



Revista Chilena de Historia Natural  
ISSN: 0716-078X  
editorial@revchilhistnat.com  
Sociedad de Biología de Chile  
Chile

PÉREZ, SANDRA E.; PÉREZ, CECILIA A.; CARMONA, MARTÍN R.; FARIÑA, JOSÉ M.;  
ARMESTO, JUAN J.

Efectos del fósforo y carbono lábiles en la fijación no simbiótica de N<sub>2</sub> en hojarasca de  
bosques siempreverdes manejados y no manejados de la Isla de Chiloé, Chile

Revista Chilena de Historia Natural, vol. 81, núm. 2, 2008, pp. 267-278  
Sociedad de Biología de Chile  
Santiago, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=369944286009>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

# Efectos del fósforo y carbono lábiles en la fijación no simbiótica de N<sub>2</sub> en hojarasca de bosques siempreverdes manejados y no manejados de la Isla de Chiloé, Chile

Effects of labile phosphorous and carbon on non-symbiotic N<sub>2</sub> fixation in logged and unlogged evergreen forests in Chiloé Island, Chile

SANDRA E. PÉREZ<sup>1\*</sup>, CECILIA A. PÉREZ<sup>1,2</sup>, MARTÍN R. CARMONA<sup>3,4</sup>, JOSÉ M. FARIÑA<sup>1,2</sup>  
& JUAN J. ARMESTO<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ecología, <sup>2</sup>Centro de Estudios Avanzados en Ecología y Biodiversidad, Pontificia Universidad Católica de Chile, Alameda 340, Santiago, Chile

<sup>3</sup> Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB), Universidad de Chile, Santiago, Chile

<sup>4</sup> Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas (CEAZA), Universidad de La Serena, La Serena, Chile;

\*e-mail para correspondencia: seperez@puc.cl

## RESUMEN

El flujo de entrada de nitrógeno (N) en ecosistemas de bosques templados de la Isla de Chiloé puede ocurrir en una proporción importante vía fijación no simbiótica (FNS). Debido a que este proceso es llevado a cabo por bacterias (diazotrofias) está regulado, además del efecto de factores climáticos (temperatura y humedad), por la disponibilidad de nutrientes, en particular fósforo y carbono como fuentes de energía. Nuestra hipótesis es que si el fósforo y el carbono son limitantes para la FNS, esta limitación se acentuaría en bosques manejados, en donde adición experimental de P y C deberían estimular la actividad microbiana. En este trabajo se determinó los efectos de la adición de cuatro niveles de fósforo inorgánico (0 mmol P/L, 0,645 mmol P/L, 3,23 mmol P/L y 6,45 mmol P/L) y cuatro niveles de carbono lóbil como glucosa (0 mmol P/L, 23,3 mmol C/L, 46,6 mmol C/L y 70 mmol C/L), en la FNS de N<sub>2</sub> de hojarasca homogenizada de cada bosque, en condiciones controladas de temperatura y humedad, en experimentos de laboratorio. Se estudiaron bosques de zonas bajas (100-200 m de altitud) ubicados en la comuna de Chonchi, Isla de Chiloé. De estos bosques, dos habían sido manejados, uno por corta selectiva y otro por floreo, y el tercero (control) era un bosque antiguo no intervenido. La FNS del nitrógeno se estimó mediante la “técnica de reducción de acetileno”. Análisis de varianzas de dos vías mostraron que las adiciones de fósforo no afectaron en forma significativa las tasas de reducción de acetileno (TRA) de la hojarasca en ninguno de los tres bosques, pero la adición de carbono lóbil en forma de glucosa afectó negativamente la TRA en el máximo nivel aplicado, en la hojarasca del bosque no manejado. Solo el factor bosque, relacionado a la práctica silvicultural, dio cuenta de las diferencias observadas en las TRA, siendo mayores en el bosque no manejado. Estas diferencias no fueron explicadas por las variables manipuladas experimentalmente. El manejo de bosque afectó la composición florística de la hojarasca, pero no hubo diferencias su relación C/N, ni en los contenidos de N o P totales.

**Palabras clave:** bosques manejados, *Laureliopsis philippiana*, ensayo de reducción de acetileno, actividad bacteriana.

## ABSTRACT

Nitrogen input to evergreen temperate forests of Chiloé Island, Chile occurs predominantly via non-symbiotic fixation (NSF). Because this is a bacterial-mediated process (diazotrophs), in addition to environmental factors (e.g., temperature and moisture), phosphorous availability and energy supply from carbon in the substrate may influence the rates of N fixation. Our hypothesis is that if both phosphorous and carbon are limiting NSF, this limitation would be greater in logged forests, where additions of labile P and C would stimulate microbial activity. Our objectives are to assess the effects of inorganic phosphorus and labile carbon (as glucose) additions (0 mmol P/L, 0.645 mmol P/L, 3.23 mmol P/L y 6.45 mmol P/L and 0 mmol P/L, 23.3 mmol C/L, 46.6 mmol C/L y 70 mmol C/L, respectively) on the rates of NSF measured in the litter layer of each forest in laboratory assays, under controlled temperature and moisture and using homogeneous litter samples. We studied lowland evergreen rainforests (100-200 m of altitude), located in the Chonchi district, in Chiloé Island. Two forest stands were logged, subjected to industrial and non-industrial selective logging, and the third stand was unlogged (control). The NSF of nitrogen was assessed by the acetylene reduction assay.

Two-way ANOVAs showed that phosphorous addition had no effect on acetylene reduction rates (ARR) in the litter of logged or unlogged forests, but the addition of labile carbon in the form of glucose negatively affected ARR when applied at the maximum level to the litter of unlogged forest. In all treatments the factor forest accounted for the differences in ARR, which was higher in unlogged forest. These differences were not explained by any of the variables experimentally manipulated in this study. The main difference among forests was floristic composition of litterfall, but litter did not differ among forests in its C/N ratio or total P and N contents.

**Key words:** logging effects, *Laureliopsis philippiana*, acetylene reduction assay, microbial activity.

## INTRODUCCIÓN

Debido a que el nitrógeno (N) es un elemento esencial para los seres vivos, la fijación de nitrógeno atmosférico es el segundo proceso más importante para sustentar la productividad primaria de los ecosistemas, luego de la fotosíntesis (Sylvia 1999). El nitrógeno es frecuentemente un elemento limitante, ya que a pesar de que un 80 % de la atmósfera está constituida por N<sub>2</sub>, este no está disponible para las plantas si no es a través de la fijación por bacterias especializadas, simbióticas y no simbióticas. Este es un proceso clave para la incorporación de N a las plantas y para sostener productividad primaria. La fijación es realizada por bacterias diazótrofas, las cuales poseen una enzima denominada nitrogenasa capaz de romper el triple enlace del nitrógeno y transformarlo a amonio. Estas bacterias pueden vivir asociadas simbióticamente a raíces o tallos de las plantas, o pueden ser de vida libre en el suelo y en el detritus orgánico. Estas últimas son responsables de la fijación no simbiótica de N (FNS) (Sylvia 1999). En ambos procesos el nitrógeno molecular es incorporado a la biomasa microbiana, y posteriormente liberado a la solución del suelo, quedando así disponible para las plantas (Chapin et al. 2002). A nivel fisiológico de las bacterias diazótrofas, el proceso de fijación de nitrógeno posee un alto costo energético, correspondiente al consumo de 12-15 moléculas de ATP por molécula de amonio fijada. Asimismo, debido a que el ATP proviene en último término de la fosforilación oxidativa de los productos de la glucosa durante la respiración celular, se ha estimado que se necesitan por lo menos 0.11 mol de glucosa para poder fijar 1 mol de amonio (Gutschick 1978). Se ha postulado entonces que la disponibilidad de fósforo (P) y glucosa para las bacterias sería limitante para la

fijación biológica del N (Gutschick 1978, Sylvia 1999). En la fijación simbiótica del nitrógeno las diazótrofas obtienen los carbohidratos desde la planta huésped, sin embargo las de vida libre, e.g., las bacterias que habitan los suelos de los ecosistemas forestales, los obtienen directamente desde la materia orgánica en descomposición (Balandreau 1986).

En ecosistemas sin perturbación humana, con mínimos ingresos de nitrógeno inorgánico reactivo por vía atmosférica, el proceso de fijación puede ser un vector clave de ingreso de nitrógeno al ecosistema (Galloway et al. 1995, Cleveland et al. 1999). En bosques templados del sur de Chile no se han documentado casos de fijación de N por simbiosis en la raíces de especies arbóreas o arbustivas nativas, pero se ha observado una alta tasa de FNS en la detritósfera, siendo esta una vía de ingreso significativa de N en ecosistemas montanos de Chiloé (Pérez et al. 2003, Carmona 2004). A pesar de la importancia de la FNS en ecosistemas de bosques templados siempreverdes de Chiloé en donde el nitrógeno es considerado un elemento limitante (Pérez et al. 1998, Perakis & Hedin 2001, Vann et al. 2002), se desconocen los factores ecológicos que están controlando este proceso (Vitousek et al. 1999, 2000, 2002).

En ecosistemas forestales templados del sur de Chile gran parte del P total del suelo se encuentra en forma orgánica (Thomas et al. 1999, Borie & Rubio 2003) y es precisamente el reciclado de la materia orgánica del suelo el proceso clave de la liberación de P disponible para las plantas (Johnson et al. 2003). En bosques montanos de la cordillera de Piuchué, Chiloé, un 46 % del P total del suelo se encuentra en forma inorgánica labil (P<sub>i</sub>) y esta fracción disponible no limitaría la productividad primaria (Thomas et al. 1999, Vann et al. 2002).

En bosques tropicales de zonas bajas en Costa Rica, las mayores tasa de FNS en la hojarasca ocurren durante la estación más húmeda cuando la disponibilidad de carbono lábil es mayor debido a la liberación de materia orgánica disuelta durante el proceso de descomposición (Cleveland et al. 2006, Reed et al. 2007). En los bosques siempreverdes de Chiloé, la hojarasca es el horizonte del suelo donde se han detectado mayores tasa de FNS, en relación al suelo mineral y desechos leñosos depositados en el piso del bosque (Pérez et al. 2004). Aun cuando el fósforo y carbono lábil no serían factores limitantes en los ecosistemas forestales templados en ausencia de perturbación humana, su almacenamiento en el suelo puede verse alterado por el manejo silvícola, debido a la remoción de grandes volúmenes de biomasa vegetal, junto a erosión y compactación de los suelos (Bormann et al. 1968, Brais et al. 2002).

En bosques templados del hemisferio norte se ha documentado que la extracción de comercial de madera produce disminuciones del contenido de fósforo disponible en el suelo a medida que aumenta el volumen de extracción con distintos tipos de práctica silvicultural (Blanco et al. 2005, Sánchez et al. 2006). El tipo de manejo podría afectar en forma diversa el almacenamiento de carbono en el suelo, ya que se han reportado pérdidas, ganancias o nulo efecto (Johnson 1992), dependiendo de las condiciones del sitio, el tipo de manejo y el tiempo transcurrido desde su aplicación. Sin embargo un metaanálisis de casos (Johnson & Curtis 2001) mostró que el manejo silvicultural consistente en corta selectiva del árbol completo, reduce el almacenamiento de carbono en los suelos hasta en un 6 % en bosques templados tanto del hemisferio norte como sur.

Nuestra hipótesis plantea que las adiciones de fósforo y carbono lábiles deberían estimular la FNS en la hojarasca en bosques sujetos a manejo silvicultural, en relación a bosques antiguos sin impacto humano significativo, debido a una posible mayor limitación de los recursos claves del proceso de FNS, en los primeros. En este trabajo determinamos si la adición de P inorgánico y C lábil en forma de glucosa, en condiciones de laboratorio, estimulan las tasas de FNS en la hojarasca de bosques siempreverdes de zonas bajas sujetos a

distintos tipos de manejo forestal en la Isla Grande de Chiloé.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Sitios de recolecta*

El material de este estudio fue colectado en la localidad de Melleico (42°37'08" S, 073°46'06" O), 12 km al oeste de Chonchi en la Isla Grande de Chiloé, Chile (Fig. 1). La vegetación dominante en el área de estudio es el bosque siempreverde laurifolio del tipo Valdiviano (Armesto & Figueira 1987), dominado por *Laureliopsis philippiana* y distintas especies arbóreas de Myrtaceae. El clima es templado lluvioso, con un promedio anual de temperatura de 10.1 °C y de precipitación de 2.128 mm; datos de la estación meteorológica Estación Biológica Senda Darwin, ubicada en las cercanías de Ancud, a ca. 100 km de Chonchi. La topografía del área corresponde a quebradas y faldeos precordilleranos de la cordillera de la Costa, con una altitud de ca. 100-200 m. En esta área se eligieron dos bosques sometidos a distintas formas de manejo silvicultural; uno por la práctica tradicional del "floreo", la cual consiste en la extracción de árboles para el uso de leña principalmente, y otro sujeto a corta selectiva, consistente en remoción de especies con mayor valor maderero, como es el caso de *Laureliopsis philippiana*, reteniendo hasta un 35 % de la cobertura del dosel original, consistente en árboles con 50 cm de diámetro aproximadamente (Vita 1996, Donoso et al. 1999). Se eligió además un bosque antiguo (ca. 300 años), no manejado, en la misma área y condiciones similares de suelo y topografía, como referencia. Estimaciones de la cobertura de dosel realizadas con un densíómetro de dosel (Pérez et al. datos no publicados) indican un 95,2 % de cobertura en el bosque no manejado, 94,4 % en el bosque con corta selectiva y 94,1 % en el bosque floreado. La nula diferencia entre los distintos bosques se debe a la abundante cobertura de *Chusquea quila* en el bosque con corta selectiva y gran número de renovales de mirtáceas en el bosque floreado, que colonizan el sotobosque luego de la extracción de los árboles emergentes.

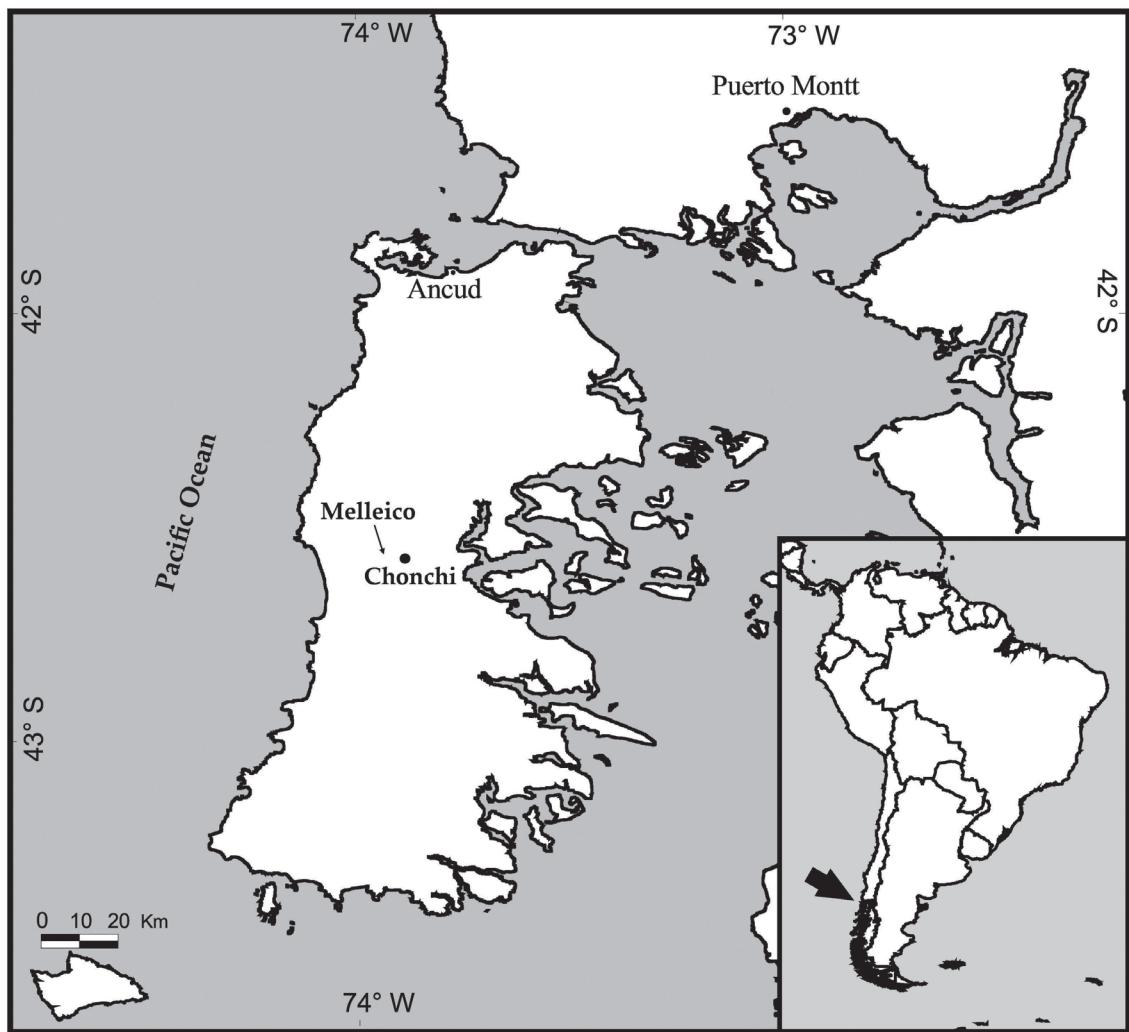


Fig. 1: Ubicación del sitio de estudio en la Isla de Chiloé.

Location of the study site in Chiloé Island.

La tasa de FNS se evaluó mediante el ensayo de reducción de acetileno (Hardy et al. 1968) en muestras de hojarasca colectadas del horizonte del suelo  $O_1$  de ca. 1 cm de profundidad, en seis puntos de muestreo por bosque. Los puntos de muestreo se ubicaron a lo largo de un transecto y separados  $> 12$  m entre sí. Las muestras de hojarasca fueron tomadas durante la estación de otoño (abril del 2006) e incubadas en frascos en el laboratorio en el mes de mayo del 2006. Con el fin de detectar diferencias en la composición florística de las muestras de hojarasca entre los bosques manejados y no manejados, el material foliar seco de los frascos controles se separó, identificó y pesó por especies, para estimar su contribución al peso total.

#### Caracterización química de la hojarasca

Las muestras utilizadas para la caracterización química de la hojarasca se obtuvieron en seis trampas de  $0.1\text{ m}^2$ , ubicadas en los puntos de muestreo. De ellas se seleccionaron tres durante las estaciones de otoño e invierno de 2007. Estas muestras se secaron y luego se molieron para la determinación de los contenidos totales de carbono, nitrógeno y fósforo. Los contenidos de carbono y nitrógeno fueron determinados por combustión instantánea en un analizador de elementos Carlo Erba NA 2500 (Pérez et al. 2004). La extracción del P total se realizó mediante ácido sulfúrico y agua oxigenada en un digestor Hach Digesdahl y

posterior determinación en forma colorimétrica con el método del molibdeno azul (Watanabe & Olsen 1965).

### Experimentos de laboratorio

Con el propósito de evaluar dos factores que pueden afectar la tasa de FNS, en este caso la adición de fósforo inorgánico ( $P_i$ ) y carbono lábil como glucosa (C-glucosa), se eliminó la variabilidad espacial de los bosques, homogenizando las muestras de hojarasca en una sola por cada bosque.

La hojarasca homogenizada se separó en las réplicas necesarias para la aplicación de diferentes tratamientos. Se utilizaron para el caso de la adición de P inorgánico seis réplicas por tratamiento y seis controles, y para el caso de la adición de C-glucosa cinco réplicas por tratamiento y cinco controles. Los controles consistieron en la adición de agua desionizada en un volumen equivalente (60 ml) a las soluciones aplicadas en los tratamientos, ya que se ha descrito que en condiciones de laboratorio el contenido hídrico afecta positivamente la TRA de la hojarasca (Carmona 2004). Las muestras de hojarasca se depositaron en frascos de vidrio de 500 ml (entre 70-140 g de peso seco) herméticamente sellados, donde se agregó acetileno ( $C_2H_2$ ), generando una mezcla al 10 % v/v de acetileno/aire (Carmona 2004, Pérez et al. 2004). Las muestras tratadas y los controles fueron incubados durante dos días en condiciones de laboratorio, a una temperatura ambiental que fluctuó entre 22 °C como mínima y 24 °C como máxima, y a una humedad de la hojarasca correspondiente a la “*in situ*”, de ca. 80 % de contenido hídrico. Cada día se tomó una muestra de la atmósfera del frasco, para medir la cantidad de acetileno reducida a etileno ( $C_2H_2$ ) por unidad de tiempo, obteniéndose así las tasas de reducción de acetileno (TRA). Para determinar la concentración de etileno de las muestras de atmósfera interna de los frascos se utilizó un cromatógrafo de gases provisto de un detector de ionización de llama (Shimadzu GC-8AIF) y una columna de acero rellena con Porapak N (Supelco®, 1m x 1/4”ss, 80/100). El cromatógrafo utilizó  $N_2$  como gas transportador (“carrier”) y la temperatura de la columna y detector se fijó en 50 °C (McNair 1981). La curva de calibración se realizó utilizando

distintas diluciones de un estándar de 100 ppm de  $C_2H_4$  en  $N_2$  (Scotty Specialty Gases). Luego del ensayo las muestras fueron secadas en la estufa a 60 °C durante 48 h como mínimo. Para calcular la TRA de la muestra de interés, se estima la pendiente de la curva de concentración de etileno en función del tiempo de incubación y referida a la masa seca de la muestra incubada. La TRA se expresa como nanomoles de etileno producidos por día de incubación y por gramo de peso seco de hojarasca (nmol etileno  $día^{-1}$   $g^{-1}$  peso seco). Para controlar la posible producción de etileno por procesos ajenos a la actividad de nitrogenasa (producción endógena de etileno), en todos los tratamientos se incluyeron muestras incubadas en aire puro sin acetileno. Estas muestras dieron siempre valores cero, o negativos, y no se consideraron posteriormente en los análisis. Por cada mol de acetileno reducido a etileno por la enzima nitrogenasa, se fija un mol de nitrógeno, relación a partir de la cual se puede estimar la tasa de FNS (Hardy et al. 1968). Para fines comparativos de este trabajo, las tasas de FNS solo se expresan como TRA.

### Adiciones de fósforo y carbono

A las muestras de hojarasca de cada bosque se aplicaron cuatro niveles crecientes de fósforo inorgánico disuelto, en forma de fosfato monopotásico ( $KH_2PO_4$ ), comenzando por 0,645 mmol P/L, concentración observada comúnmente en suelos de Chiloé (C. Pérez resultados no publicados), 3,23 mmol P/L, 6,45 mmol P/L, y un control con agua desionizada. Como una forma de controlar el efecto de una variación del pH en las muestras debido al tratamiento, se midió el pH en una suspensión de 40 mL de agua desionizada en 10 g de hojarasca. Esta suspensión se agitó en forma periódica y luego de una hora se medió el pH en forma potenciométrica con un electrodo de vidrio.

El carbono lábil en forma de glucosa fue agregado a la hojarasca en los siguientes niveles: agua desionizada como control, 23,3 mmol C/L, 46,6 mmol C/L y 70 mmol C/L. El nivel más bajo de carbono se utilizó teniendo como referencia que concentraciones de 8,33-16,6 mmol C/L en los sustratos estimulan las TRA de las cianobacterias (Bentley 1987) y de las bacterias heterótrofas (Sundareshwar 2003).

### Análisis estadístico

Se utilizó un análisis de “cluster” o de agrupamientos para identificar el grado de similitud en la composición florística de la hojarasca entre los tres bosques comparados con el programa estadístico MSVP versión 3.1. Para la determinación de la línea de corte de los agrupamientos se utilizó con la prueba de Montecarlo con 1.000 iteraciones utilizando el programa Pop-Tools versión 2.5 (Hood 2000). Se utilizó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía para determinar el efecto del tipo de bosque (i.e. sitios de colecta: bosque con manejo de “floreo”, con manejo de “corta selectiva” y un bosque no manejado; tres niveles) en la composición química de la caída de hojarasca, ya sea, relación C/N y contenidos de N y P totales. Se utilizó un ANDEVA de dos vías para establecer los efectos del tipo de bosque y de los tratamientos de adición de fósforo (cuatro niveles) y C-glucosa (cuatro niveles), sobre las TRA de la hojarasca. Posteriormente se aplicó una prueba de Tukey para determinar diferencias entre medias, ambos ocupando el programa Statistica 6.0 (Zar 1996). En el caso del tratamiento de adición de C-glucosa fue necesario homogeneizar la varianza de las TRA elevando los datos a la potencia de 0,25, con “Box-cox transformation” (Cheng 1997) del programa Minitab.

### RESULTADOS

#### Composición de hojarasca

El análisis de agrupamiento de la composición florística de la hojarasca depositada en el piso de los bosques indica que los bosques manejados y no manejados difieren entre sí, sin que exista ningún tipo de agrupamiento (Fig. 2A). Las especies dominantes en la hojarasca del bosque no manejado son *Laureliopsis philippiana* y la liana *Hydrangea serratifolia*, en tanto que en el bosque con corta selectiva la hojarasca es dominada por la especie arbustiva *Chusquea quila*. En el bosque floreado las hojas senescentes de las especies de la familia Myrtaceae, ya sea *Amomyrtus luma* o *Luma apiculata* del subdosal, y también las emergentes *Drimys winteri* y *Nothofagus nitida* son las dominantes (Fig. 2B). Las diferencias

entre bosques son resultado de la extracción selectiva de los árboles del dosel.

#### Caracterización química de la caída de hojarasca

A pesar de las diferencias florísticas, no se encontró un efecto del manejo del bosque (Tabla 1) en la relación C/N ( $F_{2,6} = 2,79$ ;  $P = 0,14$ ), contenidos de N ( $F_{2,6} = 0,91$ ;  $P = 0,45$ ) y P ( $F_{2,6} = 1,89$ ;  $P = 0,23$ ) totales de la hojarasca.

#### Experimentos de adición de nutrientes y TRA

No se encontraron diferencias significativas en las TRA de la hojarasca bajo el tratamiento de adiciones crecientes de  $P_i$ , pero sí un efecto significativo del manejo de bosque (Tabla 2). Según el análisis de Tukey ( $P < 0,05$ ), las TRA fueron mayores en el bosque no manejado, en relación a los bosques sujetos a floreo o corta selectiva (Fig. 3). Mediciones de pH bajo los distintos tratamientos indicaron que este no cambió con la adición de  $P_i$ , manteniéndose en un valor de  $5,8 \pm 0,2$  (media  $\pm$  DE).

La interacción de ambos factores, bosque y tratamiento, indica que el tratamiento de adición de glucosa fue significativo dependiendo del manejo de bosque y de la concentración de carbono lável agregado (Tabla 2). La TRA disminuyó significativamente en el bosque no manejado al máximo nivel de glucosa adicionado, mientras que en el bosque con corta selectiva y el floreado no hubo diferencias significativas en las TRA entre estos tratamientos (Fig. 4). Se detectó un efecto del manejo del bosque en las TRA, que según el análisis de Tukey ( $P < 0,05$ ), sigue la siguiente secuencia: bosque no manejado > corta selectiva > floreado (Fig. 4).

### DISCUSIÓN

Adiciones de fósforo hasta dos órdenes de magnitud superiores a los contenidos encontrados en los suelos de los bosques siempreverdes de Chiloé no estimularon la TRA en la hojarasca en los bosques sujetos a manejo silvicultural o en bosques no manejados. Una explicación a este resultado sería que el fósforo no se encuentra en una cantidad limitante en el área de estudio, por lo

cual las bacterias heterótrofas diazótrofas se encontrarían con sus poblaciones al máximo de actividad de fijación de nitrógeno. En efecto, la caracterización química de la hojarasca que ingresa al suelo (Tabla 1), mostró que los valores de contenido total de P ( $0,03-0,06 \pm 0,02$ ) son similares o están por sobre el límite de 0,04 %, nivel bajo el cual se ubican los ecosistemas con una alta habilidad en el uso del P, (i.e., alta “P-proficiency” sensu Killingbeck 1996) que poseen una baja disponibilidad de P en el suelo. No se descarta la posibilidad de que el P adicionado haya sido inmovilizado por bacterias no diazótrofas, quedando las

diazótrofas imposibilitadas de aprovecharlo. En suelos volcánicos de Hawái, bosques de estados sucesionales tempranos en donde la disponibilidad de fósforo es elevada, la FNS no difirió significativamente en respuesta a la adición de fósforo in situ, pero sí hubo diferencias significativas en parcelas fertilizadas con fósforo en los estados sucesionales tardíos del bosque, en donde la disponibilidad de fósforo es reducida debido a la fijación de P en los alófanos del suelo y a la lixiviación a largo plazo del P disponible (Crews et al. 2000, Vitousek & Hobbie 2000, Pearson & Vitousek 2002).

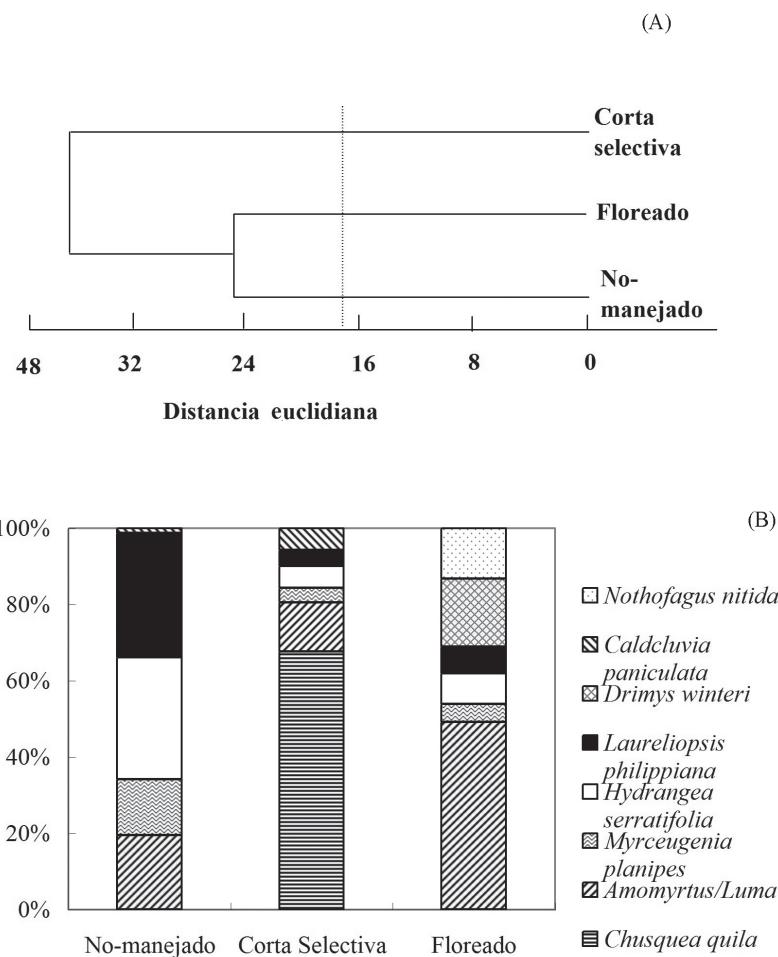


Fig. 2: Composición florística de la hojarasca de los bosques manejados y no manejados de *Laureliopsis philippiana* de la Isla Grande de Chiloé, Chile. (A) Análisis de agrupamiento, la línea punteada indica la distancia de agrupamiento crítico (prueba de Montecarlo,  $P < 0,05$ ); (B) composición de especies leñosas dominantes.

Floristic composition of the leaf litter in logged and unlogged *Laureliopsis philippiana* forests of Chiloé Island, Chile. (A) Cluster analysis, the dotted line indicates the critical grouping distance (Montecarlo test,  $P < 0.05$ ); (B) species composition of dominant trees.

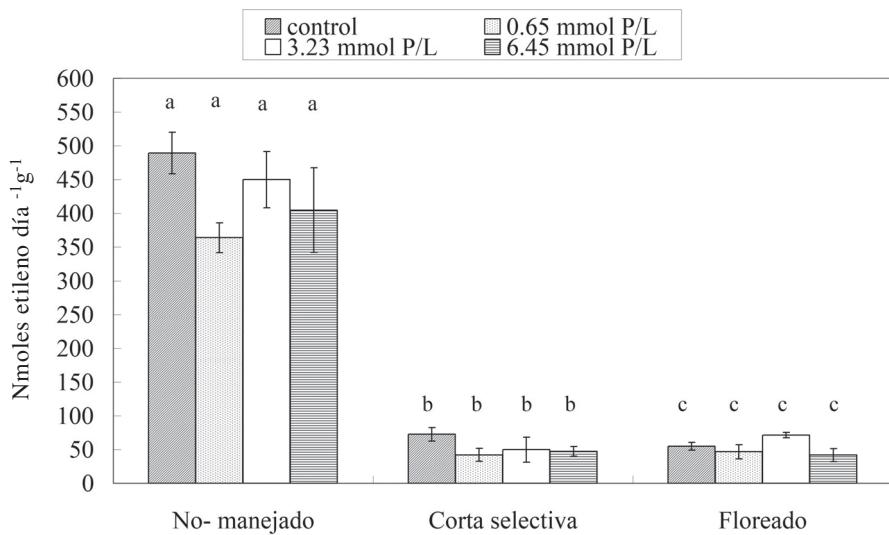


Fig. 3: Tasas promedio ( $\pm$  EE, n = 6) de reducción de acetileno para el tratamiento de adición de P inorgánico y control en la hojarasca de un bosque no manejado de *Laureliopsis philippiana* y dos bosques manejados; uno con corta selectiva y otro con floreo, en la Isla Grande de Chiloé. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre bosques, de acuerdo a la prueba de Tukey.

Average acetylene reduction rates ( $\pm$  SE, n = 6) with increasing levels of inorganic P and controls in the leaf-litter of an unlogged *Laureliopsis philippiana* forest, and two logged forests; industrial and non-industrial selective logging in Chiloé Island. Different letters indicate significant differences among forests, according to the Tukey test ( $P < 0.05$ ).

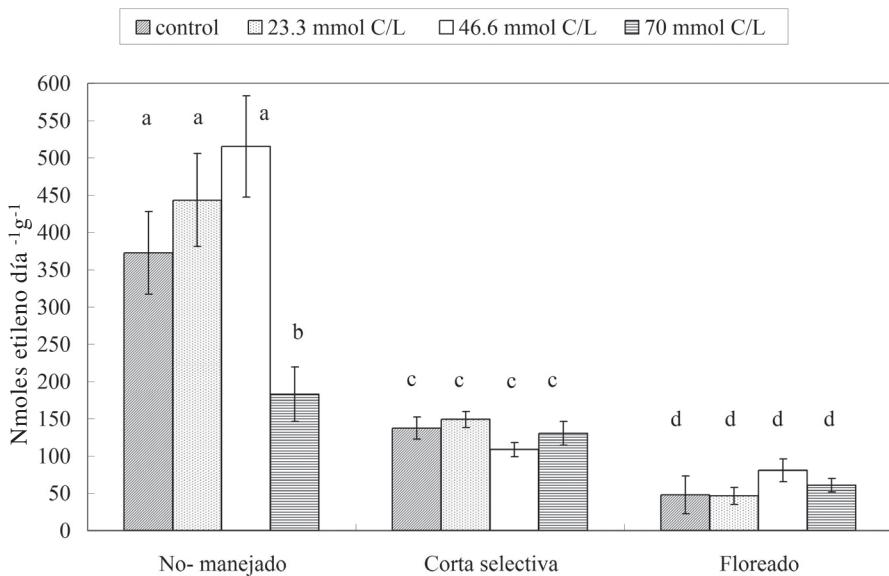


Fig. 4: Tasas promedio ( $\pm$  EE, n = 5) de reducción de acetileno para el tratamiento de adición de carbono lábil en forma de glucosa en la hojarasca de un bosque no manejado de *Laureliopsis philippiana* y dos bosques manejados; uno con corta selectiva y otro con floreo, en la Isla Grande de Chiloé. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre bosques y el tratamiento de carbono lábil, de acuerdo a la prueba de Tukey.

Average acetylene reduction rates ( $\pm$  SE, n = 5) with increasing levels of labile carbon as glucose and controls in the leaf-litter of an unlogged *Laureliopsis philippiana* forest, and two logged forests; industrial and non-industrial selective logging, in Chiloé Island. Different letters indicate significant differences among forests and labile carbon treatment, according to the Tukey test ( $P < 0.05$ ).

De la misma forma, y al contrario de nuestra hipótesis, para el caso particular del bosque no intervenido, la adición de carbono lábil en forma de glucosa a la hojarasca, tampoco estimuló las TRA en forma significativa; por el contrario se observó una reducción de las TRA con el máximo nivel adicionado. Nuestra conclusión es que las fuentes de carbono lábil tampoco son limitantes para las bacterias heterótrofas en estos bosques de Chiloé, sino al contrario, en exceso, otros nutrientes, como el fósforo, podrían llegar a ser limitantes para la formación de ATP en las bacterias. Esta sería la causa de la significativa reducción en la actividad diazótrofas a máximos niveles de carbono lábil en el bosque no manejado. Aun cuando no se dispone de mediciones del contenido basal de carbono lábil en forma de glucosa en el sustrato, una forma de estimar el grado de labilidad de la hojarasca es la relación C/N (Chapin et al. 2002). La relación C/N de la hojarasca colectada en los sitios de estudio, varía entre 40-50 (Tabla 1), lo cual puede clasificarse como un grado intermedio de recalcitrancia, ya que frecuentemente se encuentran valores entre 40 a 90 (Pérez et al. 2003, C. Pérez resultados no publicados) en bosques primarios y secundarios de Chiloé. La alta disponibilidad de carbono lábil en los bosques estudiados podría provenir de la rápida liberación de carbono orgánico disuelto a través de los procesos de descomposición de la hojarasca como se ha observado en bosques lluviosos tropicales (Cleveland 2006). Otros estudios han documentado efectos significativos de la adición de C-glucosa en la TRA en ecosistemas pobres en carbono

disponible, como es el caso de las bacterias heterótrofas que habitan los sedimentos de humedales costeros (Sundareshwar et al. 2003). En la flora epífila de los bosques tropicales, en donde las cianobacterias son dominantes, también se ha encontrado que la adición de C-glucosa estimulan las TRA (Bentley 1987). Aun cuando estas bacterias autótrofas son capaces de sintetizar sus propios carbohidratos, la adquisición de una fuente exógena de carbohidratos lábiles como el C-glucosa disminuiría el gasto energético implicado en su síntesis.

Aunque el bosque no intervenido presentó mayor actividad microbiana que los bosques sujetos a manejo, ya sea corta selectiva o floreo, a partir de los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que ninguno de los elementos descritos en la literatura como limitantes de la actividad de las bacterias diazótrofas está dando cuenta de estas diferencias entre los bosques estudiados de Chiloé. Esto queda corroborado por los resultados de la composición química de la hojarasca. Los contenidos de fósforo de la caída de hojarasca fueron iguales o superiores a los observados en ecosistemas deficientes en P y la relación C/N es moderada, sugiriendo que efectivamente P y carbono lábiles no serían limitantes en ninguno de los bosques estudiados. Solo las grandes diferencias detectadas en la composición florística de la hojarasca podrían dar cuenta de las diferencias de TRA entre los bosques, aun cuando estas no se tradujeron en diferencias significativas en los elementos químicos medidos en este estudio (Tabla 1).

TABLA 1

Caracterización química de la hojarasca caída en bosques manejados y no manejados de *Laureliopsis philippiana*, en la isla Grande de Chiloé, Chile. Se indica el promedio  $\pm$  DE, para muestras de otoño e invierno (n = 3 trampas por bosque). No hay diferencias significativas entre los bosques

Chemical characterization of the leaf litterfall in logged and unlogged forests of *Laureliopsis philippiana*, in Chiloé Island, Chile. Means  $\pm$  SD belong to samples for autumn and winter, n = 3 litter traps per forest. There were no significant differences among forests

Bosque	C/N	N total ( %)	P total ( %)
No manejado	41,1 $\pm$ 9,42	1,20 $\pm$ 0,30	0,06 $\pm$ 0,02
Corta selectiva	39,52 $\pm$ 10,7	1,25 $\pm$ 0,35	0,03 $\pm$ 0,02
Floreado	58,2 $\pm$ 11,31	0,97 $\pm$ 0,13	0,03 $\pm$ 0,02

TABLA 2

Análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del manejo (bosque no manejado, corta selectiva y floreo), tres niveles de adición de fósforo inorgánico  $P_i$  (0, 0,645 mmol P/L, 3,23 mmol P/L y 6,45 mmol P/L) y tres niveles de adición de C-glucosa (0, 23,3 mmol C/L, 46,6 mmol C/L y 70 mmol C/L) sobre la tasa de reducción de acetileno de la hojarasca de bosques dominados por *Laureliopsis philippiana* en la Isla Grande de Chiloé, Chile. Los asteriscos indican un efecto significativo con una  $P < 0,05$

Two-way ANOVAs to evaluate the effect of forest management (unlogged versus industrial selective logging), the addition of inorganic phosphorus  $P_i$  (0, 0,645 mmol P/L, 3,23 mmol P/L and 6,45 mmol P/L) and C-glucose addition (0, 23,3 mmol C/L, 46,6 mmol C/L y 70 mmol C/L) in the acetylene reduction rates of leaf-litter of *Laureliopsis philippiana*-dominated forests in Chiloé Island, Chile. Asterisks indicate a significant effect at  $P < 0.05$

	Grados de libertad	Valor de F	Valor de P
Fuente de variación variable $P_i$			
Bosque	2	244,29	0,0001*
$P_i$	3	2,74	0,055
Bosque x $P_i$	6	1,06	0,400
Fuente de variación variable C-glucosa			
Bosque	2	107,91	0,0001*
C-glucosa	3	3,66	0,019*
Bosque x C-glucosa	6	4,31	0,002*

A través de una aproximación experimental de causa-efecto, como la abordada en este estudio, es posible en el futuro investigar los otros factores que podrían dar cuenta de la diferencia en las TRA detectadas entre bosques manejados y no manejados. Elementos como el molibdeno y hierro son cofactores de la enzima nitrogenasa, pero también pueden afectar el proceso la concentración de cationes básicos y/o disponibilidad de nitrógeno en el suelo. No se descartan otros posibles factores explicativos, más difíciles de manipular experimentalmente, pero abordables a través de una comparación espacial, como son las diferencias de diversidad genética de diazótrofos entre bosques.

La disminución de las tasas de FNS del nitrógeno puede afectar la productividad en los bosques manejados, debido a que se encuentran localizados en una región en que los ingresos antropogénicos de nitrógeno son muy reducidos (Hedin et al. 1995).

#### AGRADECIMIENTOS

Nuestros agradecimientos a los proyectos FONDECYT 1050830 (2005), FONDECYT-FONDAP 1501-0001 Center for Advanced

Studies in Ecology and Biodiversity, P. Universidad Católica de Chile y a Iniciativa Científica Milenio (MIDEPLAN, Chile), a través del Instituto de Ecología y Biodiversidad, contrato P05-002. Juan Luis Allendes y Viviana Martínez ayudaron en terreno y don Arturo Gallardo, doña Elemías Gómez y Maderas Tantauco nos facilitaron el acceso a los sitios de estudio. Agradecemos también la ayuda técnica de Víctor Sagredo en los análisis del laboratorio. Finalmente agradecemos a los revisores anónimos quienes ayudaron a mejorar el manuscrito.

#### LITERATURA CITADA

- ARMESTO JJ & J FIGUEROA (1987) Stand structure and dynamics in the rainforests of Chiloé Archipelago, Chile. *Journal of Biogeography* 14: 367-376.
- BALANDREAU J (1986) Ecological factors and adaptive processes in  $N_2$ -fixing bacterial populations of the plant environment. *Plant and Soil* 90: 73-92.
- BENTLEY BL (1987) Nitrogen fixation by epiphylls in a tropical rainforest. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 74: 234-241.
- BLANCO JA, MA ZAVALA, JB IMBERT & FJ CASTILLO (2005) Sustainability of forest management practices: Evaluation through a simulation model of nutrient cycling. *Forest Ecology and Management* 213: 209-228.

- BORIE F & R RUBIO (2003) Total and organic phosphorus in Chilean volcanic soils. *Gayana Botánica* (Chile) 60: 69-78.
- BORMANN FH, GE LIKENS, DW FISHER & RS PIERCE (1968) Nutrient loss accelerated by clear cutting of a forest ecosystem. *Science* 159: 882-884.
- BRAIS S, D PARÉ, C CAMIRÉ, P ROCHON & C VASSEUR (2002) Nitrogen net mineralization and dynamics following whole-tree harvesting and winter wind rowing on clayed sites of northwestern Quebec. *Forest Ecology and Management* 157: 119-130.
- BUTNOR JR, KH JOHNSEN & FG SÁNCHEZ (2006) Whole tree and forest floor removal from loblolly pine plantation have no effect on forest floor CO<sub>2</sub> efflux 10 years after harvest. *Forest Ecology and Management* 227: 89-95.
- CARMONA M (2004) Fijación no simbiótica de nitrógeno en la detritósfera de un bosque templado en Chiloé: regulación interna y su relación con el proceso de descomposición. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile. 170 pp.
- CHAPIN FS, P MATSON & H MOONEY (2002) Principles of terrestrial ecosystem ecology. Springer, New York, New York, USA. 436 pp.
- CHEN G & R LOCKHART (1997) Box-Cox transformed linear models: a parameter-based asymptotic approach. *The Canadian Journal of Statistics* 25: 517-529.
- CLEVELAND C, A TOWNSEND, D SCHIMEL, H FISHER, R HOWARTH, L HEDIN, S PERAKIS, E LATTY, J FISCHER, A ELSEROAD & M WASSON (1999) Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N<sub>2</sub>) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles* 13: 623-645.
- CLEVELAND C, SC REED, AR TOWNSEND (2006) Nutrient regulation of organic matter decomposition in a tropical rainforest. *Ecology* 87: 492-503.
- CREWS T, H FARRINGTON & P VITOUSEK (2000) Changes in asymbiotic, heterotrophic nitrogen fixation on leaf litter of *Metrosideros polymorpha* with long-term ecosystem development in Hawaii. *Ecosystems* 3: 386-395.
- DONOSO C & A LARA (1999) Silvicultura de los bosques nativos de Chile. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. 421 pp.
- GALLOWAY JM, WH SCHLESINGER, H LEVY, A MICHAELS & J SCHNOOR (1995) Nitrogen fixation: Anthropogenic enhancement-environmental response. *Global Biogeochemical Cycles* 9: 235-252.
- GUTSCHICK V (1978) Energy and nitrogen fixation. *BioScience* 28: 571-575.
- HARDY R, HOLSTEN X & JACKSON E (1968) The acetylene- ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* 43: 1185-1207.
- HEITHECKER TD & CB HALPERN (2006) Variation in microclimate associated with dispersed-retention harvests in coniferous forests of western Washington. *Forest Ecology and Management* 236: 60-71.
- HOOD GM (2000) PopTools: software for the analysis of ecological models: disponible en internet en <http://www.cse.csiro.au/poptools/>
- JOHNSON AH, J FRIZANO & DR VANN (2003) Biogeochemical implications of the labile phosphorus in forest soils determined by the Hedley fractionation procedure. *Oecologia* 135: 487-499.
- JOHNSON DW (1992) Effects of forest management on soil carbon storage. *Water, Air, Soil Pollution* 64: 83-120.
- JOHNSON DW & PS CURTIS (2001) Effects of forest management on soil C and N storage: meta analysis. *Forest Ecology and Management* 140: 227-238.
- KILLINGBECK KT (1996) Nutrients in senesced leaves: keys to the search for potential resorption proficiency. *Ecology* 77: 1716-1727.
- MC NAIR (1981) Cromatografía de gases. Organización de Estados Americanos, Washington, Distrito de Columbia, Washington, USA. 91 pp.
- PERAKIS S & L HEDIN (2001) Fluxes and fates of nitrogen in soil of an unpolluted old-growth temperate forest, southern Chile. *Ecology* 82: 2245-2260.
- PÉREZ, CA, LO HEDIN & JJ ARMESTO (1998) Nitrogen mineralization in two unpolluted old-growth forests of contrasting biodiversity and dynamics. *Ecosystems* 1: 361-373.
- PÉREZ CA, MR CARMONA & JJ ARMESTO (2003) Non-symbiotic nitrogen fixation, net nitrogen mineralization, and denitrification in evergreen forest of Chiloé Island, Chile: a comparison with other temperate forests. *Gayana (Chile)* 60: 25-33.
- PÉREZ CA, JJ ARMESTO, C TORREALABA & MR CARMONA (2003) Litterfall dynamics and nutrient use efficiency in two evergreen temperate rain forests of southern Chile. *Austral Ecology* 28: 291-600.
- PÉREZ C, MR CARMONA, JC ARAVENA & JJ ARMESTO (2004) Successional changes in soil nitrogen availability, non-symbiotic nitrogen fixation and carbon/nitrogen ratios in southern Chilean forest ecosystems. *Oecologia* 140: 617-625.
- PRESCOTT C (1997) Effects of clearcutting and alternative silvicultural systems on rates of decomposition and nitrogen mineralization in coastal montane coniferous forests. *Forest Ecology and Management* 95: 253-260.
- QUISPEL A (1974) The biology of nitrogen fixation. North-Holland, Amsterdam, The Netherlands. 769 pp.
- REED SC, CC CLEVELAND, AR TOWSEND (2007) Controls over leaf litter and soil nitrogen fixation in two lowland tropical rainforests. *Biotropica* 39: 585-592.
- SÁNCHEZ FG, DA SCOTT & CH LUDOVICI (2006) Negligible effects of severe organic matter removal and soil compaction on loblolly pine growth over 10 years. *Forest Ecology and Management* 227: 145-154.
- SUNDRESHWAR PV, JT MORRIS, EK KOEPFLER, B FORNWALT (2003) Phosphorus limitation of coastal ecosystem processes. *Science* 299: 563-565.
- SYLVIA M (1999) Principles and applications of soil microbiology. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA. 550 pp.
- THOMAS SM, AH JOHNSON, F FRIZANO, DR VANN, DJ ZARIN & A JOSHI (1999) Phosphorus fractions in montane forest soils of the Cordillera de Piuché, Chile: Biogeochemical implications. *Plant and Soil* 211: 139-148.
- VANN DR, A JOSHI, C PÉREZ, AH JOHNSON, J FRIZANO, DJ ZARIN & JJ ARMESTO (2002) Distribution and cycling of C, N, Ca, Mg, K and P in three pristine, old-growth forests in the Cordillera de Piuché, Chile. *Biogeochemistry* 60: 25-47.

- VITA A (1996). Los tratamientos silviculturales. Escuela de Ciencias Forestales. Facultad de Ciencia Agrarias y Forestales. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 156 pp.
- VITOUSEK PM & CV FIELD (1999) Ecosystem constraints to symbiotic nitrogen fixers. A simple model and its implications. *Biogeochemistry* 46: 179-202.
- VITOUSEK PM & S HOBBIE (2000) Heterotrophic nitrogen fixation in decomposing litter: patterns and regulation. *Ecology* 81: 2366-2376.
- VITOUSEK PM, K CASSMAN, C CLEVELAND, T CREWS, CB FIELD, NB GRIMM, RW HOWARTH, R MARINO, L MARTINELLI, EB RASTTETER & JI SPRENT (2002) Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 57/58: 1-45.
- WATANABE FS & SR OLSEN (1965) Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and  $\text{N}_a\text{HCO}_3$  extracts from soil. *Soil Science Society of America Proceedings* 29: 677-678.

*Editor Asociado: Luis Corcuera*

*Recibido el 23 de julio de 2007; aceptado el 23 de noviembre 2007*