no fue el caso de la mayoría de las muestras en estudio, se optó por descartar esta relación. Si bien las relaciones 1:5 y 1:10 permiten trabajar

con volúmenes suficientes para todas las determinaciones, al usar 1:5 se obtiene un volumen de sobrenadante que no permitiría realizar una repetición de las mediciones en caso de que fuera necesario. En consecuencia, se optó finalmente por elegir la relación 1:10, cuyo CV (1,46%) está dentro del rango aceptado para esta determinación (Sadzawka y col, 2006) y entrega suficiente volumen de sobrenadante para todas las mediciones.

4.1.2. Optimización de carbono orgánico

Para la determinación del CO, se recomienda disminuir la masa a valores cercanos a 0,2 g cuando las muestras superen el 10% de CO (Sadzawka y col., 2006). Considerando que en praderas del sur de Chile se han reportado valores de CO entre 8% y 20% (Luzio y col., 2010; Hepp & Stolpe, 2014), es altamente probable que los sustratos y suelos aledaños contengan porcentajes de CO >10%. Por lo tanto, para optimizar la masa mínima de muestra se evaluaron masas menores a 0,2 g (0,1 g; 0,125 g y 0,15 g). En el suelo de prueba Santa Rosa se encontró que, al disminuir la cantidad de muestra, hubo un incremento del CV de la determinación (desde 0,74% hasta 66,88%). Al trabajar con 0,1 g se superó significativamente el 7% de CV aceptable (Sadzawka y col., 2006), por lo que se descartó esta masa. Sin embargo, las dos masas de suelo restantes se encontraron dentro del CV aceptable, por lo que la elección de la masa optima se basó en el criterio del contenido de CO.

El análisis de un sustrato liquénico de pradera de referencia reflejó que el contenido de CO fue cercano al 35%. En muestras con un alto contenido de CO (> 30%) existe el riesgo de que se consuma todo el oxidante (dicromato) sin haber completado la reacción de oxidación del CO del suelo, lo que implicaría repetir la determinación ya que la absorbancia medida quedará sobre el límite lineal del método. Es por esto que se

descartó trabajar con la mayor masa de suelo (0,15 g) a pesar de que esta exhibió un CV aceptable, y se seleccionó trabajar con 0,125 g de muestra. No obstante, con esta masa en algunos casos ocurrió igualmente la saturación, por lo que en esas muestras se optó por repetir las determinaciones con una masa de 0,11 g. Por otro lado, con 0,125 g de muestra también se debe tener en cuenta la situación contraria de aquellas muestras con bajo contenido de CO (< 5%), en donde existe el riesgo de que la determinación esté bajo del LC del método, lo que también implicaría perder muestras. Para abordar este problema se logró extender el rango lineal del método usando 1,75 mg C/mL como la concentración más baja en la calibración, en vez de los 10 mg C/mL originalmente descritos en el método. Incluso así, debido a la heterogeneidad de algunos sets, se encontraron muestras en que fue necesario masar más de 0,125 g para poder cuantificar correctamente el CO.

De esta forma, a pesar de todas las optimizaciones realizadas, la cantidad de suelo utilizada no fue la misma para todas las muestras. Considerando que a grandes rasgos los sustratos líquénicos presentan elevados contenidos de CO, pero que a la vez son muy heterogéneos, se recomienda analizar el aspecto físico de las muestras como una guía en la elección de masa. Muestras de color muy claro y/o secas suelen tener menor contenido de CO, por lo que se podría recomendar usar una masa > 0,125 g. Por otro lado, en muestras más oscuras y húmedas, que en general puedan tener un mayor contenido de CO, se recomienda utilizar una masa ~0,11 g.

4.1.3. Optimización de fósforo Olsen

Para la optimización de la determinación del P biodisponible, se consideró que, dentro de los métodos estandarizados, el P-Olsen es el más adecuado para estos sets de muestras. La literatura indica que otros tipos de determinaciones, como el método de

Bray o sus variaciones como Bray 2, pueden sobreestimar significativamente la fracción biodisponible de P, sobre todo en suelos con carácter ácido (Tran y col., 1990; do Carmo, 2005). Además, debido a la posible heterogeneidad de pH de los sustratos y suelos, producto de la variabilidad espacial y geográfica de los sitios, se eligió el método P-Olsen debido a que ha sido recomendado para suelos con un amplio rango de valores de pH (Zalba y col., 2006). Si bien existe el riesgo de que este método pueda sobreestimar esta fracción de P en los suelos más ácidos (Monterroso, 1996; Fernández, 1997), teniendo en cuenta que las muestras en estudio presentaron valores de pH neutros (COY, TAM y NAV) a ligeramente ácidos (KAR), se consideró que esta sobreestimación no sería significativa.

El protocolo estandarizado para la determinación de P Olsen considera utilizar una masa de 2,5 g de suelo, lo que constituye una proporción de muestra muy grande en relación con el total disponible. En algunos trabajos se ha realizado la determinación de P con 1 g de muestra (González, 2021), llegando a disminuir la masa de muestra hasta 0,5 g (Muster, 2019; Veas-Mattheos, 2019; Almendras, 2022). Considerando esto, se evaluó el contenido de P Olsen en una muestra compuesta de sustrato liquénico de pradera, utilizando masas de 0,1 g, 0,25 g y 0,5 g de suelo. Los resultados mostraron que al disminuir la masa de suelo hay un incremento en el CV. Con 0,1 g de muestra se obtuvieron valores de CV superiores a la variabilidad aceptada para el método (Sadzawka y col., 2006), por lo tanto, se descartó utilizar esta masa. Las dos masas restantes presentaron CV aceptables, pero dado que se busca disminuir al mínimo la masa de muestra, se seleccionó trabajar con 0,25 g.

En conjunto, todas las optimizaciones requirieron extensos tiempos de trabajo, debido a los desafíos particulares de cada método y la heterogeneidad intrínseca del suelo. A pesar de esto, todas las masas de suelo para las determinaciones fueron seleccionadas

respetando los criterios de variabilidad aceptables para cada método y a la vez minimizando el uso de la masa de suelo, lo que permitió obtener resultados representativos y confiables. Además, se logró maximizar la eficiencia en el uso de la muestra, determinando primero el CH y utilizando la muestra seca para las siguientes determinaciones; y cuantificando pH, amonio y nitrato a partir de un mismo extracto. De esta forma, la masa utilizada para todas las determinaciones fue de ~2,5 g.

4.2. Determinación de parámetros edáficos en sustratos liquénicos y suelos aledaños

Los estudios que caracterizan las propiedades fisicoquímicas de sustratos liquénicos son escasos. La mayoría de los trabajos han estudiado suelos aledaños a los líquenes y han logrado encontrar correlaciones entre las características de los suelos y la composición de especies de líquenes y sus metabolitos secundarios (Zraik y col., 2018); así como que los líquenes tienen un efecto positivo en la estabilidad del suelo (Tunç & Dögan, 2022). Otros estudios han analizado los sustratos de costras biológicas, complejas comunidades compuestas de líquenes, musgos y otros microorganismos del suelo como cianobacterias, hongos y algas; encontrando que el desarrollo de las costras biológicas afecta las características fisicoquímicas de los sustratos, principalmente el CH, el CO y el contenido de N (Chamizo y col., 2012).

Los pocos estudios que existen en donde se han analizado específicamente los sustratos liquénicos de especies de *Peltigera* se han enfocado principalmente en analizar el contenido de P y sus fracciones (Veas-Mattheos, 2019; Almendras, 2022). Estos estudios han reportado que los sustratos de líquenes creciendo en bosques contienen mayores niveles de P biodisponible, lábil y moderadamente lábil, en comparación a los sustratos de líquenes creciendo en praderas. Además, se ha propuesto que los líquenes

y sus sustratos podrían actuar como un amortiguador ambiental del efecto de la composición vegetal del sitio sobre las bacterias involucradas en el ciclo del P (Muster y col., 2022). Todos estos antecedentes refuerzan la necesidad de contar con mayores estudios en los sustratos liquénicos que permitan mejorar el entendimiento del efecto de los líquenes sobre las características del suelo y de sus comunidades bacterianas.

4.2.1. Determinación del contenido hídrico

Las determinaciones de los parámetros edáficos mostraron que todos los suelos aledaños sin influencia del liquen contuvieron niveles significativamente mayores de CH que las muestras de sustratos liquénicos (~25-125% vs ~10%), lo que podría sugerir que el liquen estaría influyendo sobre la humedad de los sustratos. Sin embargo, se debe considerar una posible subestimación del CH en los sustratos, debido a que estos fueron previamente secados para reducir la humedad y evitar la pudrición de los líquenes. A pesar de que esta subestimación se podría evitar al separar una fracción de los sustratos liquénicos previo al secado, en la práctica esto es difícil de llevar a cabo debido a la gran cantidad de muestras que se recolectan y al escaso tiempo disponible. Aun así, en terreno se pudo observar cualitativamente que los suelos fueron más húmedos que los sustratos, lo que respaldaría los resultados obtenidos.

Todos los organismos, incluidos los líquenes, necesitan agua para sus diferentes procesos metabólicos. Específicamente los líquenes se destacan por ser organismos poiquilohídricos, es decir, son incapaces de mantener su nivel de agua constante y por lo tanto este varía pasivamente con las condiciones ambientales circundantes. A pesar de esto, se ha descrito que los cianolíquenes tienen altas capacidades de retención de agua en su estructura (Carballal y col. 2006). De esta forma, la menor humedad encontrada en los sustratos se podría explicar debido a la alta capacidad de *Peltigera* de

absorber agua desde el suelo, lo que a su vez también podría influir en la diversidad de sus comunidades bacterianas.

Aunque la presencia del líquen podría estar disminuyendo el contenido de agua disponible en los sustratos, se debe considerar que esta es una variable edáfica que ha sido descrita como inherente al tipo de suelo (Salcedo-Pérez y col., 2007). Por lo tanto, depende de las condiciones ambientales (precipitaciones u otros ingresos de agua al sistema, la cobertura vegetal y la temperatura ambiente del sitio) y de las propiedades del suelo (como contenido de arcillas y materia orgánica); así como también de la pendiente del terreno, ya que esta afecta los procesos de infiltración, drenaje y escorrentía (Reid, 1973; Nyberg, 1996; Gómez-Plaza, 2000).

Al comparar el CH entre los sitios, KAR se destacó por ser el más húmedo, tanto en los suelos como en los sustratos. Este sitio contuvo los mayores niveles de CO, lo que podría explicar en parte los mayores CH encontrados. La presencia del CO incrementaría la retención de humedad en el suelo mediante las interacciones que se forman entre el agua y los grupos carboxílicos y fenólicos de las sustancias húmicas (Usharani, 2019; Anaya y col., 2016), así como producto de su participación en la interacción entre los materiales orgánicos y minerales del suelo mediante puentes de hidrógeno, lo que implicaría la formación de agregados del suelo (Izquierdo & Arévalo, 2021). A su vez, estos agregados favorecerían la presencia de poros que podrían aportar en la retención de agua en casos de episodios de saturación (Gupta & Larson, 1979; FAO, 2017).

4.2.2. Determinación de pH

El pH es un parámetro importante al estudiar los suelos, ya que se relaciona directamente con la disponibilidad y solubilidad de nutrientes como el N y el P. También influye en la reactividad del C orgánico y en el régimen de salinidad del suelo, pudiendo

imponer restricciones fisiológicas al crecimiento de las comunidades bacterianas. Específicamente, se ha demostrado que la composición de la comunidad bacteriana se correlaciona con los niveles de pH en el suelo. Por ejemplo, se ha visto que la abundancia relativa de bacterias del filo *Acidobacteriota* aumenta al disminuir el pH, mientras que se observa lo contrario para *Actinobacteriota* (Lauber y col., 2009). Esto podría explicar los cambios en la abundancia de estos filos que se observan al comparar el microbioma de talos y sustratos (Pezoa, 2021; Leiva y col., 2021; Almendras, 2022; Veas-Mattheos, 2022; Valenzuela y col., 2022), en donde *Acidobacteriota* es más abundante en los sustratos y *Actinobacteriota* es más abundante en los talos. De esta forma, se podría inferir que el microambiente generado por el líquen sería menos ácido en comparación a los sustratos.

Al comparar los valores de pH de sustratos y suelos, en el único sitio en el que se encontraron diferencias significativas fue TAM. Sin embargo, hay que considerar que las muestras de los otros sitios fueron más variables, lo que podría estar enmascarando las diferencias. Los valores promedio de pH en COY y NAV fueron mayores en los sustratos que en suelos, contrario a la tendencia observada en TAM; mientras que en KAR los valores de pH de los sustratos de *P. rufescens* fueron menores que los encontrados en los sustratos de *P. antarctica* y los suelos aledaños. Estos resultados sugieren que *Peltigera* podría estar modificando el pH de los sustratos, probablemente mediante una mayor o menor exudación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular (Adeleke y col., 2017). También se puede considerar que los procesos de nitrificación y desnitrificación podrían influir en los valores de pH de los suelos (Gundersen & Rasmussen, 1990).

Al comparar el pH entre sitios, en KAR se pudieron observar valores significativamente más ácidos, comparado con los demás sitios en donde se encontraron valores más neutrales. Además, en KAR también se encontraron los mayores contenidos de CO y de

CH. Estas dos últimas variables podrían estar influyendo en el pH mediante la degradación de la materia orgánica del suelo, con la consecuente liberación de grupos ácidos como ácidos carboxílicos, fenoles y aminas, los que contribuyen a la liberación de H^+ a los suelos (Gmach y col., 2020).

4.2.3. Determinación de carbono orgánico

En general, se ha definido al CO del suelo como todo el C que puede entrar al sistema suelo por medio de la descomposición parcial de cualquier componente que ha sido producido por organismos vivos (FAO, 2017). Sin embargo, en la cuantificación, es difícil caracterizar la composición de todo el CO que hay en una muestra con sólo una técnica analítica (Silfverberg, 1957). Se ha planteado que los métodos basados en digestiones húmedas pueden subestimar el contenido de material orgánico del suelo debido a que la oxidación no es completa, siendo necesario aplicar factores de corrección en esta determinación (Walkley & Black, 1934; Nelson & Sommers, 1996). No obstante, dado que este trabajo tiene fines ecológicos, esta metodología es adecuada, ya que cuantifica el C fácilmente oxidable, siendo esta fracción la de mayor interés biológico.

Se ha planteado que un mayor contenido de materia orgánica podría incrementar la actividad microbiana del suelo (Andriulo & Irizar, 2017; Pardo-Plaza y col., 2019). Esto es interesante de analizar, debido a que el alto contenido de CO presente en las praderas estudiadas podría favorecer el asentamiento y reproducción de los líquenes, ya que, con mayor materia orgánica y diversidad microbiana en el sistema, las posibilidades del liquen para desarrollarse se verían favorecidas (Spribille y col., 2022). Aunque no se encontraron diferencias significativas, los niveles de CO en los sustratos fueron mayores al de los suelos. Esto sugiere que la presencia del liquen estaría incrementando el contenido de CO del sustrato en que se encuentra, probablemente debido a la fijación

de C mediante la fotosíntesis, la exudación de metabolitos secundarios y la degradación de partes viejas del talo liquénico (Fujii y col., 2013). Por otro lado, estos resultados también se podrían relacionar al hecho de que en sustratos y suelos se ha reportado mayor diversidad bacteriana en comparación a los talos (Leiva, 2021; Pezoa, 2021; Almendras, 2022; Veas-Mattheos, 2022). Es probable que los altos niveles de CO lábil en los sustratos y suelos incrementen la diversidad microbiana de estos.

Al comparar entre sitios, se pudo observar que todas las muestras de KAR presentaron niveles significativamente mayores de CO en comparación a los otros sitios en estudio. Previamente se han reportado altos contenidos de CO (>20%) en este sitio, además de bajas pendientes (1% a 3%) (Luzio y col., 2010), lo que podría estar disminuyendo la pérdida del CO del suelo por escorrentía en este sitio en particular. Además, a diferencia de los otros sitios, la pradera de KAR era la más cercana a densos bosques de *Nothofagus*, lo que podría favorecer el transporte de material orgánico desde el bosque hacia las praderas.

4.2.4. Determinación de amonio y nitrato

Los líquenes y su microbioma contribuyen de manera significativa al ciclo del N. Los cianobiontes de líquenes *Peltigera* son cianobacterias del género *Nostoc*, las cuales tienen la capacidad de fijar N atmosférico. Por otro lado, también se ha visto que las bacterias asociadas a estos líquenes tienen el potencial de fijar N y además pueden estar involucrados en otras etapas del ciclo, como la mineralización, nitrificación o desnitrificación (Almendras y col., 2018b, Valenzuela y col., 2022). Adicionalmente, algunas bacterias involucradas en la simbiosis pueden degradar partes viejas del talo liquénico y así obtener N a costos energéticos menores comparado con la fijación (Grube y col., 2015).

El N orgánico (parte de la materia orgánica del suelo) también puede ser una fuente de amonio y nitrato, las cuales son formas minerales asimilables por especies vegetales y microorganismos (Robbins, 1937; Lin & Stewart, 1997). En este trabajo se pudo observar que en los suelos aledaños se encontró mayor contenido de amonio comparado con los sustratos liquénicos. Esto puede deberse a que en los sustratos podría existir una mayor abundancia de microorganismos (asociados a la presencia del líquen), en comparación a los suelos, los que podrían estar transformando el amonio en nitrato. Por otro lado, se encontró que la mayoría de los sustratos liquénicos presentaron mayor contenido de nitrato comparado a los suelos aledaños, lo que refuerza la idea de que la nitrificación se vería favorecida en los sustratos. Además, en algunos sitios se encontraron diferencias significativas en los niveles de amonio y nitrato entre los sustratos de las dos especies de líquen, lo que podría deberse a diferencias en la abundancia de los gremios cicladores de N asociados a cada especie (Serey, 2022).

Al comparar el contenido de amonio entre sitios, se pudo observar que, tanto en los suelos como en los sustratos, los sitios de la Región de Magallanes (KAR y NAV) contuvieron mayores niveles de amonio. Esto se podría relacionar con los mayores contenidos de CO encontrado en estos sitios, lo que podría incrementar los niveles de amonio provenientes de la degradación del material orgánico, y además favorece la capacidad de intercambio catiónico, lo que contribuiría a una mayor retención del amonio en el suelo (Cambardella, 2005). Al comparar los niveles de nitrato entre sitios se pudo observar que las muestras no siguieron la misma tendencia respecto a los otros nutrientes. Se ha planteado que las bacterias nitrificantes tienen bajas tasas de crecimiento y son sensibles a factores ambientales como la concentración de amonio, la concentración de oxígeno, la intensidad de la luz, el pH, y los cambios de temperatura

(Kim y col., 2006). Todos estos factores podrían contribuir a incrementar la variabilidad de los niveles de nitrato en los diferentes sitios.

4.2.5. Determinación de fósforo Olsen

Dentro de la simbiosis liquénica, tanto el C como el N serían obtenidos principalmente por el fotobionte mediante la fijación desde la atmósfera (Nash, 2008). Sin embargo, el P, el cual también es un nutriente esencial, debe ser adquirido desde el suelo. En cianolíquenes se ha visto que el P es crucial para el crecimiento, ya que, por ejemplo, una sola inmersión del cianoliquen *Lobaria pulmonaria* en solución de fosfato dobla su crecimiento anual, lo que sugiere que el P es retenido y reciclado dentro del talo (McCune & Caldwell, 2009). Además, se ha observado que la fertilización con P en comunidades de cianolíquenes incrementa la fijación de N en *Peltigera aphthosa* y *Peltigera polydactyla* (Weiss y col., 2005). Se ha sugerido que estos altos requerimientos de P estarían siendo suministrados principalmente por el microbioma bacteriano de los líquenes, mediante la producción y liberación de enzimas y ácidos orgánicos al suelo (Pezoa, 2021; Almendras, 2022; Veas-Mattheos, 2022, Valenzuela y col., 2022; Muster y col., 2022).

Muchas veces la concentración total de P en los suelos es alta, pero la fracción biodisponible es acotada, debido a procesos de adsorción del P a la fracción mineral o su oclusión en minerales secundarios con hierro y aluminio (Borie & Rubio, 2003; Sims & Vadas, 2005). Esto provoca que el P sea un nutriente bastante limitante en los suelos, y que cuando se encuentra biodisponible sea rápidamente demandado por plantas y microorganismos (Sims & Pierzynski, 2005). El P biodisponible en el suelo puede estar presente mayoritariamente como ortofosfatos, aunque el P microbiano y el P orgánico

son reservorios que pueden convertirse rápidamente en P biodisponible (Veas-Mattheos, 2022; Tapia-Torres & García-Oliva, 2013).

En este trabajo, no se observaron diferencias significativas en los contenidos de P biodisponible entre sustratos y suelos, ni entre los sustratos de las dos especies de líquenes. Algunos antecedentes sobre la diversidad bacteriana de los gremios solubilizadores de P en suelos y sustratos asociados a líquenes, han reportado que las bacterias solubilizadoras de P son similares entre los sustratos y suelos, pero con algunas diferencias en su composición (Pezoa, 2021; Veas-Mattheos, 2022). Sin embargo, dado que no se encontraron diferencias significativas en el nivel de P biodisponible entre estos dos microambientes, se podría inferir que a pesar de que la diversidad de bacterias es distinta, se alcanzan niveles de solubilización similares en ambas muestras.

Al comparar el contenido de P entre sitios, se pudo observar que la mayoría de las muestras contuvieron niveles de P menores a 50 $\mu\text{g P/g}$ suelo, excepto las de KAR. Algunos antecedentes de P en otras praderas del sur de Chile cercanas a bosques de *Nothofagus* han reportado que los contenidos de P biodisponible estarían en el rango de 3 a 41 $\mu\text{g P/g}$ (Borie & Rubio, 2003), lo que concuerda con los resultados encontrados en COY, TAM y NAV, pero son menores a los valores encontrados en KAR. Esto podría tener relación con los mayores contenidos de CO encontrados en KAR, ya que, al existir mayor material orgánico, la mineralización de P podría ser mayor, considerando que la materia orgánica es un importante reservorio de P en el suelo (Kertesz & Frossard, 2015).

4.3. Factores que influyen sobre las propiedades fisicoquímicas de los sustratos liquénicos

Al analizar los resultados de las determinaciones por separado no se encontraron muchas diferencias significativas entre las muestras de sustratos liquénicos y suelos aledaños. El único parámetro que mostró diferencias significativas fue el CH, en donde todos los suelos fueron más húmedos que los sustratos. Mientras que, en el resto de las determinaciones, solo se detectaron algunas diferencias en ciertos sitios en particular. Sin embargo, considerando la complejidad de la matriz suelo, en donde todos sus componentes están interconectados entre sí, lo que produce un efecto sinérgico de todas las propiedades, es necesario analizar los resultados en conjunto.

Los análisis multivariados mostraron una clara separación de los sustratos y suelos, lo que se corroboró mediante análisis PERMANOVA. El único sitio en donde esta separación no fue significativa fue en TAM. En general, en este sitio se encontraron los niveles de nutrientes más bajos en comparación al resto de los sitios, por lo que tal vez los valores detectados no fueron suficientes para reflejar diferencias significativas entre los microambientes. Considerando que en el resto de los sitios los sustratos sí se diferenciaron de los suelos, se podría inferir que los líquenes estarían modificando las propiedades fisicoquímicas de los suelos donde crecen. Es sabido que los líquenes tienen un papel clave en la formación del suelo a través de la meteorización física y química; y que mediante la producción de distintas sustancias químicas y liberación de diversas enzimas pueden acelerar el proceso de descomposición de la materia orgánica (Beckett y col., 2013). Además, los líquenes actúan como sumideros de nutrientes, contribuyendo al enriquecimiento de los ambientes con formas orgánicas y minerales producto de la fotosíntesis y de la fijación de N (Kallison, 2021). De esta forma, los líquenes podrían estar modificando el suelo mediante diversos procesos.

Por otro lado, se pudo observar que los sustratos de *P. antarctica* y *P. rufescens* fueron similares entre sí y no se separaron significativamente en ningún sitio de estudio. Además, al excluir del análisis a los suelos y analizar solo los sustratos liquénicos de las dos especies tampoco se encontró que la identidad del micobionte fuera un factor significativo en la separación de las muestras. Esto sugiere que la capacidad de alterar las características edáficas de los suelos sería intrínseca de los líquenes y no dependería de la especie. Estudios previos sobre las comunidades bacterianas asociadas a líquenes *Peltigera* y sus sustratos han encontrado que la especie de líquen es un factor que modula la diversidad de sus microbiomas, posiblemente mediante la exudación de distintos metabolitos secundarios que podrían cambiar las condiciones de los microambientes (Leiva y col., 2016; Almendras, 2022; Serey, 2022). Sin embargo, con estos resultados se puede comprobar que las condiciones fisicoquímicas en los sustratos de ambas especies de líquenes son similares. Por lo tanto, es probable que el micobionte esté modulando las comunidades microbianas asociadas mediante otros procesos de interacción química entre los simbiositos todavía desconocidos (Nazem-Bokaei y col., 2021).

Finalmente, se encontró que el sitio fue el factor que más influyó sobre las características fisicoquímicas de los sustratos. En varios parámetros edáficos se pudo observar que las muestras de los sitios de la Región de Aysén fueron similares entre sí, y se diferenciaron de los sitios de la Región de Magallanes. Esto sugiere que el gradiente latitudinal podría estar afectando las características edáficas, producto de los distintos factores de formación de suelo (material parental, topografía, biota, clima y tiempo) propios de cada sitio (Jenny, 1941; Van Breemen & Buurman, 2002). Si bien los líquenes poseen la capacidad de modificar su entorno, hay que considerar que es difícil que estos puedan alterar significativamente las características intrínsecas del suelo. Por lo tanto, es

razonable que el sitio sea el principal factor que explique las diferencias encontradas en las muestras.

4.4. Proyecciones

En este trabajo se analizaron los parámetros edáficos para muestras de sustratos liquénicos asociados a una especie endémica (*P. antarctica*) y una cosmopolita (*P. rufescens*), y sus respectivos suelos aledaños, en ambientes de pradera de cuatro sitios del sur de Chile. Considerando que los sitios de muestreo son ambientes de praderas aledaños a bosques, sería interesante hacer la comparación entre estos dos tipos de hábitats, para evaluar si influyen más sobre los parámetros edáficos que el sitio.

Dado que en este trabajo se determinaron nutrientes presentes principalmente en la solución suelo y débilmente retenidos a la superficie mineral u orgánica (extracción con agua o bicarbonato de sodio), un aspecto interesante a evaluar sería el uso de otro extractante que permita cuantificar los nutrientes intercambiables (amonio y nitrato). Además, se podrían determinar las fracciones lábiles y moderadamente lábiles de fósforo (formas orgánicas e inorgánicas), e incorporar el análisis de otros nutrientes de interés biológico como el azufre. Esta información sería útil para complementar análisis de estudios de las comunidades microbianas y grupos funcionales presentes en estas muestras. Para ello, sería interesante complementar estos análisis con estudios de actividad enzimática en las muestras, evaluando enzimas asociadas al metabolismo del carbono, nitrógeno y fósforo, para confirmar la importancia de la biodiversidad de estos ambientes en el ciclado de nutrientes.

V. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos en este estudio son el primer reporte de la caracterización fisicoquímica de diversos parámetros edáficos de sustratos de líquenes *Peltigera* en el sur de Chile.
2. En este trabajo se logró la optimización de las determinaciones analíticas para disminuir la cantidad de muestra requerida en las metodologías de uso frecuente en el estudio de suelos, sin perder representatividad de los resultados.
3. Los sustratos liquénicos de *P. antarctica* y *P. rufescens* y sus suelos aledaños se caracterizaron por ser levemente ácidos y contener altos niveles de carbono orgánico, nitrógeno mineral y fósforo biodisponible.
4. En general, los sustratos liquénicos tendieron a contener mayores niveles de nutrientes biodisponibles que los suelos aledaños, y a su vez, los sitios de Karukinka y Navarino (región de Magallanes) presentaron mayores contenidos de nutrientes comparados con los sitios de Coyhaique y Tamango (región de Aysén).
5. Los líquenes estarían alterando las propiedades edáficas de los suelos que habitan, aunque la especie de micobionte no tendría un efecto significativo sobre estas.
6. El sitio fue el principal factor que explicó las diferencias encontradas en las características fisicoquímicas de los sustratos liquénicos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Adamo, P., & Violante, P. (2000). Weathering of rocks and neogenesis of minerals associated with lichen activity. *Applied Clay Science*, 16, 229–256. DOI: 10.1016/S0169-1317(99)00056-3
- Adeleke, R., Nwangburuka, C., & Oboirien, B. (2017). Origins, roles and fate of organic acids in soils: A review. *South African Journal of Botany*, 108, 393–406. DOI: 10.1016/j.sajb.2016.09.002
- Almendras, K., Leiva, D., Carú, M., & Orlando, J. (2018a). Carbon consumption patterns of microbial communities associated with *Peltigera lichens* from a Chilean temperate forest. *Molecules*, 23(11), 2746. DOI: 10.3390/molecules23112746
- Almendras, K., García, J., Carú, M., & Orlando, J. (2018b). Nitrogen-fixing bacteria associated with *Peltigera cyanolichens* and *Cladonia chlorolichens*. *Molecules*, 23(12), 3077. DOI: 10.3390/molecules23123077
- Almendras, K. (2022). Bacterias solubilizadores de fosfato asociadas a talos y sustratos de cianolíquenes *Peltigera* creciendo en un bosque y una pradera de la Reserva Nacional Coyhaique. Tesis de doctorado. Universidad de Chile.
- An, R., & Moe, L. A. (2016). Regulation of pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase activity in the model rhizosphere-dwelling bacterium *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(16), 4955–4964. DOI: 10.1128/AEM.00813-16
- Anaya, C. A., Mendoza, M., Rivera, M., Páez, R., & Olivares-Martínez, L. D. (2016). Contenido de carbono orgánico y retención de agua en suelos de un bosque de niebla en Michoacán, México. *Agrociencia*, 50(2), 251-269. ISSN 2521-9766
- Andriulo, A. E. & Irizar, A. B. (2017). La materia orgánica como indicador base de calidad del suelo. Manual de indicadores de calidad del suelo para las ecorregiones de Argentina. Marcelo G. Wilson - 1a ed. Entre Ríos: Ediciones INTA, 2017. Libro digital, PDF. ISBN 978-987-521-826-0
- Aschenbrenner, I., Cernava, T., Berg, G., & Grube, M. (2016). Understanding microbial multi-species symbioses. *Frontiers in Microbiology*, 7, 180. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00180
- Barker, W. W., & Bandfield, J. F. (1996). Biologically versus inorganically mediated weathering reactions: relationships between minerals and extracellular microbial polymers in lithobiontic communities. *Chemical Geology*, 132, 55-69. DOI: 10.1016/S0009-2541(96)00041-1
- Beckett, R. P., Zavarzina, G., & Liers, C. (2013). Oxidoreductases and cellulases in lichens: Possible roles in lichen biology and soil organic matter turnover. *Fungal Biology*, 117, 431-438. DOI: 10.1016/j.funbio.2013.04.007
- Bermúdez de Castro, F., Müller, A. & Schmitz, M. F. (1990). Líquenes fijadores de nitrógeno atmosférico. *Ecología* 4: 131–141.
- Borie, F., & Rubio, R. (2003). Total and organic phosphorus in Chilean volcanic soils. *Gayana - Botanica*, 60(1), 69–78. DOI :10.4067/S0717-66432003000100011

- Bottomley, P. J., & Myrold, D. D. (2015). Biological N Inputs. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*, 447–470. DOI:10.1016/b978-0-12-415955-6.00015-3
- Cambardella, C. A. (2005). Carbon cycle in soils | Formation and Decomposition. In D. Hillel (Ed.), *Encyclopedia of Soils in the Environment* (pp. 170–175). Elsevier. DOI: 10.1016/B0-12-348530-4/00932-2
- Cantarella, H., Trivelin, P.C.O. & Vitti, A.C. (2007) Nitrogen and sulfur in the sugar cane. In: Yamada, T., Abdalla, S.R.S. and Vitti, G.C., Eds., *Nitrogen and Sulfur in the Brazilian Agriculture*, International Plant Nutrition Institute, Piracicaba, 355-412. DOI: 10.2134/agronj1976.00021962006800060013x
- Carballal, R. & Casares-Porcel, Manuel & Gutiérrez, L & Rowe, Jorge. (2006). Capítulo 7. Introducción a los líquenes.
- Carter, M. R., & Gregorich, E. G. (Eds.). (2007). *Soil Sampling and Methods of Analysis* (2nd ed.). CRC Press. DOI: 10.1201/9781420005271
- Cernava, T., Erlacher, A., Aschenbrenner, I., Krug, L., Lassek, C., Riedel, K., Grube, M., & Berg, G. (2017). Deciphering functional diversification within the lichen microbiota by metaomics. *Microbiome*, 5(1), 82. DOI: 10.1186/s40168-017-0303-5
- Chagnon, P., Magain, N., Miadlikowska, J., & Lutzoni, F. (2019). Species diversification and phylogenetically constrained symbiont switching generated high modularity in the lichen genus *Peltigera*. *Journal of Ecology*, 107(4), 1645–1661. DOI: 10.1111/1365-2745.13207
- Chamizo, S., Cantón, Y., Miralles, I., & Domingo, F. (2012). Biological soil crust development affects physicochemical characteristics of soil surface in semiarid ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 49, 96–105. DOI: 10.1016/j.soilbio.2012.02.017
- Chen, J., Blume, H. P., & Beyer, L. (2000). Weathering of rocks induced by lichen colonization - a review. *Catena*, 39, 121-146. DOI: 10.1016/S0341-8162(99)00085-5
- do Carmo, M. (2005). La disponibilidad de fósforo evaluada por el método de Olsen en suelos ácidos de Portugal: significado agronómico y ambiental. Tesis de Doctorado, Universidad de Córdoba.
- FAO. (2017). *Carbono Orgánico del Suelo: el potencial oculto*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura Roma, Italia. <https://www.fao.org/3/i6937s/i6937s.pdf>
- Fernández, M. (1997). Evaluación en cámara de crecimiento de tres métodos de determinación de fósforo asimilable en suelos no calcáreos. *Boletín de la Sociedad Española de la Ciencia del Suelo* (N°3-1): 189-203.
- Fujii, K., Morioka, K., Hangs, R., Funakawa, S., Kosaki, T. & Anderson, D. W. (2013). Rapid turnover of organic acids in a Dystric Brunisol under a spruce–lichen forest in northern Saskatchewan, Canada. *Canadian Journal of Soil Science*. 93(3): 295-304. DOI: 10.4141/cjss2012-108
- Gmach, M. R., Cherubin, M. R., Kaiser, K., & Cerri, C. E. P. (2020). Processes that influence dissolved organic matter in the soil: a review. *Scientia Agricola*, 77(3). DOI: 10.1590/1678-992x-2018-0164

- Gómez-Plaza, Antonio (2000). Variabilidad espacio temporal del contenido de humedad del suelo en una zona mediterránea semiárida: efectos de las condiciones antecedentes en la respuesta hidrológica. Tesis Doctoral, E.T.S.I. Montes (UPM). DOI: 10.20868/UPM.thesis.709
- González, M. (2021). Efecto de ácidos orgánicos de bajo peso molecular (AOBPM) en la solubilización de fósforo en depósitos volcánicos de diferentes edades. Tesis de Magíster. Universidad de Chile.
- Görres, J. H., & Amador, J. A. (2005). Spatial Patterns. In D. Hillel (Ed.), *Encyclopedia of Soils in the Environment* (pp. 562–570). Elsevier. DOI: 10.1016/B0-12-348530-4/00169-7
- Grimm, M., Grube, M., Schiefelbein, U., Zühlke, D., Bernhardt, J., & Riedel, K. (2021). The Lichens' Microbiota, Still a Mystery? *Frontiers in Microbiology*, 12, 623839. DOI: 10.3389/fmicb.2021.623839
- Grube, M., Cardinale, M., Viera de Castro Jr, J., Müller, H., & Berg, G. (2009). Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. *The ISME Journal*, 3, 1105–1115. DOI: 10.1038/ismej.2009.63
- Grube, M., Cernava, T., Soh, J., Fuchs, S., Aschenbrenner, I., Lassek, C., Wegner, U., Becher, D., Riedel, K., Sensen, C., & Berg, G. (2015). Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. *The ISME Journal*, 9, 412–424. DOI: 10.1038/ismej.2014.138
- Gundersen, P., & Rasmussen, L. (1990). Nitrification in Forest Soils: Effects from Nitrogen Deposition on Soil Acidification and Aluminum Release. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 1–45. DOI:10.1007/978-1-4612-3366-4_1
- Gupta, S. & Larson, W. (1979). Estimating Soil Water Retention Characteristics From Particle Size Distribution, Organic Matter Percent, and Bulk Density. *Water Resources Research - Water Resources Research* 15. 1633-1635. DOI: 10.1029/WR015i006p01633.
- Guschina, I., Dobson, G., & Harwood, J. (2003). Lipid metabolism in cultured lichen photobionts with different phosphorus status. *Phytochemistry*, 64(1), 209–217. DOI: 10.1016/S0031-9422(03)00279-6
- Hepp K., Christian y Stolpe B., Neal (2014) Caracterización y propiedades de los suelos de la Patagonia Occidental (Aysén) [en línea]. Coyhaique, Chile: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 298. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/7793> (Consultado: 26 noviembre 2022).
- Horwath, W. (2015). Chapter 12 - Carbon Cycling: The Dynamics and Formation of Organic Matter. In E. A. Paul (Ed.), *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (Fourth Edition) (pp. 339–382). Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-415955-6.00012-8
- Izquierdo, J. & Arévalo, J. (2021). Determinación de la materia orgánica del suelo (MOS) por el método químico y por calcinación. *Revista Ingeniería y Región* Vol. 26 Julio-Diciembre 2021/ Universidad Surcolombiana. DOI: 10.25054/22161325.2527
- Jackson, T. A. (2015). Weathering, secondary mineral genesis, and soil formation caused by lichens and mosses growing on granitic gneiss in a boreal forest environment. *Geoderma*, 251-252, 78-91. DOI: 10.1016/j.geoderma.2015.03.012

- Jenny, H. (1941) *Factors of Soil Formation: A System of Quantitative Pedology*. McGraw-Hill Book Company Inc., New York. DOI: 10.2134/agronj1941.00021962003300090016x
- Kallison, E. R. (2021). A Review of the Contributions by Lichen to Building Soil. *IdeaFest: Interdisciplinary Journal of Creative Works and Research from Humboldt State University*: Vol. 5, Article 1. Available at: <https://digitalcommons.humboldt.edu/ideafest/vol5/iss1/1>
- Kandeler, E., & Gerber, H. (1988). Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*, 6(1), 68–72. DOI: 10.1007/BF00257924
- Kertesz, M. A., Frossard, E. (2015). Chapter 16 - Biological Cycling of Inorganic Nutrients and Metals in Soils and Their Role in Soil Biogeochemistry, Editor(s): Eldor A. Paul, *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Fourth Edition)*, Academic Press, Pages 471-503, ISBN 9780124159556, DOI: 10.1016/B978-0-12-415955-6.00016-5.
- Kim, D. J., Lee, D. I., & Keller, J. (2006). Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. *Bioresource Technology*, 97(3), 459–468. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.03.03
- Kishore, N., Pindi, P., & Reddy, R. (2015). Phosphate-Solubilizing Microorganisms: A Critical Review. In: Bahadur B., Venkat Rajam M., Sahijram L., Krishnamurthy K. (Eds.), *Plant Biology and Biotechnology*. Springer, New Delhi. DOI: 10.1007/978-81-322-2286-6_12
- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., & Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15), 5111–5120. DOI: 10.1128/aem.00335-09
- Leiva, D., Clavero-León, C., Carú, M., & Orlando, J. (2016). Intrinsic factors of *Peltigera* lichens influence the structure of the associated soil bacterial microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(11), fiw178. DOI: 10.1093/femsec/fiw178
- Leiva, D., Fernández-Mendoza, F., Acevedo, J., Carú, M., Grube, M., & Orlando, J. (2021). The bacterial community of the foliose macro-lichen *Peltigera frigida* is more than a mere extension of the microbiota of the subjacent substrate. *Microbial Ecology*, 81, 965–976. DOI: 10.1007/s00248-020-01662-y
- Li, Z., Tian, D., Wang, B., Wang, J., Song, W., Xu, X., Wang, C., He, N., & Niu, S. (2018). Microbes drive global soil nitrogen mineralization and availability. *Global Change Biology*. 25. DOI:10.1111/gcb.14557.
- Liba, C., Ferrara, F., Manfio, G., Fantinatti-Garboggini, F., Albuquerque, R., Pavan, C., Ramos, P., Moreira-Filho, C., & Barbosa, H. (2006). Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *Journal of Applied Microbiology*, 101(5), 1076–1086. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03010.x
- Lin, J. T., & Stewart, V. (1997). Nitrate Assimilation by Bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 1–30. DOI:10.1016/s0065-2911(08)60014-4
- Luzio L., W., Casanova Pinto, M. y Seguel Seguel, Ó. (2010). *Suelos de Chile*. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/182305>

- Martínez, I., Burgaz, A., Vitikainen, O., & Escudero, A. (2003). Distribution patterns in the genus *Peltigera* Willd. *Lichenologist*, 35(4), 301–323. DOI: 10.1016/S0024-2829(03)00041-0
- McCune, B., & Caldwell, B. (2009). A single phosphorus treatment doubles growth of cyanobacterial lichen transplants. *Ecology*, 90(2), 567–570. DOI: 10.1890/08-0344.1
- McGrath, J., Chin, J., & Quinn, J. (2013). Organophosphonates revealed: New insights into the microbial metabolism of ancient molecules. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 412–419. DOI: 10.1038/nrmicro3011
- Merrick, M.J., Edwards, R.A. (1995). Nitrogen control in bacteria. *Microbiology Reviews* 59(4):604-22. DOI: 10.1128/mr.59.4.604-622.1995.
- Miadlikowska, J., & Lutzoni, F. (2000). Phylogenetic revision of the genus *Peltigera* (lichen-forming Ascomycota) based on morphological, chemical, and large subunit nuclear ribosomal DNA data. *International Journal of Plant Sciences*, 161(6), 925–958. DOI: 10.1086/317568
- Millán-Marrero, F. C., Prato, J. G., La Cruz, Y., & Sánchez, A. (2018). Estudio metodológico sobre la medición de pH y conductividad eléctrica en muestras de compost. *Revista Colombiana de Química*, 47(2), 21–27. DOI: 10.15446/rev.colomb.quim.v47n2.67338
- Millbank, J. W. (1984). The use of simulated environments for assessing nitrogen throughput by cyanophylic lichens. En: C. Veegec y W. E. NewtDn (eds.). *Advances in Nitrogen Fixation Research*. Martinus Nijhoff. The Hague. 61. DOI: 10.1007/978-94-009-6923-0_30
- Monterroso, C., Fernández Marcos, M. L., Álvarez, E. (1996). Factors influencing phosphorus adsorption in mine soils in Galicia, Spain. *Science of Total Environment* 180, 137-145. DOI: 10.1016/0048-9697(95)04934-7
- Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31–36. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)88444-5
- Muster, C. (2019). Microorganismos solubilizadores de fosfato asociados a cianolíquenes, sus sustratos y los suelos aledaños en un gradiente de recuperación de bosque nativo de lenga mediante regeneración natural y reforestación con pinos. Tesis de Magister. Universidad de Chile.
- Muster, C., Leiva, D., Morales, C., Grafe, M., Schloter, M., Carú, M., & Orlando, J. (2022). *Peltigera frigida* Lichens and Their Substrates Reduce the Influence of Forest Cover Change on Phosphate Solubilizing Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 13. DOI: 10.3389/fmicb.2022.843490
- Myrold, D.D., (1998). Transformations of Nitrogen. In: Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G., Zuberer, D.A. (Eds.), *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Prentice Hall, Upper Saddle River, pp. 259e294. DOI: 10.1016/B978-0-12-820202-9.00015-0
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., & Renella, G. (2011). Role of Phosphatase Enzymes in Soil. In: Bünemann E., Oberson A., Frossard E. (Eds.), *Phosphorus in Action*. Soil Biology, vol 26. Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-15271- 9_9
- Nash, T. (2008). In: Nash T. (Eds.), *Lichen Biology*. Cambridge University Press, London. DOI: 10.1017/CBO9780511790478

- Nazem-Bokaei, H., Hom, E. F. Y., Warden, A. C., Mathews, S., & Gueidan, C. (2021). Towards a Systems Biology Approach to Understanding the Lichen Symbiosis: Opportunities and Challenges of Implementing Network Modelling. *Frontiers in Microbiology*, 12. DOI: 10.3389/fmicb.2021.667864
- Nelson, D.W. & Sommers, L.E. (1996). Total Carbon, Organic Carbon, and Organic Matter. In *Methods of Soil Analysis* (eds D. Sparks, A. Page, P. Helmke, R. Loeppert, P.N. Soltanpour, M.A. Tabatabai, C.T. Johnston and M.E. Sumner). DOI: 10.2136/sssabookser5.3.c34
- Norman, R.J. and Stucki, J.W. (1981), The Determination of Nitrate and Nitrite in Soil Extracts by Ultraviolet Spectrophotometry. *Soil Science Society of America Journal*, 45: 347-353. DOI: 10.2136/sssaj1981.03615995004500020024x
- Nyberg, L. (1996), Spatial variability of soil water content in the covered catchment at Gårdsjön, Sweden. *Hydrological Process* 10: 89-103. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1085(199601)10:1<89::AID-HYP303>3.0.CO;2-W
- Olsen, S.R. and Sommers, L.E. (1982) Phosphorus. In: Page, A.L., Ed., *Methods of Soil Analysis Part 2 Chemical and Microbiological Properties*, American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison, 403-430.
- Orlando, J., Almendras, K., Veas-Mattheos, K., Pezoa, M., & Carú, M. (2021). *Peltigera cyanolichens* from Southern Chile. Version 1.4. Laboratory of Microbial Ecology (Laboratorio de Ecología Microbiana) - Universidad de Chile. Occurrence dataset DOI: 10.15468/ef76hj accessed via GBIF.org on 2022-01-08.
- Pardo-Plaza, Y.J., Paolini-Gómez, J.E. & Cantero-Guevara, M.E. (2019). Microbial biomass and basal soil respiration under agroforestry systems with coffee crops. *Rev. U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. Volumen 22 No. 1:e1144 DOI: 10.31910/rudca.v22.n1.2019.1144
- Pellegrini, A. E, Sucunza, F. A, Millán, G., & Vázquez, M. E. (2016). Comparación de metodologías analíticas para diagnosticar suelos con enmiendas básicas en el ámbito templado argentino. *Cienc Suelo (Argentina)* 34(1): 1-12.
- Pezoa, M. (2021). Microorganismos solubilizadores de fosfato y mineralizadores de fósforo asociados a líquenes *Peltigera* del Parque Nacional Patagonia. Tesis de Magíster. Universidad de Chile.
- Reid, I. (1973). The influence of slope orientation upon the soil moisture regime, and its hydrogeomorphological significance. *Journal of Hydrology*, 19(4), 309–321. DOI: 10.1016/0022-1694(73)90105-4
- Robbins, W. J. (1937). The Assimilation by Plants of Various Forms of Nitrogen. *American Journal of Botany*, 24(5), 243–250 DOI: 10.2307/2436609
- Sadzawka, A., Carrasco, M. A., Grez, R., Mora, M. de L. L., Flores, H., & Neaman, A. (2006). Métodos de análisis recomendados para los suelos de Chile. Revisión 2006. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Serie actas INIA N° 34.
- Salcedo-Pérez, E., Galvis-Spinola, A., Hernández-Mendoza, T. M., Rodríguez-Macias, R., Zamora-Natera, F., Bugarin-Montoya, R., & Carrillo-González, R. (2007). la humedad aprovechable y su relación con la materia orgánica y superficie específica del suelo. *Terra Latinoamericana*, 25 (4), 419-425. E-ISSN: 2395-8030

- Serey, N. (2022). Potencial contribución a la obtención de nutrientes por parte de la comunidad bacteriana asociada a cianolíquenes *Peltigera* de una pradera de la Isla Navarino. Seminario de Título. Universidad de Chile.
- Sharma, S., Sayyed, R., Trivedi, M., & Gobi, T. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus, 2, 587. DOI: 10.1186/2193-1801-2-587
- Sigurbjörnsdóttir, M., Andrésón, O., & Vilhelmsson, O. (2015). Analysis of the *Peltigera membranacea* metagenome indicates that lichen-associated bacteria are involved in phosphate solubilization. Microbiology, 161(5), 989–996. DOI: 10.1099/mic.0.000069
- Silfverberg, L. (1957). Chemical determination of soil organic matter. A critical review of existing methods. Royal Swedish Geotechnical Institute Proceedings N°15.
- Sims, T. J., & Pierzynski, G. M. (2005). Chemistry of Phosphorus in Soils. Soil Science Society of America Journal, 677(8), 151–192. DOI: 10.2136/sssabookser8.c2
- Sims, J. T., & Vadas, P. A. (2005). Phosphorus in soils | Overview. In D. Hillel (Ed.), Encyclopedia of Soils in the Environment (pp. 202–210). Elsevier. DOI: 10.1016/B0-12-348530-4/00237-X
- Sindhu, S., Phour, M., Choudhary, S., & Chaudhary, D. (2014). Phosphorus Cycling: Prospects of Using Rhizosphere Microorganisms for Improving Phosphorus Nutrition of Plants. In: Parmar N., Singh A. (Eds.) Geomicrobiology and Biogeochemistry. Soil Biology, vol 39. Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-41837-2_11
- Sparks, D. L. (2003). 3 - Chemistry of Soil Organic Matter. In D. L. Sparks (Ed.), Environmental Soil Chemistry (Second Edition) (pp. 75–113). Academic Press. DOI: 10.1016/B978-012656446-4/50003-7
- Spribile, T., Resl, P., Stanton, D.E. and Tagirdzhanova, G. (2022), Evolutionary biology of lichen symbioses. New Phytologist, 234: 1566-1582. DOI: 10.1111/nph.18048
- St. Luce, M., Whalen, J. K., Ziadi, N., & Zebarth, B. J. (2011). Nitrogen Dynamics and Indices to Predict Soil Nitrogen Supply in Humid Temperate Soils. Advances in Agronomy, 55–102. DOI:10.1016/b978-0-12-385538-1.00002-0
- Tan, K. H. (1993). Principles of Soil Chemistry. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc.; pp 267 – 271. ISBN: 0-8247-8989-X.
- Tapia-Torres, Yunuen, & García-Oliva, Felipe. (2013). La disponibilidad del fósforo es producto de la actividad bacteriana en el suelo en ecosistemas oligotróficos: Una revisión crítica. Terra Latinoamericana, 31(3), 231-242. ISSN 2395-8030
- Tran, T. S., Giroux, M., Guilbeault, J., & Audesse, P. (1990). Evaluation of Mehlich-III extractant to estimate the available P in Quebec soils. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 21(1-2), 1–28. DOI:10.1080/00103629009368212
- Tunç, E. & Doğan, B. (2022). The effect of lichens on soil aggregate stability. The International Journal of Energy and Engineering Sciences, 7 (1), 40-51. Retrieved from <https://dergipark.org.tr/en/pub/ijees/issue/66139/1060390>

- Usharani K. V. (2019). Role of soil physical, chemical and biological properties for soil health improvement and sustainable agriculture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. E-ISSN: 2278-4136
- Valenzuela, C., Leiva, D., Carú, M. & Orlando, J. (2022). Prediction of the metabolic functions of nitrogen, phosphorus, and sulfur cycling bacteria associated with the lichen *Peltigera frigida*. *Microbiology*, 91, 604-610. DOI: 10.1134/S0026261721102117
- Van Bremen, N. and P. Buurman. 2002. *Soil formation*. Second Edition. Kluwer Academic Publishers. New York. 416 p. ISBN: 978-0-306-48163-5
- Veas-Mattheos, K. (2019). Identificación de cianolíquenes del género *Peltigera* en dos contextos ambientales de la Reserva Nacional Coyhaique y determinación de las fracciones de fósforo en sus sustratos. Seminario de Título. Universidad de Chile.
- Veas-Mattheos, K. (2022). Bacterias solubilizadoras de fosfato asociadas a cianolíquenes *Peltigera rufescens* creciendo en praderas del sur de Chile. Tesis de Magíster. Universidad de Chile.
- Walkley, A.J. & Black, I.A. (1934) Estimation of Soil Organic Carbon by the Chromic Acid Titration Method. *Soil Science*, 37, 29-38. DOI: 10.1097/00010694-193401000-00003
- Weiss, M., Hobbie, S. E., & Gettel, G. M. (2005). Contrasting responses of nitrogen-fixation in arctic lichens to experimental and ambient nitrogen and phosphorus availability. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 37(3), 396–401. DOI: 10.1657/1523-0430(2005)037[0396:CRONIA]2.0.CO;2
- Yang, Y., Chen, X., Liu, L., Li, T., Dou, Y., Qiao, J., Wang, Y., An, S., & Chang, S. X. (2022). Nitrogen fertilization weakens the linkage between soil carbon and microbial diversity: A global meta-analysis. *Global Change Biology*, 00, 1–16. DOI: 10.1111/gcb.16361
- Zalba, P., Bravo, O., Amiotti, N. M. & Peinemann, N. (2002). Métodos alternativos para determinar las disponibilidades de fósforo en suelos agrícolas. *Ciencia del Suelo* 20 (1): 50-53.
- Zraik, M., Booth, T., & Piercey-Normore, M. D. (2018). Relationship between lichen species composition, secondary metabolites and soil pH, organic matter, and grain characteristics in Manitoba. *Botany*. 96(4): 267-279. DOI: 10.1139/cjb-2017-0176

VII. ANEXO

Curva de calibración CO

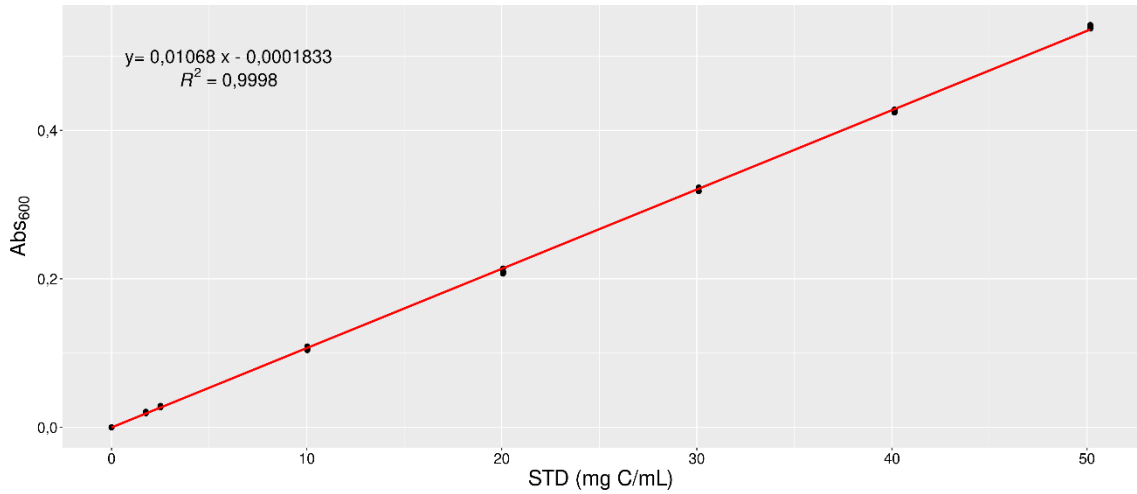


Figura Anexo 1. Curva de calibración para la determinación de carbono orgánico.

Curva de calibración amonio

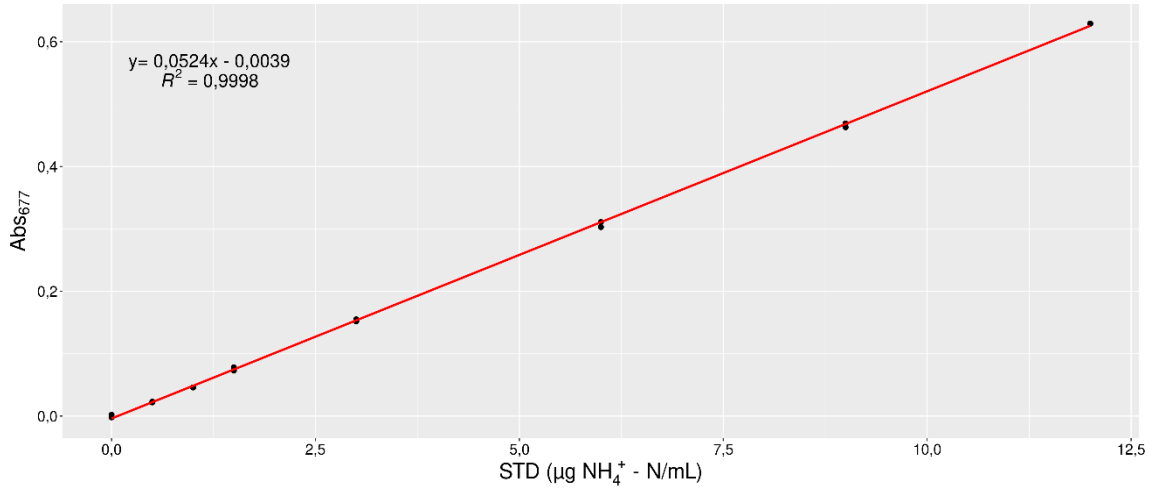


Figura Anexo 2. Curva de calibración para la determinación de amonio. Se construyeron curvas de calibración diarias, por lo que sólo se muestra una de las curvas.

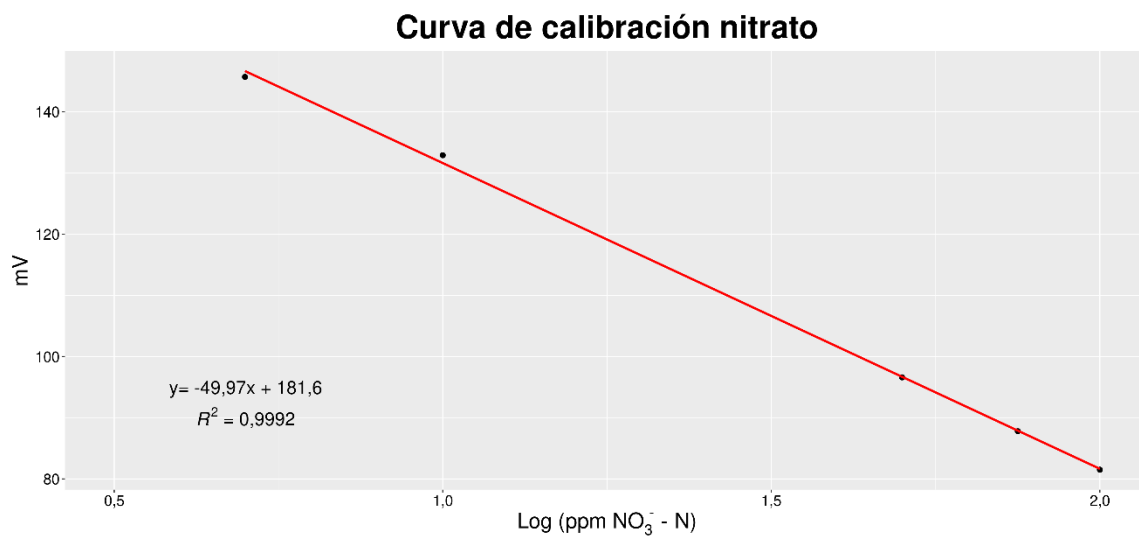


Figura Anexo 3. Curva de calibración para la determinación de nitrato. Se construyeron curvas de calibración diarias, por lo que sólo se muestra una de las curvas.

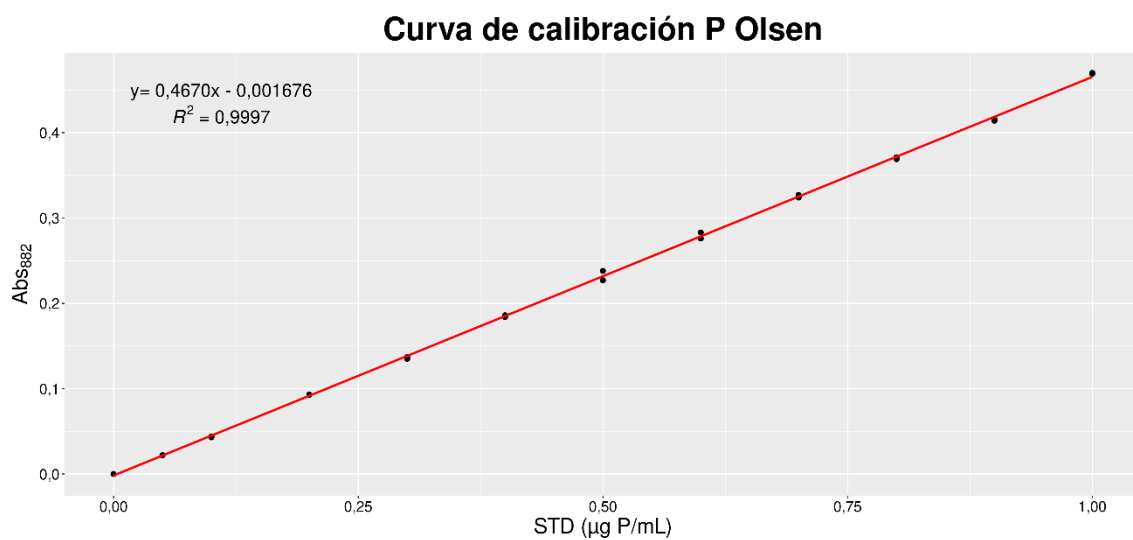


Figura Anexo 4. Curva de calibración para la determinación de fósforo Olsen.

Tabla Anexo 1. Georreferencia de las muestras de sustratos liquénicos y suelos aledaños utilizadas en este estudio

Sitio	Microambiente	Especie	Muestra	Latitud	Longitud	Altitud (m)	
Reserva Nacional Coyhaique (COY)	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	COY19-001	-45,536258	-72,020871	670,3	
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	COY19-006	-45,536258	-72,019897	669,2	
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	COY19-007	-45,536316	-72,019902	668,9	
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	COY19-010	-45,536003	-72,020189	671,8	
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	COY19-011	-45,536003	-72,020375	673,8	
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	COY19-012	-45,535992	-72,020597	676,3	
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	COY19-015	-45,536110	-72,020630	674,5	
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	COY19-020	-45,536180	-72,020650	674,5	
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	COY19-002	-45,536261	-72,019788	670,4	
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	COY19-016	-45,536103	-72,020579	673,2	
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	COY19-019	-45,535917	-72,020756	675,9	
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	COY19-022	-45,536121	-72,020559	706,5	
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	COY19-023	-45,536205	-72,020591	706,4	
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	COY19-027	-45,536421	-72,020558	700,7	
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	COY19-028	-45,536119	-72,020752	705,2	
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	COY19-030	-45,535928	-72,020833	705,3	
	Suelo	-	COY19_PS01	-45,535923	-72,020959	706,5	
	Suelo	-	COY19_PS02	-45,535953	-72,020798	705,3	
	Suelo	-	COY19_PS03	-45,535984	-72,020641	704,1	
	Suelo	-	COY19_PS04	-45,536013	-72,020480	702,9	
	Suelo	-	COY19_PS05	-45,536043	-72,020331	701,7	
	Suelo	-	COY19_PS06	-45,536149	-72,020269	700,2	
	Suelo	-	COY19_PS07	-45,536274	-72,020203	698,6	
	Suelo	-	COY19_PS08	-45,536418	-72,020139	697,1	
	Parque Nacional Patagonia, sector Tamango (TAM)	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	TAM19-022	-47,222170	-72,531360	434,8
		Sustrato	<i>P. antarctica</i>	TAM19-024	-47,221880	-72,531300	441,4
		Sustrato	<i>P. antarctica</i>	TAM19-026	-47,221810	-72,531280	443,0
		Sustrato	<i>P. antarctica</i>	TAM19-027	-47,221760	-72,531370	446,2
Sustrato		<i>P. antarctica</i>	TAM19-040	-47,221720	-72,531380	451,3	
Sustrato		<i>P. antarctica</i>	TAM19-041	-47,221510	-72,531290	450,5	
Sustrato		<i>P. antarctica</i>	TAM19-049	-47,221760	-72,531420	447,1	
Sustrato		<i>P. antarctica</i>	TAM19-050	-47,221790	-72,531210	442,4	
Sustrato		<i>P. rufescens</i>	TAM19-023	-47,222110	-72,531330	435,4	
Sustrato		<i>P. rufescens</i>	TAM19-029	-47,221730	-72,531370	447,2	
Sustrato		<i>P. rufescens</i>	TAM19-030	-47,221660	-72,531390	447,3	
Sustrato		<i>P. rufescens</i>	TAM19-042	-47,221570	-72,531280	449,3	
Sustrato		<i>P. rufescens</i>	TAM19-043	-47,221580	-72,531310	450,7	
Sustrato		<i>P. rufescens</i>	TAM19-046	-47,221550	-72,531530	448,1	

Sitio	Microambiente	Especie	Muestra	Latitud	Longitud	Altitud (m)
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	TAM19-048	-47,221730	-72,531470	447,3
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	TAM19-053	-47,221502	-72,531350	410,8
	Suelo	-	TAM19-PS01	-47,221550	-72,531200	447,2
	Suelo	-	TAM19-PS02	-47,221520	-72,531310	449,3
	Suelo	-	TAM19-PS03	-47,221530	-72,531430	448,1
	Suelo	-	TAM19-PS04	-47,221630	-72,531610	410,8
	Suelo	-	TAM19-PS05	-47,221690	-72,531520	441,4
	Suelo	-	TAM19-PS06	-47,221750	-72,531390	446,2
	Suelo	-	TAM19-PS07	-47,221850	-72,531270	451,3
	Suelo	-	TAM19-PS08	-47,222140	-72,531300	442,4
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	KAR20-277	-54,126453	-68,708595	153,7
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	KAR20-363	-54,126481	-68,708391	257,5
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	KAR20-387	-54,126387	-68,708346	238,4
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	KAR20-389	-54,126483	-68,708319	168,5
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	KAR20-391	-54,126440	-68,708347	169,0
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	KAR20-404	-54,126410	-68,708289	169,3
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	KAR20-406	-54,126384	-68,708365	170,3
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	KAR20-273	-54,126403	-68,708602	153,7
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	KAR20-279	-54,126438	-68,708552	154,7
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	KAR20-283	-54,126394	-68,708520	155,5
Parque Natural Karukinka (KAR)	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	KAR20-295	-54,126349	-68,708465	154,9
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	KAR20-403	-54,126390	-68,708294	169,5
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	KAR20-411	-54,126381	-68,708421	171,5
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	KAR20-413	-54,126363	-68,708361	170,8
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	KAR20-415	-54,126357	-68,708325	168,8
	Suelo	-	KAR20_PS01	-54,126415	-68,708624	163,3
	Suelo	-	KAR20_PS02	-54,126358	-68,708585	162,3
	Suelo	-	KAR20_PS03	-54,126354	-68,708535	164,0
	Suelo	-	KAR20_PS04	-54,126431	-68,708478	164,0
	Suelo	-	KAR20_PS05	-54,126422	-68,708372	162,9
	Suelo	-	KAR20_PS06	-54,126376	-68,708345	162,8
	Suelo	-	KAR20_PS07	-54,126316	-68,708366	163,8
	Suelo	-	KAR20_PS08	-54,126402	-68,708276	162,4
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	NAV20-225	-54,936262	-67,655328	4,4
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	NAV20-226	-54,936257	-67,655329	3,1
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	NAV20-227	-54,936248	-67,655307	4,6
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	NAV20-228	-54,936264	-67,655300	3,7
Isla Navarino (NAV)	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	NAV20-230	-54,936220	-67,655254	3,4
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	NAV20-233	-54,936232	-67,655131	2,0
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	NAV20-234	-54,936226	-67,655077	2,5
	Sustrato	<i>P. antarctica</i>	NAV20-237	-54,936291	-67,655099	1,1
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	NAV20-193	-54,936527	-67,655308	166,3
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	NAV20-194	-54,936526	-67,655316	166,3

Sitio	Microambiente	Especie	Muestra	Latitud	Longitud	Altitud (m)
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	NAV20-201	-54,936476	-67,655366	81,0
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	NAV20-207	-54,936396	-67,655392	50,2
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	NAV20-208	-54,936395	-67,655400	48,3
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	NAV20-209	-54,936381	-67,655395	45,4
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	NAV20-210	-54,936395	-67,655394	43,2
	Sustrato	<i>P. rufescens</i>	NAV20-214	-54,936346	-67,655391	24,1
	Suelo	-	NAV20_PS01	-54,936525	-67,655298	1,1
	Suelo	-	NAV20_PS02	-54,936442	-67,655402	0,2
	Suelo	-	NAV20_PS03	-54,936355	-67,655428	0,2
	Suelo	-	NAV20_PS04	-54,936270	-67,655439	1,4
	Suelo	-	NAV20_PS05	-54,936239	-67,655353	2,1
	Suelo	-	NAV20_PS06	-54,936246	-67,655345	3,2
	Suelo	-	NAV20_PS07	-54,936248	-67,655212	3,1
	Suelo	-	NAV20_PS08	-54,936295	-67,655001	1,2

Tabla Anexo 2. Diferencias significativas (p ajustado $< 0,05$) según PERMANOVA y comparaciones pareadas adonis.

Sitio	Parejas	R ²	Valor p	p ajustado
COY	S-ant vs S-ruf	0,291	0,022	0,066
	S-ant vs Suelo	0,282	0,005	0,015
	S-ruf vs Suelo	0,442	0,001	0,003
TAM	S-ant vs S-ruf	0,248	0,017	0,051
	S-ant vs Suelo	0,201	0,024	0,072
	S-ruf vs Suelo	0,169	0,082	0,246
KAR	S-ant vs S-ruf	0,071	0,398	1,000
	S-ant vs Suelo	0,412	0,001	0,003
	S-ruf vs Suelo	0,432	0,001	0,003
NAV	S-ant vs S-ruf	0,498	0,001	0,003
	S-ant vs Suelo	0,326	0,003	0,009
	S-ruf vs Suelo	0,302	0,005	0,015