



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

Dr. Roberto Godoy Bórquez

Instituto de Ciencias Ambientales y Evolutivas.

Facultad de Ciencias

Profesor Co-Patrocinante

Dr. Eduardo Valenzuela Flores.

Instituto de Bioquímica y Microbiología

Facultad de Ciencias

**HIDRÓLISIS DE FLUORESCEÍNA DIACETATO Y ACTIVIDAD DE
LAS ENZIMAS PROTEASA, CELULASA, NITRATO REDUCTASA Y
UREASA DEL SUELO EN BOSQUE PRÍSTINO, SUR DE CHILE**

Tesis de Grado presentada como parte de
los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de *Bioquímico*

GUSTAVO ADOLFO ULLOA LARREA

VALDIVIA – CHILE

2014

“La vida no es triste sino alegre, el mundo no es un desierto sino un jardín; el hombre no nace para sufrir sino para gozar; el fin de nuestras vidas no es la muerte, sino la vida.”

Alberto Hurtado (1901-1952) Sacerdote Jesuita.

Dedicado a mi padres.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quisiera agradecer al profesor Dr. Roberto Godoy, por haberme dado la oportunidad de participar tesista en un su proyecto de investigación y formar parte de un equipo de trabajo multidisciplinario que fue muy provechoso para mi aprendizaje.

A la profesora MSc. Mónica Barrientos, por haberme dado las herramientas necesarias para generar una mayor confianza en el trabajo y por la ayuda brindada en el laboratorio.

Al Sr. Juan Fuentealba, por su grata compañía, apoyo y excelente disposición para ayudar.

Asimismo a mis compañeros del laboratorio de Biogeoquímica, por la simpatía y la constante disposición a ayudar en lo que fuera necesario.

Al Instituto de Ciencias Ambientales y Evolutivas y su personal, que colaboraron de forma directa o indirecta en el desarrollo de esta tesis.

A mis amigos de siempre y a aquellos que se sumaron a lo largo de camino, por su sincera amistad y compañía.

A mis padres y hermanos por su incondicional apoyo en cada uno de los pasos que he querido seguir en mi vida, entregándome ese toque de confianza necesaria para poder seguir adelante con aquellas cosas que me he propuesto.

El financiamiento para el desarrollo de esta tesis fue obtenido por medio del proyecto FONDECYT numero: 1110331 “Biogeoquímica en bosques templados del sur de Chile: flujos de C y N en ambientes prístinos versus sitios con cambio en el uso de suelo”.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN.	1
1.1 SUMMARY.	2
2. INTRODUCCIÓN.	3
2.1. Bosques del sur de América.	3
2.2. Ciclo biogeoquímicos.	5
2.3. El suelo.	8
2.3.1. Andisoles.	11
2.4. Evaluación biológica del suelo.	13
2.5. Enzimas en el suelo.	14
2.5.2. Enzimas en estudio.	16
2.8. Hipótesis	17
2.9. Objetivos.	18
2.9.1. Objetivo general.	18
2.9.2. Objetivos específicos.	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	19
3.1. Materiales.	19
3.1.1. Reactivos.	19
3.1.2. Equipos.	20
3.1.3. Otros.	20
3.2 Métodos.	21
3.2.1 Área de estudio.	21
3.2.2. Clima y suelo.	23

3.2.3. Medición de las variables microclimáticas.	23
3.2.4. Colecta de suelo.	25
3.2.5. Determinación de la humedad del suelo.	25
3.2.6. Variables químicas del suelo.	26
3.2.7. Actividades enzimáticas portenciales.	27
3.2.7.1. Determinación celulasa..	29
3.2.7.2. Determinación ureasa.	30
3.2.7.3. Determinación proteasa.	31
3.2.7.4. Determinación nitrato reductasa.	32
3.2.7.5. Determinación hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA).	33
3.2.8. Analisis de datos.	35
4. RESULTADOS.	36
4.1 Variables microclimáticas en el área de estudio y contenido humedad del suelo.	36
4.2. Parametros químicos y fisicos del suelo.	42
4.2.1. Densidad y caracterización química del suelo.	42
4.2.2. Amonio y nitrato	44
4.3. Actividades enzimáticas y FDA en el suelo.	49
4.3.1. Actividad enzimática celulasa.	49
4.3.2. Actividad enzimática ureasa.	52
4.3.3 Actividad enzimática proteasa.	54
4.3.4. Actividad enzimática nitrato reductasa.	57
4.3.5. Reacción de hidrólisis diacetato de fluoresceína.	60
4.4. Estacionalidad actividades enzimáticas y reacción de hidrólisis FDA.	63
4.5. Relación actividades enzimáticas y FDA, variables climáticas y químicas del suelo.	70

5. DISCUSIÓN.	79
6. BIBLIOGRAFÍA.	96
7. ANEXOS.	120

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de las rutas principales del C y N en ecosistemas boscosos.	9
Figura 2. Sitio de recolección muestras de suelo.	22
Figura 3. Esquema base de los procedimientos colorímetros utilizados.	28
Figura 4. Temperatura promedio del aire y precipitación mensual.	37
Figura 5. Temperatura promedio mensual del suelo obtenida por medio de registro continuo a intervalos de 1 hora (<i>data logger</i> HOBO®).	39
Figura 6. Porcentajes de humedad del suelo.	41
Figura 7. Concentración mensual de amonio en el suelo ($\mu\text{g N-NO}_4^+$ gss^{-1}) de las parcelas experimentales.	45
Figura 8. Concentración mensual de nitrato en el suelo ($\mu\text{g N-NO}_3^-$ gss^{-1}) de las parcelas experimentales.	47
Figura 9. Actividad enzimática mensual de la celulasa en el suelo ($\text{mg. glucosa gss}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$) de las parcelas experimentales.	50
Figura 10. Actividad enzimática mensual de la ureasa en el suelo ($\mu\text{g N-NH}_4^+$ $\text{gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$) de las parcelas experimentales.	53
Figura 11. Actividad enzimática mensual de la proteasa en el suelo ($\text{mg. gelatina gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$) de las parcelas experimentales.	55

Figura 12. Actividad enzimática mensual de la nitrato reductasa en el suelo ($\mu\text{g N-NO}_2^- \text{ gss}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$) de las parcelas experimentales. 58

Figura 13. Reacción de hidrólisis de la FDA mensual en el suelo ($\mu\text{g fluoresceína gss}^{-1} \text{ h}^{-1}$) de las parcelas experimentales. 61

Figura 14. Actividades enzimáticas estacionales en el suelo ($\mu\text{g producto gss}^{-1} \text{ min}^{-1}$) de la parcela experimental P1. Parque Nacional Puyehue. Centro – Sur de Chile del suelo. 65

Figura 15. Actividades enzimáticas estacionales en el suelo ($\mu\text{g producto gss}^{-1} \text{ min}^{-1}$) de la parcela experimental P2. Parque Nacional Puyehue. Centro – Sur de Chile. 67

Figura 16. Actividades enzimáticas estacionales en el suelo ($\mu\text{g producto gss}^{-1} \text{ min}^{-1}$) de la parcela experimental P3. Parque Nacional Puyehue. Centro – Sur de Chile. 69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Densidad y algunos parámetros químicos del suelo superficial.	43
Tabla II. Coeficientes, p-valores obtenidos a partir de las correlaciones de Pearson y Spearman y ecuación del modelo ajustado de las variables dependientes del suelo en la parcela intervenida (P1).	72
Tabla III. Coeficientes, p-valores obtenidos a partir de las correlaciones de Pearson y Spearman y ecuación del modelo ajustado de las variables dependientes del suelo en la parcela semi - intervenida (P2).	74
Tabla IV. Coeficientes, p-valores obtenidos a partir de las correlaciones de Pearson y Spearman y ecuación del modelo ajustado de las variables dependientes del suelo en la parcela control (P3).	75

ABREVIATURAS**Abreviatura****Nombre**

ANOVA

Análisis de varianza simple.

FDA

Fluoresceína diacetato.

 gss^{-1} Gramo de suelo seco $^{-1}$.

MOS

Materia orgánica del suelo.

1. RESUMEN

Por sus bajas depositaciones atmosféricas, los bosques templados de la cordillera de Los Andes en el Sur de Chile representan ecosistemas únicos, caracterizados por una alta eficiencia en el ciclaje de nutrientes con mecanismos conservativos, bajo condiciones climáticas extremas de precipitaciones ($> 7000 \text{ mm año}^{-1}$). Las alteraciones catastróficas de estos ecosistemas promueven la dinámica natural de las comunidades biológicas y los procesos biogeoquímicos. Sin embargo, las perturbaciones naturales y el manejo forestal, afectan drásticamente los reservorios de carbono, nitrógeno y los ciclos biogeoquímicos. Planteamos que la actividad biológica del suelo en bosques templados de Chile, disminuye por perturbación antropogénica, como el cambio de uso de suelo, lo que afecta la biomasa y cobertura vegetal. Estas situaciones provocan cambios en microclima, con aumento de temperatura y disminución de la humedad del suelo, cuyos resultados a corto plazo son incremento del N inorgánico del suelo, con variación estacional. Para evaluar el impacto ambiental en el suelo de estos bosques, generado por la deforestación, se comparan las actividades enzimáticas en suelo de bosques prístinos e intervenidos, del Parque Nacional Puyehue, Sur de Chile. Las actividades específicas de las enzimas celulasa, ureasa, proteasa, nitrato reductasa y la hidrólisis de fluoresceína diacetato, fueron alteradas producto de la deforestación, disminuyendo respecto del suelo sitio control (bosque prístino). Las correlaciones fueron estadísticamente significativas y positivas con el contenido hídrico y química del suelo y negativas con la temperatura. Los resultados obtenidos proveen una línea base, como indicador frente al impacto antropogénico, para ser incorporado en programas de monitoreo ambiental en bosques templados lluviosos del sur de Chile.

1.1 SUMMARY

Due to their low atmospheric depositions, the temperate forests of the Andes in southern Chile represent unique ecosystems, characterized by a highly efficient nutrient cycling despite rapidly draining soils, under extreme conditions of weather rainfall volumes ($> 7000 \text{ mm year}^{-1}$). Catastrophic disturbances of these forest ecosystems drive the natural dynamics of living communities and alter biogeochemical processes. However, natural disturbances and forest management drastically affect both carbon and nitrogen pools and their biogeochemical cycles. We assert that the biological activity in soils, in temperate forests of southern Chile decrease after anthropogenic disturbances, e.g. by land-use change, diminishing standing biomass and land cover. These circumstances alters the microclimatic conditions, leading to a rise in soil temperature and a decline in soil moisture, which in short-term result in increasing soil inorganic N, with seasonal fluctuations. To evaluate the environmental impact in temperate rain forest soils generated by deforestation, enzyme activities in soils of pristine and disturbed forest-sites at the Puyehue National Park in southern Chile were compared. Specific enzyme activities of cellulose, urease, protease and nitrate reductase and the hydrolysis of fluorescein diacetate were altered due to deforestation, decreasing in disturbed as compared to pristine sites. The statistical correlations were significant and positive with soil moisture, but negative against soil temperature. The results provide a baseline, as an indicator of anthropogenic disturbance, to be incorporated into environmental monitoring programs in Chilean temperate rainforests.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Bosques del sur de América

Los bosques del Cono Sur de América constituyen una reserva de la biosfera y tienen una gran importancia a nivel local, regional y global. Poseen más de la mitad de la superficie total de los bosques templados en el hemisferio Sur (Armesto *et al.*, 2009). Estos ecosistemas tienen un alto valor ecológico y social, ya que proporcionan una gran variedad de bienes y servicios que, son de enorme importancia medio ambiental y económica, tanto a nivel nacional como internacional (Lara *et al.*, 2003; Frank *et al.*, 2009). Los bosques templados de la región del Sur de Chile, poseen una biota particular y son reconocidos como un *hotspot* de biodiversidad (Olson y Dinerstein 1998), especialmente en relación con su historia geológica y climática. Esta peculiaridad les confiere un carácter de isla biogeográfica con representantes derivados de elementos Gondwánicos, un elevado número de especies endémicas, géneros y familias monotípicas y en algunos casos, con representantes de singularidad taxonómica (Armesto *et al.*, 2001). Así por ejemplo, a los bosques templados del Sur de Chile se les conoce por ser bosques prístinos, ya que presentan escasa - nula polución crónica, a diferencia de los bosques del hemisferio norte, cercano a grandes ciudades y áreas industriales (Godoy *et al.*, 2001, 2009). En la actualidad los bosques templados de Sudamérica, presentan una condición crítica de especies amenazadas con problemas de conservación, debido al fuerte impacto antrópico, a su área de distribución reducida y aislamiento geográfico (Armesto *et al.*, 2001, 2009, Frank *et al.*, 2009). Estos inconvenientes han sido favorecidos por un incremento paulatino de cambios de uso del

suelo, especialmente el reemplazo de la vegetación nativa por plantaciones exóticas y la expansión de la actividad agrícola y ganadera, que ocurre en forma acentuada en diversas áreas de la región (Aguayo *et al.*, 2009, Lara *et al.*, 2009).

Por la composición química de las precipitaciones, los bosques templados de la Cordillera de los Andes en el Sur de Chile, representan ecosistemas únicos en el mundo, libres de contaminación al compararlos con los del Hemisferio Norte, constituyen sitios control y de línea base con características excepcionales (Oyarzún *et al.*, 2004, Perakis y Hedin, 2001, 2002). La evaluación de eventos de contaminación por transporte atmosférico a grandes distancias, particularmente para estos ecosistemas boscosos en áreas montañosas remotas, es aún incipiente (Godoy *et al.*, 2001, 2009) y son caracterizados por presentar una gran dependencia del ciclo interno de la materia orgánica, cuyos mecanismos conservativos, revelan una alta eficiencia en la economía de nutrientes, particularmente bajo condiciones climáticas extremas de elevadas precipitaciones ($> 7000 \text{ mm año}^{-1}$) (Oyarzún *et al.*, 2004, Huygens *et al.*, 2008). Los bosques de *Nothofagus* spp. de la Cordillera de Los Andes, localizados en suelos de origen volcánico, presentan a menudo características limitadas de nutrientes, especialmente en elementos esenciales tales como N y P (Godoy *et al.*, 2009), lo que plantea la necesidad de conocer el funcionamiento y la dinámica de aquellos ciclos biogeoquímicos, que son vitales en la conservación de estos ecosistemas boscosos.

2.2. Ciclos biogeoquímicos

Se define al ciclo biogeoquímico como los procesos biológicos, geológicos y químicos que ocurren en la atmósfera, océanos y sistema terrestre y al intercambio de nutrientes que ocurre entre estos sistemas. La circulación de nutrientes es uno de los aspectos claves en la dinámica de los ecosistemas terrestres y forman parte substancial en la evolución de los sistemas ecológicos (Likens, 2001).

En relación al ciclo del Carbono, los ecosistemas terrestres y acuáticos realizan un intercambio constante de sus componentes con la atmósfera. Como consecuencia de esto, la composición química de la atmósfera se encuentra fuertemente influenciada por procesos naturales (*e.g.*, intercambio gaseoso de plantas y animales, volcanismo, etc.) y procesos antropogénicos a nivel local y global (Sala *et al.*, 2000, Schulze, 2000, Madsen, 2008).

En la naturaleza, el Carbono se encuentra en forma orgánica e inorgánica. Con respecto a la forma inorgánica, la mayor fuente se presenta en forma gaseosa, representado principalmente por el monóxido y por el dióxido de carbono (CO , CO_2), respectivamente. En el suelo se encuentra una segunda fuente de C inorgánico, en donde las formas más comunes son el ácido carbónico (H_2CO_3), el carbonato de calcio (CaCO_3) y la dolomita $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ (Sala *et al.*, 2000, Larcher, 2003). Por su parte el C orgánico, se encuentra formando parte de moléculas vitales de todo ser vivo como son; hidratos de carbono, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, y además formando parte del humus del suelo, que corresponde a un conjunto de compuestos orgánicos de alto a bajo peso molecular. Estos son producto de la descomposición microbiana de principalmente fuentes orgánicas que son incorporadas al suelo (Godoy *et al.*, 2014). De esta forma la transformación del C-inorgánico a C-orgánico es realizado principalmente por las

plantas vía fotosíntesis y algunas bacterias (*Thiobacillus*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*), constituyendo la forma de C más activamente reciclada (Larcher, 2003, Madsen, 2008). Por medio del Ciclo de Calvin (fotosíntesis), el CO₂ es fijado y posteriormente transformando en glucosa (C₆H₁₂O₆), quedando el C inmovilizado en forma temporal en los organismos vivos. Luego que éstos llevan a cabo sus procesos metabólicos, liberan CO₂ y cuando mueren, los microorganismos principalmente bacterias y hongos (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Sarcina*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, entre otros) por medio de la acción de exo-enzimas, mineralizan los compuestos orgánicos, provocando un retorno de una alta proporción del C a la atmósfera en forma de CO₂ (Madsen, 2008). Si bien una buena proporción del C-orgánico se mineraliza (alrededor del 85%), también un porcentaje de éste forma el humus del suelo. El humus está constituido por moléculas orgánicas parcialmente degradadas, más desechos metabólicos (antibióticos, aminoácidos, poli- y monosacáridos, pigmentos, etc.) de los propios microorganismos. Por otro lado una parte importante del C también es secuestrado en el suelo a diferentes profundidades, y puede permanecer por tiempos prolongados sin ser mineralizado (Madsen, 2008, Neculman *et al.*, 2013).

El ciclo del nitrógeno corresponde a cada uno de los procesos biológicos y abióticos en que se basa el suministro de este elemento en los seres vivos. Es uno de los ciclos biogeoquímicos importantes en que se basa el equilibrio dinámico de composición de la biosfera terrestre. El N es un elemento químico que en la naturaleza se encuentra tanto en formas orgánicas como inorgánicas, que son asimilables o liberadas como producto de las diferentes transformaciones bióticas y abióticas. El gran reservorio de N lo constituye principalmente la atmósfera con un 78% que corresponde fundamentalmente a su forma gaseosa, como gas inerte (N_{2(g)}). Este gas en si no es aprovechable directamente por la mayoría de los organismos, sino

cuando forma parte de moléculas orgánicas como proteínas (formadas por aminoácidos), ácidos nucleicos (bases nitrogenadas) y moléculas energéticas como el ATP (Adenosin trifosfato) (Jaffe, 2000).

Dentro del ciclo del N en la naturaleza, el primer evento que acontece es la fijación de $N_{2(g)}$ y su consecuente conversión a moléculas orgánicas. Este proceso biológico, lo realizan exclusivamente los procariontes como las bacterias, como *Azotobacter* (aerobia), *Clostridium* (anaerobia estricta), *Klebsiella* (anaerobia facultativa) y algunas cianobacterias (aerobias o anaerobias facultativas) (Newton, 2007). Independiente de la especie de bacteria que fije biológicamente el $N_{2(g)}$, el proceso es llevado a cabo por medio de la acción de la enzima nitrogenasa. En esta reacción se obtiene como producto el amoníaco (NH_3), el que a su vez es incorporado por las bacterias para la síntesis de sus aminoácidos (Madsen, 2008). Esta enzima es un complejo enzimático compuesto por metaloproteínas, entre ellas la dinitrogenasa codificada por el gen *nifH* (Mo-Fe proteína) y dinitrogenasa reductasa codificada por los genes *nifD* y *nifK* (Fe proteína). Un segundo evento en el ciclo del N lo constituye la proteólisis que realizan bacterias y hongos del suelo (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Proteus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Trichoderma*, etc.), donde las proteínas que forman parte de la MOS son hidrolizadas a aminoácidos y éstos posteriormente son desaminados y descarboxilados retornando a la atmosfera el N en forma de NH_3 y el C en forma de CO_2 . Un tercer evento es la nitrificación, proceso que es llevado a cabo por bacterias aerobias estrictas que además son lito-autótrofas (*Nitrosomomas* y *Nitrobacter*). Estos procariontes, oxidan el NH_4^+ a NO_2^- y finalmente el NO_2^- a NO_3^- , este último compuesto queda en el suelo y sirve como nutriente para las plantas y para poblaciones de microorganismos heterotróficos. Sin embargo, si el NO_3^- no es utilizado rápidamente, se lixivia desde el suelo hacia las fuentes de agua más profundas o hacia cursos de

agua, con la pérdida asociada al ecosistema y contribuyendo al proceso de eutrofización de los sistemas acuáticos (superficiales y/o subterráneos). Un cuarto evento denominado desnitrificación, es llevado a cabo por bacterias y hongos anaerobios facultativos (*Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Absidia*, *Fusarium*, *Penicillium*, entre otros) que en condiciones de anaerobiosis, utilizan el NO_3^- como aceptor de electrones, provocando la reducción del NO_3^- a $\text{N}_2(\text{g})$, evento final con el que el ciclo se completa. (Madsen, 2008).

La figura 1 esquematiza los ciclos biogeoquímicos correspondientes al carbono y nitrógeno en ecosistemas boscosos, indicando además sus principales rutas.

2.3. El suelo

Es un recurso viviente, dinámico y no renovable, al menos en una escala de tiempo humano (García *et al.*, 2003), cuya condición y funcionamiento es vital para la productividad del ecosistema y para el mantenimiento de la calidad ambiental local, regional y global (Doran *et al.*, 1999). Los procesos de descomposición y mineralización de la materia orgánica en el suelo tienen un papel importante para la conservación del balance entre la producción y el consumo del CO_2 de la biosfera, tanto al reciclar el C atmosférico que está en forma de CO_2 como en la formación de la materia orgánica, la cual es reservorio no solo del C atmosférico sino que también de otros elementos. Las etapas esenciales de los ciclos globales, como el del agua, C, N, P y S, suceden en el suelo. Es así como la velocidad de ciclaje y la disponibilidad de estos.

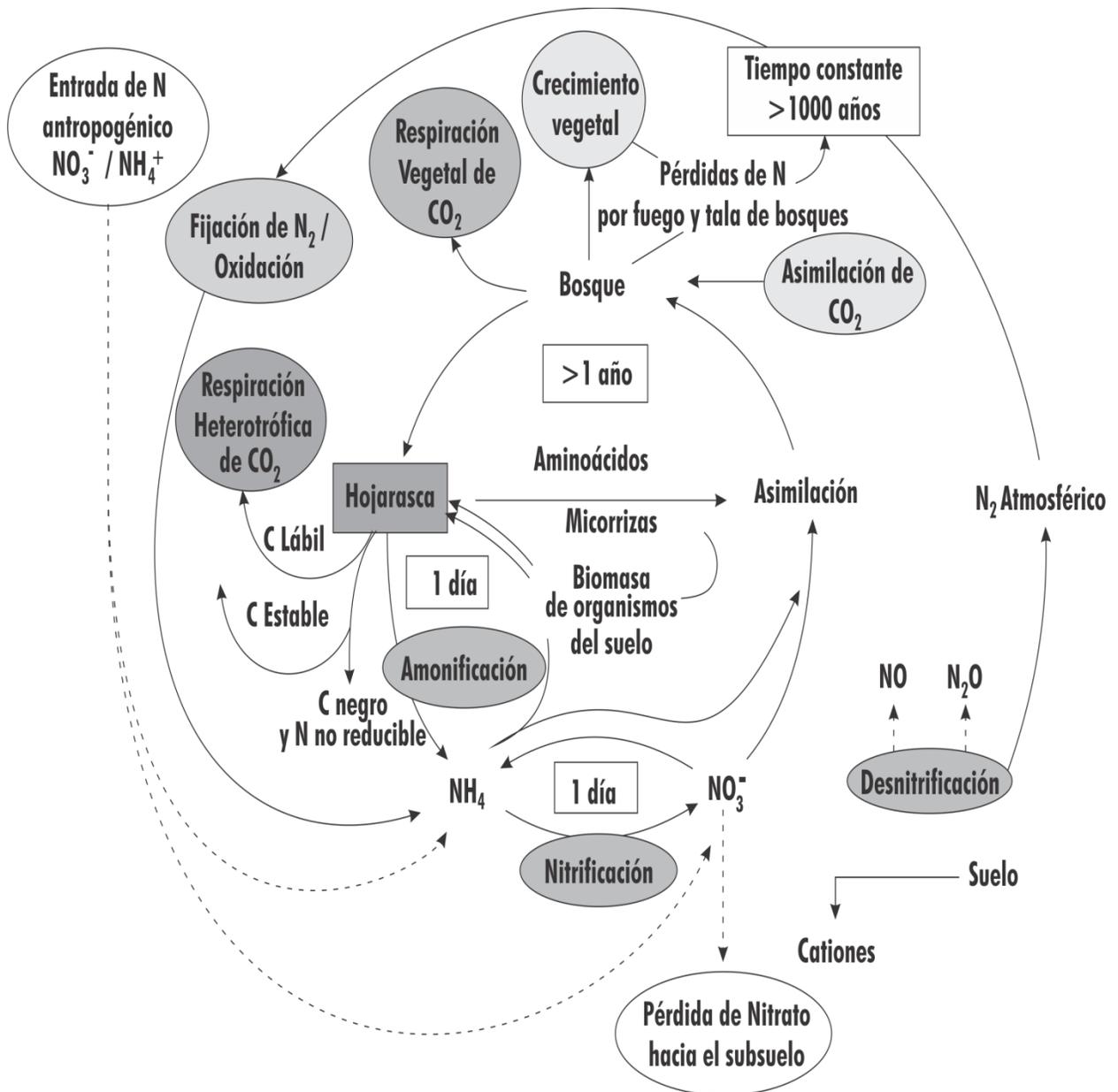


Figura 1. Esquema general de las rutas principales del C y N en ecosistemas boscosos. Se resaltan los tiempos de integración convencionales o tiempos de residencia promedio en los diferentes subciclos. Las flechas enteras indican el flujo de C y las punteadas, las rutas del N de origen antropogénico. Fuente: esquema Godoy *et al.*, 2014 (Modificado de Schulze, 2000).

elementos están siendo alteradas continuamente por las diferentes formas de vida y por la explotación desmedida de los recursos naturales (Lara *et al.*, 2003).

Las prácticas de manejo convencionales como los cambios en los patrones del uso del suelo, la utilización de plaguicidas y fertilizantes han tenido una fuerte influencia sobre la calidad del agua y de la atmósfera, generando variaciones además en la calidad del suelo, en la producción y consumo de gases como el CO₂, óxido nitroso y metano (Doran y Zeiss, 2000). Además, el manejo convencional ha promovido la pérdida de materia orgánica, reduciendo la fertilidad y la estabilidad estructural e incitando de esta forma a un incremento en la erosión y del CO₂ atmosférico; favoreciendo así al calentamiento global (Roldan *et al.*, 2003). Los niveles elevados de gases asociados al efecto invernadero y las alteraciones en los ciclos hidrológicos han contribuido a la generación de cambios en el clima global y en la reducción de la capa de ozono (Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007). Para afrontar estas amenazas es necesario comprender como el manejo del suelo está afectando sus procesos, además de la necesidad de plantear alternativas de uso que mantengan tanto la calidad ambiental como la eficiencia de este recurso. En base a esto, es importante hacer una correlación a nivel particular en reciprocidad a nuestros bosques, especialmente a aquellos que son antiguos y que constituyen una parte importante de la reserva mundial de bosques templados del mundo (Frank *et al.*, 2009).

2.3.1. Andisoles

Son suelos desarrollados sobre material piroclástico depositado por erupciones volcánicas y cuya principal característica es la variedad de material parental (roca madre) debido a la naturaleza de

los materiales expulsados en las erupciones. El origen de estos suelos se debe al rápido enfriamiento de los materiales expulsados, que no permite la cristalización de los minerales con un alto grado de organización, resultando así un material vítreo o vidrio volcánico amorfo. Son en estos suelos donde se ubica la mayor parte de los bosques templados de Chile (Tosso, 1985), que poseen un alto contenido de materia orgánica (MOS), acumulada en forma de complejos de humus-Fe y Al (Huygens *et al.*, 2005; Matus *et al.*, 2006). La MOS adsorbida por el alofán (suelos provenientes de cenizas volcánicas, depositadas en ambientes de alta pluviosidad) presenta una dinámica de la MOS más lenta que en suelos no volcánicos, debido a factores de descomposición que protegen a la misma, interfiriendo en los principales ciclos de nutrientes (C, N y P). Como consecuencia de lo anterior, poseen una alta retención de MOS (hasta un 31 %) (Matus *et al.*, 2008, 2009). El efecto de las propiedades físicas del suelo tipo Andisol, que se caracteriza por presentar baja densidad, influye sobre las propiedades estructurales y que por cambio en su uso disminuyen la permeabilidad del agua y aire junto con la capacidad de retención de agua y contracción, en particular frente a escenarios de regímenes climáticos contrastante (elevada precipitación y sequía), modificando su comportamiento dinámico y productividad (Huygens *et al.*, 2005).

Recientes estudios señalan que los bosques de lento crecimiento, pueden continuar almacenando carbono y contribuir en forma significativa a su secuestro, en particular con distribución en áreas boscosas y acumulación en el suelo profundo (Matus *et al.*, 2008, 2009). Se prevé que el tamaño de los reservorios de C orgánico en suelos volcánicos y su tiempo de residencia medio en suelos profundos, puede incrementar, con períodos estimados de 2.000–10.000 años (Fontaine *et al.*, 2007). Un estudio comparativo de perfiles de suelo de bosques montañosos de lento crecimiento en el Sur de Chile en áreas libres de contaminación mostró que poseen una relación C/N = 33,0–

49,3, comparados con áreas de bosques de coníferas con entrada de N atmosférico, que poseen índice de la relación más bajos (16,2–23,5) (Zarin *et al.*, 1998). La materia orgánica disuelta en la matriz del suelo, cuyo origen corresponde a lixiviados de origen biótico y exudados de las raíces y microflora, y de la hidrólisis de materia orgánica insoluble en el suelo, es una fuente lábil de C para el edafón; sin embargo, podría ser acumulada en el perfil del suelo, favorecido por las características físico-químicas del sustrato y por las condiciones climáticas de la región (Neculman *et al.*, 2013).

Cambios en los patrones de distribución del pool de N en suelos volcánicos de la región, como producto de la deforestación de un bosque primario, indican una tendencia hacia la reducción de N hacia las fracciones de alto peso molecular (humina y ácidos húmicos) (Borie *et al.*, 2002). Esto produce una pérdida del equilibrio natural, afectando la rotación y reservorio de N, que en último término afectan el ciclo de N y C (Huygens *et al.*, 2005). Las bajas tasas de N-min en los meses fríos y húmedos de invierno, pueden ser explicados por la absorción de N inorgánico por las raíces y su eventual inmovilización en la biomasa microbiana (Rivas *et al.*, 2009). El papel de algunos procesos biogeoquímicos claves, como son la nitrificación heterotrófica, reducción de nitrato vía des-asimiladora hacia amonio y un ciclo de nitrógeno inorgánico disuelto (DIN) que opera independientemente de las pérdidas de nitrógeno orgánico disuelto (DON), son discutidos como mecanismos claves en estos bosques templados lluviosos, al minimizar las pérdidas a través de emisiones gaseosas o por escorrentía (Pérez *et al.*, 2004, Huygens *et al.*, 2008). Estos autores demostraron que el ciclo de N en bosques siempreverdes lluviosos en Chiloé (42°S), cambia durante los estadios sucesionales y, que existe una estrecha relación dependiente en como los regímenes de perturbación del bosque (incendios, tala) afectan la pérdida del C y N, la fijación biológica de N y los ensamblajes del componente biótico.

2.4. Evaluación biológica del suelo

Una evaluación de la diversidad biológica de suelo, no solo debe estar basada en la identificación y cuantificación de los microorganismos involucrados, sino que es esencial investigar el rol funcional para así definir el significado de la diversidad microbiana (Valenzuela *et al.*, 2001). El material vegetal depositado en el suelo constituye la principal fuente de nutrientes para la vegetación, fauna y microorganismos edáficos. Un gran porcentaje de la degradación del material vegetal es realizado por la microbiota del suelo, donde los hongos y bacterias son el principal componente (Madsen, 2008).

Es así como las propiedades de los suelos varían naturalmente a través del tiempo por factores que determinan su formación, como la precipitación, los organismos que lo habitan, la actividad antropogénica, etc. En consecuencia, no existe solo una medida biológica o química para determinar el estado y calidad de un suelo, sino que para poder aproximarse al entendimiento de los ciclos de los nutrientes y a los niveles de actividad microbiana responsables de estos procesos, se investigan varias actividades enzimáticas a la vez, dado que son estos parámetros los que dan cuenta de las reacciones bioquímicas que suceden dentro de este heterogéneo y complejo sistema (Steubing *et al.*, 2002; Madsen, 2008). Además, ellas están estrechamente relacionadas con las propiedades físicas, químicas y biológicas y son sensibles a los cambios generados por el manejo o intervención del hombre (Godoy *et al.*, 2013). Por ende las actividades enzimáticas permiten monitorear el funcionamiento del suelo, respondiendo a la necesidad de entender los efectos positivos y negativos sobre las propiedades y los procesos que suceden dentro de esta matriz y las relaciones entre estos factores, los usos y prácticas de manejo (Madsen, 2008; Rivas *et al.*, 2009).

2.5. Enzimas en el suelo

Las enzimas son biocatalizadores de naturaleza proteica de alto grado de especialización, en que su gran mayoría necesitan de coenzimas no proteicas o cofactores para llevar a cabo su rol catalítico, el que es ejecutado en un ambiente específico denominado sitio activo, dentro del cual una reacción determinada puede transcurrir a mayor velocidad (Nelson y Cox, 2009). Este confinamiento posee un elevado grado de especificidad respecto a sus sustratos, ya que la superficie del sitio activo se encuentra revestida con residuos aminoacídicos, con sustituyentes específicos que se unen al sustrato, catalizando su transformación química hacia la formación del producto. La velocidad de la reacción catalizada, estará determinada por la energía requerida para que se produzca el alineamiento de los grupos reactivos, los reordenamientos de enlaces y otras transformaciones, que son necesarias para que ocurra el proceso catalítico (García *et al.*, 2003). Para que haya reacción, las moléculas deben desde el estado basal de energía alcanzar un nivel energético superior, momento en el que se alcanza el estado de transición, que corresponde a un momento molecular fugaz en el que acontecimientos tales como rotura o formación de enlaces y desarrollo de cargas han llegado al instante preciso en el que el colapso hacia sustrato o hacia producto es igualmente probable (Lehninger, 2009).

Los microorganismos y las raíces de las plantas (incluidas las micorrizas), liberan enzimas al suelo por secreción o por lisis celular; un bajo porcentaje de estas proteínas quedan inmovilizadas y estabilizadas en interacción con los diferentes componentes de la fase sólida del suelo, como las arcillas, moléculas orgánicas y complejos órgano-minerales (Joinville *et al.*, 2004). Dependiendo del material, la interacción se da por mecanismos que incluyen: micro encapsulación, enlaces transversales, formación de co-polímeros, adsorción, entrapamiento, intercambio iónico y

enlaces covalentes (Dick y Tabatabai, 1992). Solo un bajo porcentaje de las enzimas que abandonan las células se encuentran estabilizadas, ya que se liberan a un medio ambiente donde pueden ser sometidas a desnaturalización no biológica, adsorción, inactivación o degradación por proteasas (García *et al.*, 2003). Al igual que en los otros sistemas vivos, la velocidad de la reacción catalizada por una enzima es dependiente del pH, de la fuerza iónica, de la temperatura y de la presencia o ausencia de inhibidores (Burns, 1982; Sarkar *et al.*, 1989). Las enzimas proceden de células proliferantes, latentes o restos de ellas. La mayor producción de enzimas extracelulares se le atribuye a microorganismos producto de su gran biomasa, su alta actividad metabólica y su corto ciclo de vida, en contraste con otros organismos que también las pueden liberar como las plantas y los animales. En el suelo se ha detectado la actividad de hidrolasas, transferasas, oxidoreductasas y liasas que están directamente relacionadas con los ciclos del C, N, P y S (García *et al.*, 2003). Las enzimas del suelo son consideradas “sensores”, ya que entregan información sobre el estado y condiciones fisicoquímicas del suelo (Aon y Colaneri, 2001, García *et al.*, 2003), de esta forma los cambios provocados en la actividad de las enzimas no solo dependen de las variaciones de la expresión génica, sino también de factores ambientales que afectan a la actividad (Nanniperi *et al.*, 2002).

2.5.1. Enzimas en estudio

Bacterias y hongos, sintetizan y excretan enzimas extracelulares tales como ureasas, proteasas, esterases, fosfatasas, etc., catalizando las reacciones para la descomposición de la MOS y de los ciclos de nutrientes en los ecosistemas terrestres y acuáticos (Taylor, 1989; Zhang *et al.*, 2005). La ureasa es una enzima que participa en el ciclo del N, como catalizador de la reacción de

hidrólisis de la urea en amonio y dióxido de carbono (Steubing *et al.*, 2002, García *et al.*, 2003). Las proteasas catalizan las reacciones que degradan proteínas y péptidos (Nannipieri *et al.*, 1994). La nitrato reductasa que cataliza la reducción del NO_3^- en NO_2^- , juega un importante rol en el proceso de desnitrificación, actuando en el primer paso de una cascada de reacciones que tiene como producto N_2 (Abdelmagid y Tabatabai, 1986), por lo que, al igual que ureasas y proteasas, están involucradas en el ciclo del N. Por su parte las celulasas son glucosidasas que corresponden a un conjunto de enzimas capaces de catalizar la degradación de la celulosa, específicamente hidrolizando los enlaces glucosídicos β 1-4 entre las unidades de glucosa del polímero, originando el disacárido celobiosa como producto de la catálisis. Derivan de aquellos organismos celulolíticos fundamentalmente hongos (*Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicilium* etc.) y bacterias, tanto aerobias como anaerobias (*Cellulomonas*, *Clostridium*, *Streptomyces* etc.) (Valenzuela *et al.*, 2008), que de esta manera forman parte del ciclo del C. La hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA), es una reacción que involucra diversos grupos de enzimas, tales como: proteasas, lipasas, esterases, constituyendo un indicador sensible de la actividad microbiana total de la hojarasca y el suelo (Adam y Duncan, 2001; Green *et al.*, 2006). Sin embargo, considerando la capacidad de resiliencia del ecosistema (definiéndolo como un ente vivo y dinámico), se puede pensar que cualquier cambio medio ambiental podría ser detectado en su inicio por su componente biológico (por ej.; enzimas). De ahí que la presencia o deficiencia de enzimas del suelo, puedan ser consideradas como un bioindicador sensible ante una posible perturbación ambiental.

2.6. Hipótesis

- **H₁:** La actividad biológica del suelo en bosques templados del sur de Chile disminuye por la perturbación antropogénica por cambios en la cobertura vegetal del suelo y consecuente exposición a un aumento de la temperatura medio ambiental.
- **H₂:** La actividad biológica del suelo en bosques templados lluviosos varía temporalmente a través del año, asociada a variaciones estacionales del microclima y estatus del N inorgánico disponible en el suelo.

2.7. Objetivos

2.7.1. Objetivo general:

- Determinar la variación de la actividad enzimática del suelo en el tiempo, como un bioindicador en los procesos naturales del ecosistema boscoso templado lluvioso de Chile y la evaluación de los impactos producto de la intervención antropogénica.

2.7.2. Objetivos específicos:

- Analizar y comparar la actividad enzimática potencial del suelo en 3 parcelas experimentales del bosque templado lluvioso, elegidas bajo condición natural (prístina) versus sitios con diferentes grados de perturbación antrópica por actividad silvicultural.
- Determinar la variación estacional de las actividades biológicas del suelo en respuesta a las variaciones del microclima y química de suelo (NO_3^- y NH_4^+) en cada parcela experimental, del bosque templado lluvioso.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Reactivos

Determinación de celulasa: Buffer Acetato 2 M pH 5.5 (Ácido Acético, Acetato de Sodio anhidro). Reactivo A: Carbonato de Sodio anhidro, Cianuro de Potasio. Reactivo B: Hexacianoferrato III de Potasio. Reactivo C: Ácido Sulfúrico concentrado (H_2SO_4), Dodecilsulfato de Sodio (SDS), Sulfato de Amonio-Fierro III. Solución Madre (Glucosa anhidra 25 μ g/ml), Solución Sustrato (Carboximetilcelulosa sal sódica 7 mg/mL) (CMC).

Determinación de proteasa: albúmina de bovino 10 mg/mL; Reactivo de Biuret: Ioduro de Potasio, Hidróxido de Sodio (NaOH) 2.5 N, Sulfato de Cobre ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$), Tartrato de Sodio y Potasio; Solución sustrato (Gelatina 10 mg/mL).

Determinación de ureasa: Ácido Dicloriosocianuro-Sodio dihidratado, Hidróxido de Sodio (NaOH) 0.3 M, Cloruro de, Nitroprusiato de Sodio; Salicilato de Sodio ($C_7H_5NaNO_3$); Solución de extracción de KCl 1M (KCl, HCl 1M); Solución sustrato (Urea ($CO (NH_2)_2$) 4.8 mg/mL).

Determinación de nitrato reductasa: Tampón Fosfato de potasio 25 mM. pH 7.2, 30 ml/L de n-propanol, 30 ml/L de Tritón X-100, Sulfanilamida, N- N-(1-naftil) etilendiamino dihidrocloruro; Solución sustrato (Nitrato de Potasio (KNO_3) 0,01 gr/mL).

Determinación de la hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA): Tampón Fosfato de Potasio 60 mM, pH 7.6, Mezcla de Cloroformo:Metanol (2:1); Solución sustrato (Diacetato de fluoresceína 1 mg/mL).

3.1.2. Equipos

Agitador orbital Boeco® OS-20 Germany, balanza analítica Belltronic® PBX-310, balanza precisa Shimadzu® UX 220 H, baño termorregulado Memmert® WNB7, bomba de vacío Millipore® WP6122050, cámara de secado e incubación Labtech®, destilador Thermo Scientific® easypure II barnstead, espectrofotómetro Shimadzu ®UV-visible UV mini 1240, estufa Binder®, pHmetro Ultrabasic® benchtop, placa calefactora y magnética Labtech® LMS-1003, refrigerador Consul® 240 vortex manual Maxi mix II 37600.

3.1.3. Otros

Cubeta de cuarzo 1 cm (camino óptico), desecador, embudos de vidrio, espátula, filtros de papel Whatman® 42, gradillas para tubos de ensayos, , jeringas 10 mL, matraces Erlenmeyer y aforados 100, 250, 500, 1000 mL, micropipetas Eppendorf® P-100, P-200, P-1000, P-5000, P-10000 µL, papel de aluminio, parafilm®, pinzas, pipetas Pasteur, pipeta volumétrica, pipetas graduadas de 1, 5, 10, 25 mL, piseta, probetas de 100, 500, 1000 mL, propipeta, tips 100, 200, 1000, 5000 y 10000 µL, recipientes de polipropileno de 50 y 80 cc, soporte universal, tubos de ensayo de 10 mL tubos de ensayo de 10 mL, vasos de precipitado de 100, 250, 500 y 1000 mL.

3.2 Métodos

3.2.1. Área de estudio

Las muestras de suelo fueron recolectadas en el Parque Nacional Puyehue ($40^{\circ}47'S - 72^{\circ}12'W$), ubicado en la Cordillera de Los Andes a una altitud de 700-900 m.s.n.m., emplazado entre los sectores Las Parras - Lago Paraíso. Este Parque se localiza entre las provincias de Valdivia y Osorno, en las regiones de Los Ríos y Los Lagos, respectivamente (CONAF, 2008a), (Figura2). Se seleccionaron 3 parcelas de experimentación (de aproximadamente 0,5 ha cada una), las que implican área de estudio control (prístina) y otra área que fue sometida a deforestación (lugar de instalación central hidroeléctrica “Correntoso-Palmar”), separadas por 200 m de longitud, con igual exposición, tipo de suelo y altitud, establecidas en un sector representativo para mediciones *in situ* y colecta de muestras. En forma complementaria se instaló una parcela en un área deforestada en el límite perimetral externo del Parque, con el objetivo de comparar los cambios que ocurren frente a intervención antrópica (silvícola).

- **P₁**: Parcela sometida a deforestación ($54^{\circ} 79' 85'' S$ y $72^{\circ} 95' 38'' W$). Ubicada en el límite perimetral externo del Parque. Es importante señalar que, en los meses iniciales del estudio de las actividades enzimáticas, esta parcela fue sometida a un proceso de intervención total en el mes de Noviembre del 2011, en la cual se liberó la superficie de toda la vegetación arbórea y arbustiva, permaneciendo solo una cubierta herbácea para no alterar el suelo de la parcela. Los árboles talados fueron cortados con una motosierra y los trozos resultantes fueron retirados en forma manual (sin arrastrar por animales de tiro),

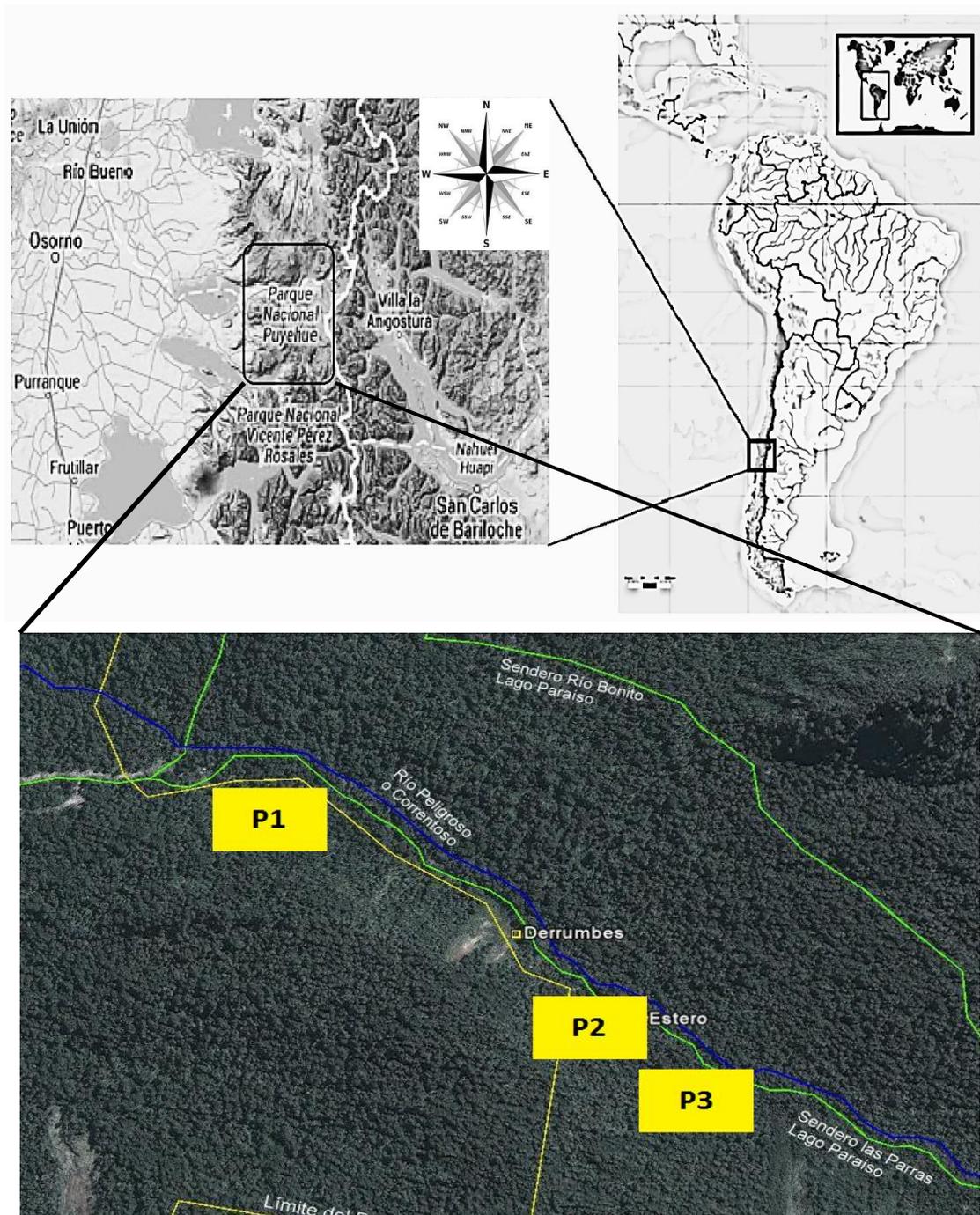


Figura 2. Sitio de recolección muestras de suelo. Parque Nacional Puyehue, emplazado en la Cordillera de los Andes entre las regiones de Los Ríos y Los Lagos. Centro- Sur de Chile.

además no se extrajo ningún tocón (para no perturbar el suelo). Lo mismo fue realizado para las ramas y hojas.

- **P₂**: Parcela semi-intervenida (54° 79' 94'' S y 72° 95' 24'' W). Se encuentra en proceso de regeneración tras ser sometida a manejo silvicultural, consistente a una intervención parcial en donde fue extraída la vegetación arbustiva (Agosto 2011).
- **P₃**: Parcela Control, no posee intervención antropogénica (54° 80' 65'' S y 72° 85' 30'' W), correspondiente a bosque prístino.

3.2.2 Clima y suelo

Ha sido clasificado como templado frío lluvioso, donde las temperaturas medias fueron: mínima de 3,3 °C, máxima de 12,3 °C y media anual de 7,6 °C. Si bien el sector registra precipitaciones estivales, el régimen pluviométrico indica los máximos de lluvias se registran en invierno. Los meses de mayo y junio serían los más lluviosos, mientras que enero y febrero serían los de menor precipitación. Las precipitaciones fluctúan entre los 3.700 mm en el sector de Aguas Calientes (baja altitud) y los 2.700 mm en el sector de Anticura (CONAF, 2008b). En el sector Lago Paraíso, se registran montos del orden de 8.000 mm anuales (Oyarzún *et al.*, 2004). Los meses más cálidos son diciembre, enero y febrero con una temperatura media mensual promedio de 14°C. Las temperaturas más bajas se producen en los meses de junio, julio y agosto con un promedio mensual de 3°C (CONAF, 2008b).

El área posee una topografía compleja de carácter montañoso y los suelos son jóvenes, originados fundamentalmente a partir de cenizas volcánicas, que corresponden al tipo de suelo definido como Trumao (*Typic Dystrandepts*) (Tosso, 1985). La vegetación existente corresponde a bosque siempreverde prístino de *Nothofagus betuloides* (Coigüe de Magallanes) y *Saxegothaea conspicua* (Mañío de hojas cortas), cuya edades estimada es >300 años.

3.2.3 Medición de las variables microclimáticas

En cada una de la toma de muestras mensuales de suelo en las tres parcelas en estudio, se realizaron registros simultáneos de las variables microclimáticas visibles a simple vista, por medio de un protocolo en el que se evaluaba: nubosidad, lluvia, viento, etc. Además, se midió la temperatura del suelo en distintos intervalos de tiempo (0, 20, 40 y 60 min), para lo cual se utilizó un termómetro digital portable, el que era insertado en el suelo con una profundidad de 5 cm. Además, en cada una de las parcelas en estudio se registró la temperatura en intervalos de 1 hora, por medio de la utilización de dispositivos de registro continuo, *data logger* HOBO®, cuyos sensores fueron instalados cuidadosamente para no ser removidos, a una profundidad de 5 cm.

La precipitación en el sitio de estudio fue registrada por medio de pluviómetros instalados en el sitio de estudio. En forma paralela la estación meteorológica, Aguas Calientes, ubicada en el Parque Nacional Puyehue, registró las variables microclimáticas de temperatura (°C) del aire (máxima, media y mínima) y precipitación mensual (acumulada y la máxima) del sitio de estudio.

3.2.4. Colecta de suelo

En cada parcela se ubicaron 3 subparcelas al azar de 0,1 ha, distantes entre 10-50 m una de otra. En cada subparcela se seleccionaron al azar tres calicatas. En cada una de estas fueron tomadas en forma mensual, 3 muestras de suelo (Ej: P1A, P1B y P1C), cada una de 2 kg aproximadamente para obtener una muestra compuesta de los primeros 10 cm de profundidad del suelo. Esta toma de muestras se realizó en forma mensual por un periodo de 15 meses.

En cada oportunidad las muestras de suelo colectadas para el análisis, fueron depositadas en bolsas plásticas transparentes de 24x40 cm, debidamente rotulada y posteriormente trasladadas en cajas aislantes, con refrigerante en su interior, hasta el laboratorio para proceder al análisis enzimático antes de las 3 horas de haber realizado la colecta del material. Previamente a la ejecución de los experimentos de las actividades enzimáticas, las muestras de suelo fueron tamizadas a 2 mm, en tamices limpios mediante el uso de bandejas y guantes quirúrgicos dispuestos especialmente para el proceso. En forma inmediata se procedió a pesar el material de suelo y así desarrollar en forma expedita los procedimientos analíticos.

3.2.5. Determinación de la humedad del suelo

Se utilizó el método gravimétrico, que evalúa el cambio del peso inicial de suelo, tras perder el contenido hídrico que este posee luego de ser sometido a un proceso de desecación. Para ello las 3 muestras de suelo de las parcelas en estudio, fueron tamizadas mediante el uso de un tamiz de 2 mm de diámetro de partícula. Posteriormente se pesaron 10 gr. que fueron depositados en bolsas

de papel rotuladas. Luego las muestras se colocaron en una estufa a 105 °C por un periodo de 24 hrs, hasta peso constante.

El contenido de humedad se calculó a partir de la diferencia de peso (gramos) entre el suelo fresco (húmedo) y el suelo seco, para así expresar el resultado obtenido en porcentajes (Steubing *et al.*, 2002).

$$1. \text{ Humedad del suelo (\%)} = \frac{\text{Peso húmedo (gr.)} - \text{Peso seco (gr.)} * 100}{\text{Peso húmedo (gr.)}}$$

3.2.6. Variables químicas del suelo

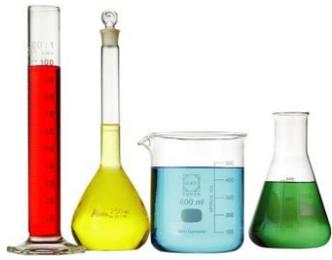
Se hizo análisis de los parámetros químicos del suelo (pH, C_{total}, N_{total}, relación C/N), con el fin de caracterizar el suelo de cada una de las parcelas en estudio y así poder relacionar estos parámetros con los valores que se obtuvieron de las actividades enzimáticas del suelo en diferentes grados de perturbación antrópica.

Para obtener las muestras de suelo para el análisis se realizó una calicata en cada parcela experimental, donde las muestras de suelo fueron colectadas en el horizonte superficial de 0-20 cm de profundidad. Las muestras de suelo fueron analizadas por servicio en el Laboratorio de Nutrición y Suelos Forestales, Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales, de la Universidad Austral de Chile.

La determinación de nitrato y amonio con el fin de cuantificar sus concentraciones, permitirá individualizar las diferentes parcelas experimentales y determinar si existe relación significativa entre las actividades enzimáticas en estudio y N inorgánico. De esta forma, a partir de las muestras de suelo colectadas en forma mensual, se procedió al análisis por la extracción de N inorgánico (NO_3^- y NH_4^+) utilizando KCl (solución de extracción). Posteriormente a través de técnicas colorimétricas se identificaron ambos analitos usando el método del ácido sulfosalicílico (Robarge *et al.*, 1983) para la identificación de nitrato (N- NO_3^-), mientras que para el amonio (N- NH_4^+) se utilizó la metodología del indofenol (APHA, 2005). Las muestras de suelo fueron analizadas en el laboratorio de Biogeoquímica, Instituto de Ciencias Ambientales y Evolutivas, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

3.2.7. Actividades enzimáticas potenciales

Para la cuantificación de las actividades enzimáticas se utilizaron técnicas que se fundamentan en los principios de la espectrofotometría. En donde por medio de la utilización de reactivos específicos se consigue una reacción química con los productos obtenidos a partir de las diferentes actividades enzimáticas estudiadas. Estos reaccionan en forma proporcional generando soluciones coloreadas la que por medio del espectrofotómetro se consigue cuantificar sus absorbancias respectivas en regiones del espectro visible, permitiendo así conocer la concentración del producto de las catálisis, lo que da cuenta de las actividades enzimáticas (Figura 3).

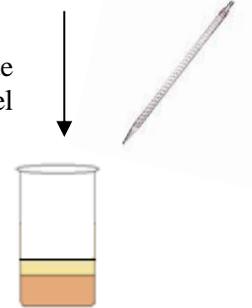


1.- Preparación de los medios de incubación y reactivos necesarios en el procedimiento.

2.- Se pesan los gr. de suelos según se indique para cada protocolo de medición enzimática.



3.- Adición medio de incubación, que contiene el sustrato específico.



4.- Incubación:

Proteasa: 37° C durante 2 horas.

Nitrato reductasa: 30° C durante 24 horas.

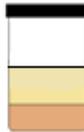
Ureasa: 37° C durante 2 horas.

Celulasa: 50° C durante 24 horas.

Hidrólisis FDA: 30° C durante 1 hora.



5.- Luego de la incubación, la muestra se deja enfriar para después ser filtrada.



7.- Luego del desarrollo del color, se mide la absorbancia a la longitud de onda que indique el protocolo.



6.- Se colecta el filtrado, se toma una alícuota y se adiciona el reactivo para la colorimetría.

Figura 3: Esquema base de los procedimientos colorímetros que se utilizan para la cuantificación de las diferentes actividades enzimáticas del suelo analizadas.

3.2.7.1. Determinación de celulasa

La actividad potencial de la enzima celulasa se determinó por duplicado para muestras y controles según el método de la CM-celulosa, modificado por Schinner y Von Mersi (Schinner y Von Mersi, 1990). Para ello se pesaron 5 gr de suelo en un recipiente de polipropileno tapa rosca de 80 cc. Se adicionaron 15 mL de tampón acetato y 15 mL de solución compuesta por CMC (Carboximetil Celulosa), se cerró el frasco y se incubó durante 24 hrs., a 50 °C. Se filtró y se diluyó 1 mL del filtrado con 30 ml (suelos forestales). Luego 1 mL del filtrado diluido fue vertido en tubos de vidrio. Se adicionó 1 mL del reactivo A y 1 mL del reactivo B. Finalmente se mezcló en vortex y se llevó a ebullición en baño termoregulado (100 °C) por 15 min. Después, se dejó enfriar en baño de agua a 20 °C durante 5 minutos, se adicionó 5 ml del reactivo C, se mezcló y se dejó reposar a una temperatura de 20 °C por 60 min para el desarrollo del color azul de berdines. Finalmente, se midió la densidad óptica dentro de los siguientes 30 minutos a 690 nm. frente al blanco.

Para obtener la concentración de glucosa equivalente de cada muestra se procedió a realizar una curva de calibración, para lo que se utilizó una solución madre de glucosa monohidratada. Se prepararon soluciones de concentración conocida; 0,0028, 0,056, 0,084, 0,0112, 0,0140 y 0,0168 mg/mL respectivamente. Los datos obtenidos fueron graficados en función de; A° (Absorbancia) versus concentración y la pendiente obtenida correspondió al factor de calibración. Luego, los datos de absorbancia obtenidos a partir de las diferentes muestras analizadas (hecho previamente el cálculo de la diferencia entre el tubo control y el tubo de muestra), fueron cuantificados mediante la utilización de la relación; $\text{Absorbancia (A)} = \text{Factor de Calibración} \cdot \text{Concentración}$, luego multiplicando por los diferentes factores de dilución atribuidos a las diluciones realizadas

durante el procedimiento, se obtuvo la concentración de glucosa equivalente, la que equivale al producto obtenido a partir de la catálisis del complejo enzimático de la celulasa. Los resultados fueron expresados en función de la glucosa equivalente por la relación: $\text{mg glucosa gss}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$.

3.2.7.2. Determinación de ureasa

La actividad de la enzima ureasa se determinó por duplicado para muestras y controles según el método descrito por Steubing *et al.*, (2002). Para ello se pesaron 5,0 gr de suelo húmedo y fino o una cantidad equivalente de suelo fresco y se depositó en un recipiente de polipropileno tapa rosca de 80 cc. La muestra fue humedecida con 2,5 mL de la solución de urea (1). Luego se incubó a 37°C durante 2 horas, agitando a intervalos regulares. Luego se procedió a enfriar la solución a temperatura ambiente. Después del enfriamiento se adicionó nuevamente 2,5 mL de urea (1) y se agregaron 47,5 mL de la solución de KCl (2), se agitó durante 30 min. Esta solución se filtró y del filtrado se tomó 1 mL que fue depositado en un tubo de ensayo, diluyendo con 9 mL de agua. Finalmente se adicionaron 5 mL de la solución mixta (5) (Mezcla de las soluciones 3,4 y agua destilada), 2 mL de solución de oxidación (6) (Ácido dicloroisocianuro-sodio dihidrato) y se agitó durante 30 min. Finalmente se midió la absorbancia de la muestra contra el blanco a 660 nm.

Para obtener la concentración de amoníaco de cada muestra se procedió a realizar una curva de calibración, para lo que se utilizó una solución madre de cloruro de amonio. Se prepararon soluciones de concentración conocida; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 12,0; 14,0 y 17,0 $\mu\text{g/mL}$. Los datos obtenidos fueron graficados en función de; A° (Absorbancia) versus concentración y la pendiente

formada correspondió al factor de calibración. Luego los datos de absorbancia obtenidos a partir de las diferentes muestras analizadas (hecho previamente el cálculo de la diferencia entre el tubo control y el tubo de muestra), fueron cuantificados mediante la utilización de la relación; Absorbancia (A) = Factor de Calibración • Concentración, luego multiplicando por los diferentes factores de dilución atribuidos a las diluciones realizadas durante el procedimiento se obtuvo la concentración de amonio, que equivale al producto obtenido a partir de la catálisis enzimática de las ureasas. Los resultados fueron expresados en función de la relación; $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$.

3.2.7.3. Determinación de proteasa

La actividad de la enzima proteasa se determinó por duplicado para muestras y controles mediante la reacción de Biuret según Toro (2005). Se pesaron 5,0 gr de suelo fresco tamizado y se depositaron en un recipiente de polipropileno de 125 mL con tapa rosca. Se adicionaron 25 mL de agua desionizada. Luego se adicionaron 25 mL de la proteína (Gelatina) que actúa como sustrato de la enzima (Proteasa). Se Incubó la muestra por 2 horas a 37 °C, se agitó 4 veces por cada hora (una vez cada 15 minutos). Luego, se retiró la muestra de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente al menos por 15 minutos. Después, se filtró la muestra utilizando papel filtro N°2. Una vez filtrada se utilizaron 700 μL de la muestra y 2,8 mL del reactivo de Biuret para el desarrollo del color azul purpura. El color se dejó desarrollar durante 30 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia a 540 nm contra el blanco. Si hubo acción enzimática, las proteínas que constituían la gelatina serán hidrolizadas y la reacción de Biuret dará negativa. En una hidrolisis enzimática parcial, el reactivo de Biuret cuantificara las proteínas remanentes.

Para determinar la actividad proteasa de las muestras se realizó una curva de calibración para lo que se utilizó una solución madre de gelatina. Se prepararon soluciones de concentración conocida; 0,08; 0,20; 0,40; 0,80; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 y 12,0 mg/ml. Los datos obtenidos fueron graficados en función de; A° (Absorbancia) versus concentración y la pendiente formada correspondió al factor de calibración. Luego los datos de absorbancia obtenidos a partir de las diferentes muestras analizadas (hecho previamente el cálculo de la diferencia entre el tubo control y el tubo de muestra), fueron cuantificados mediante la utilización de la relación; Absorbancia (A) = Factor de Calibración • Concentración, luego multiplicando por los diferentes factores de dilución atribuidos a las diluciones realizadas durante el procedimiento se obtuvo la concentración de proteínas que fueron hidrolizadas por la acción de las proteasas. Los resultados fueron expresados en función de la relación; mg. gelatina gss⁻¹ 2h⁻¹.

3.2.7.4. Determinación de nitrato reductasa

La actividad de la enzima nitrato reductasa se determinó por duplicado para muestras y controles según el método de Jaworski (1972) modificado según Faleiros y Cazetta (1996). Se pesaron 5,0 gr de suelo fresco y se depositaron en un frasco de polipropileno tapa rosca de 125 cc. Después fueron adicionados 60 mL de medio de incubación, compuesto de 25 mM de buffer fosfato pH 7,2, 25 mM de KNO₃ (Sustrato), 30 mL/L de n-propanol 30 mL/L de Tritón X-100. Luego el sistema fue sometido a infiltración de vacío para remover el aire contenido en la muestra. La muestra fue incubada durante 24 horas a 30 °C manteniéndose en oscuridad. El nitrito (NO₂⁻) producido por la actividad enzimática de la nitrato reductasa fue determinado utilizando una alícuota de 1 ml de la muestra incubada. A esta alícuota se le adicionó 1 mL del reactivo de

sulfanilamida (10 gr/L en HCl 3M) y 1 mL de N-(1-naftil) etilendiamino dihidrocloruro (0,2 gr/L). Finalmente, se dejó desarrollar el color por 20 min y se procedió a medir la absorbancia a 540 nm.

Para la obtención de la concentración de nitrito (NO_2^-) de cada muestra, se realizó una curva de calibración utilizando una solución madre de nitrito de sodio (NaNO_2). Se prepararon soluciones de concentración conocida; 0,010; 0,025; 0,050; 0,100; 0,200; 0,300 y 0,400 $\mu\text{g/mL}$. Los datos obtenidos fueron graficados como; A° (Absorbancia) versus concentración y la pendiente formada correspondió al factor de calibración. Luego los datos de absorbancia obtenidos a partir de las diferentes muestras analizadas (previamente se calculó la diferencia entre el tubo control y el tubo de muestra), fueron cuantificados mediante la utilización de la relación; Absorbancia (A°) = Factor de Calibración • Concentración, luego multiplicando por los diferentes factores de dilución atribuidos a las diluciones realizadas durante el procedimiento se obtuvo la concentración de nitrito (NO_2^-), que equivale al producto obtenido a partir de la catálisis enzimática de las nitrato reductasa. Los resultados fueron expresados en función de la relación; $\mu\text{g N-NO}_2^- \text{ gss}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$.

3.2.7.5. Determinación hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA)

La reacción de hidrólisis de FDA se determinó por duplicado para muestras y controles según el método de Adam y Duncan (2001) modificado. El suelo húmedo natural se almacena a 4 °C antes del análisis en caso de no ser utilizado en forma inmediata. Para este estudio se utilizó suelo fresco, para ello se pesó 1,0 gr de suelo fresco y se depositó en un tubo centrifuga tipo Falcón de 50 mL. Después se adicionaron 7,4 mL de Buffer fosfato pH 7,2, en el caso de los controles se

adicionó 7,5 mL. Luego se realizó una pre-incubación a 30°C por 10 minutos. Posterior a eso se adicionó a las muestras y blancos 0,1 mL de diacetato de fluoresceína y luego se incubó a 30 °C por 50 min. Finalmente se adicionó 7,5 mL de la mezcla Cloroformo/Metanol (2:1) y se procedió a centrifugar los muestras a 3000 rev/min por un periodo de 5 min para decantar las partículas de suelo que pudieran haber estado en suspensión.

Para obtener la concentración de diacetato de fluoresceína de cada muestra se procedió a realizar una curva de calibración utilizando una solución madre de fluoresceína sal de sodio. Se prepararon soluciones de concentración conocida; 12,0; 18,0; 24,0; 30,0; 36,0 y 42,0 $\mu\text{g/mL}$. Los datos obtenidos se graficaron como; A° (Absorbancia) versus concentración y la pendiente formada correspondió al factor de calibración. Luego los datos de absorbancia obtenidos a partir de las diferentes muestras analizadas (hecho previamente el cálculo de la diferencia entre el tubo control y el tubo de muestra), fueron cuantificados mediante la utilización de la relación; $\text{Absorbancia (A)} = \text{Factor de Calibración} \cdot \text{Concentración}$, luego multiplicando por los diferentes factores de dilución atribuidos a las diluciones realizadas durante el procedimiento se obtuvo la concentración de fluoresceína ($\mu\text{g fluoresceína gss}^{-1} \text{ h}^{-1}$), que equivale al producto obtenido a partir de la reacción de hidrolisis que involucran al conjunto de enzimas que son cuantificadas mediante esta reacción. Los resultados fueron expresados en función de la relación; $\mu\text{g fluoresceína gss}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Además de las expresiones enzimáticas individuales, se consideró la expresión de estas en una unidad común correspondiente a $\mu\text{g (producto) gss}^{-1} \text{ min}^{-1}$. En donde el término en paréntesis corresponde a una equivalencia del producto obtenido por cada enzima. Esto, con fines de realizar comparaciones a nivel estacional entre las actividades como también para efectuar correlaciones a nivel estadístico entre las diferentes variables analizadas.

3.2.8. Análisis de datos

Los resultados obtenidos a partir del análisis de las actividades enzimáticas y de la reacción de hidrólisis FDA, fueron sometidas a un análisis de varianza (ANOVA) y las medias fueron comparadas mediante Test de Tukey a un nivel de significancia de $\alpha \leq 0,05$. Además, esta prueba estadística fue utilizada para el análisis de estacionalidad de las actividades enzimáticas. Posteriormente se buscó correlaciones de las actividades enzimáticas y de la cuantificación de la reacción de hidrólisis de la FDA con variables del suelo (temperatura del suelo, contenido hídrico y química del suelo). Para ello se realizó un análisis de correlación de múltiples variables utilizando las correlaciones producto de Pearson entre cada par de variables (el rango de coeficiente de correlación Pearson va de -1 a +1) midiendo la fuerza de la relación lineal entre las variables para un nivel de confianza del 95%. En forma complementaria se realizaron correlaciones por rangos de Spearman entre cada par de variables (el rango de este coeficiente de correlación Spearman va de -1 a +1) midiendo la fuerza de la asociación que existe entre las variables comparadas. Finalmente para aquellas variables seleccionadas que presentaron importancia estadísticamente significativa en las correlaciones, se procedió por medio de una regresión lineal simple de un factor a estimar los modelos ajustados que mejor representen las relaciones obtenidas entre las variables estudiadas. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa STATGRAPHICS *Centurión XV.1*.

4. RESULTADOS

4.1. Variables microclimáticas en el área de estudio y contenido humedad del suelo

En relación a las variables microclimáticas y humedad del suelo se muestran (Figura 4) los montos de precipitación mensual, así como también los datos de temperatura ambiental del área de estudio. Se exponen los valores obtenidos de temperatura máxima, media y mínima ($^{\circ}\text{C}$), obteniéndose un valor promedio de temperatura de $9,4^{\circ}\text{C}$; la máxima de temperatura fue de $22,7^{\circ}\text{C}$ registrada durante el mes de enero 2012, mientras que la mínima de temperatura fue de $-0,9^{\circ}\text{C}$ que se registró en el mes de Julio 2012. Los datos registrados muestran un marcado ritmo estacional, donde los valores de temperatura fluctuaron en relación a las distintas estaciones del año, tendiendo a la baja durante los meses que conforman el otoño e invierno, con valores extremos de $0,3^{\circ}\text{C}$ y $-0,9^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Mientras los valores se presentan, en alza con el comienzo de la primavera en donde luego se alcanzó los picos de temperatura durante los meses de verano ($14,7^{\circ}\text{C}$).

En cuanto a la precipitación mensual, ésta también exhibió una regularidad estacional con excepción de los meses de febrero y diciembre del 2012 en que se obtuvieron 392 y 629 mm, respectivamente. La máxima de precipitación se registró en el mes de junio del 2012 con un monto de 684 mm, mientras que la mínima de precipitación fue registrada en diciembre del 2011 registrando un valor de 79 mm.

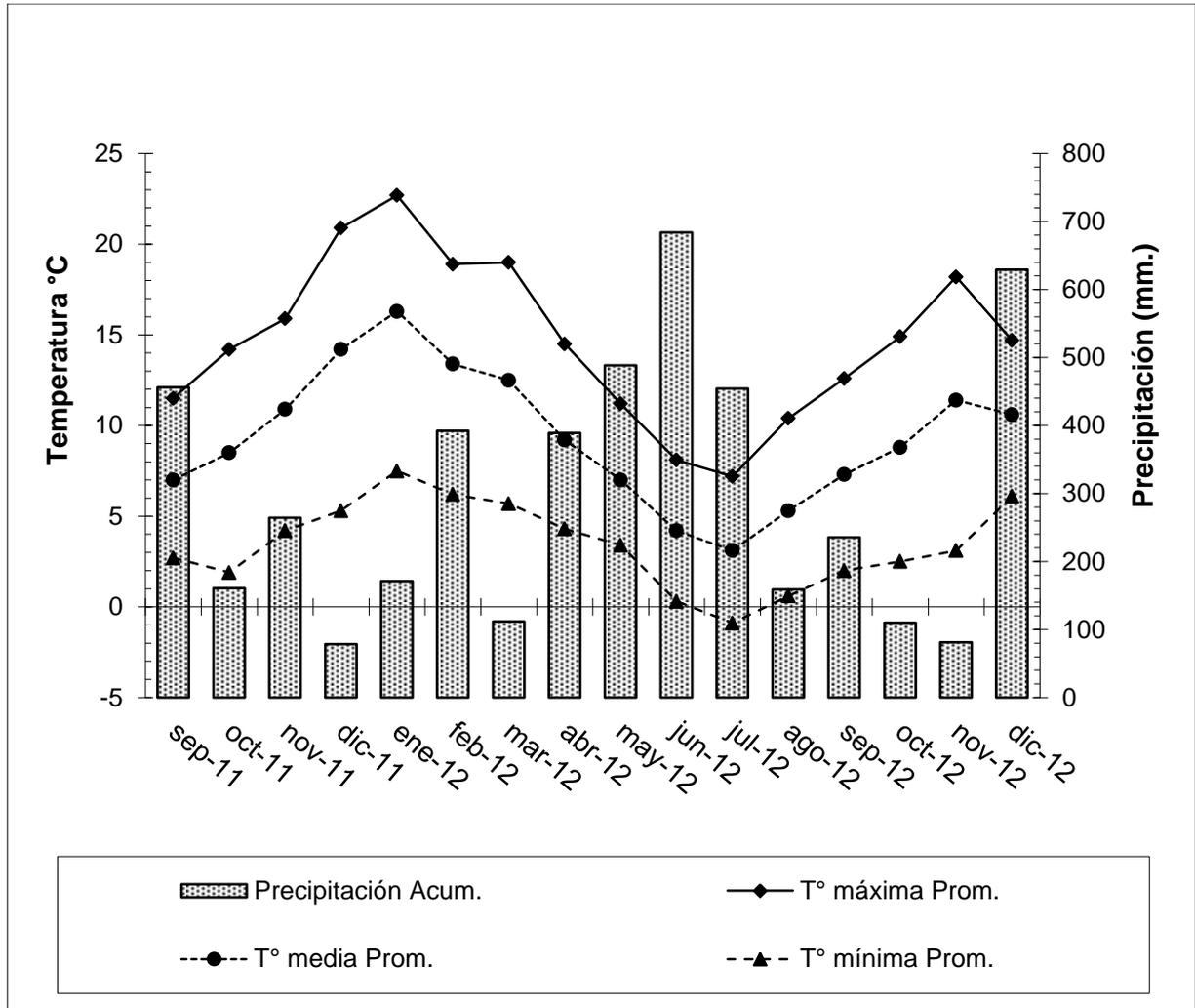


Figura 4. Temperatura promedio máxima, media, mínima del aire y precipitación mensual desde Septiembre del 2011 a Diciembre del 2012, del Parque Nacional Puyehue, Centro-Sur de Chile. Registro estación meteorológica (CONAF).

Para la temperatura del suelo registrada en forma continua en intervalos de una hora, se utilizó el promedio mensual de los registros obtenidos (Figura 5), formato que permitió visualizar un particular ritmo estacional, con valores de temperatura mayores en P1, donde la máxima promedio fue 14,86 °C registrada en enero del 2012. Un caso similar aconteció para las otras parcelas experimentales P2 y P3 donde se obtuvieron valores promedio de temperatura de 13,20 y 13,21 °C, respectivamente. Mientras que para P1 la mínima temperatura promedio obtenida fue de 2,59 °C correspondiente al mes de Julio del 2012, mes en el que también para P2 y P3 se obtienen las mínimas promedio de temperatura correspondientes a 1,11 y 0,20 °C respectivamente. (ANEXO 1).

Junto con la observación de las mínimas y máximas de los promedios de temperatura mensual, también se registró que para P1 se obtuvieron valores de temperatura levemente mayores en todos los meses en paralelo con las otras parcelas experimentales que mostraron valores equivalentes de temperatura en la gran mayoría de los meses del estudio. Así mismo es importante hacer mención de los datos individuales registrados con los que se generaron los promedios mensuales, ya que en forma particular en la parcela experimental P3 se obtuvieron valores inusuales de temperatura tales como 21,46; 26,92; 29,22 y 32,51 °C, respectivamente. Estos valores fueron observados a las 13:00 hrs. en 4 días diferentes del mes de septiembre del año 2012. Esto correspondió a un hecho fortuito provocado por un despliegue del sensor de registro, que quedó en la intemperie y con una exposición directa a la radiación solar. Estos factores pudieron haber provocado los aumentos de temperatura anteriormente señalados.

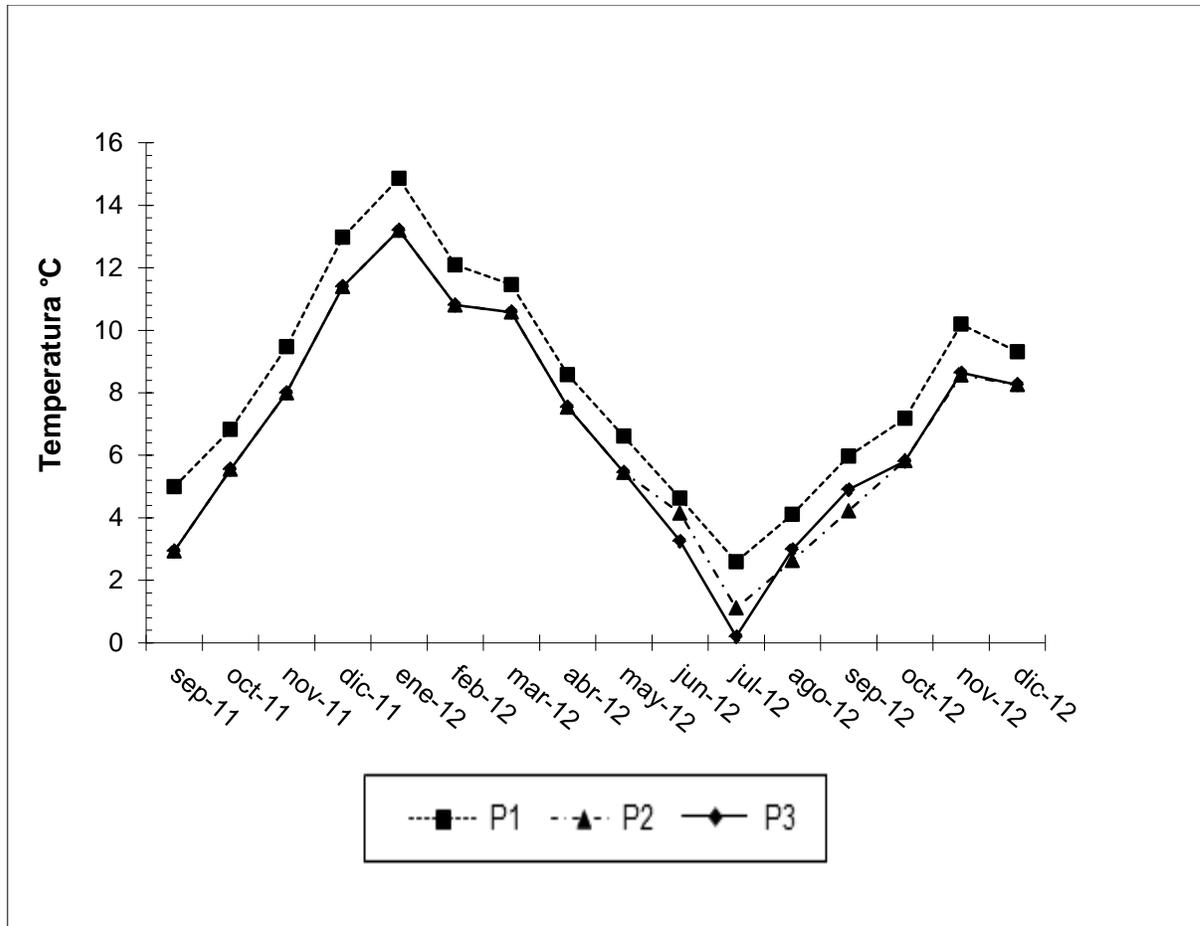


Figura 5. Temperatura promedio mensual del suelo obtenida por medio del registro continuo en intervalos de 1 hora (*data logger* HOBO®), en parcela deforestada (P1), parcela semi-intervenida (P2) y parcela control (P3). Parque Nacional Puyehue. Centro-Sur de Chile.

Los porcentajes de humedad (contenido hídrico) del suelo de las tres parcelas experimentales fueron registrados a partir del mes de Septiembre 2011 hasta Diciembre 2012, los registros fluctuaron desde un 72,84% a un 48,59% (Figura 6). En P1, se exhibió el máximo de humedad en Noviembre del 2011 con un valor de 68,08% mientras que el menor porcentaje de humedad se registró en Marzo del 2012 con un valor de 56,22%. P2 presentó un máximo de humedad en Octubre del 2012 con un valor de 71,33%, mientras que el menor porcentaje se registró en Enero del 2012 con un valor de 48,59%. Finalmente P3, presentó un máximo de humedad en Septiembre del 2011 con un valor de 72,84%, en tanto el menor porcentaje de humedad se registró en Enero del 2012 al igual que P2 pero con un valor de humedad de 52,05%.

Por otra parte, según análisis estadístico correspondiente a ANOVA y Test de Tukey (95% de confianza) (ANEXO 3), se originaron diferencias estadísticamente significativas entre las parcelas experimentales en los meses de Septiembre 2011, Octubre del 2011, Enero 2012 y Febrero 2012. Inicialmente en el mes de Septiembre, P3 registró un valor de 72,84 % donde exhibió diferencias estadísticamente significativas en relación con las parcelas P1 y P2, cuyos porcentajes de humedad registrada fueron de 60,74% y 64,49% respectivamente. Estos registros fueron menores en relación con P3. En el mes de Octubre, P2 registró un valor correspondiente a 70,02%, el que exhibió diferencias estadísticamente significativas en relación a la parcela P3, cuyo porcentaje de humedad registrada fue de 58,80%, cuyo registro es menor en relación al % de humedad obtenido en P2. En el mes de Enero, P1 registró un valor correspondiente a 56,89%, lo que exhibió diferencias estadísticamente significativas en relación con la parcela P2, cuyo porcentaje de humedad registrada fue de 48,59 %, registro que es menor en relación al % de hu-

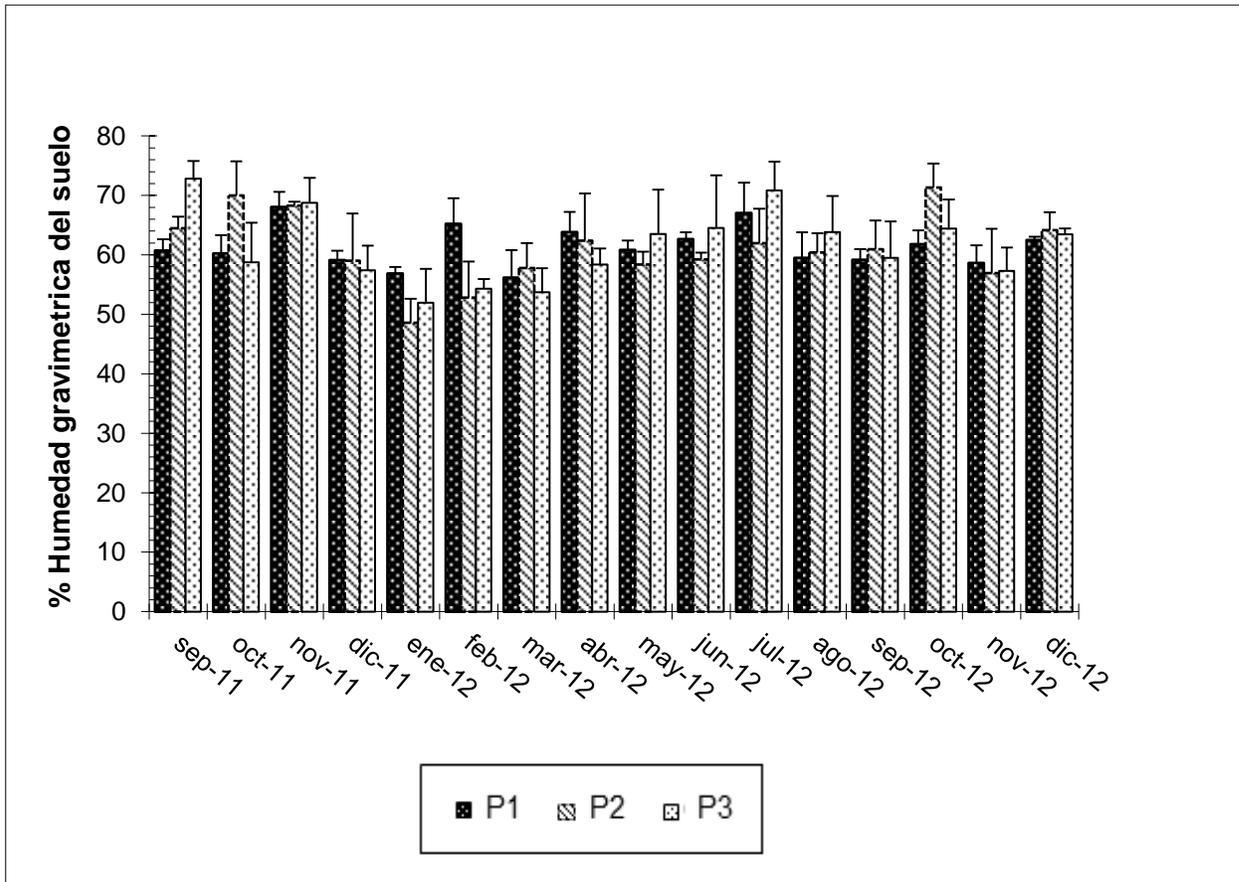


Figura 6. Contenido hídrico del suelo (promedio mensual \pm desviación estándar) en; parcela deforestada (P1), parcela semi-intervenida (P2) y parcela control (P3). Parque Nacional Puyehue. Centro-Sur de Chile.

medad obtenido en P1. Finalmente en el mes de febrero, P1 registró un valor correspondiente a 65,23% lo que exhibe diferencias estadísticamente significativas en relación con las parcelas P2 y P3, cuyos porcentajes de humedad registrada fueron de 52,82% y 52,33% respectivamente. Estos registros fueron menores en relación al valor de humedad obtenido en P1.

4.2. Parámetros físicos y químicos del suelo

4.2.1 Densidad y caracterización química del suelo

Se determinó la densidad y algunos parámetros químicos del suelo en el horizonte superficial (Tabla I) de las parcelas experimentales. La densidad del suelo que se obtuvo en cada parcela experimental fue correspondiente a: P1 = 0,335 g/cm³; P2= 0,297 g/cm³ y P3 = 0,379 g/cm³. Los suelos que poseen un alto contenido de materia orgánica pueden alcanzar densidades aparentes muy por debajo de 1,0 g/cm³, valores inferiores indican un grado importante de porosidad del suelo que se caracteriza por una alta presencia de raíces. Situación observada durante la colecta de las muestras de suelo, en las parcelas experimentales.

En relación al pH, este manifestó valores que van desde 5,26 a 5,51 obtenido del análisis de los suelos de las parcelas. En cuanto al carbono total (C_t), es mayor en P1 (9,7 %), P2 y P3 presentan valores inferiores con 5,3 % y 4,3 %, respectivamente. El nitrógeno total (N_t) presenta mayor valor en el suelo de P1, los valores de % N_t son: 0,41; 0,16 y 0,16 en P1; P2 y P3, respectivamente (Tabla I).

Tabla I. Densidad y algunos parámetros químicos del suelo superficial de las parcelas experimentales. Parque Nacional Puyehue. Centro- Sur de Chile. Parcela Deforestada (P1), Parcela Semi-intervenida (P2) y Parcela Control (P3).

Parcelas	Densidad g/cm³.	pH	% Ct	% Nt	C/N
P1	0,335	5,51	9,7	0,41	23,6
P2	0,297	5,48	5,3	0,16	32,7
P3	0,379	5,26	4,3	0,16	27,9

4.2.2. Amonio y Nitrato

Las concentraciones de amonio (N-NH_4^+) y de nitrato (N-NO_3^-) en el suelo de las parcelas experimentales fueron cuantificadas y analizadas mensualmente, para así posteriormente poder determinar la respuesta de las enzimas en relación a la variación de N inorgánico en el suelo (ANEXO 4 y 5).

La concentración de amonio (N-NH_4^+) no presentó una clara tendencia estacional en los meses en que fue realizado el presente estudio. Las concentraciones promedio del amonio fueron desde 0,86 hasta un 11,75 $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1}$, respectivamente, con una gran variación en la desviación estándar. (Figura 7).

En relación a la parcela P1 los valores de amonio (N-NH_4^+) mínimo y máximo cuantificados correspondieron a; 1,16 $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1}$ en Octubre 2012 y a 7,11 $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1}$ en Enero 2012, respectivamente. En general, estos valores en P1 presentaron montos relativamente inferiores respecto de las parcelas en comparación P2 y P3. Por su parte, la parcela P2 exhibió una concentración oscilante en el tiempo y se cuantificó una mínima de amonio de 0,85 $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1}$ en el mes de Octubre 2012, mientras que el máximo valor cuantificado fue de 9,22 $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1}$ en el mes de Noviembre 2012. Finalmente, en la parcela P3 se presentó la mayor parte del tiempo del estudio valores de concentración superiores a las parcelas en comparación P1 y P2. En P3, se cuantificó una mínima de 1,91 $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1}$ en el mes de Diciembre 2012, mientras que la máxima cuantificada fue de 11,75 $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1}$ en el mes de Enero 2012. Además, también es destacable la medición realizada en Junio 2012 donde se obtuvo 11,56 $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1}$.

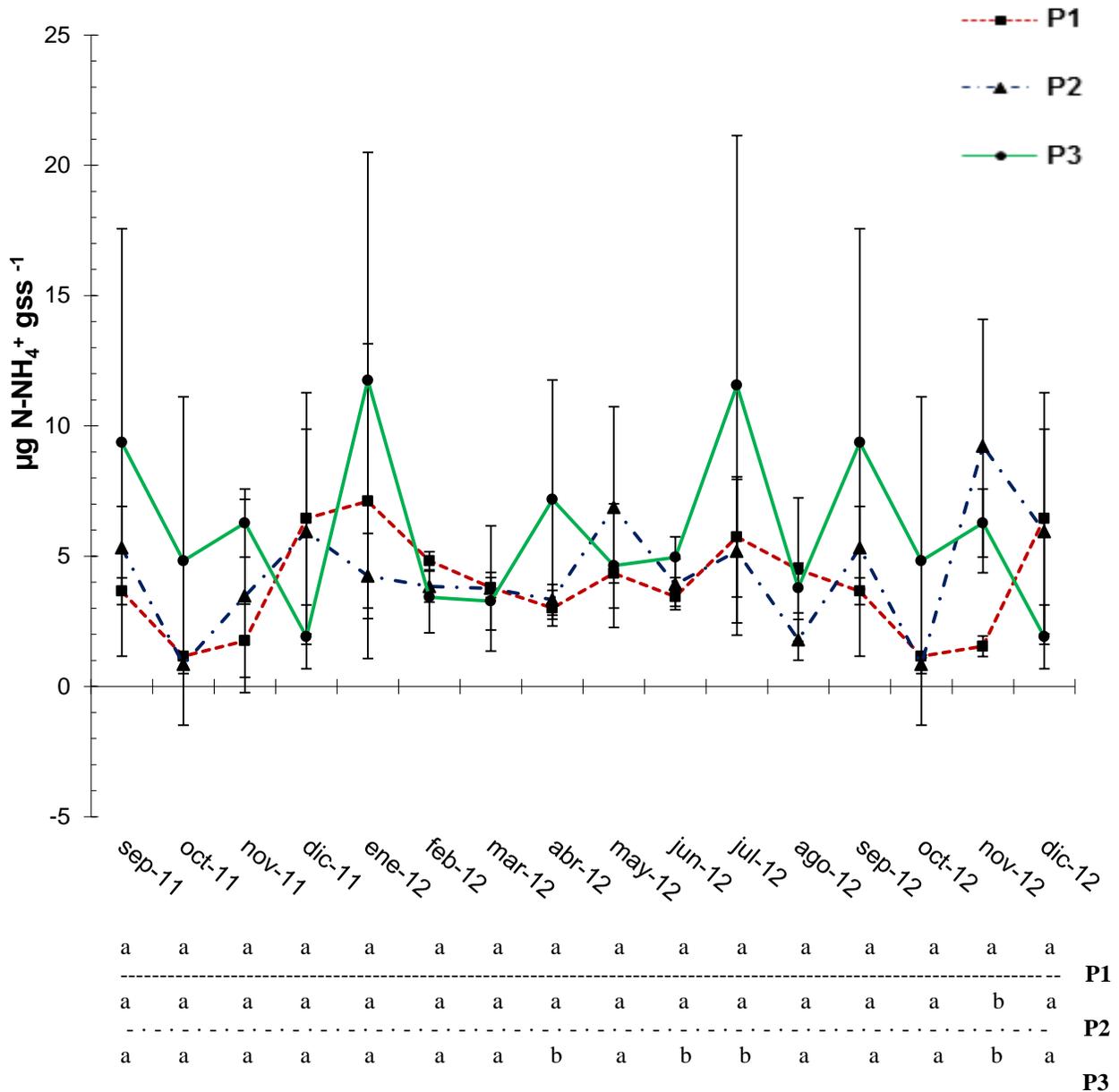


Figura 7. Concentración mensual de amonio en el suelo ($\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{gss}^{-1}$) de las parcelas experimentales. Parque Nacional Puyehue. Centro – Sur de Chile.: parcela deforestada (P1), parcela semi-intervenida (P2) y parcela control (P3). Las barras verticales exhiben \pm desviación estándar mensual correspondiente. Líneas horizontales (bajo el gráfico), señalizan a cada una de las parcelas experimentales, letras diferentes señalan diferencias estadísticamente significativas (Test Tukey, $p \leq 0,05$), bajo el mes correspondiente.

NH_4^+ gss^{-1} . En consiguiente, no fue posible observar alguna tendencia, puesto que no hubo una regularidad en la concentración de este ión en ninguna de las parcelas estudiadas.

En relación a esto la Parcela P1, no mostró una gran variabilidad en los resultados cuantificados con respecto a la parcela control. Sin embargo, luego de la intervención total realizada en P1, se observó un aumento gradual de la concentración de amonio, posiblemente por un incremento en el proceso de mineralización y consecuente biodisponibilidad del N para la generación de NH_4^+ , llevado a cabo por los microorganismos del suelo. Si bien no existe una gran diferencia con las otras parcelas experimentales, esto daría cuenta de que los mecanismos de retención e inmovilización de N en las otras parcelas estarían siendo más efectivos, lo cual se podría relacionar además, con la concentración de NO_3^- en el suelo.

Según ANOVA y test de Tukey (95% de confianza), solo los meses de Febrero, Abril, Junio, Agosto y Noviembre del 2012 presentaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de amonio en el suelo, durante los meses de estudio. Asimismo y en forma coincidente, los meses anteriormente descritos presentaron un p-valor $\leq 0,05$ (ANEXO 6).

Para el promedio anual de las mediciones obtenidas en el análisis de las concentraciones de amonio, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las parcelas en estudio.

En relación al nitrato (N-NO_3^-) (Figura 8), se observó principalmente una tendencia estacional en las concentraciones. Puesto que en el mes de Diciembre 2011, comenzó un incremento de los valores cuantificados, mientras que a partir del mes de Marzo 2012 una disminución gradual de las concentraciones de nitrato hasta Septiembre 2012. Luego presentó una oscilación con nuevas alzas en Octubre y Diciembre. Las concentraciones obtenidas variaron desde 2,48 hasta un 8,87 $\mu\text{g N-NO}_3^-$ gss^{-1} , respectivamente. En relación a la P1, el mínimo y máximo cuantificados fue de;

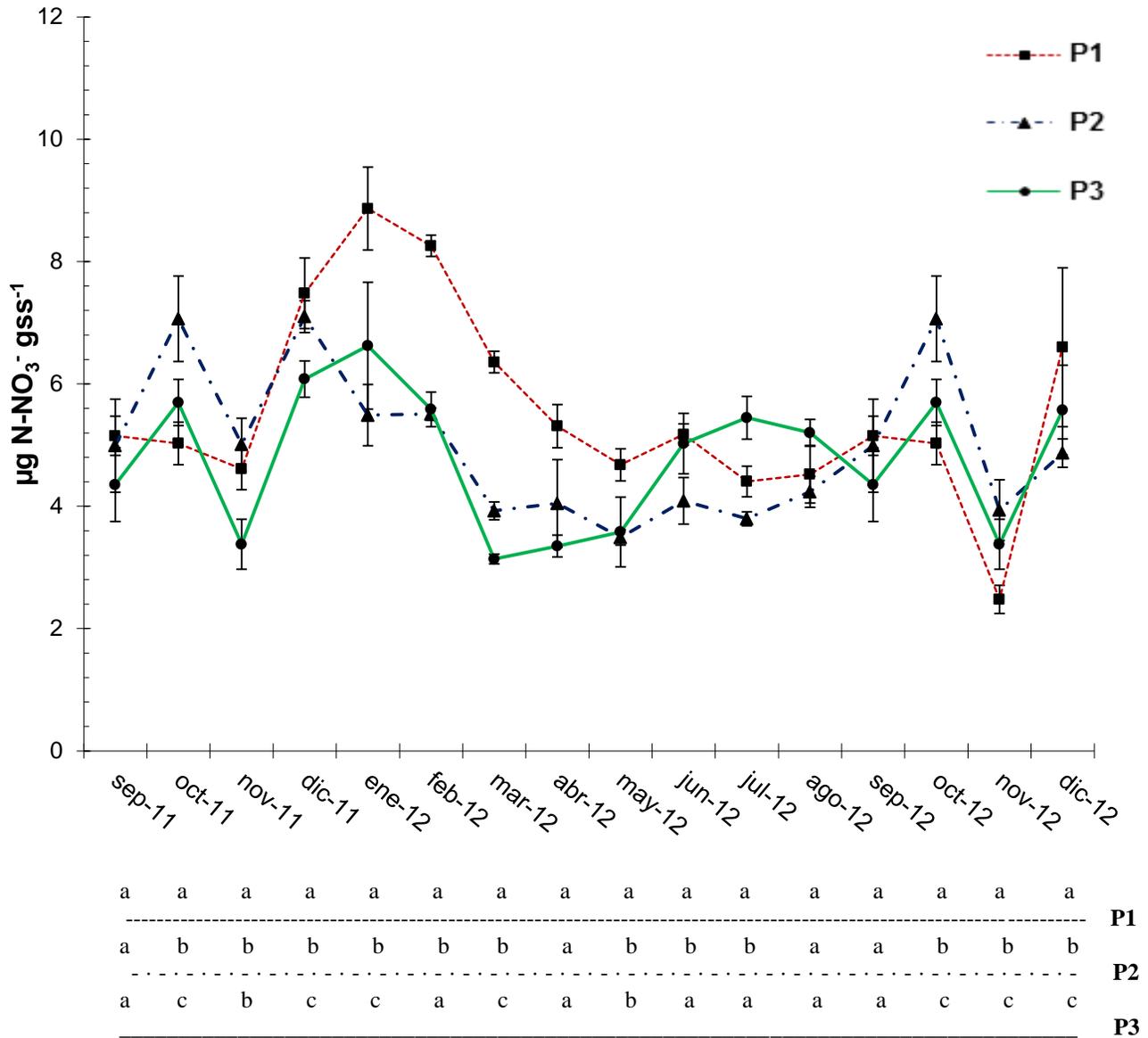


Figura 8. Concentración mensual de nitrato en el suelo ($\mu\text{g N-NO}_3^- \text{ gss}^{-1}$) de las parcelas experimentales. Parque Nacional Puyehue. Centro – Sur de Chile.: deforestada (P1), parcela semi-intervenida (P2) y parcela control (P3). Las barras verticales exhiben \pm desviación estándar mensual correspondiente. Líneas horizontales (bajo el gráfico), señalizan a cada una de las parcelas experimentales, letras diferentes señalan diferencias estadísticamente significativas (Test Tukey, $p \leq 0,05$), bajo el mes correspondiente.

2,48 en Noviembre 2012 y $8,87 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ gss}^{-1}$ en enero del 2012, respectivamente (Figura 8). Por su parte P2, expresó la mínima concentración en el mes de Mayo 2012 con un valor de 3,49, mientras que el máximo valor cuantificado fue de $7,10 \mu\text{g N-NO}_3 \text{ gss}^{-1}$ en el mes de Diciembre 2011, respectivamente. Finalmente en la parcela P3, se cuantificó una concentración de 3,14 en el mes de Marzo 2012, mientras que la máxima obtenida en Enero 2012 fue de $6,62 \mu\text{g gss}^{-1}$, respectivamente. En consiguiente, en esta parcela control (P3) se presentó en casi la totalidad de los meses valores promedio menores en comparación con las otras parcelas en estudio (P1 y P2) con excepción del mes de Marzo 2012 en el que el valor mínimo cuantificado fue en la parcela P1. Esto implicaría que la parcela control refleja mecanismos eficientes de retención de nutrientes, evitando los procesos por los cuales se realiza la transformación de amonio a nitrato, puesto que este último puede ser fácilmente lixiviado desde el suelo sobre todo en periodos de alta pluviometría, principal característica del sitio estudiado. Además el nitrato no estaría siendo asimilado por las plantas, producto de la intervención realizada en P1, proceso que se refleja en el aumento considerable de la concentración durante la estación final del año 2011 que luego disminuye en los meses de invierno.

Según ANOVA y test de Tukey (95% de confianza), en todos los meses en estudio se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de nitrato (N-NO_3^-) en suelo, destacándose principalmente la parcela control (P3), que mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto a las otras parcelas experimentales, en casi la totalidad de los meses en estudio, seguido de P2 y finalmente P1 (ANEXO7). La gran mayoría de los meses presentaron p-valor $\leq 0,05$, con excepción de Septiembre del 2011, Agosto y Septiembre del 2012.

El promedio anual de las mediciones obtenidas en el análisis de las concentraciones de nitrato no

exhibieron diferencias estadísticamente significativas entre las parcelas en estudio.

4.3. Actividades enzimáticas y FDA en el suelo

Se presentan las actividades enzimáticas mensuales en suelo de las enzimas; celulasa, ureasa, nitrato reductasa y proteasa, así como también la cuantificación de la reacción de hidrólisis de fluoresceína diacetato (FDA), la que involucra la medida de un conjunto de enzimas (proteasas, lipasas y estereasas principalmente).

4.3.1. Actividad enzimática de celulasa

En general para la medición de la totalidad de las parcelas estudiadas, la medición de la actividad enzimática de la celulasa en el suelo (Figura 9) no mostró una regularidad para el período en que fue realizado el análisis, puesto que se observaron procesos de incrementos y disminuciones en la actividad, sin mostrar una clara tendencia estacional. Los valores de actividad registrados, variaron entre 1,45 mg. glucosa $\text{gss}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$ como valor mínimo cuantificado (Agosto 2012) y 6,97 mg. glucosa $\text{gss}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$, correspondiente a la máxima actividad (Julio 2012).

En forma específica en la parcela P1, presentó un rango de valores sensiblemente más bajos en comparación con las otras parcelas en estudio (P2 y P3 respectivamente) (Figura 9). Se obtuvieron registros de actividad enzimática que modelaron un comportamiento relativamente

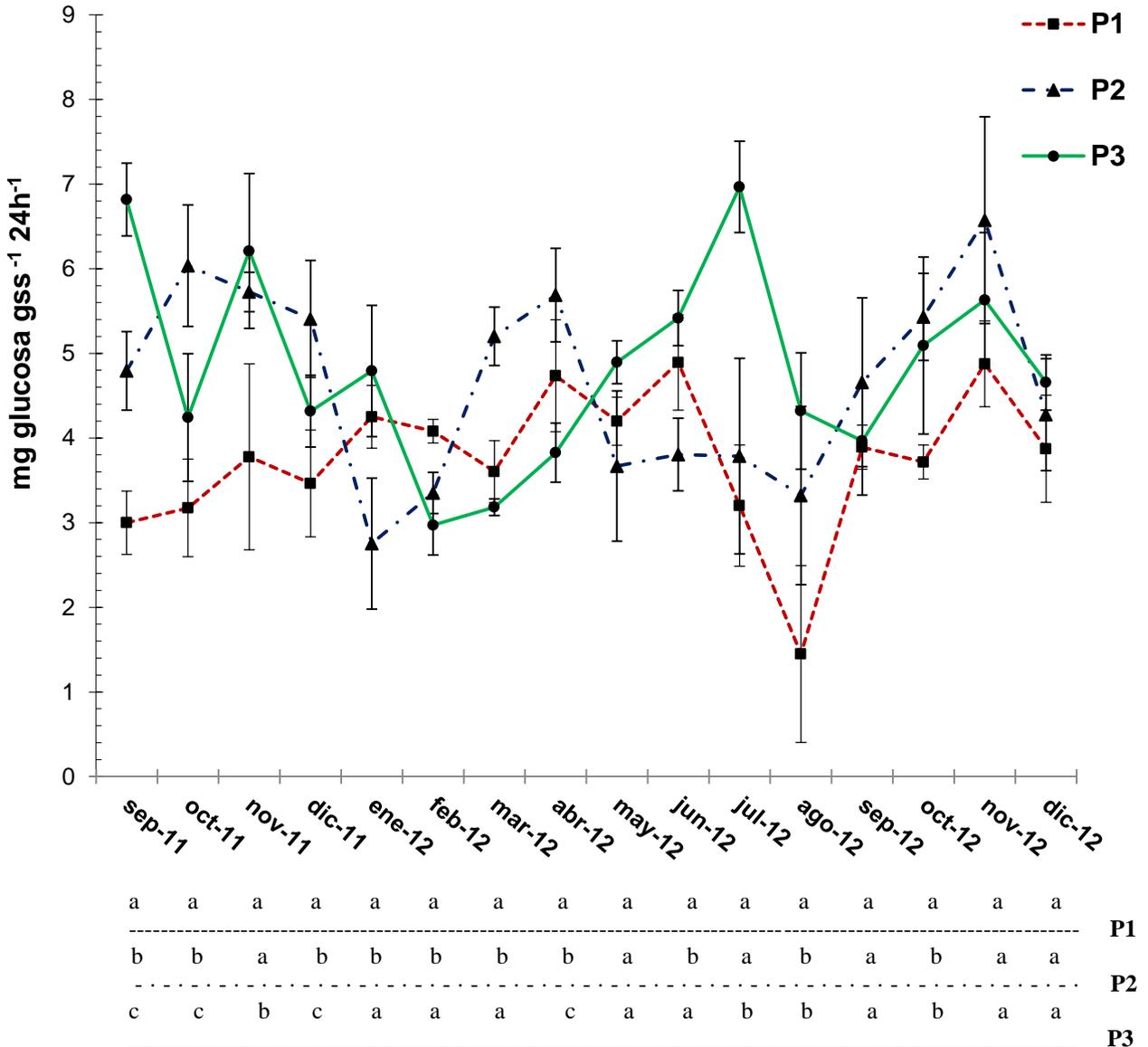


Figura 9. Actividad enzimática mensual de la celulasa en el suelo ($\text{mg. glucosa gss}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$) de las parcelas experimentales. Parque Nacional Puyehue. Centro – Sur de Chile.: parcela deforestada (P1), parcela semi-intervenida (P2) y parcela control (P3). Las barras verticales exhiben \pm desviación estándar mensual correspondiente. Líneas horizontales (bajo el gráfico), señalizan a cada una de las parcelas experimentales, letras diferentes señalan diferencias estadísticamente significativas (Test Tukey, $p \leq 0,05$), bajo el mes correspondiente.

constante con alzas y bajas pero que mostraron una leve tendencia hacia un incremento de los registros de actividad enzimática hacia los meses finales del monitoreo. Fue así como, el valor mínimo de actividad de la celulasa que fue registrada correspondió a $1,45 \text{ mg. glucosa gss}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$ obtenido durante el mes de Agosto 2012, mientras que el máximo de actividad fue de $4,89 \text{ mg. glucosa gss}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$, fue registrado en el mes de Junio 2012.

En cuanto a la parcela P2, los registros principalmente fueron variables, en donde en los primeros meses de medición mostró una tendencia de actividad enzimática de la celulasa elevada, respecto de P1. Se registró el valor mínimo de actividad en el mes de Enero 2012 ($2,53 \text{ mg. glucosa gss}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$) (Figura 9), para luego ascender gradualmente hasta Abril 2012 y luego en forma oscilante nuevamente desde Agosto a Noviembre del 2012 ($6,57 \text{ mg. glucosa gss}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$) con los máximos registrados en el último mes mencionado para el periodo de estudio.

Finalmente para la actividad de la celulasa del suelo de la parcela P3, se observó en general una mayor actividad en el periodo Septiembre 2011 a Enero 2012 y luego en el periodo de Abril 2012 hasta el Diciembre 2012 en comparación a la P1. Se registró como mínima de actividad un valor de $3,01 \text{ mg. glucosa gss}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$, valor obtenido en el mes de Febrero 2012, mientras que el máximo de actividad se registró en el mes de Julio 2012, con un valor correspondiente a $6,97 \text{ mg glucosa gss}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$ (Figura 9).

Para el promedio anual (Diciembre 2011 a Noviembre 2012) de las mediciones obtenidas en el análisis de la actividad enzimática de la celulasa en las parcelas experimentales fue de: $3,86$; $4,47$ y $4,61 \text{ mg. glucosa gss}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$ en; parcela intervenida (P1), parcela semi – intervenida (P2) y parcela control (P3), respectivamente. Para estos resultados no se obtuvo diferencias estadísticamente significativas en las parcelas en estudio (ANEXOS 8 y 9). El suelo de la parcela

deforestada (P1) reveló una disminución de un 16,26% de la actividad enzimática de la celulasa en comparación con la parcela control (P3). En relación con la parcela semi – intervenida (P2), la parcela deforestada (P1) presentó una disminución de 13,65% para la actividad celulasa del suelo.

4.3.2. Actividad enzimática de ureasa

En general la medición de la actividad enzimática de la ureasa en el suelo (Figura 10) mostró una tendencia con un grado de estacionalidad con leves alzas en los meses de Primavera – Verano, con excepción de algunos registros mensuales que presentaron valores de actividad similares a los que se obtuvieron en los periodos de Otoño-Invierno, en los que se produjo un descenso en la actividad. Los valores de actividad registrados para esta enzima variaron entre $189,95 \mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$ como valor mínimo cuantificado y $1568,04 \mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$, valor correspondiente a la máxima de actividad.

En forma específica la parcela P1, presentó los valores más bajos de actividad durante los 15 meses de medición correspondiente a la totalidad del periodo estudiado. Exhibió registros de actividad enzimática que modelaron un comportamiento relativamente constante, con excepción del registro del mes de Febrero 2012 correspondiente al máximo de actividad de $820,67 \mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$. El valor mínimo de actividad registrada correspondió a $189,95 \mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$ obtenido en el mes de Agosto 2012

La parcela P2, exhibió inicialmente una tendencia hacia el incremento en la actividad enzimática en Primavera 2011 reflejada por la obtención del registro de máxima actividad durante el mes de Octubre 2011 ($1285,07 \mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$), que posteriormente se vio interrumpida por una

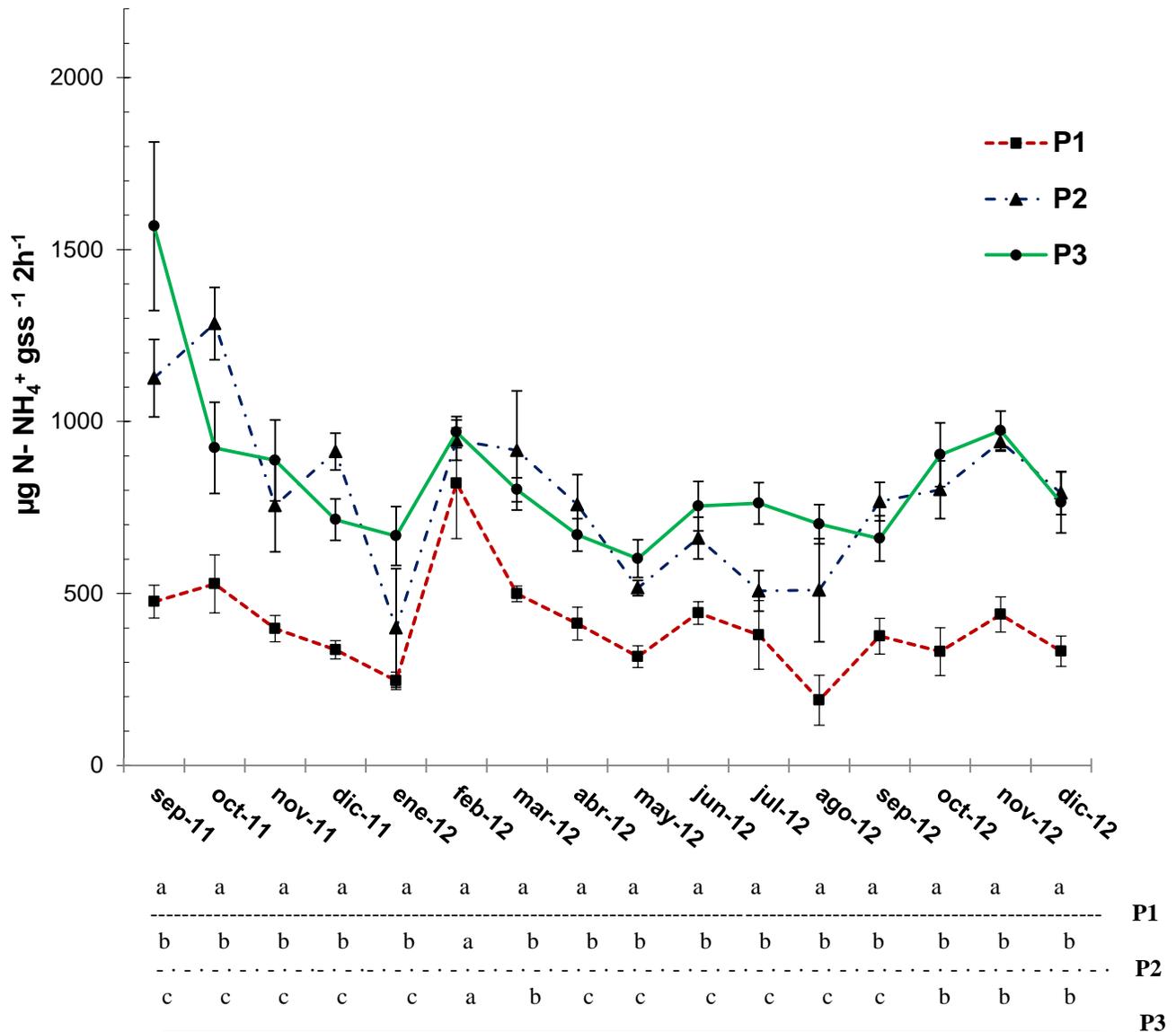


Figura 10. Actividad enzimática mensual de la ureasa en el suelo ($\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$) de las parcelas experimentales. Parque Nacional Puyehue. Centro – Sur de Chile.: parcela deforestada (P1), parcela semi-intervenida (P2) y parcela control (P3). Las barras verticales exhiben \pm desviación estándar mensual correspondiente. Líneas horizontales (bajo el gráfico), señalizan a cada una de las parcelas experimentales, letras diferentes señalan diferencias estadísticamente significativas (Test Tukey, $p \leq 0,05$), bajo el mes correspondiente.

disminución gradual de la actividad, registrando la mínima durante el mes de Enero 2012 ($486,27 \mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$).

Por su parte en la parcela P3 luego de registrarse la actividad máxima de los suelos estudiados $1568,04 \mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$ obtenida durante el mes de Septiembre 2011, en el mes subsiguiente la actividad decayó en forma considerable para luego disminuir en forma gradual hasta el mes de Enero 2012. En los meses subsiguientes, la actividad enzimática ureasa descendió gradualmente hasta el mes de Mayo ($601,39 \mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$) registrándose la mínima de actividad.

El promedio anual (Diciembre 2011 a Noviembre 2012) de las mediciones correspondientes a la actividad enzimática de la ureasa en las parcelas experimentales fue de: $399,23$; $727,00$ y $764,99 \mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$ en; parcela intervenida (P1), parcela semi – intervenida (P2) y parcela control (P3), respectivamente. Se obtuvo diferencia estadísticamente significativa en P1 (ANEXOS 8 y 9). El suelo de parcela deforestada (P1) presentó una disminución de un $47,81\%$ de la actividad enzimática de la ureasa en comparación con la parcela control (P3). En relación con la parcela semi – intervenida (P2), la parcela deforestada (P1) presentó una disminución de un $45,08\%$.

4.3.3 Actividad enzimática de proteasa

A grandes rasgos, la medición de la actividad enzimática de la proteasa en los suelos de las parcelas en estudio (Figura 11), mostró una tendencia oscilante (variable) en el periodo en el que fue realizado el análisis, puesto que principalmente se observaron registros de actividad que mo-

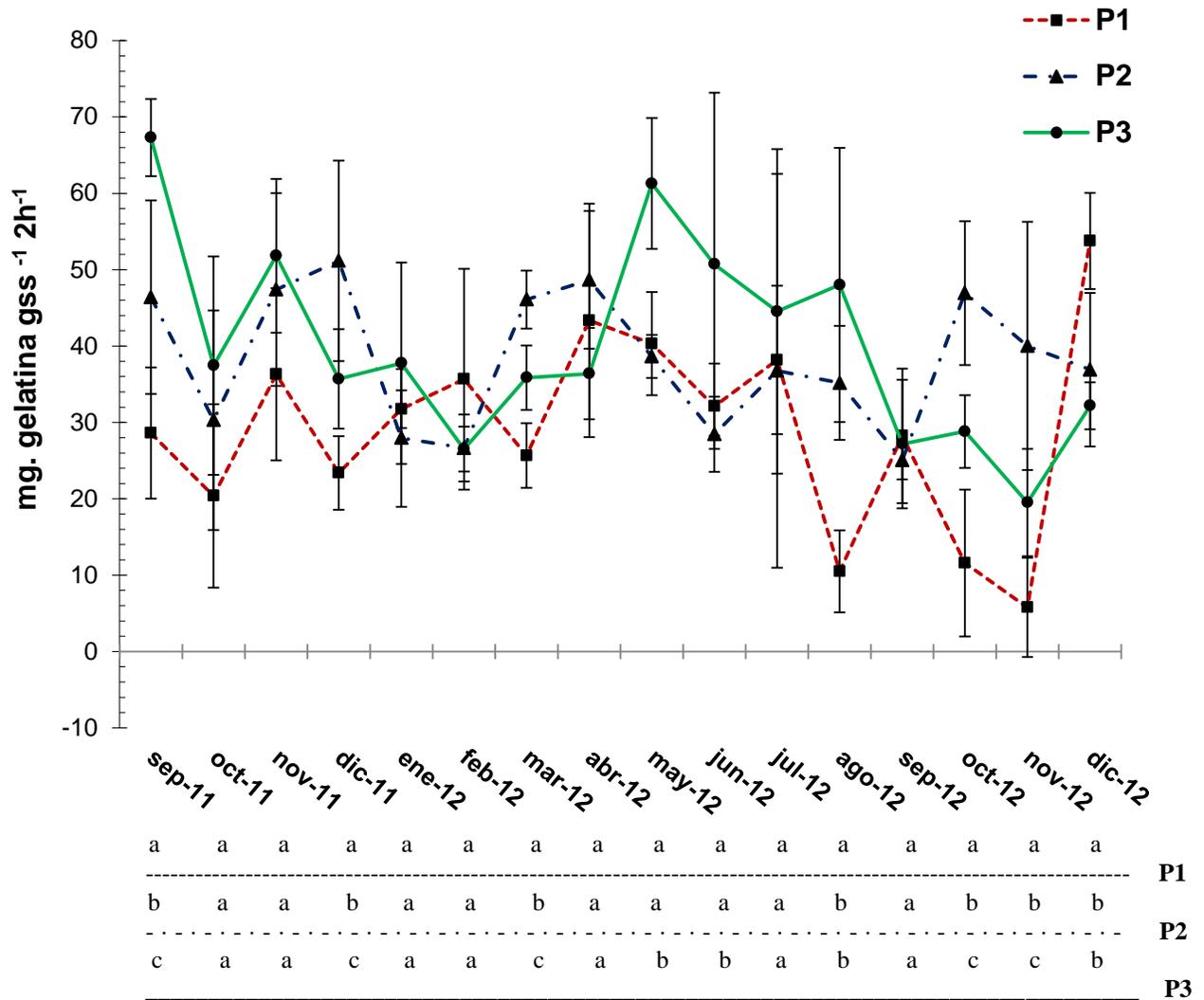


Figura 11. Actividad enzimática mensual de la proteasa en el suelo ($\text{mg. gelatina gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$) de las parcelas experimentales. Parque Nacional Puyehue. Centro – Sur de Chile.: parcela deforestada (P1), parcela semi-intervenida (P2) y parcela control (P3). Las barras verticales exhiben \pm desviación estándar mensual correspondiente. Líneas horizontales (bajo el gráfico), señalizan a cada una de las parcelas experimentales, letras diferentes señalan diferencias estadísticamente significativas (Test Tukey, $p \leq 0,05$), bajo el mes correspondiente.

delaron procesos de alzas y bajas sin expresar una clara tendencia. La parcela P1, mostró siempre valores inferiores en su actividad al compararlas con las parcelas P2 y P3, respectivamente.

Los valores de actividad enzimática de la proteasa variaron entre 5,77 como valor mínimo y 67,29 mg. gelatina $\text{gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$, valor que correspondió a la máxima actividad, respectivamente.

En forma específica la parcela P1, modeló un comportamiento variable en el tiempo. Sin embargo, en el mes de Diciembre 2011 la actividad enzimática de la proteasa ascendió en forma gradual hasta alcanzar en el mes de Febrero 2012 un registro de 35,67 mg. gelatina $\text{gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$, cuyo valor fue mayor en relación a las otras parcelas en el mismo mes de estudio (P2 y P3). Desde Julio 2012 (36,77 mg. gelatina $\text{gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$) se exhibe un comportamiento errático en la actividad llegando a la mínima durante el periodo Noviembre 2012 (5,77 mg. gelatina $\text{gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$), mientras que la máxima actividad fue de 53,77 mg. gelatina $\text{gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$, fue registrado en el mes de Diciembre 2012.

En cuanto a P2 y P3, ambas mostraron un comportamiento similar en la actividad de esta enzima, con diferencias durante el periodo de invierno-primavera del año 2012, (Mayo, Junio, Julio y Agosto) donde la situación control (P3) mostró los máximos de actividad enzimática de proteasa, respecto a P1 y P2, respectivamente. Destaca para P3, la actividad máxima de los suelos estudiados correspondiente a 67,29 mg. gelatina $\text{gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$ durante el análisis del mes de Septiembre 2011.

El promedio anual (Diciembre 2011 a Noviembre 2012) de las mediciones correspondientes a la actividad enzimática de la proteasa en las parcelas experimentales fue de: 27,21; 37,63 y 37,69 mg. gelatina $\text{gss}^{-1} 2\text{h}^{-1}$ en parcela intervenida (P1), parcela semi – intervenida (P2) y parcela control (P3), respectivamente. Se obtuvo diferencia estadísticamente significativa en P1 con

respecto a la parcela P2 y P3 (Figura 11) (ANEXOS 8 y 9). El suelo de parcela deforestada (P1) presentó una disminución de un 27,80% de actividad enzimática de la proteasa en comparación con la parcela control (P3). En cuanto a la comparación de P1 versus P2, se obtuvo una disminución de un 27,69%.

4.3.4. Actividad enzimática de nitrato reductasa

A nivel global, la actividad enzimática de la nitrato reductasa en los suelos de las parcelas en estudio (Figura 12) fue menor en la parcela deforestada P1. Además, expuso una irregular tendencia en el período en que fue realizado el análisis, puesto que se observaron comportamientos variables. Sin embargo, se logra apreciar que la actividad disminuye entre los meses de Diciembre 2011 y Marzo 2012 para luego, a fines del periodo de análisis (primavera 2012), aumentar gradualmente con ciertos registros variables de disminución en la actividad. Los valores de actividad registrados variaron entre 0,02 y 3,49 $\mu\text{g N-NO}_2^- \text{ gss}^{-1} 24\text{h}^{-1}$, como valor mínimo y máximo registrado, respectivamente.

En relación a P1, exhibió registros de actividad que modelaron un comportamiento variable con algunas alzas en ciertos meses en particular. En los primeros meses, la actividad enzimática de la nitrato reductasa descendió gradualmente, alcanzando en el mes de Diciembre 2011 un valor cercano a la mínima de actividad registrada ($0,14 \mu\text{g N-NO}_2^- \text{ gss}^{-1} 24\text{h}^{-1}$), y uno similar correspondiente a $0,09 \mu\text{g N-NO}_2^- \text{ gss}^{-1} 24\text{h}^{-1}$ obtenido en el mes de Agosto 2012. Posteriormente, en forma súbita en el análisis del mes de Febrero 2012, se obtuvo un registro de $2,12 \mu\text{g N-NO}_2^-$

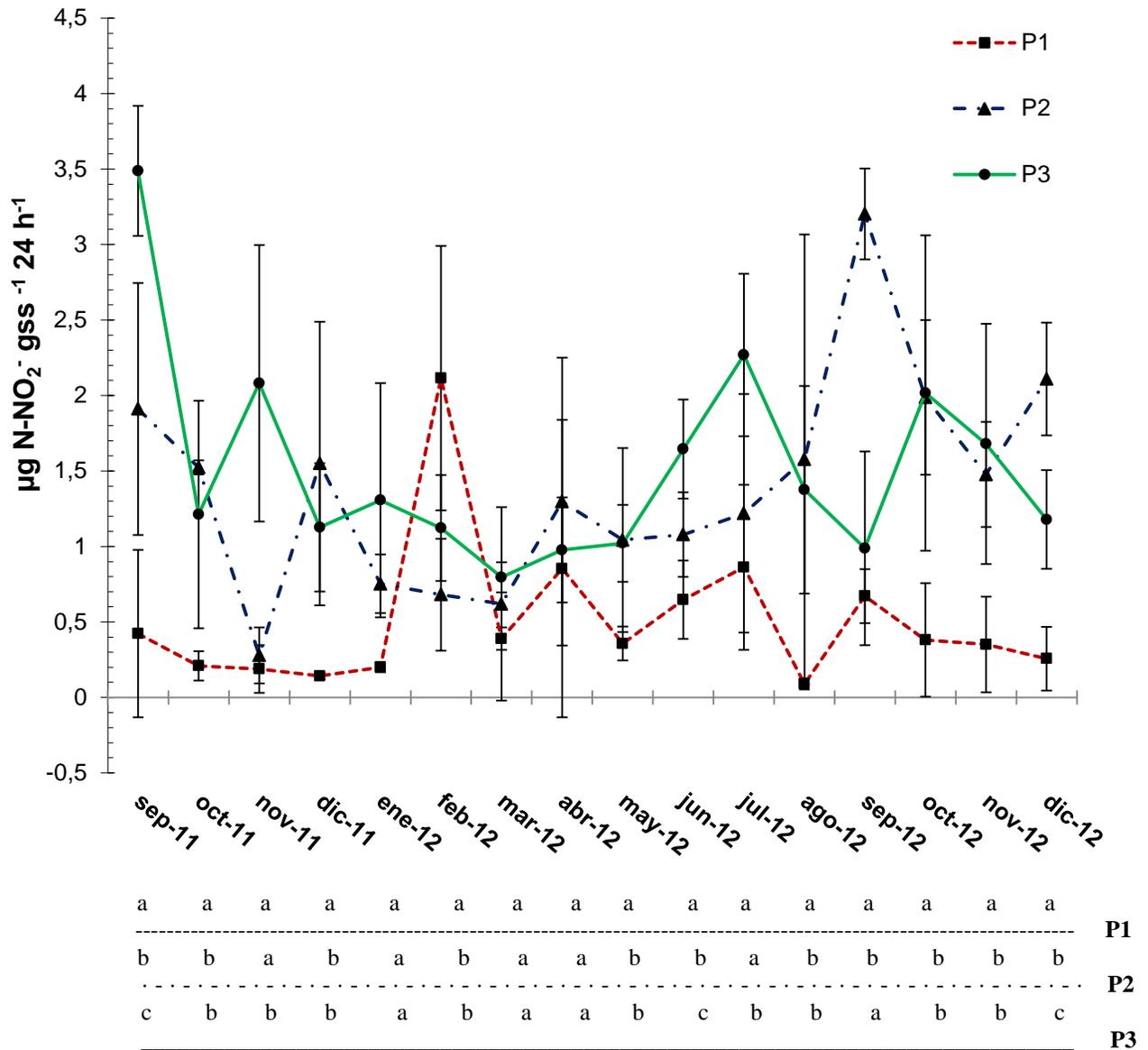


Figura 12. Actividad enzimática mensual de la nitrato reductasa en el suelo ($\mu\text{g N-NO}_2^- \text{ gss}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$) de las parcelas experimentales. Parque Nacional Puyehue. Centro – Sur de Chile.: parcela deforestada (P1), parcela semi-intervenida (P2) y parcela control (P3). Las barras verticales exhiben \pm desviación estándar mensual correspondiente. Líneas horizontales (bajo el gráfico), señalizan a cada una de las parcelas experimentales, letras diferentes señalan diferencias estadísticamente significativas (Test Tukey, $p \leq 0,05$), bajo el mes correspondiente.

$\text{gss}^{-1} 24\text{h}^{-1}$, correspondiente al punto máximo de actividad, registrado en el suelo de las parcelas estudiadas durante en comparación con el mismo mes de estudio.

En cuanto a la parcela P2, esta reveló en forma inicial un valor elevado de actividad enzimática ($1,91 \mu\text{g N-NO}_2^- \text{gss}^{-1} 24\text{h}^{-1}$). Mientras que en forma posterior, en el mes de Noviembre 2011 se registró la mínima actividad ($0,28 \mu\text{g N-NO}_2^- \text{gss}^{-1} 24\text{h}^{-1}$). La actividad enzimática de la nitrato reductasa mostró una tendencia gradual de aumento de la actividad reflejada hacia los meses que componen la estación de Otoño - Primavera (2012), la que se manifestó con un máximo en los registros de la actividad de esta enzima, en el mes de Septiembre 2012 ($3,20 \mu\text{g N-NO}_2^- \text{gss}^{-1} 24\text{h}^{-1}$).

Finalmente la parcela P3 fue la de mayor actividad enzimática con altos en los periodos comprendidos entre Mayo – Julio y Octubre Noviembre (2012), contrastando con la tendencia observada entre el periodo Diciembre 2011 a Mayo 2012, en donde se registró como actividad mínima un valor de $0,80 \mu\text{g N-NO}_2^- \text{gss}^{-1} 24\text{h}^{-1}$ en el mes de Marzo 2012, mientras que el máximo de actividad se registró a inicios del estudio en el mes de Septiembre 2011 con un valor de $3,49 \mu\text{g N-NO}_2^- \text{gss}^{-1} 24\text{h}^{-1}$ (Figura 12).

El promedio anual (Diciembre 2011 a Noviembre 2012) de las mediciones correspondientes a la actividad enzimática de la nitrato reductasa en las parcelas experimentales fue de: 0,57; 1,37 y $1,36 \mu\text{g N-NO}_2^- \text{gss}^{-1} 24\text{h}^{-1}$ en parcela intervenida (P1), parcela semi – intervenida (P2) y parcela control (P3), respectivamente. Se obtuvo diferencia estadísticamente significativa en P1 (ANEXOS 8 y 9). El suelo de parcela deforestada (P1) presenta una disminución de un 58,08% de actividad enzimática de la nitrato reductasa en comparación con la parcela control (P3). En

relación con la parcela semi – intervenida (P2), la parcela deforestada (P1) exhibió una disminución de la actividad enzimática de la nitrato reductasa de un 58,39%.

4.3.5. Hidrólisis diacetato de fluoresceína (FDA)

La reacción de hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA), como indicador de actividad enzimática en los suelos de las parcelas en estudio (Figura 13), no mostró una clara tendencia, a excepción de los primeros meses de monitoreo, en donde la reacción de hidrólisis FDA exhibió un aumento progresivo y en forma consecutiva una leve tendencia a la declinación. En forma general, los valores obtenidos de las parcelas estudiadas no difieren en amplia magnitud, pero la parcela P1 es la que expresa los menores valores para esta cuantificación en comparación con P2 y P3, respectivamente. Los valores de actividad FDA registrados variaron entre 21,59 $\mu\text{g fluoresceína gss}^{-1} \text{ h}^{-1}$ como valor mínimo registrado y 143,50 $\mu\text{g fluoresceína gss}^{-1} \text{ h}^{-1}$ correspondiente a la máxima para esta reacción.

P1, exhibió registros del producto de la reacción FDA que orientaron de una conducta variable, con caídas pronunciadas en los registros de cuantificación y posteriores aumentos. En los primeros meses de estudio, la cuantificación del producto obtenido presentó una elevación en el mes de Noviembre 2011, en donde se obtuvo el máximo cuantificado para las parcelas analizadas (P1, P2 y P3) (124,29 $\mu\text{g fluoresceína gss}^{-1} \text{ h}^{-1}$), mientras que el valor mínimo de actividad registrada fue de 21,59 $\mu\text{g fluoresceína gss}^{-1} \text{ h}^{-1}$, obtenido durante el mes de Abril 2012.

La parcela experimental P2, presentó inicialmente una tendencia hacia una progresión gradual de la magnitud de la reacción de hidrólisis, alcanzando la máxima en el mes de Noviembre 2011

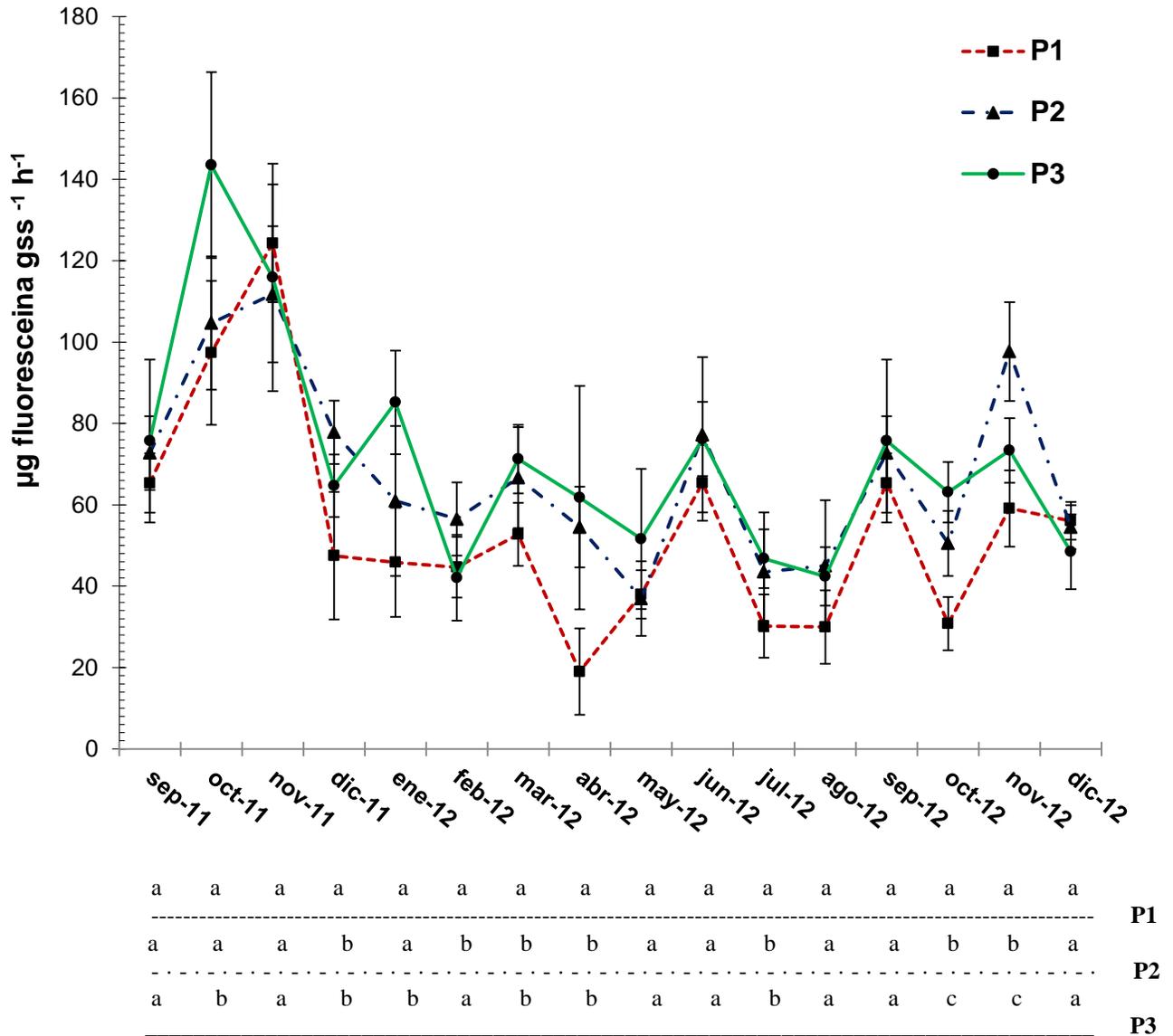


Figura 13. Reacción de hidrólisis de la FDA mensual en el suelo ($\mu\text{g fluoresceína gss}^{-1} \text{h}^{-1}$) de las parcelas experimentales. Parque Nacional Puyehue. Centro – Sur de Chile.: parcela deforestada (P1), parcela semi-intervenida (P2) y parcela control (P3). Las barras verticales exhiben \pm desviación estándar mensual correspondiente. Líneas horizontales (bajo el gráfico), señalizan a cada una de las parcelas experimentales, letras diferentes señalan diferencias estadísticamente significativas (Test Tukey, $p \leq 0,05$), bajo el mes correspondiente.

(111,78 μg fluoresceína $\text{gss}^{-1} \text{h}^{-1}$) para luego descender en forma gradual hasta el mes de Mayo 2012 registrándose como mínima de reacción un valor de 36,96 μg fluoresceína $\text{gss}^{-1} \text{h}^{-1}$. En forma posterior, los registros oscilaron con un aumento de importancia hacia finales del estudio en el mes de Noviembre 2012.

P3, mostró valores irregulares sin una tendencia regular. Se cuantificó en forma inicial en el mes de Octubre 2011 la máxima reacción para FDA de los suelos en estudio; 143,50 μg fluoresceína $\text{gss}^{-1} \text{h}^{-1}$, en los meses siguientes la actividad mostró un decaimiento en forma considerable y gradual en donde en el mes de Febrero 2012 la actividad alcanzó la mínima reacción (42,08 μg fluoresceína $\text{gss}^{-1} \text{h}^{-1}$). Tendencia similar se observó en el periodo de Marzo a Mayo 2012 produciéndose una baja en la cuantificación FDA. En los meses posteriores, los registros fueron fluctuantes, mostrando solo un acotado periodo de alza entre Septiembre y Noviembre 2012. El promedio anual (Diciembre 2011 a Noviembre 2012) de las mediciones correspondientes a la reacción de hidrólisis FDA en las parcelas experimentales fue de: 44,26; 61,68 y 62,85 μg fluoresceína $\text{gss}^{-1} \text{h}^{-1}$ en: parcela intervenida (P1), parcela semi – intervenida (P2) y parcela control (P3), respectivamente. Se obtuvo diferencia estadísticamente significativa en P1 (ANEXOS 8 y 9). El suelo de la parcela deforestada (P1) presenta una disminución de un 29,57% en la reacción de hidrólisis FDA en comparación con la parcela control (P3). En relación con la parcela semi – intervenida (P2), la parcela deforestada (P1) mostró una disminución de un 28,24%.

4.4. Estacionalidad actividades enzimáticas y reacción de hidrólisis FDA

Se presentan las actividades enzimáticas estacionales en suelo de las enzimas; celulasa, ureasa y nitrato reductasa, así como también la cuantificación de la reacción de hidrólisis de fluoresceína diacetato (FDA). Con el propósito de apreciar la variabilidad que estas presentaron a lo largo del periodo de estudio y así poder determinar la posible influencia que ejercen las variables del microclima asociada a cada estación (otoño, invierno, primavera y verano). A continuación se presentan los resultados del análisis en forma independiente para cada parcela. Es de importancia señalar que para la presentación de los resultados, no se consideró la actividad enzimática proteasa del suelo. Puesto que esta actividad ostenta los mayores valores de actividad, los cuales al compararse con los resultados de las otras actividades provocarían un aumento en el rango de valores del eje y, dificultando la apreciación del comportamiento estacional de estas. Consecuentemente no fue considerada en el análisis de ANOVA, puesto que los resultados obtenidos de este análisis solo exhibían diferencias estadísticamente significativas de la proteasa con las otras actividades y reacción de la FDA. Sin embargo, la actividad proteasa en las parcelas estudiadas, es considerada para efectos descriptivos de su comportamiento estacional.

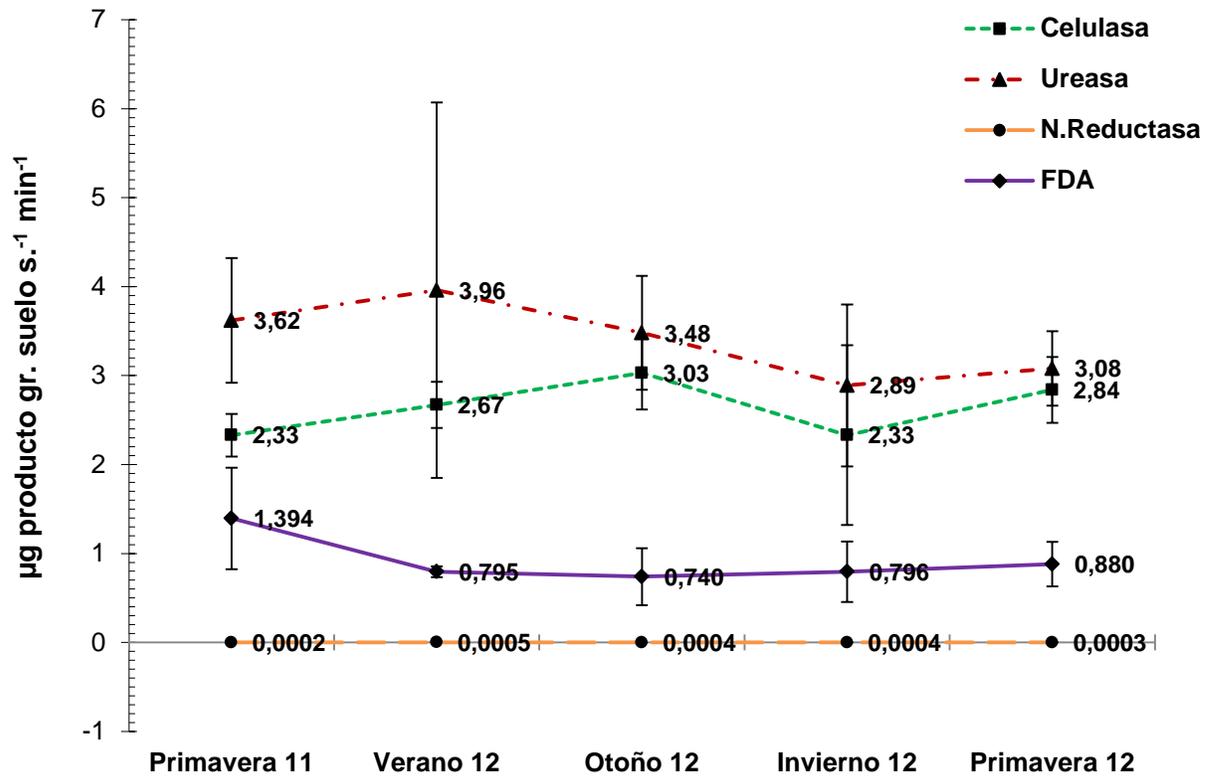
En la parcela P1 (ANEXO 11), se exhibe una actividad estacional menor que las parcelas P2 y P3. Se obtiene que la enzima proteasa fue la que presentó mayor actividad de las enzimas analizadas y reacción FDA. Alcanzó la máxima en la estación de otoño 2012 con una temperatura del suelo de 7,82 ° C y contenido hídrico de 60,90%. Mientras que la mínima se observó en la estación de primavera 2012, con un contenido hídrico de 62,07%, el cual es similar al registrado

en invierno 2012 que exhibió un registro levemente mayor. Ambas estaciones, difieren en los registros de temperatura del suelo (8,57 °C y 4,23 °C, respectivamente).

Considerando el análisis realizado (Figura 14) ureasa fue la que presentó mayor actividad, con aumentos de esta en las estaciones primaverales (2011 y 2012) alcanzando la máxima actividad en verano, en donde se registró una temperatura del suelo de 12,85 °C y un contenido hídrico del suelo de 59,38%. En forma consiguiente, la actividad celulasa alcanzó el máximo registro en la estación de otoño con una temperatura promedio de 7,82 °C y 60,90% en el contenido hídrico. En cuando a la reacción FDA, se observó que en las estaciones de primavera (2011-2012) fue en donde se registró mayor actividad, destacándose la máxima en primavera 2011 (1,394 μg producto $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$) (con promedios variables de 8,02 °C y 62,07 %). Finalmente, la enzima nitrato reductasa mostró una máxima en la estación de invierno en donde se registró la menor temperatura (4,32 °C) y el mayor porcentaje en contenido hídrico (62,10%). Cabe destacar cierta similitud de las variables climáticas en algunas estaciones del año y la diferencia estacional en las actividades enzimáticas estudiadas, lo que daría cuenta de la influencia individual de estas variables en los mecanismos catalíticos de estas enzimas.

En relación al análisis estadístico, las enzimas ureasa y celulasa presentaron diferencias estadísticas con todas las enzimas cuantificadas en todas las estaciones. Sin embargo, en la estación de primavera 2011, todas las actividades enzimáticas presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

En la parcela P2, la enzima proteasa fue la que presentó mayor actividad de las enzimas analizadas y reacción FDA. Alcanzó la máxima en la estación de primavera 2011 con una tempe-



a	a	a	a	a	Celulasa
b	a	a	a	a	Ureasa
c	b	b	b	b	N. R.
d	b	c	c	c	FDA

Figura 14. Actividades enzimáticas estacionales en el suelo ($\mu\text{g producto gss}^{-1} \text{ min}^{-1}$) de la parcela experimental P1. Parque Nacional Puyehue. Centro – Sur de Chile.: Las barras verticales exhiben \pm desviación estándar mensual correspondiente. Líneas horizontales (bajo el gráfico), señalizan a cada una de las enzimas analizadas, letras diferentes señalan diferencias estadísticamente significativas (Test Tukey, $p \leq 0,05$), bajo la estación correspondiente.

ratura del suelo de 6,97 °C y contenido hídrico de 65,46%, mientras que la mínima se observó en la estación de invierno 2011, con un contenido hídrico de 60,67%, el cual es equivalente al registrado en otoño 2012 que exhibió un registro cercano a la máxima. Además, esta estación presentó un registro de temperatura de 6,97 °C, cercano al obtenido a la estación de primavera 2011 y mayor a la estación en donde se registró la mínima. (3,03 °C) (ANEXO 11). En cuanto a los resultados comparativos de las actividades y reacción FDA (Figura 15), la mayor actividad fue cuantificada para la enzima ureasa, que exhibió un máximo en la estación de primavera 2011, en donde se obtuvo una temperatura y contenido hídrico del suelo de 6,97 °C y 65,46% respectivamente (misma tendencia observada para proteasa). Luego, la actividad desciende gradualmente con el transcurso de las estaciones presentando la menor actividad en la estación de invierno que presentó un contenido hídrico (60,67%) levemente menor al registrado en las estaciones de primavera que fueron analizadas. Sin embargo, esta estación presentó la menor temperatura del suelo (3,03 °C) y en consecuencia los registros de menor actividad enzimática con excepción de la actividad nitrato reductasa que mostró un valor cercano a la máxima obtenida en la estación de primavera 2012. Consiguientemente, esta actividad registró una mínima en la estación de Verano 2012, la cual destacó por el bajo contenido hídrico y la mayor temperatura registrada del suelo (11,50°C y 54,56%). En cuanto a la actividad celulasa y reacción FDA, al igual que lo señalado para la actividad ureasa, registraron las máximas en las estaciones de primavera. En tanto, en la estación de otoño 2012, la actividad celulasa, exhibió un registro semejante de actividad y de temperatura a las obtenidas en las estaciones primaverales, pero con diferencia en el contenido hídrico (59,48%).

Las enzimas ureasa y celulasa presentaron diferencias estadísticas entre ellas y además con nitrato reductasa y reacción FDA en todas las estaciones analizadas. Sin embargo, estas últimas

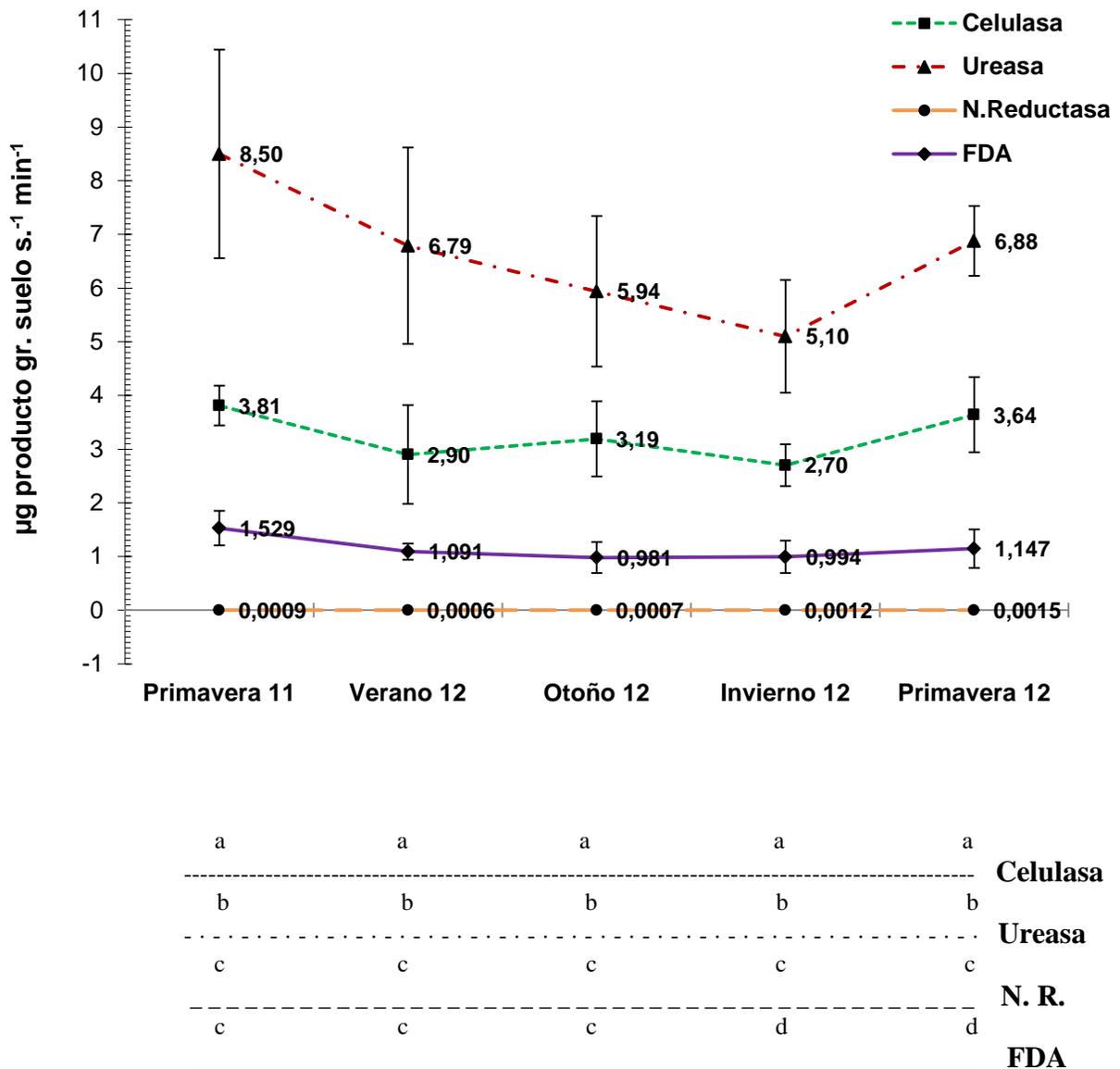


Figura 15. Actividades enzimáticas estacionales en el suelo ($\mu\text{g producto gss}^{-1} \text{ min}^{-1}$) de la parcela experimental P2. Parque Nacional Puyehue. Centro – Sur de Chile.: Las barras verticales exhiben \pm desviación estándar mensual correspondiente. Líneas horizontales (bajo el gráfico), señalizan a cada una de las enzimas analizadas, letras diferentes señalan diferencias estadísticamente significativas (Test Tukey, $p \leq 0,05$), bajo el mes correspondiente.

no presentaron diferencias significativas en primavera 2011, verano y otoño 2012, respectivamente (Figura 15).

Finalmente, en P3 se obtuvieron mayores valores de las actividades enzimáticas y reacción FDA con respecto de P1 y levemente más aumentadas en comparación con P2, mostrando un comportamiento estacional muy similar. La actividad proteasa fue la que mostró mayor actividad en contraste con las otras enzimas analizadas y reacción FDA. Esta presentó la máxima actividad estacional en primavera 2011, a diferencia de la primavera 2012 donde se registró la mínima actividad estacional. Ambas presentaron registros de temperatura del suelo análogas de 6,97 y 6,90 °C, respectivamente. Mostraron diferencias, si bien no sustanciales, en el contenido hídrico (64,46 y 61,19 %, correspondientemente) (ANEXO 12). De lo obtenido del análisis comparativo (Figura 16), al igual que P1 y P2, la enzima ureasa también presentó la mayor actividad, exhibiendo máximos en las estaciones de primavera, destacando la primavera 2011, con una temperatura y contenido hídrico del suelo de 6,97 °C y 64,46% respectivamente. Este último registro fue bastante equivalente al obtenido en la estación de invierno (64,69%), pero contrasta con la temperatura que fue registrada en esta estación, la cual fue menor (2,84 °C). Sin embargo, el comportamiento de las actividades en esta estación fue bastante disímil. La reacción FDA, fue la única que mostró una menor cuantificación, mientras que la nitrato reductasa exhibió un valor levemente menor a la máxima obtenida en la primavera 2011. Presentando además un mínimo en la estación de verano 2012, con registros de contenido hídrico y temperatura de suelo de 54,37% y 11,50° C, respectivamente. Comportamiento equivalente reflejó la actividad celulasa en el suelo. No obstante, ambas actividades enzimáticas durante la estación de otoño obtuvieron bajas actividades enzimáticas. Esta estación presentó un registro de las mediciones climáticas de temperatura y contenido hídrico del suelo de 6,71 °C y 60,04%, respectivamente.

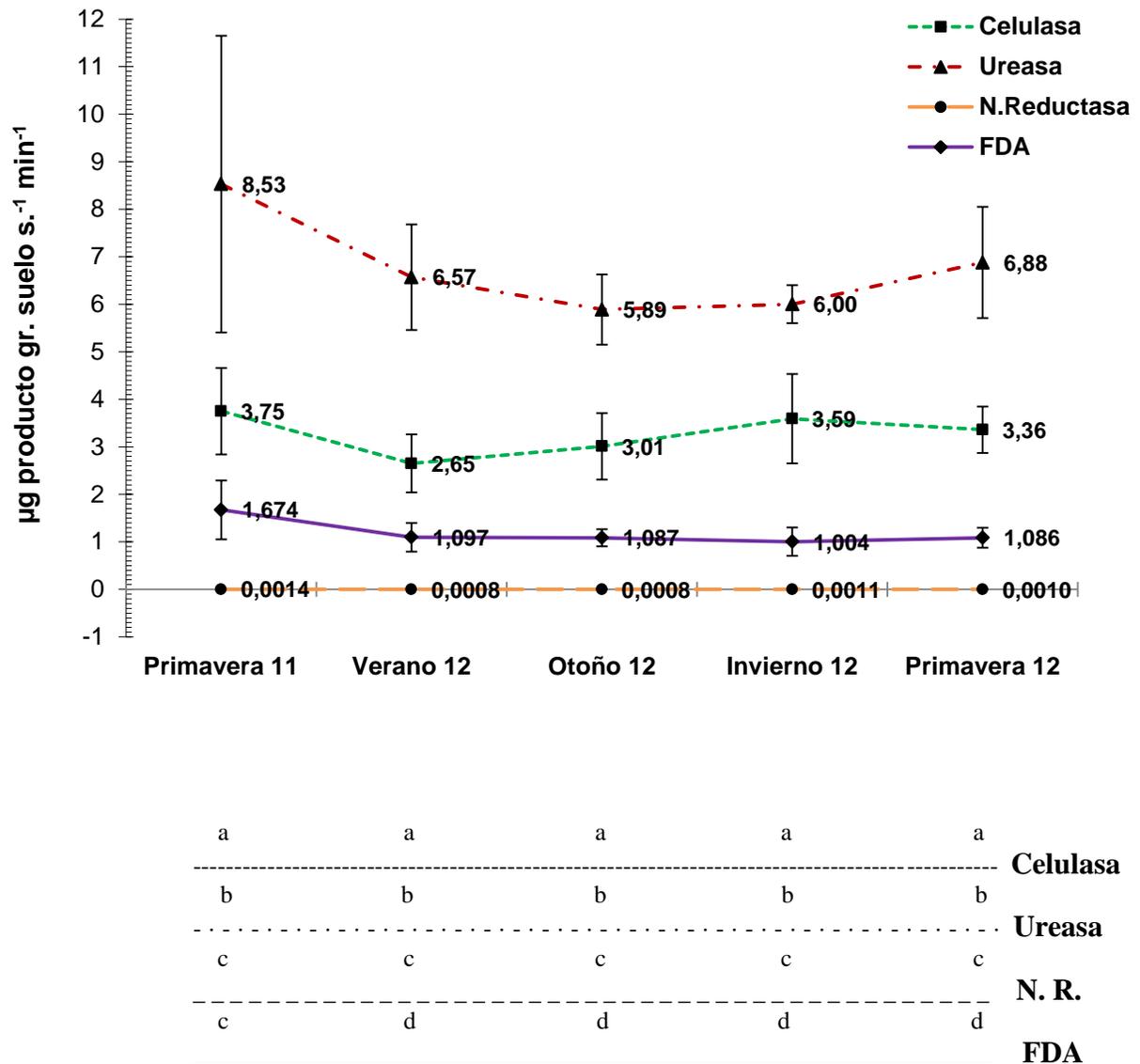


Figura 16. Actividades enzimáticas estacionales en el suelo ($\mu\text{g producto gss}^{-1} \text{min}^{-1}$) de la parcela experimental P3. Parque Nacional Puyehue. Centro – Sur de Chile.: Las barras verticales exhiben \pm desviación estándar mensual correspondiente. Líneas horizontales (bajo el gráfico), señalizan a cada una de las enzimas analizadas, letras diferentes señalan diferencias estadísticamente significativas (Test Tukey, $p \leq 0,05$), bajo el mes correspondiente.

Estos comportamientos estacionales, dan cuenta de la importancia de las variables climáticas, puesto que en aquellas estaciones en donde se presentan algunos registros con valores equivalentes (temperatura del suelo y contenido hídrico), las actividades enzimáticas exhiben comportamientos semejantes en su actividad.

Para el análisis estadístico, las actividades enzimáticas y reacción de FDA presentaron diferencias estadísticas entre ellas en todas las estaciones analizadas del periodo de estudio.

4.5. Relación actividades enzimáticas y FDA, variables climáticas y químicas del suelo

Se realizó un análisis de correlación de múltiples variables para los datos obtenidos, a partir de las mediciones realizadas en cada una de las parcelas en estudio (P1, P2 y P3), en forma independiente. De esta forma, a través de las correlaciones de Pearson y Spearman (ANEXOS 13 al 18), que además fueron representadas en matrices de dispersión, se obtuvieron aquellas correlaciones de las variables que presentaron importancia estadísticamente significativa. Es así como a partir de los resultados de las correlaciones se eligieron aquellas que son de importancia en los objetivos y en el desarrollo de este trabajo tomando en consideración, la posible influencia de los parámetros químicos del suelo (N-NO_3^- y N-NH_4^+) y de las variables microclimáticas sobre las actividades enzimáticas y FDA para así poder representar la magnitud del efecto antropogénico. Estas correlaciones fueron sometidas a un análisis de regresión simple de un factor para estimar aquellos modelos ajustados que mejor representen las relaciones existentes entre las actividades enzimáticas y FDA con las variables del suelo en estudio.

Por medio de las correlaciones anteriormente señaladas, se obtuvo aquellas relaciones que fueron significativas para ambos análisis (Pearson y Spearman), y las ecuaciones de los modelos ajustados para las relaciones que presentaron diferencias estadísticamente significativas en la parcela P1. Los resultados fueron representados en la tabla II (ANEXO 13 y 14).

De esta forma, el modelo que describió de mejor manera la correlación existente entre la actividad proteasa y el contenido hídrico en el suelo, fue el correspondiente al modelo ajustado cuadrado-X (*Squared-X*) que exhibió el R^2 más alto, siendo de un 22,65%, el que mejor explicó la variabilidad entre la actividad enzimática proteasa y contenido hídrico. Mientras que para la relación entre el nitrato ($N-NO_3^-$) y la temperatura registrada en forma continua fue correspondiente al modelo cuadrado doble (*Double squared*) el que explica el 63,76% de variabilidad en la concentración de nitrato. Las ecuaciones de los modelos ajustados obtenidos para las variables analizadas en relación a la parcela intervenida (P1), se exhiben en la Tabla II.

Para el caso de la relación de la proteasa y el contenido hídrico el coef. de correlación 0,48 indica una relación relativamente débil entre las variables. El p-valor en la tabla ANOVA es \geq a 0,05, por lo que no existe relación estadísticamente significativa entre las variables para un nivel de confianza del 95%. Sin embargo, esta relación se estudia ya que a partir de la correlación Spearman se obtiene un p-valor \leq a 0,05, lo que indica una diferencia estadísticamente significativa. (Tabla II). En cuanto a la relación entre el nitrato ($N-NO_3^-$) y la temperatura registro continuo el coeficiente de correlación obtenido fue de 0,80 que exhibe una relación moderadamente fuerte entre las variables, puesto que el p-valor en la tabla ANOVA es \leq a 0,05 (Tabla II), que demuestra que el resultado es significativo entre estas variables para un nivel de confianza del 95%

Tabla II. Coeficientes, p-valores obtenidos a partir de las correlaciones de Pearson y Spearman y ecuación del modelo ajustado de las variables dependientes del suelo en la parcela intervenida (P1) que presentaron importancia estadística, para un nivel de confianza del 95%.

Variables analizadas		Coeficiente	P-Valor \leq 0,05	Coeficiente	P-Valor \leq 0,05
		Pearson	Pearson	Spearman	Spearman
Ureasa	Nitrato reductasa	0,7976	0,0002	0,5265	0,0414
Nitrato	Amonio	0,6629	0,0051	-	-
Nitrato	T° registro continuo del suelo.	0,6598	0,0054	0,5979	0,0206
Proteasa	Contenido hídrico	-	-	0,6412	0,0130
Variables correlacionadas	Coef. de correlación	R ²	R ² Ajustado	Ecuación del modelo ajustado	
Proteasa y Contenido hídrico	0,48	22,65%	17,14%	Proteasa = -214,522 + 0,120779 *contenido hídrico ²	
Nitrato y T° registro continuo	0,80	63,76 %	61,17%	NO ₃ ⁻ = sqrt(13,4735 + 0,251641 *Temperatura registro continuo ²)	

Para la parcela P2, las correlaciones que fueron significativas tanto en el análisis de Pearson y Spearman junto con las ecuaciones del modelo ajustado de las variables obtenidas se muestran en la Tabla III.

De esta forma, el modelo que describió de mejor manera la correlación existente entre la actividad celulasa y el contenido hídrico en el suelo, fue el correspondiente al modelo doble recíproco (*Double reciprocal*) que mostró el R^2 más alto, siendo este de un 45,59%, este modelo es el que mejor explicó tal porcentaje de variabilidad en la actividad enzimática. Las ecuaciones de los modelos ajustados obtenidos para las variables analizadas en relación a la parcela intervenida (P2), se exhiben en la Tabla III.

Para el caso de la relación de la celulasa y el contenido hídrico el coef. de correlación 0,67 indica una relación moderadamente fuerte entre las variables. El p-valor en la tabla ANOVA es \leq a 0,05 (Tabla III), por lo que el análisis presenta relación significativa entre estas variables para un nivel de confianza del 95%.

Finalmente, las correlaciones que presentaron diferencias estadísticas significativas en la parcela P3, y las ecuaciones del modelo ajustado de estas son exhibidas en la Tabla IV.

Para la relación existente entre la actividad celulasa y el contenido hídrico en el suelo, el modelo que describió mejor la correlación existente entre ambas variables, fue correspondiente al cuadrado doble (*Double squared*) que exhibió el R^2 más alto, siendo de un 68,17%, este modelo fue el que mejor explicó tal porcentaje de variabilidad en la actividad enzimática, en tanto para relación con la variable independiente; temperatura registro continuo, concernió al modelo cuadrado-Y logaritmo-X (*Squared-Y Log-X*) el que explicó el 41,28% de variabilidad de la actividad de la celulasa.

Tabla III. Coeficientes, p-valores obtenidos a partir de las correlaciones de Pearson y Spearman y ecuación del modelo ajustado de las variables dependientes del suelo en la parcela semi - intervenida (P2) que presentaron importancia estadística, para un nivel de confianza del 95%.

Variables analizadas		Coeficiente	P-Valor \leq 0,05	Coeficiente	P-Valor \leq 0,05
		Pearson	Pearson	Spearman	Spearman
Celulasa	Ureasa	0,6476	0,0067	0,5735	0,0263
Celulasa	Proteasa	0,5629	0,0232	0,5882	0,0227
Celulasa	Contenido hídrico	0,5628	0,0232	-	-
Celulasa	FDA	0,6500	0,0064	0,6112	0,0179
Ureasa	FDA	0,5908	0,0160	-	-
Variables correlacionadas	Coef. de correlación	R ²	R ² Ajustado	Ecuación del modelo ajustado	
Celulasa y Contenido hídrico	0,67	45,59%	41,70%	Celulasa = 1/(-0,248587 + 34,9114/contenido hídrico)	

Tabla IV. Coeficientes, p-valores obtenidos a partir de las correlaciones de Pearson y Spearman y ecuación del modelo ajustado de las variables dependientes del suelo en la parcela control (P3) que presentaron importancia estadística, para un nivel de confianza del 95%.

Variables analizadas		Coeficiente	P-Valor	Coeficiente	P-Valor \leq
		Pearson	$\leq 0,05$ Pearson	Spearman	$0,05$ Spearman
Celulasa	Proteasa	0,5106	0,0433	-	-
Celulasa	Nitrato reductasa	0,8448	0,0000	0,8667	0,0008
Celulasa	Contenido hídrico	0,8017	0,0002	0,6976	0,0069
Celulasa	T° registro continuo del suelo	- 0,5429	0,0298	-	-
Ureasa	Nitrato reductasa	0,7830	0,0003	-	-
Proteasa	Nitrato reductasa	0,5035	0,0468	-	-
Proteasa	Contenido hídrico	0,6551	0,0059	0,6000	0,0201
Proteasa	T° registro continuo del suelo	-	-	- 0,5206	0,0438
Nitrato reductasa	Contenido hídrico	0,7744	0,0004	0,6711	0,0093
Nitrato reductasa	T° registro continuo del suelo	- 0,4991	0,0491	-	-
Variables correlacionadas	Coef. de correlación	R ²	R ² Ajustado	Ecuación del modelo ajustado	
Celulasa y contenido hídrico	0,83	68,17%	65,89%	Celulasa = $\sqrt{-11,6736 + 0,00616982 \cdot \text{contenido hídrico}^2}$	
Celulasa y T° registro continuo del suelo	-0,64	41,28%	37,08%	Celulasa = $\sqrt{17,9771 - 3,67219 \cdot \ln(\text{contenido hídrico})}$	
Proteasa y contenido hídrico.	0,68	46,35%	42,52%	Proteasa = $\sqrt{-1505,19 + 71,5554 \cdot \text{contenido hídrico}^2}$	

Proteasa y T° registro continuo del suelo	-0,48	23,03%	17,53%	Proteasa = $\sqrt{195530 - 10667,4 * T^{\circ} \text{ registro continuo}}$
Nitrato reductasa y contenido hídrico	0,80	63,82%	61,24%	Nitrato R. = $(0,00529516 + 0,00000695761 * \text{Contenido hidrico}^2)^2$
Nitrato reductasa y T° registro continuo del suelo	-0,53	28,19%	23,06%	Nitrato R. = $\exp(-6,29672 - 0,253882 * \sqrt{\text{Temperatura registro continuo}})$

Para la relación de la actividad proteasa y el contenido hídrico el modelo que representó la relación entre estas variables correspondió al cuadrado doble (*Double squared*), que fue aquel que exhibió el R^2 más alto, correspondiente a un 46,35%, siendo este modelo el que mejor explicó tal porcentaje de variabilidad en la actividad enzimática. En tanto para la variable independiente; temperatura registro continuo, el modelo cuadrado-Y (*Squared-Y*) fue aquel que explicó el 23,03% de la variabilidad en la actividad de la proteasa.

Finalmente para la actividad nitrato reductasa y la relación con el contenido hídrico el modelo que representó esta relación fue raíz cuadra-Y cuadrado-X (*Square root-Y squared-X*) exhibiendo el mayor R^2 (63,82%). Para la variable independiente temperatura registro continuo, el modelo que explicó la relación de esta con la actividad nitrato reductasa fue, el modelo logaritmo-Y raíz Cuadrada-X (*Logarithmic-Y square root-X*) que mostró un R^2 de 28,19%.

Las ecuaciones de los modelos ajustados obtenidos para las variables analizadas en relación a la parcela intervenida (P3), se exhiben en la Tabla IV. Para el caso de la relación de la celulosa y el contenido hídrico el coef. de correlación 0,83 indica una relación moderadamente fuerte entre las variables, situación equivalente ocurre para la relación entre la celulosa y la temperatura registro continuo que exhibe un coef. de correlación de $-0,64$. El p-valor en la tabla ANOVA es $\leq 0,05$ (Tabla IV), por lo que existe relación estadísticamente significativa entre estas variables para un nivel de confianza del 95%.

En la relación de la proteasa y el contenido hídrico, el coef. de correlación 0,68 indica una relación moderadamente fuerte entre las variables. El p-valor en la tabla ANOVA es $\leq 0,05$ (Tabla IV), por lo que existe relación estadísticamente significativa entre estas variables para un nivel de confianza del 95%, mientras que para la otra variable independiente correspondiente a la temperatura registro continuo, el coef. de correlación es de $-0,48$ que exhibe una relación

relativamente débil entre las variables, además el p-valor en la tabla ANOVA \geq a 0,05 por lo que no existe relación significativa entre las variables para un nivel de confianza del 95%. Sin embargo, esta relación se estudió por el p-valor \leq a 0,05 obtenido en la correlación de Spearman indicando una diferencia estadísticamente significativa (Tabla IV).

Para la relación entre nitrato reductasa y el contenido hídrico, el coef. de correlación 0,80 indica una relación moderadamente fuerte entre las variables situación semejante ocurre para la relación entre nitrato reductasa y la temperatura registro continuo pero con un coef. de correlación de - 0,53. Para ambas correlación de la actividad enzimática con las variables independientes analizadas se obtuvo un p-valor en la Tabla ANOVA \leq a 0,05, indicando que en ambos casos existe resultados significativos (Tabla IV).

5. DISCUSIÓN

En los bosques templados lluviosos del Centro-Sur de Chile los ciclos biogeoquímicos, dependen fundamentalmente de la circulación interna de nutrientes, a través de la transformación y mineralización de la materia orgánica del suelo (MOS), (Godoy *et al.*, 2009; Huygens *et al.*, 2011) y de la fijación biológica de nitrógeno (Pérez *et al.*, 2003 y 2004; Reed *et al.*, 2011).

La MOS adsorbida por el alofán, propio de suelos provenientes de cenizas volcánicas depositadas en ambientes de alta pluviosidad, presenta una dinámica más lenta que en suelos no volcánicos, debido a factores de descomposición que protegen a la misma, influyendo directamente en los principales ciclos de nutrientes (C, N y P) (Matus *et al.*, 2008). Como consecuencia de lo anterior, existe una alta retención de MOS (hasta un 31 %) (Matus *et al.*, 2008, 2009).

En efecto, la dinámica del C del suelo en ecosistemas terrestres naturales resulta difícil de predecir, debido a la presencia simultánea de diversos factores y mecanismos que contribuyen a la estabilización de la MOS, los cuales residen en el entorno del suelo, como la cantidad y naturaleza de las arcillas minerales, pH del suelo, y concentración de Al y Fe libres e incluso, factores microclimáticos (temperatura y precipitación) (Neculman *et al.*, 2013).

Una visión sobre los procesos microbiológicos y mecanismos de conservación del ciclo del N en suelos de bosques templados de Chile, señalan que la mayor parte del reservorio de N está asociado con la MOS, donde la descomposición constituye entonces el inicio de muchos procesos biológicos y químicos (Huygens *et al.*, 2008, 2011). Aquí es de relevancia la presencia de exoenzimas en los procesos de despolimerización de la MOS, que dan origen al ciclo interno del N

(Huygens *et al.*, 2008). El reservorio de N en el suelo para la mayoría de los ecosistemas boscosos templados en Chile, varía de un 0,6 a 0,9 %, con abundancia casi absoluta de las fracciones de N orgánico (principalmente N húmico, N humínico y N fúlvico), (Borie *et al.*, 2002).

La biomasa microbiana es un componente relevante de la MOS y su presencia, ha sido asociada como un indicador biológico importante por su papel como fuente y reservorio de nutrientes, gobernando la mayoría de las transformaciones de la materia orgánica. De esta forma, regulan el almacenamiento (inmovilización) y liberación de C, N etc. en el componente edáfico de los ecosistemas terrestres (Godoy *et al.*, 2013). La biomasa edáfica es controlada por factores bióticos y abióticos del suelo (Subke *et al.*, 2012). El tamaño del reservorio biomásico del suelo y los cambios estacionales cuali-cuantitativos de su biota, están influenciados por la cantidad de MOS, factores climáticos, características físico-químicas, y uso del suelo (Dube *et al.*, 2009). Considerando que la biomasa microbiana representa solo entre el 1 a 4% del carbono y 2 a 6% del nitrógeno total del suelo, su presencia es de vital importancia, y juega un papel fundamental en la formación de la estructura y estabilización del suelo (Belezaca *et al.*, 2014).

Rivas *et al.*, (2009) demuestran que la dinámica biológica en suelos, de bosques templados lluviosos del sur de Chile, se ve afectada por cambios en el uso del suelo. Estudios de suelos forestales en los que se comparan manejos silvícolas de baja y elevada intensidad, señalan que son estos últimos los que presentan una menor cantidad de materia orgánica, en comparación con suelos de baja intensidad de manejo (Haynes, 2005; Wallenius *et al.*, 2011).

En cuanto a los resultados obtenidos en la presente investigación, se observa en forma global que la parcela experimental P1 (intervenida por deforestación), es aquella que presenta diferencias

significativas en la mayoría de los parámetros estudiados de actividad biológica del suelo, en comparación con los suelos de las parcelas P2 y P3, que presentan valores similares de las diferentes actividades enzimáticas, microclima (temperatura y contenido hídrico del suelo) y química del suelo (N-NO_3^- y N-NH_4^+). Antecedentes de Belezaca *et al.*, (2014) para el mismo sitio de estudio, señalan que la eliminación total de la cobertura vegetal realizado en P1, condujo a una disminución $> 80\%$ en los contenidos de C y N de la biomasa microbiana del suelo, en comparación a los tratamientos con manejo silvicultural parcial (eliminación del sotobosque P2) y bosque prístino (control-P3).

Los resultados correspondientes a la enzima celulasa, que forma parte importante del ciclo del carbono, presentó un rango de valores que fueron desde 1,01 a 4,48 $\mu\text{g glucosa gss}^{-1} \text{ min}^{-1}$, similar a lo observado en los trabajos de Rhee *et al.*, (1987) y García Álvarez e Ibáñez, (1994) con rangos de actividad de 0,375 – 11,72 y 0,83 – 10,67 $\mu\text{g glucosa gss}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectivamente. En estudios de la contribución fungi y bacteriana en la actividad carboximetilcelulasa del suelo y en análisis estacional de las actividades y la influencia de la cosecha sobre la microbiota y las actividades enzimáticas.

Se contrastaron las diferencias significativas de P1 con ambas parcelas experimentales (P2 y P3), en 6 de los 16 meses del periodo en estudio. Sin embargo, al considerar el promedio anual obtenido de la actividad enzimática celulasa correspondiente al periodo entre los meses de Diciembre 2011 a Noviembre 2012 en cada una de las parcelas experimentales, no mostraron diferencias estadísticamente significativas. De esta forma, se obtuvo que la parcela P1 presentó una máxima actividad promedio en la estación de otoño y una menor en primavera 2011, a diferencia de las parcelas P2 y P3 en donde el efecto estacional fue acentuado en primavera 2011 y verano 2012, respectivamente. Estudios en cambios en el uso del suelo forestal, desde uno de

baja hacia uno de elevada intensidad de manejo, no muestran resultados significativos para la actividad enzimática celulasa (Dick, 1996; Ferreiro, 2006). Sin embargo, a pesar que existe un aporte constante de hojarasca en bosques lluviosos templados de la región, que se traduce en ingresos de la materia orgánica del suelo, lo que corresponde a uno de los principales procesos de transferencia de nutrientes desde el componente aéreo de la plantas hacia el suelo (Godoy *et al.*, 2014). Además, este aporte de MOS mejora la estructura y capacidad de retención de humedad del suelo (Staelens *et al.*, 2011), además de influir directamente en las actividades biológicas del edafón (Steubing *et al.*, 2002). Por lo general, la hojarasca posee una determinada estructura y composición, con diferentes fases degradativas, las que pueden ser variables en cuanto a la duración del proceso, dependiendo principalmente de la zona biogeoclimática, tipo de disturbio y que puede influir sobre la capacidad de retención de humedad y de la presencia de organismos descomponedores (Valenzuela *et al.*, 2001; Staelens *et al.*, 2003; Guevara *et al.*, 2009), pudiendo permanecer el carbono en el suelo del bosque por periodos de tiempo prolongados (Fontaine *et al.*, 2007). Estos mecanismos estarían favoreciendo que la actividad enzimática celulasa en el suelo de la parcela P1, no se vea alterada en relación al análisis anual de la actividad de esta enzima. Además, es importante considerar que una parte importante del C es secuestrado en el suelo y puede permanecer por tiempos prolongados sin ser mineralizado, como ocurre en áreas de bosques próximos al lugar de estudio (Neculman *et al.*, 2013). Esto implica que luego de la intervención, la materia orgánica que quedó depositada estaría jugando un rol fundamental, favoreciendo la inmovilización en una red tridimensional de complejos húmicos y arcillosos (Tabatabai, 1996; Burns, 2002). Otro aspecto importante a considerar, debiera ser el cambio en la estructura de la comunidad microbiana en el suelo de la parcela P1, ya que podría estar presentando un metabolismo mucho más activo producto de condiciones de estrés fisiológico por

efecto de la perturbación. Algunos estudios señalan la importancia de los microorganismos del suelo en los mecanismos de regulación de la expresión de enzimas específicas, las que dependerán de la disponibilidad de nutrientes y de factores ambientales asociados (Leiros *et al.*, 2000; Wallenstein *et al.*, 2009). Los diferentes mecanismos anteriormente descritos, no permiten observar una diferencia significativa con respecto a la parcela semi-intervenida (P2) y control (P3).

Para aquellas enzimas del ciclo del Nitrógeno, la actividad de la enzima ureasa, presentó un rango de valores que fueron desde 1,58 a 13,07 $\mu\text{g. N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1} \text{ min}^{-1}$, cercano a lo observado en el trabajo de Rivas *et al.*, (2008) con rangos de actividad entre 0,026 – 9,08 $\mu\text{g. N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1} \text{ min}^{-1}$, donde se comparó bosque de *Nothofagus* en la región. Esto contrasta con lo obtenido por Nuñez *et al.*, (2012), quien observó en estudios de la biomasa microbiana y actividad ureasa del suelo en una pradera permanente, rangos de actividad entre 2,36 y 2,76 $\mu\text{g. N-NH}_4^+ \text{ gss}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Se observó que en la parcela P1 presentó una actividad menor, con diferencias significativas respecto de la parcela semi – intervenida (P2) y control (P3), en 15 de los 16 meses del periodo en estudio. Por tanto esta enzima mostró ser sensible a la perturbación antrópica en los ecosistemas boscosos de la región. En cuanto a los promedios anuales obtenidos de la actividad enzimática ureasa para cada una de las parcelas en estudio (Diciembre 2011 a Noviembre 2012), confirma nuevamente que P1 registra diferencias significativas respecto P2 y P3. Las parcelas experimentales presentaron la máxima actividad en la estaciones de primavera – verano, mientras que los menores valores de actividad en otoño e invierno. De esta forma, a pesar de la perturbación a la cual fue sometida la parcela P1, la enzima ureasa mostro comportamientos estacionales de actividad similares a P2 y P3. Esta tendencia ocurre producto que la materia

orgánica que se encuentra presente en los suelos de las parcelas es estabilizada en complejos humus-ureasa (Borie y Fuentealba 1982). A pesar de esto se obtiene una menor actividad enzimática producto de las condiciones climáticas extremas. En caso contrario, la actividad se favorece por condiciones climáticas benignas, principalmente por un aumento de las temperaturas (Makoi y Ndakidemi 2008). Es importante además, considerar como los aportes de la materia orgánica son transformados en sustratos metabolizable, para la posterior acción enzimática ya que por medio de la acción de arginasas, se transforma la arginina (aminoácido) en urea y ornitina, donde la ureasa cataliza la formación de urea en NH_4^+ y $\text{CO}_{2(g)}$ (liberado a la atmósfera) (Steubing *et al.*, 2002).

En la evaluación de la actividad de la enzima proteasa en el suelo, en la parcela P1 se obtuvieron resultados con diferencias significativas respecto de la parcela control (P3), se observaron diferencias significativas en 10 de los 16 meses del periodo. En cuanto a los promedios anuales obtenidos de esta actividad P1 mostró diferencias significativas con respecto de P2 y P3. La enzima proteasa fue la que mostró mayor actividad de las actividades enzimáticas del suelo a partir de las tres parcelas experimentales. Donde se presentó un rango de valores desde 48,11 a 560,78 $\mu\text{g. gelatina gss}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Algunos valores de mínima actividad caerían dentro del rango máximo obtenido por Rivas *et al.*, (2008) (4,67 – 60,58 $\mu\text{g. gelatina gss}^{-1} \text{ min}^{-1}$),

Esta enzima cumple un rol fundamental en el mecanismo de proteólisis, en donde las proteínas que forman parte constituyente de la materia orgánica del suelo son hidrolizadas hasta aminoácidos. Este proceso es realizado por las proteasas de bacterias y hongos dando paso posteriormente a la desaminación de los aminoácidos para la generación de NH_4^+ (Godoy *et al.*, 2014). Por tanto esta enzima, constituye un punto inicial en la posterior disponibilidad de sustratos para otras enzimas que conforman parte importante del ciclo del nitrógeno. Es por esto

que la generación de una porción de formas monoméricas biodisponibles, generadas a través de la despolimerización de la MOS por medio de la acción enzimática, corresponde a una etapa crítica para la generación de un nitrógeno biodisponible en el suelo (Huygens *et al.*, 2008). Este mecanismo, acontece por la participación de diferentes exo-enzimas producidas por organismos específicos que las sintetizan según sus requerimientos de N (Godoy *et al.*, 2014). De forma que este proceso corresponde a un control bioquímico, donde los monómeros biodisponibles se encuentran bajo un riguroso control de tipo biológico (Huygens *et al.*, 2008ab). Es así como se pueden encontrar diferencias en el comportamiento estacional de esta actividad enzimática, en donde la parcela P1 exhibe un valor máximo de actividad durante la estación otoñal 2012, mientras que P2 y P3, esto sucede en la estación de primavera 2011. A pesar de la diferencia señalada, en general todos los valores de máxima actividad enzimática son alcanzados con los registros promedio de mayor contenido hídrico en el suelo. Esto se explica por ser las precipitaciones, una condición normal a través de gran parte del año, propio de los bosques templados lluviosos de montaña, que registran montos anuales en la región superiores a 8.000 mm (Oyarzún *et al.*, 2004, Godoy *et al.*, 2014).

La nitrato reductasa presentó un rango de valores que fueron desde 0,00001 a 0,0024 $\mu\text{g N-NH}_4^+$ $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$, muy por debajo de lo encontrado por Abdelmagid y Tabatabai (1986) y Kandeler *et al.*, (1996), quienes obtuvieron actividades que se encontraron en el rango de: 0,013 – 0,556 $\mu\text{g N NO}_2^-$ $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$ y 0,031 – 0,056 $\mu\text{g N-NO}_2^-$ $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectivamente, donde se estudia el efecto tanto de metales pesados, como de elementos traza sobre la actividad de esta enzima en el suelo.

De esta forma, cualquier impacto negativo en la actividad de la nitrato reductasa, reducirá el parcialmente el proceso de mineralización de la materia orgánica en su estadio final (Grisham *et al.*, 1996). Dado que corresponde a una enzima intracelular, que participa en el proceso de desnitrificación, catalizando el paso de reducción de NO_3^- a NO_2^- (Madsen, 2008). Es así, como a partir del estudio de esta enzima en el suelo de la parcela P1 se obtuvo resultados de actividad enzimática más bajos, con diferencias significativas en 12 de los 16 meses del análisis con respecto de la parcela control (P3). Cabe destacar que durante el estudio la máxima actividad de la nitrato en P1, sobrepasa los niveles cuantificados para P2 y P3. Esta situación de máxima actividad enzimática tiene estrecha concordancia con los máximos de N-NO_3^- en la solución del suelo que se presenta durante los meses estivales del 2012. Al considerar solo los promedios anuales, la parcela P1 registra diferencias significativas con la parcela semi – intervenida (P2) y con la parcela control (P3), respectivamente. En estudios similares (Crawford, 1999, Campebell, 2000), la actividad nitrato reductasa fue significativamente mayor en suelo control (sin intervención), en comparación con suelos tratados para posterior cultivo silvícola, que indica una mayor actividad de esta enzima, donde el bosque asimilaría los aportes de nitrógeno en forma más eficiente, señalando que el suelo tiene una mayor productividad debido a los aportes de nitrógeno. Además, que la mayor parte del reservorio de N se encuentra asociado con la MOS (Boeckx *et al.*, 2005).

En cuanto a la diferencia estacional observada de la nitrato reductasa, las parcelas P1, P2 y P3 exhiben los máximos en las estaciones de primavera 2011, 2012 y verano 2012, respectivamente. Los efectos estacionales en esta actividad parecen ser variables pero muy específicos, donde leves cambios en la temperatura y/o contenido hídrico del suelo, pueden determinar un aumento o disminución de la tasa metabólica de esta enzima (Trasar-Cepeda *et al.*, 2008).

En cuanto a la reacción de hidrólisis de la FDA, presentó un rango de valores que variaron entre 0,36 y 2,43 μg fluoresceína $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$. Estos se encuentran por sobre lo obtenido en Rivas *et al.*, (2008) y Burket *et al.*, (1998) en estudio de los parámetros microbiológicos y del suelo y su relación con la mineralización de N en bajo diferentes sistemas de manejo, quienes registraron valores de reacción FDA de: 0,03 – 0,36 μg fluoresceína $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$ y 0,12 – 0,52 μmol fluoresceína $\text{gss}^{-1} \text{h}^{-1}$, respectivamente. Registros de Lillo *et al.*, (2011) sitúan los valores de FDA en un rango de: 0,10 a 1,25 μg fluoresceína $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$, de la actividad biológica del suelo en el Parque Nacional Conguillío. Esta reacción de la FDA considera la medición de diversos grupos enzimáticos, tales como: proteasas, lipasas, esterases, constituyendo de esta forma, un indicador sensible de la actividad microbiana total de la hojarasca y del suelo (Sánchez *et al.*, 2008). Normalmente la medición de esta variable se correlaciona directamente con la biomasa microbiana activa, que es la que genera esta reacción de hidrólisis (Nannipieri *et al.*, 2002). La medición de esta variable, en la parcela P1 registró valores más bajos, exhibiendo diferencias estadísticamente significativas en 8 de los 16 meses del análisis en relación a la parcela control (P3). Para los promedios anuales obtenidos de la reacción de hidrólisis de la FDA en la parcela P1, registró resultados inferiores significativos, con la parcela semi – intervenida (P2) y la parcela control (P3). En cuanto a la estacionalidad observada de la reacción FDA, las tres parcelas experimentales exhibieron una tendencia similar, presentando las máximas de actividad estacional durante la primavera 2011, mientras que las mínimas para P1 y P3 fueron observadas en la estación de invierno y otoño para P2, respectivamente. Los resultados de mayor actividad de la FDA, se explicarían por las condiciones ambientales más benignas y por el potencial aporte del material vegetal en descomposición, favoreciendo una mayor fuente de nutrientes, lo que mejora las condiciones para el desarrollo y proliferación de la biomasa microbiana, especialmente de

aquella que se ubica en los horizontes superficiales (Doran y Jones, 1996). No obstante, las diferencias entre estaciones probablemente se deberían a la disponibilidad de C y a las condiciones de humedad y temperatura del sitio (Alvear *et al.*, 2007; Bardgett *et al.*, 2005).

En cuanto a las actividades enzimáticas que presentaron disminuciones en algunas estaciones, invierno principalmente, Rivas *et al.*, (2009) plantea que en los meses fríos y húmedos, pueden existir bajas tasas de mineralización de N (N_{\min}), producto de la absorción de N inorgánico por medio de las raíces y una eventual inmovilización en la biomasa microbiana en condiciones medioambientales extremas, referidas a las altas precipitaciones y disminución de la temperatura, que incluyen periodos con precipitación nival. Sin embargo, hay que considerar que esto es solo una tendencia observada en base a las estaciones, lo cual no implica que en algunos meses particulares de la estación fría y húmeda, las actividades no se vieran incrementadas. Trasar-Cepeda *et al.*, (2008), destaca que las propiedades bioquímicas del suelo se ven, en general, positivamente afectadas por una mayor temperatura y humedad, ya que ambas implican un mayor desarrollo microbiano debido a la mayor disponibilidad de sustrato (Li y Sarah, 2003). En suelos muy húmedos, también se puede producir un incremento de las propiedades bioquímicas del suelo (Patra *et al.*, 1995; Cooper, 1997), debido a los efectos positivos de la humedad en la estabilización de algunas enzimas (Gupta *et al.*, 1993). El hecho que existan comportamientos estacionales de las actividades enzimáticas contrarias a lo esperado, se deba probablemente a los grados de sensibilidad a los factores ambientales (independientes o de conjunto), o a que éstas tengan distintos orígenes (Isoenzimas). Ambas hipótesis también han sido documentadas por Li y Sarah, (2003). De esta forma, el conjunto de resultados presentados indica que las actividades enzimáticas del suelo presentan una clara variabilidad con respecto a la estación del año. Si bien, se observan divergencias de comportamiento, esto pone de manifiesto que la variabilidad, dentro

y entre estaciones climáticas, es un factor de importancia cuando se necesita interpretar medidas de la actividad bioquímica del suelo (Fenner *et al.*, 2005; Koch *et al.*, 2007; Trasar-Cepeda *et al.*, 2008; Wallenstein *et al.*, 2009). Todos los mecanismos se encuentran regulados por la disponibilidad de sustrato que tengan estas enzimas, entre otros mecanismos que regulan la expresión génica de estas macromoléculas por parte de los microorganismos especializados (Madsen, 2008). De esta forma, se obtiene un control de tipo biológico en estos procesos. No obstante, aún existe una demanda apremiante por entender las relaciones que ocurren entre la estructura del suelo, la función de la diversidad genética y las comunidades microbianas involucradas (O'Donnell *et al.*, 2001, Suenaga, 2011).

Considerando los mecanismos de entrada de nitrógeno en los suelos anteriormente descritos, es la parcela P1 la que presenta el mayor porcentaje de N_{total} (0,41 %) en comparación a las otras parcelas experimentales P2 y P3, ambas con un N_{total} de 0,16 %. Principalmente el aumento en el contenido de N, se debería en forma esencial al aporte de materia orgánica proveniente de los restos de la cobertura vegetal que fueron acumulados en el suelo posterior a la tala a la cual fue sometida la parcela P1, lo cual habría favorecido la mineralización de la MOS, producto de una mayor temperatura que estaría gatillando el proceso. Este mecanismo de biodisponibilidad de N ayudaría a comprender los valores de nitrato ($N\text{-NO}_3^-$) en las parcelas en estudio, donde P1 presenta un valor más alto de concentración de este compuesto en comparación con las otras parcelas (P2 y P3), puesto que este estaría siendo liberado de manera directa con la potencial pérdida vía lixiviación (Godoy *et al.*, 2014). Sin embargo, hay que considerar que en suelos de bosques lluviosos se optimiza la retención del N (Huygens *et al.*, 2008), pero los impactos antropogénicos alteran este mecanismo, provocando pérdidas de nitrógeno que principalmente se dan en forma orgánica (95% del N total), mientras que el porcentaje restante lo integran las

formas inorgánicas NO_3^- (0,2 % del N total) y NH_4^+ (4,8 % del N total) (Hedin *et al.*, 1995). De igual forma, la parcela intervenida (P1) muestra mayores valores de amonio (N-NH_4^+). Estas potenciales pérdidas del pool de N en forma inorgánica, nos orientan sobre la disminución de las actividades enzimáticas que ocurren en la parcela intervenida (P1).

Otro parámetro de importancia para la comprensión de la dinámica de las actividades enzimáticas, tanto del ciclo del Carbono como del Nitrógeno corresponde al pH del suelo, este parámetro es un regulador importante de las comunidades microbianas del suelo y de las actividades enzimáticas (Sinsabaugh *et al.*, 2008; Lauber *et al.*, 2009; Rousk *et al.*, 2009). Sin embargo, los datos bibliográficos señalan resultados contradictorios en lo que se refiere al sentido de la influencia de este factor (pH) en las propiedades bioquímicas del suelo, ya que incluso para la misma enzima se pueden encontrar tanto correlaciones positivas (Speir, 1991; Ekenler y Tabatabai, 2005) como negativas (Frankenberger y Dick, 1992; Parham *et al.*, 2000), sin que se conozcan muy bien las causas de estas ambigüedades (O'Toole *et al.*, 1995). La existencia de correlaciones positivas entre pH y propiedades bioquímicas, indican que cuanto menor sea el valor del pH, más elevada será la actividad enzimática del suelo, lo que en cierta medida podría considerarse como algo anómalo, ya que la actividad enzimática requiere un ámbito físico-químico adecuado, el cual no se corresponde con el predominio de la acidez (Brookes, 1995). Además se plantea que la relación debe buscarse a través del efecto indirecto ejercido sobre la materia orgánica, ya que cuanto mayor sea la acidez se producirá una disminución en la tasa de descomposición de la materia orgánica, por lo que esta tiende a acumularse, transformándose gradualmente generando compuestos de alto peso molecular (Zeller *et al.*, 2005; Gomoryova *et al.*, 2013). Esto es consistente con la mayor relación C/N en P2 y P3, indicando que la proporción de materia orgánica no descompuesta es elevada. Junto con esto y en forma

consecuente, se obtiene que los suelos en estudio presentaron valores de pH levemente ácidos, lo cual refleja un mecanismo eficiente en relación a la dinámica de nutrientes en estos suelos. Producto de las condiciones climáticas adversas en las que se desarrollan los procesos metabólicos. No obstante en condiciones experimentales a pesar de los valores de pH, la parcela control (P3) presentó una mayor potencialidad enzimática. Garrido y Matus, (2012) plantean que existe una relación más robusta en tanto los valores de pH disminuyan ($< 5,5$) produciéndose una mayor estabilización de la materia orgánica del suelo producto de su relación con el Al por su efecto estabilizador.

Aquellas variables de importancia en el presente estudio fueron sometidas a un análisis de correlación múltiple, en donde se obtuvieron resultados que fueron significativas. En la parcela deforestada (P1) es en la que se obtiene un menor número de asociaciones, destacándose principalmente la falta de correlaciones entre las actividades enzimáticas, a diferencia de lo obtenido en las otras parcelas experimentales (P2 y P3), que presentaron un mayor número de correlaciones significativas. Esto da cuenta de un grado de conexión entre los procesos enzimáticos implicados en los ciclos del carbono y nitrógeno. Trasar-Cepeda *et al.*, (2007) y Lei Tian *et al.*, (2010) encontraron una elevada interconexión entre las enzimas de los ciclos del carbono, nitrógeno y fósforo. Esto es de gran importancia ya que como es bien sabido, para evaluar la calidad del suelo en base a sus propiedades bioquímicas no se puede emplear una única propiedad (Nanniperi *et al.*, 2002; Gil-Sotres *et al.*, 2005), debido a la elevada variabilidad que éstas presentan. Esto hace que generalmente se recomiende la medición simultánea de varias propiedades bioquímicas, con objeto de buscar expresiones que combinen dichas medidas para lograr pronunciar la calidad funcional del suelo (Nanniperi *et al.*, 2004; Ferreiro, 2006; Wallenius *et al.*, 2011).

Se profundizó en la relación entre las variables microclimáticas y las propiedades bioquímicas analizadas, con objeto de diferenciar estas con el posible efecto de la perturbación antropogénica sobre las actividades enzimáticas. La influencia del microclima, particularmente estudiada por los parámetros de temperatura de registro continuo y contenido hídrico del suelo (humedad), exhibieron un número disminuido de correlaciones tanto en la parcela deforestada (P1), como en la parcela semi – intervenida (P2) con respecto de la parcela control (P3), lo cual es sugerente de una influencia directa de la perturbación sobre el suelo, inclusive en diferentes grados. Posiblemente en P1, producto de un mayor grado de intervención, quedó expuesta a un aumento en la temperatura del suelo con una consiguiente pérdida de humedad específica, esto es de alta relevancia para las actividades enzimáticas ya que existe un grado de sensibilidad directa frente a estos patrones que determinan su funcionalidad (Wallenius *et al.*, 2011; Baldrian *et al.*, 2013). La parcela control (P3), mostró una mayor correlación entre las variables analizadas (enzimáticas y microclimáticas). A pesar de la importancia que tiene en este estudio conocer el efecto de las variables del microclima, uno de los problemas a la hora de estudiar la influencia de las variables climáticas sobre las propiedades bioquímicas, es que existen pocos estudios que aborden este tema y los que se han realizado, suelen efectuarse a escala global, realizando estimaciones de datos climáticos y recopilando propiedades de otros estudios. De todas formas en este tipo de trabajos (Raich y Schlessinger, 1992; Basanta *et al.*, 2002; Zeller *et al.*, 2005) se ha comprobado la dependencia a escala global entre propiedades bioquímicas, como las actividades enzimáticas, respiración basal y el carbono asociado a la biomasa microbiana, y variables climáticas, como la temperatura, precipitación o humedad.

Una vez obtenidos los resultados de las correlaciones de las variables múltiples y conociendo la importancia de algunas variables como factores que influyen en las actividades enzimáticas en el

suelo, se investigan las relaciones de mayor importancia de acuerdo a los objetivos planteados en el presente estudio. Esto permitió establecer de manera más fidedigna el grado de influencia sobre las actividades enzimáticas. De esta forma en la parcela deforestada (P1), se obtiene una correlación positiva entre la actividad proteasa y el contenido hídrico del suelo, mientras que en la parcela semi – intervenida (P2) se encontró una correlación positiva entre la celulasa y el contenido hídrico. En cuanto a la parcela control (P3) se obtienen correlaciones positivas entre las actividades enzimáticas; celulasa, proteasa, y nitrato reductasa con el contenido hídrico. Sin embargo estas mismas actividades se correlacionan en forma negativa con la temperatura registrada en forma continua. De acuerdo a los resultados anteriormente expuestos es importante enfatizar que no se obtuvo correlación de la actividad ureasa del suelo con respecto de las variables microclimáticas, lo que es congruente con otros estudios (Ferreiro, 2006; Rivas *et al.*, 2009; Lebrun *et al.*, 2012) en el que se hace referencia a este escenario. De igual forma la reacción de hidrólisis FDA no exhibió ninguna correlación con las variables del microclima. Sin embargo en la parcela P2, se obtuvo una correlación positiva con la actividad ureasa, lo cual es sugerente de una biomasa microbiana activa (Nannipieri *et al.*, 2003). Sin embargo Li y Sarah (2003) señalan una correlación positiva del contenido hídrico con la hidrólisis de la fluoresceína diacetato por aumento en la disponibilidad de sustratos metabolizables para los microorganismos del suelo.

Rivas *et al.*, (2009) en estudio de la actividad enzimática del suelo en un bosque de *Nothofagus obliqua* y una plantación de *Pinus radiata* del centro-sur de Chile, señala que la actividad proteasa no muestra correlación con las variables microclimáticas lo cual también difiere de los resultados aquí logrados

En cuanto a la actividad de la nitrato reductasa en suelo, hay pocos estudios en el que se asocie esta actividad enzimática con variables microclimáticas. Sin embargo, Xu-Ri *et al.*, (2012) señala que los procesos de nitrificación y desnitrificación, son altamente dependientes de la temperatura. Mientras Bohlen *et al.*, (2001) indican que estos procesos expresan diferentes comportamientos estacionales, en donde aumentos sensibles de estas variables, podrían ejercer una influencia negativa en la actividad de esta enzima y en otras, la proteasa. En la mayoría de los estudios de actividades enzimáticas involucran evaluaciones simultáneas de las actividades ureasa, proteasa y FDA como bioindicadores. Algunos autores (Insam, 1990; Kshattriya *et al.*, 1992), explican que un incremento de temperatura origina una menor cantidad de sustratos metabolizables por los microorganismos del suelo. Wallenstein *et al.*, (2009) plantea que en la estación calida (verano), existe una limitación de N biodisponible, lo que resulta en una disminución del pool enzimático. Los trabajos de Anderson y Domsch (1986); Wardle (1992); Raich y Schlessinger (1992); Jarvis *et al.*, (1996), encuentran correlaciones positivas entre propiedades bioquímicas y variables climáticas, lo que estos autores atribuyen a una mayor velocidad en la tasa de descomposición por los microorganismos del suelo, vía aumentos en la temperaturas (Baldrian *et al.*, 2013, Gomoryova *et al.*, 2013), siempre que se asocie a la humedad adecuada del suelo. De esta forma, la gran mayoría de los estudios recientes se han orientado a la expresión de los genes que codifican para las enzimas específicas, que aplica nuevas técnicas para comprender mejor los mecanismos, teniendo en consideración la necesidad de cuantificar *in situ* las actividades enzimáticas ya que de esta forma, se lograría comprender la influencia real de todas las variables, que se consideren como un efecto importante (Wallenstein *et al.*, 2009; Wallenius *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2012; Burns *et al.*, 2013).

En general, los antecedentes acerca de las actividades enzimáticas para suelos de origen volcánico en el Centro-Sur de Chile, indican resultados que revelan cambios sustanciales en la comparación de sitios de bosque natural *versus* suelos con influencia antropogénica (Frank, 1998; Rivas *et al.*, 2007; 2009; Alvear *et al.*, 2008).

A pesar de los diferentes mecanismos postulados que podrían estar influyendo en las actividades enzimáticas, este estudio logra un precedente, puesto que los resultados presentados permitirán comprender de mejor forma cual es la dinámica de las actividades enzimáticas bajo perturbaciones antropogénicas y condiciones climáticas extremas, en suelos de bosques prístinos en el sur de Chile. Metodología de aplicación con mediciones *in situ*, podría aportar un conocimiento más acabado, en relación a los mecanismos de estabilización de las enzimas en el suelo.

A partir de los resultados aquí presentados, se aceptan las hipótesis del trabajo donde la actividad biológica del suelo (enzimática) en bosques templados del sur de Chile, disminuye por la perturbación antropogénica producto de cambios en la cobertura vegetal y consecuente, exposición a un aumento de la temperatura medio ambiental y estacional, así como el estatus del N inorgánico en el suelo.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abdelmagid, H.M y Tabatabai, M.A. (1986). Nitrate reductase activity of soils. *Soil Biology and Biochemistry.*, 19, 421 – 427.

Adam, G. y Duncan, H. (2001). Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry.*, 33, 943-951.

Aguayo, M., Pauchard, A., Azocar, G. y Parra, O. (2009). Cambio del uso del suelo en el centro sur de Chile a fines del siglo XX. Entendiendo la dinámica espacial y temporal del paisaje. *Revista Chilena Historia Natural.*, 82, 361-374.

Ai, C., Liang, G., Sun, J., Wang, X.B. y Zhou, W. (2012). Responses of extracellular enzyme activities and microbial community in both the rhizosphere and bulk soil to long-term fertilization practices in a fluvo-aquic soil. *Geoderma.*, 173, 330–338.

Alef, K. y Nannipieri, P. (1995). Methods in applied soil microbiology and biochemistry. *Academic Press.*, London, United Kingdom. 576 pp.

Alvear, M., Rosas, A., Rouanet, J.L. y Borie, F. (2005). Effects of three soil tillage systems on some biological activities in an Ultisol from southern Chile. *Soil and Tillage Research.*, 82, 195-202.

Alvear, M., Reyes, F., Morales, A., Arriagada, C y Reyes, M. (2007). Actividad biológica y agregados estables al agua en dos tipos de formaciones vegetales de un bosque templado del Centro-Sur de Chile con perturbación antrópica. *Ecología Austral.*, 17, 113-122.

Alvear, M., Astorga, M. y Reyes, F. (2008). Efecto de los residuos vegetales provenientes de dos tratamientos silvícolas en una plantación de *Pinus radiata* D. DON sobre los cambios estacionales de las actividades biológicas del suelo. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition.*, 8, 14-27.

Anderson, T. y Domsch, K. (1986). Carbon assimilation and microbial activity in soil. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde.*, 149, 457-468.

Aon, M.A., Cabello, M.N., Sarena, D.E., Colaneri, A.C., Franco, M.G., Burgos, J.L. y Cortassa, S. (2001). I. Spatio-temporal patterns of soil microbial and enzymatic activities in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology.*, 18, 239-254.

APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. Edition 21. APHA / AWWA / WPCF. Parte 4. 2005

Armesto, J.J., Rozzi, R. y Caspersen, J. (2001). Temperate forest of North and South America. En: Chapin F, O Sala, E Huber-Sannwald (ed.). *Global Biodiversity in a Changing Environment. Scenarios for the 21st Century*, 223-249. Springer.

Armesto, J.J., Smith-Ramírez, C., Carmona, M.R., Celis-Diez J. L., Díaz I. A., Gaxiola A., Gutiérrez A.G., Núñez-Avila M.C., Pérez C.A. y Rozzi, R. (2009). Old-Growth temperate rainforests of south america: Conservation, plant–Animal interactions, and baseline biogeochemical processes. En: Wirth C., Gleixner G. and Heimann M. (ed.). *Old-Growth Forests: Function, Fate and Value*. Springer. Berlin.

Baldrian, P., Snajdr, J., Merhautová, V., Dobiášová, P., Cajthaml, T. y Valásková, V. (2013). Responses of the extracellular enzyme activities in hardwood forest to soil temperature and seasonality and the potential effects of climate change. *Soil Biology and Biochemistry.*, 56, 60-68.

Banerjee, M.R., Burton, D.L., McCaughery, W.P.P. y Grant, C.A. (2000). Influence of pasture management son soil biological quality. *J. Range Management.*, 53, 127-133.

Bardgett, R., Bowman, W., Kaufmann, R. y Schmidt, S. (2005). A temporal approach to linking aboveground and belowground ecology. *Ecology and Evolution.*, 20, 634-641.

Barnes, B.V., Zak, D.R., Denton, S.R. y Spurr, S.H. (1998). *Forest ecology.*, 4ta Ed. New York, USA. Jonh Wiley, 774 pp.

Basanta, M.R., Díaz-Raviña, M., González-Prieto, S.J. y Carballas, T. (2002). Biochemical properties of forest soils as affected by a fire retardant. *Biology and Fertility of Soils.*, 36, 377-383.

Belezaca, C., Godoy, R., Valenzuela, E., Barrientos, M. y Vidal, B. (2014). Influencia de actividades antropogénicas sobre la dinámica de la biomasa microbiana (C y N) del suelo en bosques de antiguo crecimiento, Centro-Sur de Chile. *Gayana Botánica.*, (enviado).

Boeckx, P., Paulino, L., Oyarzún, C.E., Van Cleemput, O. y Godoy, R. (2005). Soil $\delta^{15}\text{N}$ patterns in old-growth forests of southern Chile as integrator for N cycling. *Isotopes in Environmental and Health Studies.*, 41, 249-259.

Bohlen, P.J., Groffman, P.M., Driscoll, C.T., Fahey, T.J. y Siccama, T.G., (2001). Plant-soilmicrobial interactions in a northern hardwood forest. *Ecology.*, 82, 965-978.

Borie, F. y Fuentealba, R. (1982). Bioquímica de suelos derivados de cenizas volcánicas. II. Actividad ureásica. *Agricultura Técnica (Chile).*, 42, 135-141.

Borie, G., Peirano, P., Zunino, H., y Aguilera, S.M. (2002). N-pool in volcanic ash-derived soils in Chile and its changes in deforested sites. *Soil Biology and Biochemistry.*, 34, 1201-1206.

Brookes, P.C. (1995). The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils.*, 19, 269-279.

Burns, R.G. (1982). Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry.*, 14, 423-427.

Burns, R.G. y Dick, R.P. (2002). Enzymes in the environment: *Activity, ecology and applications.* Marcel Dekker., New York.q2

Burns, R., De Forest, J., Marxsen, J., Sinsabaugh, R., Stromberger, M., Wallenstein, M., Weintraub, M. y Zoppini A. (2013). Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry.*, 58, 216-234.

Campbell, W. (2000). Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 277–303.

CONAF (Corporación Nacional Forestal, Chile). (2008a). Plan de manejo Parque Nacional Puyehue. Departamento de áreas protegidas y medioambiente región de los Lagos. 141pp.

CONAF (Corporación Nacional Forestal, Chile). (2008b). Proyecto “Mejoramiento del refugio y área de descanso, sector lago Paraíso, Parque Nacional Puyehue”, región de Los Lagos. 15 pp.

Cooper, J.M. y Warman, P.R. (1997). Effect of three fertility amendments on soil dehydrogenase activity, organic carbon and pH. *Canadian Journal of Soil Science.*, 281-283.

Crawford, N. (1999). Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell.*, 7, 859–68.

Dick, A. y Tabatabai, M.A. (1992). Significance and potential use of soil enzymes. En meeting, FJB (Ed.). *Soil Microbial Ecology: Applications in agriculture and environmental management.* Marcel Dekker, NY, USA, 95-127.

Dick, R.P., Breakwell, D.P. y Turco. R.F. (1996). Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. En: Doran, J.W. y Jones, A.J. (Eds.). *Methods for assessing soil quality, SSSA Special publication, 49.* SSSA y ASA, Madison, WI, pp 247-271

Deng, S.P., Kang, H. y Freeman, C. (2011). Microplate fluorimetric assay of soil enzymes. In: Dick, R.P. (Ed.), *Methods of Soil Enzymology.* *Soil Science Society of America.*, 311–318.

Doran, J.W. y Jones, A.J. (1996). Handbook of methods for assessing quality. Madison: SSSA., pp, 247-272.

Doran, J.W., Arshad, M.A. y Gilley, J.E. (1999). Determinants of soil quality and health. En: Rattan Lat (Eds.). *Soil Quality and Soil Erosion.*, CRC Press, Florida. 39-57

Doran, J.W. y Zeiss, M.R. (2000). Soil health and sustainability: Managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology.*, 15, 3-11.

Drouillon, M. y Merckx, R. (2005). Performance of para-nitrophenyl phosphate and 4-methylumbelliferyl phosphate as substrate analogues for phosphomonoesterase in soils with different organic matter content. *Soil Biology and Biochemistry.*, 37, 1527–1534.

Dube, F., Zagal, E., Stolpe, N. y Espinosa, M. (2009). The influence of land-use change on the organic carbon distribution and microbial respiration in a volcanic soil of the Chilean Patagonia. *Forest Ecology and Management.*, 257, 1695-1704.

Ekenler, M. y Tabatabai, M.A. (2004). Arylamidase and amidohydrolases in soils as affected by liming and tillage systems. *Soil and Tillage Research.*, 77, 157-168.

Faleiros, R.R. y Cazetta, J.O. (1996). Optimization of the in vivo assay for nitrate reductase activity determination in pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp] leaves. *Científica.*, 24, 385-396.

Fenner, N., Freeman, C. y Reynolds, B. (2005). Observations of a seasonally shifting thermal optimum in peatland carbon-cycling processes; implications for the global carbon cycle and soil enzyme methodologies. *Soil Biology and Biochemistry.*, 37, 1814–1821

Ferreiro, J.P. (2006). Propiedades bioquímicas de suelos de prado de Galicia. Tesis de Doctorado, Facultad de Farmacia, Universidad Santiago de Compostela.

Fontaine, S., Barot, S., Barre, P., Bdioui, N., Mary, B. y Rumpel, C. (2007). Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature.*, 450, 277–281.

Frank, D., Finckh, M. y Wirth, C. (2009). Impacts of land use on habitat functions of old-growth forests and their biodiversity. En: Wirth C., Gleixner G. and Heimann M. (ed.). *Old-growth forests: function, fate and value.*, 429-450. Springer. Berlin.

Frank, D. y Goffman, P. (1998). Ungulate vs. landscape control of soil C and N processes in grasslands of Yellowstone National Park. *Ecology.*, 79, 2229-2241.

García Álvarez, A. y Ibañez, J.J. (1994). Seasonal fluctuations and crop influence on microbiota and enzyme activity in fully developed soils of central Spain. *Arid Soil Research and Rehabilitation.*, 8, 161 – 178.

García, C. y Hernández, T. (1997). Biological and biochemical indicators in derelict soils subjected to erosion. *Soil Biology and Biochemistry.*, 29, 171-177.

García, C., Gil, F., Hernández, T. y Trasar, C. (2003). Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos. Medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Editorial *Mundi – Prensa*, 371 pags. España.

Garrido, E. y Matus, F. (2012). Are organo-mineral complexes and allophane content determinant factors for the carbon level in Chilean volcanic soils? *Catena.*, 92, 106-112.

Gomoryova, E., Ujhazy, K., Martinak, M. y Gomory, D. (2013). Soil microbial community response to variation in vegetation and abiotic environment in a temperate old-growth forest. *Applied Soil Ecology.*, 68, 10-19.

Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C. y Seoane, S. (2005). Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry.*, 37, 877-887.

Godoy, R., Oyarzún, C. y Gerding V. (2001). Precipitation chemistry in deciduous and evergreen *Nothofagus* forests of southern Chile under a low-deposition climate. *Basic and Applied Ecology.*, 2, 65-72.

Godoy, R., Paulino, L., Valenzuela E., Oyarzún C., Huygens D. y Boeckx P. (2009). temperate ecosystems of Chile: characteristic biogeochemical cycles and disturbance regimes. In: Verhoest, N., , Boeckx P. , Oyarzún, C. y Godoy, R. (eds.) *Ecological advances on Chilean temperate rainforests*. Academia Press, Belgium, 31-40.

Godoy, R., Valenzuela, E., Guevara, G., Boy, J., Barrientos, M. y Matus, F. (2014). *Biogeoquímica en bosques templados del sur de Chile*. En: Donoso C., ME González, A Lara, (eds). *Ecología Forestal: Bases para el Manejo Sustentable y Conservación de los Bosques Nativos*. Ediciones Universidad Austral de Chile. 736 p.

Green, V., Stott D. y Diack, M. (2006). Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil sample. *Soil Biology and Biochemistry.*, 38, 693- 701.

Guevara, G., Godoy, R., Boeckx, P., Jara, C. y Oyarzún, C.E. (2009). Leaf litter dynamics in headwater streams of the Chilean Andes: influence of shredders and silvicultural activities. In: Verhoest, N., , Boeckx P. , Oyarzún, C. y Godoy, R. (eds.) *Ecological advances on Chilean temperate rainforests.* Academia Press, Belgium.

Gupta, V., Farrell, R. y Germida, J. (1993). Activity of arylsulfatase in Saskatchewan soils. *Canadian Journal of Soil Science.*, 73, 341-347.

Grisham, M., Johnson, G. y Lancaster, J. (1996). Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymology.*, 268, 237– 45.

Haynes, R.J. (2005). Labile organic matter fractions as central components of the quality of agricultural soils: an overview. *Advances in Agronomy.*, 85, 221-268.

Hedin, L.O., Armesto, J.J. y Johnson, A.H. (1995). Patterns of nutrient loss from unpolluted, old-growth temperate forests - evaluation of biogeochemical theory. *Ecology.*, 76, 493-509.

Huygens, D., Boeckx, P., Van Cleemput, O., Godoy, R. y Oyarzún, C. (2005). Aggregate structure and stability linked to carbon dynamic in a Chilean Andisol. *Biogeosciences.*, 2, 203-238.

Huygens, D., Boeckx, P., Templer, P., Paulino, L., Van Cleemput, O., Oyarzún, C., Müller, Ch. y Godoy, R. (2008). Mechanisms for retention of bioavailable nitrogen in volcanic rainforest soils. *Nature Geosciences.*, 1, 543 – 548.

Huygens, D., Roobroeck, D., Cosyn, L., Salazar, F., Godoy, R. y Boeckx, P. (2011). Microbial nitrogen dynamics in south central Chilean agricultural and forest ecosystems located on an Andisol. *Nutrient Cycling in Agroecosystems.*, 89, 175–187.

Huygens, D. y Boeckx, P. (2009). Terrestrial nitrogen cycling in southern Chile: looking back and forward. En: Verhoest NEC, Oyarzún CE, P Boeckx, R Godoy (ed.). *Ecological Advances on Chilean Temperate Rainforests.* Academia Press. Belgium, 89-101.

Insam, H. (1990). Are the soil microbial biomass and basal respiration governed by the climatic regime? *Soil Biology and Biochemistry.*, 22, 525-532.

Insam, H., Parkinson, D. y Domsch, K. (1989). Influence of macroclimate on soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry.*, 21, 211-221.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). (2007). Fourth Assessment Report, Climate Change 2007: *Synthesis Report.* Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Jaffe, D.A. (2000). The nitrogen cycle. En: Jacobson MC, RJ Charlson, H Rodhe, GH Orians (ed.). *International Geophysics.*, 322-342. Academic Press.

Jaworski, E.K. (1972). Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and biophysical research communications.*, 43, .1274-1279.

Joinville, S., Revault, M., Quiquampoix, H. y Baron, M.H. (2004). Structural effects of drying and rehydration for enzymes in soils: Kinetics-FTIR analysis of chymotrypsin adsorbed on montmorillonite. *Journal of Colloid and Interface Science.*, 273, 414–425.

Jones, D. (1998). Organics acids in the rhizosphere a critical review. *Plant and Soil.*, 205, 25-44.

Kandeler, E., Kampichler, C. y Horak, O. (1996). Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biology and Fertility of Soils.*, 23, 299-306

Koch, O., Tscherko, D. y Kandeler, E. (2007). Temperature sensitivity of microbial respiration, nitrogen mineralization, and potential soil enzyme activities in organic alpine soils. *Global Biogeochemistry Cycles.*, 21, GB4017.

Kshattriya, S., Sharma, G. y Mishra, R. (1992). Enzyme activities related to litter decomposition in forest of different age and altitude in North East India. *Soil Biology and Biochemistry.*, 24, 265-270.

Lara, A., Soto, D., Armesto, J., Donoso, P., Wernli, C., Nahuelhual, L. y Squeo, F. (2003). Componentes científicos clave para una política nacional sobre usos, servicios y conservación de los bosques nativos chilenos. Universidad Austral de Chile, Valdivia.

Lara, A., Little, C., Urrutia, R., McPhee, J., Álvarez-Garretón, C., Oyarzún, C.E., Soto, D., Donoso, P., Nahuelhual, L., Pino, M y Arismendi, I. (2009). Assessment of ecosystem services as an opportunity for the conservation and management of native forests in Chile. *For. Ecology Management.*, 258, 415-424.

Larcher, W. (2003). *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups.* Springer, Berlin.

Lauber, C., Sinsabaugh, R. y Zak, D. (2009). Laccase gene composition and relative abundance in oak forest soil is not affected by short-term nitrogen fertilization. *Microbial Ecology.*, 57, 50-57.

Lebrun, J.D., Trinsoutrot-Gattin, I., Vincelas-Akpa M., Bailleul C., Brault A., Mougín C. y Laval, K. (2012). Assessing impacts of copper on soil enzyme activities in regard to their natural spatiotemporal variation under long-term different land uses. *Soil Biology and Biochemistry.*, 49, 150-156.

Li, X. y Sarah, P. (2003). Enzyme activities along a climate transect in the Judean Desert. *Catena.*, 54, 349-363.

Likens, G.E. (2001). Ecosystems: Energetics and biogeochemistry. In: A new century of biology (eds. W. J. Kress y G. Barrett), pp. 53-88. *Smithsonian Institution Press.*, Washington and London.

Lillo, A., Ramírez, H., Reyes, F., Ojeda, N. y Alvear, M. (2011). Actividad biológica del suelo de bosque templado en un transecto altitudinal, Parque Nacional Conguillío (38° S), Chile *Bosque.*, 32, 46-56

Madsen, E. (2008). Environmental Microbiology- from genome to biogeochemistry. *Blackwell Publishing*, 479 pág.

Makoi, J. y Ndakidemi, P. (2008). Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem. *African Journal of Biotechnology.*, 7, 181-191.

Matus, F., Amigo, X. y Kristiansen, S. (2006). Aluminium stabilization controls organic carbon levels in Chilean volcanic soils. *Geoderma.*, 132, 158-168.

Matus, F., Lusk, C. y Maire, C. (2008). Effects of soil texture, C input rates and litter quality on free organic matter and N mineralization in Chilean rain forest and agricultural soils. *Comm. Plant and Soil Analysis Communication in Plant and Soil Analysis.*, 39, 187-201.

Matus, F., Panichini, M., Godoy, R. y Borie, F. (2009). Soil carbon storage in allophanic soils: Study of a pristine *Nothofagus pumilio* in the upper altitudinal limit of temperate rain forest. In: Verhoest, N., , Boeckx P. , Oyarzún, C. and Godoy, R. (eds.) *Ecological advances on Chilean temperate rainforests*. Academia Press, Belgium, pag. 147-170.

McGill, W., Cannon, K., Robertson, J. y Cook, F. (1988). Dynamics of soil microbial biomass and water-soluble organic C in Breton L after 50 years of cropping to two rotations. *Canadian Journal of Soil Science.*, 66, 1-19.

Nannipieri, P. (1994). The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In: Pankhurst, CE; BM Doube; VVSR Gupta y PR Grace (eds.). *Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems*. CSIRO, Australia, pp. 238-244.

Nannipieri, P., Kandeler, E. y Ruggiero, P. (2002). Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: *Enzymes in the Environment* (eds R.G. Burns y R. Dick), Marcel Dekker, New York. pp. 1–33

Neculman R., Rumpel, C., Matus, F., Godoy, R., M Steffens, M. y Mora, M. (2013). Organic matter stabilization in two Andisols of contrasting age under temperate rain forest. *Biology and Fertility of Soils.*, 49, 681-689.

Nelson, D. y Cox, M. (2009). Lehninger. Principios de Bioquímica. Editorial *Omega*, Barcelona, España. 1158 pp.

Newton, W.E. (2007). Physiology, biochemistry, and molecular biology of nitrogen fixation. En: Bothe H, Ferguson SJ, Newton WE (eds.), *Biology of the Nitrogen Cycle.*, 110-129. Amsterdam (The Netherlands), *Elsevier*.

Núñez, P., Jara, A., Sandoval, Y., Demanet, R. y Mora, M. (2012). Biomasa microbiana y actividad ureasa del suelo en una pradera permanente pastoreada de Chile. *Cienc. Suelo.*, 30, n°2.

Nsabimana, D., Haynes, R. y Wallis, F. (2004). Size, activity and catabolic diversity of the soil microbial biomass as affected by land use. *Applied Soil Ecology.*, 26, 81-92.

Olson, D.M. y Dinerstein, E. (2002). The Global 200: Priority Ecoregions for Global Conservation. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 89, 199-224.

O'Toole, P., Morgan, M.A., y McGarry, S. (1985). A comparative study of urease activities in pasture and tillage soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis.*, 16, 759-773.

Oyarzún, C., Godoy, R., De Schreijver, A., Staelens, J. y Lust, N. (2004). Water chemistry and nutrient budget in an undisturbed evergreen rainforest of southern Chile. *Biogeochemistry.*, 71, 107-123.

Patra, D., Chand, S. y Anwar, F. (1995). Seasonal changes in microbial biomass in soils cropped with palmarosa (*Cymbopogon martinii*, L.) and Japanese mint (*Mentha arvensis*, L.) in subtropical India. *Biology and Fertility of Soils.*, 19, 193-196.

Perakis, S. y Hedin, L. (2001). Fluxes and fates of nitrogen in soil of an unpolluted old-growth temperate forest, southern Chile. *Ecology.*, 82, 2245-2260.

Perakis, S. y Hedin, L. (2002) Nitrogen loss from unpolluted South American forests mainly via dissolved organic compounds. *Nature.*, 415, 416-419.

Pérez, C., Carmona, M. y Armesto, M. (2003). Non-Symbiotic nitrogen fixation, net nitrogen mineralization and denitrification in evergreen forest of Chiloé island, Chile: A comparison with other temperate forest. *Gayana Botánica.*, 60, 25-33

Pérez, C., Carmona, M., Aravena, J. y Armesto, J. (2004). Successional changes in soil nitrogen availability, non symbiotic nitrogen fixation and C/N ratios in southern chilean forest ecosystems. *Oecologia.*, 140, 617-625.

Promis, A., Caldentey, J. y Ibarra, M. (2010). Microclima en el interior de un bosque de *Nothofagus pumilio* y el efecto de una corta de regeneración. *Bosque.*, 31(2), 129-139.

Raich, J. y Schlesinger, W. (1992). The global carbon dioxide flux in soil respiration and its relationship to vegetation and climate. *Tellus.*, 44B,81-99.

Reed, S., Cleveland, C. y Townsed, A. (2011). A functional ecology of free-living nitrogen fixation: contemporary perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematic.*, 42, 489-512.

Rhee, Y.H., Hah, Y.C. y Hong, S.W. (1989). Relative contributions of fungi and bacteria to soil carboxymethylcellulase activity. *Soil Biology and Biochemistry.*, 19, 479 – 481.

Rivas, Y., Godoy, R., Valenzuela, E., Leiva, J., Oyarzún, C. y Alvear, M. (2007) Actividad biológica del suelo en dos bosques de *Nothofagus* del centro sur de Chile. *Gayana Botanica.*, 64, 81-92.

Rivas, Y., Oyarzún, C., Godoy, R. y Valenzuela, E. (2009). Mineralización del Nitrógeno, Carbono y actividad enzimática del suelo en un bosque de *Nothofagus obliqua* (Mirb) Oerst y una plantación de *Pinus radiata* D.Don.del Centro-Sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural.*, 82, 119-134.

Robarge, W., Edwards, P.A. y Johnson, B. (1983). Water and waster analysis for nitrate by nitrates of salicylic acid. *Comm. Soil Sci. Plant. Anal.*, 14(12), 1207-1215.

Roldan, A., Caravaca, F., Hernández, M.T., García, C., Sanchez-Brito, C., Velasquez, C. y Tiscareño, M. (2003). No-Tillage, crop residue additions, and legume cover cropping effects on soil quality characteristics under maize in patzcuaro watershed (Mexico). *Soil and Tillage Research.*, 1786, 1-9.

Rousk, J., Brookes, P. y Bååth, E. (2009). Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Applied and Environmental Microbiology.*, 75, 1589-1596.

Rutting, T., Huygens, D., Müller, C., Van Cleemput, O., Godoy, R. y Boeckx, P. (2008). Functional role of DNRA and nitrite reduction in a pristine south Chilean *Nothofagus* forest. *Biogeochemistry.*, 90, 243-248.

Saiya-Cork, K., Sinsabaugh, R. y Zak, D.R. (2002). The effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an *Acer saccharum* forest soil. *Soil Biology and Biochemistry.*, 34, 1309–1315.

Sala, O., Jakson, R., Mooney, H. y Howarth, R. (2000). Methods in ecosystem science. *Springer Verlag.*, 421 p.

Sánchez-Monedero, M., Mondini, C., Cayuela, M., Roig, A., Contin, M. y De Nobili, M. (2008). Fluorescein diacetate hydrolysis, respiration and microbial biomass in freshly amended soils. *Biology and Fertility of Soils.*, 44, 885–890.

Sarkar, J., Leonowicz, A. y Bollag, J.M. (1989). Immobilization of enzymes in clays and soil. *Soil Biology and Biochemistry.*, 21, 223-230.

Sinsabaugh, R., Lauber, C., Weintraub, M., Allison, S., Crenshaw, C., Contosta, A., Cusack, D., Frey, S., Gartner, T., Holland, K., Keeler, B., Stursova, M., Takacs-Vesbach, C., Waldrop, M., Wallenstein, M. y Zak, D. (2008). Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology Letters.*, 11, 1252-1264.

Sollins, P., Homann, P. y Caldwell, B.A. (1996). Stabilisation and destabilisation of soil organic matter: mechanisms and controls. *Geoderma.*, 74, 65-105.

Schimel, J. y Klein, J. (2000). Microbial response to freeze-thaw cycles in tundra and taiga soils. *Soil Biology and Biochemistry.*, 28, 1061-1066.

Schinner, F. y Von Mersi, W. (1990). Xylanase, CM-cellulase and invertase activity in soil: an improved method. *Soil Biology and Biochemistry.*, 22, 511- 515.

Schulze, E.D. (2000). The carbon and nitrogen cycles of forest ecosystems. In: Schulze E-D (ed.) *Carbon and nitrogen Cycling in European Forest Ecosystems. Ecological Studies.*, 142, 3-13, Springer Verlag.

Schnürer, J. y Rosswall, T. (1982). Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. . *Applied and Environmental Microbiology.*, 43, 1256–1261.

Speir, T. y Cowling, J. (1991). Phosphatase activities of pasture plants and soils: Relationship with plant productivity and soil P fertility indices. *Biology and Fertility of Soils.*, 12, 189-194.

Staelens, J., De Schrijver, A., Oyarzún, C.E. y Lust, N. (2003). Comparison of dry deposition and canopy exchange of base cations in temperate hardwood forest in Chile and Flanders. *Gayana Botanica.*, 60 (1), 9-16.

Staelens, J., Ameloot, N., Almonacid, L., Padilla, E., Boeckx, P., Huygens D., Verheyen, K., Oyarzún, C. y Godoy, R. (2011). Litterfall, litter decomposition and nitrogen mineralization in old-growth evergreen and secondary deciduous *Nothofagus* forests in south-central Chile. *Revista Chilena de Historia Natural.*, 84, 125-141.

Steubing, L., Godoy, R. y Alberdi, M. (2002). Métodos de ecología vegetal. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. 345 pp.

Subke, J.A., Carbone, M.S., Khomik, M., Stoy, P. y Bahn, M. (2012). Biotic interactions and biogeochemical processes in the soil environment. *Biogeosciences.*, 9, 1823-1825.

Suenaga, H. (2011). Targeted metagenomics: a high-resolution metagenomics approach for specific gene clusters in complex microbial communities. *Environmental Microbiology.*, 14, 13-22.

Tabatabai, M.A. (1986). Nitrate reductase activity of soils. *Soil Biology and Biochemistry.*, 4, 421-427.

Taylor, B., Parkinson, R. y Pearsons, D. (1989). Nitrogen and lignin content as predictors of litter decay rates: a microcosm test. *Ecology.*, 70, 97-104.

Tian, L., Dell, E. y Shi, W. (2010). Chemical composition of dissolved organic matter in agroecosystems: Correlations with soil enzyme activity and carbon and nitrogen mineralization. *Applied Soil Ecology.*, 46, 426–435.

Toro, V.C. (2004). Perfil Bioquímico de cepas fúngicas rizosféricas. Tesis de pregrado, Escuela de Licenciatura en Ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Tosso, J. (1985). Suelos volcánicos de Chile. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Santiago. p.723.

Trasar Cepeda, C., Leirós, M., Seoane, S. y Gil, F. (2000). Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biology and Biochemistry.*, 32, 1867-1875.

Trasar-Cepeda, C., Leiros, M.C. y Gil-Sotres, F. (2008). Hydrolytic enzyme activities in agricultural and forest soils. Some implications for their use as indicators of soil quality. *Soil Biology and Biochemistry.*, 40, 2146-2155.

Valenzuela, E., Leiva, S. y Godoy, R. (2001). Potencial enzimático de microhongos asociados a la descomposición de hojarasca de *N. pumilio*. *Revista Chilena de Historia Natural.*, 74, 737-749.

Valenzuela, E., Hipp, J., Alonso, C., Godoy, R., Alberdi, M., Alvarez, M. y Saavedra, I. (2008). Physiological-enzymatic characteristics and inoculation of mycelial strains of *Descolea antarctica* Sing. in *Nothofagus* seedlings. *Electronic Journal of Biotechnology* (on line) 11 (2) available on line at: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol11/issue2/full/7/> ISSN, 0717-3458.

Van Elsas, J. y Boersma, F. (2011). A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. *European Journal of Soil Biology.*, 47, 77-87.

Wallenstein, M.D., McMahon, S.K. y Schimel, J.P. (2009). Seasonal variation in enzyme activities and temperature sensitivities in Arctic tundra soils. *Global Change Biology.*, 15, 1631–1639

Wallenstein, M., Steven, D.A., Emakovich, J., Steinweg, J.M. y Sinsabaugh, R. (2011). Controls on the temperature sensitivity of soil enzymes: A key driver of *in situ* enzyme activity rates. *Soil Biology.*, Editorial Springer., 383 pags.

Wallenius, K., Rita, H., Lappi, K., Lindström, K., Hartikainen, H., Raateland, A., R. y Niemi, R. (2011). Effects of land use on the level, variation and spatial structure of soil enzyme activities and bacterial communities. *Soil Biology and Biochemistry.*, 43, 1464-1473.

Wardle, D.A., Yeates, G.W., Nicholson, K.S., Bonner, K.I. y Watson, R.N. (2001). Response of soil microbial biomass dynamics, activity and plant litter decomposition to agricultural intensification over a seven-year period. *Soil Biology and Biochemistry.*, 31, 1707-1720.

Xu-Ri, I., Prentice, C., Spahni, R. y Shan Niu, H. (2012). Modelling terrestrial nitrous oxide emissions and implications for climate feedback, *New Phytologist.*, 196, 472-488.

Zarin, D., Johnson, A. y Thomas, S. (1998). Soil organic carbon and nutrient status in old-growth montane coniferous forest watersheds, Isla Chiloé, Chile. *Plant and Soil.*, 201, 251-258.

Zeller, V., Bardgett, R. y Tappeiner, U. (2005). Site and management effects on soil microbial properties of subalpine meadows: a study of land abandonment along a northsouth gradient in the European Alps. *Soil Biology and Biochemistry.*, 33, 639-649.

Zhang, Y., Wu, N., Zhou, G. y Bao, W. (2005). Changes in enzyme activities of spruce (*Picea balfouriana*) forest soil as related to burning in the eastern Qinghai-Tibetan plateau. *Applied Soil Ecology.*, 30, 215-225.

7. ANEXOS

ANEXO 1. Temperatura del suelo (5 cm de profundidad aprox.) registrada de forma continua en intervalos de 1 hr, en (P1) Parcela deforestada, (P2) Parcela semi - intervenda y (P3) Parcela control, ubicadas en el Sector Las Parras-Lago Paraíso, Parque Nacional Puyehue, Centro-Sur de Chile.

Meses	Temperatura P1	Temperatura P2	Temperatura P3
Sep-11	4,99	2,93	2,93
Oct-11	6,82	5,55	5,55
Nov-11	9,47	8,00	8,00
Dic-11	12,98	11,40	11,40
Ene-12	14,86	13,20	13,21
Feb-12	12,09	10,81	10,81
Mar-12	11,46	10,58	10,58
Abr-12	8,58	7,54	7,54
May-12	6,61	5,45	5,45
Jun-12	4,62	4,15	3,25
Jul-12	2,59	1,11	0,20
Ago-12	4,11	2,63	2,99
Sep-12	5,97	4,22	4,90
Oct-12	7,18	5,83	5,81
Nov-12	10,19	8,57	8,64
Dic-12	9,31	8,26	8,26

ANEXO 2. Temperatura del suelo *in situ* en los distintos intervalos de tiempo de la colecta de gases en (P1) Parcela deforestada, (P2) Parcela semi - intervenida y (P3) Parcela control, ubicadas en Sector las Parras – Lago Paraíso, Parque Nacional Puyehue. Centro – Sur de Chile. Distintas letras indican diferencias significativas entre las parcelas en cada mes, según ANOVA y Test de Tukey (95% de confianza).

Temperatura del suelo in situ en diferentes intervalos de tiempo de las parcelas en estudio.								
Fecha colecta	Parcelas	Intervalos de tiempo en la medición.				Promedio temperatura del suelo (°C)	Desviación estándar.	ANOVA (p≤0,05) P-Valor
		0 min	20 min	40 min	60 min			
27-09-2011	P1	7,8	7,9	7,9	8,0	7,90 a	0,082	0,0000*
27-09-2011	P2	5,0	5,0	5,0	5,0	5,00 b	0,000	
27-09-2011	P3	5,0	5,0	5,0	5,0	5,00 b	0,000	
18-10-2011	P1	4,6	4,8	5,0	5,2	4,90 a	0,258	0,0001*
18-10-2011	P2	4,6	3,9	4,0	4,2	3,98 b	0,171	
18-10-2011	P3	3,8	3,9	4,0	4,2	3,98 b	0,171	
15-11-2011	P1	11,9	12,0	12,7	13,5	12,53 a	0,741	0,0000*
15-11-2011	P2	9,1	9,1	9,2	9,2	9,15 b	0,058	
15-11-2011	P3	10,9	11,0	11,0	11,1	11,00 c	0,082	
26-12-2011	P1	12,5	12,3	12,3	12,7	12,45 a	0,191	0,0000*
26-12-2011	P2	10,7	10,7	10,7	10,8	10,73 b	0,050	
26-12-2011	P3	10,8	10,9	11,0	11,0	10,93 b	0,096	
03-01-2012	P1	14,2	14,3	14,4	14,7	14,40 a	0,216	0,0000*
03-01-2012	P2	12,1	12,1	12,2	12,2	12,15 b	0,058	
03-01-2012	P3	12,0	12,1	12,1	12,1	12,08 b	0,050	
27-02-2012	P1	11,4	11,4	11,5	11,5	11,45 a	0,058	0,0000*
27-02-2012	P2	10,1	10,1	10,1	10,1	10,10 b	0,000	
27-02-2012	P3	10,6	10,6	10,6	10,6	10,60 c	0,000	
19-03-2012	P1	13,3	13,3	13,3	13,2	13,28 a	0,050	0,0000*
19-03-2012	P2	11,7	11,7	11,7	11,7	11,70 b	0,000	
19-03-2012	P3	12,1	12,1	12,1	12,0	12,08 c	0,050	
16-04-2012	P1	7,9	7,9	7,9	8,0	7,93 a	0,050	0,0000*
16-04-2012	P2	7,3	7,3	7,3	7,3	7,30 b	0,000	
16-04-2012	P3	7,2	7,2	7,2	7,3	7,23 c	0,050	
14-05-2012	P1	6,2	6,3	6,3	6,3	6,28 a	0,050	0,0000*
14-05-2012	P2	5,8	5,8	5,8	5,9	5,83 b	0,050	
14-05-2012	P3	5,8	5,8	5,8	5,9	5,83 b	0,050	

11-06-2012	P1	4,2	4,3	4,3	4,4	4,30 a	0,082	0,0000*
11-06-2012	P2	4,1	4,1	4,1	4,1	4,10 b	0,000	
11-06-2012	P3	3,7	3,7	3,8	3,8	3,75 c	0,058	
16-07-2012	P1	3,4	3,4	3,4	3,4	3,40 a	0,000	0,0000*
16-07-2012	P2	1,4	1,4	1,4	1,4	1,40 b	0,000	
16-07-2012	P3	0,9	0,9	0,9	1,0	0,93 c	0,050	
15-08-2012	P1	5,1	5,1	5,1	5,2	5,13 a	0,050	0,0000*
15-08-2012	P2	3,1	3,1	3,1	3,1	3,10 b	0,000	
15-08-2012	P3	3,1	3,1	3,1	3,1	3,10 b	0,000	
10-09-2012	P1	4,1	4,2	4,4	4,5	4,30 a	0,183	0,2072
10-09-2012	P2	4,1	4,1	4,1	4,2	4,13 a	0,050	
10-09-2012	P3	3,9	4,1	4,2	4,3	4,13 a	0,171	
01-10-2012	P1	5,5	5,4	5,4	5,5	5,45 a	0,058	0,0000*
01-10-2012	P2	3,2	3,2	3,3	3,3	3,25 b	0,058	
01-10-2012	P3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,30 b	0,000	
16-11-2012	P1	11,9	12,0	12,4	13,2	12,38 a	0,591	0,0000*
16-11-2012	P2	9,7	9,7	9,8	9,8	9,75 b	0,058	
16-11-2012	P3	9,4	9,1	8,9	9,1	9,13 c	0,206	
07-12-2012	P1	9,5	9,5	9,5	9,5	9,50 a	0,000	0,0000*
07-12-2012	P2	7,3	7,3	7,3	7,3	7,30 b	0,000	
07-12-2012	P3	7,3	7,3	7,3	7,3	7,30 b	0,000	

ANEXO 3. Promedio y desviación estándar del % de humedad de las muestras de suelo colectadas en forma mensual, en (P1) Parcela Deforestada, (P2) Parcela Semi-intervenida y (P3) Parcela Control, ubicadas en Sector las Parras – Lago Paraíso, Parque Nacional Puyehue. Centro - Sur de Chile. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las parcelas en cada uno de los meses, según ANOVA y Test de Tukey (95% de confianza).

Fecha colecta	% de humedad del suelo						ANOVA ($p \leq 0,05$)
	P1		P2		P3		
	Promedio	D.E	Promedio	D.E	Promedio	D.E	
Sep-11	60,74 a	1,89	64,49 a	1,96	72,84 b	2,98	0,0019*
Oct-11	60,29 a	3,01	70,02 b	5,71	58,80 (b)c	6,63	0,0821*
Nov-11	68,08 a	2,53	68,31 b	0,65	68,77 c	4,18	0,9564
Dic-11	59,16 a	1,54	59,03 b	7,94	57,43 c	4,12	0,9047
Ene-12	56,89 a	1,09	48,59 (a)b	4,04	52,00 c	5,63	0,1144*
Feb-12	65,23 a	4,28	52,82 (a)b	6,05	54,33 (a)c	1,60	0,0256*
Mar-12	56,22 a	4,61	57,81 a	4,19	53,73 a	4,05	0,5374
Abr-12	63,87 a	3,34	62,43 a	7,91	58,39 a	2,69	0,4562
May-12	60,86 a	1,58	58,41 a	2,13	63,52 a	7,44	0,4411
Jun-12	62,66 a	1,15	59,27 a	1,11	64,53 a	8,86	0,4960
Jul-12	67,06 a	5,07	62,00 a	5,77	70,85 a	4,83	0,2002
Ago-12	59,51 a	4,27	60,45 a	3,20	63,86 a	6,03	0,5212
Sep-12	59,18 a	1,80	60,97 a	4,82	59,51 a	6,12	0,8819
Oct-12	61,84 a(b)	2,28	71,33 b	4,03	64,45 c	4,86	0,0567
Nov-12	58,66 a	2,95	56,95 a	7,43	57,32 a	3,91	0,9129
Dic-12	62,54 a	0,51	64,20 a	3,00	63,47 a	1,00	0,5765

(*) Existen diferencias estadísticamente significativas

D.E: Desviación estándar.

ANEXO 4. Promedio y desviación estándar de la concentración de nitrato (N-NO_3^-) de las muestras de suelo colectadas en forma mensual, en (P1) Parcela deforestada, (P2) Parcela semi-intervenida y (P3) Parcela control, ubicadas en Sector las Parras – Lago Paraíso, Parque Nacional Puyehue. Centro - Sur de Chile. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las parcelas en cada uno de los meses, según ANOVA y Test de Tukey (95% de confianza).

Fecha colecta	Nitrato						ANOVA ($p \leq 0,05$)
	P1		P2		P3		
	Promedio	D.E	Promedio	D.E	Promedio	D.E	
Sep-11	5,15 a	4,82	4,99 b	0,76	4,35 (a)c	0,60	0,0761*
Oct-11	5,03 a	4,03	7,06 b	0,70	5,70 c	0,38	0,0000*
Nov-11	4,61 a	0,34	5,01 b	0,43	3,38 b	0,41	0,0000*
Dic-11	7,48 a	7,94	7,10 b	0,26	6,08 c	0,30	0,0001*
Ene-12	8,87 a	4,04	5,49 b	0,50	6,62 c	1,04	0,0000*
Feb-12	8,26 a	6,05	5,51 b	0,10	5,58 a	0,28	0,0000*
Mar-12	6,36 a	4,19	3,93 b	0,14	3,14 c	0,08	0,0000*
Abr-12	5,31 a	7,91	4,05 a	0,72	3,35 a	0,18	0,0000*
May-12	4,68 a	2,13	3,49 b	0,13	3,58 b	0,57	0,0001*
Jun-12	5,17 a	1,11	4,09 b	0,38	5,02 a	0,49	0,0003*
Jul-12	4,41 a	5,77	3,80 b	0,12	5,45 a	0,35	0,0000*
Ago-12	4,52 a	3,20	4,24 a	0,25	5,20 a	0,22	0,1104*
Sep-12	5,15 a	4,82	4,99 a	0,76	4,35 a	0,60	0,0761*
Oct-12	5,03 a	4,03	7,06 b	0,70	5,70 c	0,38	0,0000*
Nov-12	2,48 a	7,43	3,94 b	0,50	3,38 c	0,41	0,0000*
Dic-12	6,60 a	3,00	4,87 b	0,23	5,57 c	0,73	0,0001*

(*) Existen diferencias estadísticamente significativas
D.E: Desviación estándar.

ANEXO 5. Promedio y desviación estándar de la concentración de amonio ($N-NH_4^+$) de las muestras de suelo colectadas en forma mensual, en (P1) Parcela Deforestada, (P2) Parcela Semi-intervenida y (P3) Parcela Control, ubicadas en Sector las Parras – Lago Paraíso, Parque Nacional Puyehue. Centro - Sur de Chile. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las parcelas en cada uno de los meses, según ANOVA y Test de Tukey (95% de confianza).

Fecha colecta	Amonio						ANOVA ($p \leq 0,05$)
	P1		P2		P3		
	Promedio	D.E	Promedio	D.E	Promedio	D.E	
Sep-11	3,64 a	0,51	5,32 b	1,59	9,35 c	8,20	0,1438
Oct-11	1,17 a	0,05	0,86 b	0,35	4,81 c	6,30	0,1443
Nov-11	1,76 a	1,41	3,47 b	3,71	6,27 c	1,30	0,3108
Dic-11	6,44 a	17,88	5,93 b	18,78	1,92 c	18,25	0,9956
Ene-12	7,11 a	6,03	4,24 b	1,63	11,75 c	8,74	0,1410
Feb-12	4,82 a	0,35	3,83 b	0,60	3,43 (a)c	1,37	0,0425*
Mar-12	3,79 a	0,38	3,76 b	2,40	3,27 c	1,10	0,8070
Abr-12	3,00 a(c)	0,68	3,32 b(c)	0,59	7,17 c	4,59	0,0306*
May-12	4,34 a	0,37	6,87 b	3,86	4,64 c	2,37	0,2211
Jun-12	3,44 a(c)	0,36	3,92 b(c)	0,97	4,96 c	0,78	0,0096*
Jul-12	5,74 a	2,31	5,19 b	2,75	11,56 c	9,59	0,1523
Ago-12	4,49 a	2,75	1,79 (a)b	0,78	3,78 c	0,95	0,0442*
Sep-12	3,65 a	0,51	5,32 b	1,59	9,36 c	8,20	0,1438
Oct-12	1,16 a	0,05	0,85 b	0,35	4,82 c	6,30	0,1443
Nov-12	1,54 a(b)(c)	0,39	9,22 b	4,86	6,27 c	1,30	0,0014*
Dic-12	6,45 a	17,88	5,94 b	18,78	1,91 c	18,25	0,9956

(*) Existen diferencias estadísticamente significativas

D.E: Desviación estándar.

ANEXO 6. Análisis de varianza (Nivel de confianza del 95%) de las concentraciones anuales de: nitrato (N-NO_3^-) y amonio (N-NH_4^+) en: parcela deforestada (P1), parcela semi – intervenida (P2) y parcela control (P3), ubicadas en el sector Las Parras – Lago Paraíso, Parque Nacional Puyehue.

(A) Análisis de varianza concentración anual nitrato.

<i>Source</i>	<i>Sum of squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean square</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Value</i>
<i>Between groups</i>	5,72587	2	2,86294	1,38	0,2654
<i>Within groups</i>	68,3873	33	2,07234		
Total (Corr.)	74,1132	35			

(B) Análisis de varianza concentración anual amonio.

<i>Source</i>	<i>Sum of squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean square</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Value</i>
<i>Between groups</i>	25,5451	2	12,7725	2,04	0,1456
<i>Within groups</i>	206,221	33	6,24913		
Total (Corr.)	231,766	35			

ANEXO 7. Análisis de contrastes de múltiples rangos (Nivel de confianza del 95%) de las concentraciones anuales de; nitrato (N-NO_3^-) y amonio (N-NH_4^+) en: parcela deforestada (P1), parcela semi – intervenida(P2) y parcela control (P3), ubicadas en el sector Las Parras – Lago Paraíso, Parque Nacional Puyehue.

(A) Multiple range tests for nitrato by plots.

<i>Method: 95,0 percent LSD</i>			
<i>Plots</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogenous Groups</i>
P1	12	4,7875	X
P2	12	4,8075	X
P3	12	5,64333	X
<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
P1 - P2		0,835833	1,19569
P1 - P3		0,855833	1,19569
P2 - P3		0,02	1,19569

* denotes a statistically significant difference.

(B) Multiple range tests for amonio by plots.

<i>Method: 95,0 percent LSD</i>			
<i>Plots</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogenous Groups</i>
P1	12	4,12667	X
P2	12	4,52	X
P3	12	6,0775	X
<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
P1 - P2		-0,393333	2,07633
P1 - P3		-1,95083	2,07633
P2 - P3		-1,5575	2,07633

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 8. Análisis de varianza (Nivel de confianza del 95%) de las actividades anuales de; celulasa, ureasa, proteasa, nitrato reductasa, y de la reacción de hidrolisis FDA en: parcela deforestada (P1), parcela semi – intervenida (P2) y parcela control (P3), ubicadas en el sector Las Parras – Lago Paraíso, Parque Nacional Puyehue.

(A) Análisis de varianza actividad anual celulasa.

<i>Source</i>	<i>Sum of squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean square</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Value</i>
<i>Between groups</i>	3,82535	2	1,91268	1,64	0,2099
<i>Within groups</i>	38,5529	33	1,16827		
Total (Corr.)	42,3783	35			

(B) Análisis de varianza actividad anual ureasa.

<i>Source</i>	<i>Sum of squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean square</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Value</i>
<i>Between groups</i>	970672	2	485336	19,59	0
<i>Within groups</i>	817503	33	24772,8		
Total (Corr.)	1,79E+06	35			

(C) Análisis de varianza actividad anual proteasa.

<i>Source</i>	<i>Sum of squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean square</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Value</i>
<i>Between groups</i>	873,776	2	436,888	3,49	0,0423
<i>Within groups</i>	4135,85	33	125,329		
Total (Corr.)	5009,63	35			

(D) Análisis de varianza actividad anual nitrato reductasa.

<i>Source</i>	<i>Sum of squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean square</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Value</i>
<i>Between groups</i>	5,12082	2	2,56041	7,5	0,0021
<i>Within groups</i>	11,2605	33	0,341227		
Total (Corr.)	16,3813	35			

(E) Análisis de varianza reacción de hidrolisis anual FDA.

<i>Source</i>	<i>Sum of squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean square</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Value</i>
<i>Between groups</i>	2601,02	2	1300,51	5,39	0,0094
<i>Within groups</i>	7959,72	33	241,204		
Total (Corr.)	10560,7	35			

ANEXO 9. Análisis de contrastes de múltiples rangos (Nivel de confianza del 95%) de las actividades anuales de; celulasa, ureasa, proteasa, nitrato reductasa, y de la reacción de hidrolisis FDA en: parcela deforestada (P1), parcela semi – intervenida(P2) y parcela control (P3), ubicadas en el sector Las Parras – Lago Paraíso, Parque Nacional Puyehue.

(A) Multiple range tests for celulasa by plots.

<i>Method: 95,0 percent LSD</i>			
<i>Plots</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogenous Groups</i>
P1	12	3,8625	X
P2	12	4,47	X
P3	12	4,615	X
<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
P1 - P2		-0,6075	0,897755
P1 - P3		-0,7525	0,897755
P2 - P3		-0,145	0,897755

* denotes a statistically significant difference.

(B) Multiple range tests for ureasa by plots.

<i>Method: 95,0 percent LSD</i>			
<i>Plots</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogenous Groups</i>
P1	12	399,226	X
P2	12	727,003	X
P3	12	764,995	X
<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
P1 - P2	*	-327,777	130,73
P1 - P3	*	-365,769	130,73
P2 - P3		-37,9925	130,73

* denotes a statistically significant difference.

(C) Multiple range tests for protease by plots.

<i>Method: 95,0 percent LSD</i>			
<i>Plots</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogenous Groups</i>
P1	12	27,2075	X
P2	12	37,6317	X
P3	12	37,685	X
<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
P1 - P2	*		
P1 - P3	*		
P2 - P3			

* denotes a statistically significant difference.

(D) Multiple range tests for nitrato reductasa by plots.

<i>Method: 95,0 percent LSD</i>			
<i>Plots</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogenous Groups</i>
P1	12	0,568333	X
P2	12	1,3625	X
P3	12	1,37417	X
<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
P1 - P2	*	-0,805833	0,485185
P1 - P3	*	-0,794167	0,485185
P2 - P3		0,0116667	0,485185

* denotes a statistically significant difference.

(E) Multiple range tests for FDA by plots.

<i>Method: 95,0 percent LSD</i>			
<i>Plots</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogenous Groups</i>
P1	12	44,2583	X
P2	12	61,6775	X
P3	12	62,845	X
<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
P1 - P2	*	-17,4192	12,8997
P1 - P3	*	-18,5867	12,8997
P2 - P3		-1,1675	12,8997

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 10. Promedio de las actividades enzimáticas estacionales obtenidas a partir del suelo de la parcela intervenida (P1) y las variables microclimáticas. Parque Nacional Puyehue. Centro – Sur de Chile.

Actividad estacional en P1							
Estaciones	Celulasa	Ureasa	Proteasa	Nitrato reductasa	FDA	Contenido Hídrico	Temperatura registro continuo. °C
	(μg glucosa. $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$)	(μg N-NH ₄ ⁺ $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$)	(μg gelatina $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$)	(μg N-NO ₂ $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$)	(μg fluoresceína $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$)	%	
Primavera 2011	2,33	3,62	226,33	0,0002	1,394	62,07	8,57
Verano 2012	2,67	3,96	242,58	0,0005	0,795	59,38	12,85
Otoño 2012	3,03	3,48	294,67	0,0004	0,740	60,90	7,82
Invierno 2012	2,33	2,89	227,17	0,0004	0,796	62,10	4,32
Primavera 2012	2,84	3,08	207,00	0,0003	0,880	60,56	8,16

ANEXO 11. Promedio de las actividades enzimáticas estacionales obtenidas a partir del suelo de la parcela semi - intervenida (P2) y las variables microclimáticas. Parque Nacional Puyehue. Centro - Sur de Chile.

Actividad estacional en P2							
Estaciones	Celulasa	Ureasa	Proteasa	Nitrato reductasa	FDA	Contenido Hídrico %	Temperatura registro continuo. °C
	(μg glucosa. $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$)	(μg N- NH_4^+ $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$)	(μg gelatina $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$)	(μg N- NO_2 $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$)	(μg fluoresceína $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$)		
Primavera 2011	3,81	8,50	365,08	0,0009	1,529	65,46	6,97
Verano 2012	2,90	6,79	316,42	0,0006	1,092	54,56	11,50
Otoño 2012	3,19	5,94	337,08	0,0007	0,981	59,48	6,93
Invierno 2012	2,70	5,10	261,33	0,0012	0,994	60,67	3,03
Primavera 2012	3,63	6,88	310,25	0,0015	1,147	63,36	6,72

ANEXO 12. Promedio de las actividades enzimáticas estacionales obtenidas a partir del suelo de la parcela control (P3) y las variables microclimáticas. Parque Nacional Puyehue. Centro - Sur de Chile.

Actividad estacional en P3							
Estaciones	Celulasa	Ureasa	Proteasa	Nitrato reductasa	FDA	Contenido Hídrico	Temperatura registro continuo.
	(μg glucosa. $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$)	(μg N- NH_4^+ $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$)	(μg gelatina $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$)	(μg N- NO_2 $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$)	(μg fluoresceína $\text{gss}^{-1} \text{min}^{-1}$)	%	$^{\circ}\text{C}$
Primavera 2011	3,75	8,53	400,50	0,0014	1,674	64,46	6,97
Verano 2012	2,65	6,57	282,92	0,0008	1,097	54,37	11,50
Otoño 2012	3,01	5,89	383,83	0,0008	1,087	60,04	6,71
Invierno 2012	3,59	6,00	355,08	0,0011	1,004	64,69	2,84
Primavera 2012	3,36	6,88	224,33	0,0010	1,086	61,19	6,90

ANEXO 13. Correlación de Pearson de los datos obtenidos en la parcela P1 para cada par de variables, correspondientes a; celulasa, ureasa, proteasa, nitrato reductasa, reacción de hidrolisis FDA, nitrato, amonio, contenido hídrico y temperatura registro continuo de T° (°C).

	Celulasa	Ureasa	Proteasa	Nitrato r	FDA	Amonio	Nitrato	T continua	C hídrico
Celulasa		0,2692	0,2998	0,2837	0,0396	-0,1218	0,0492	0,3658	0,0761
		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
		0,3134	0,2593	0,2870	0,8842	0,6530	0,8564	0,1635	0,7794
Ureasa	0,2692		0,1090	0,7976	0,2158	-0,2340	0,1873	0,1734	0,2752
	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
	0,3134		0,6877	0,0002	0,4221	0,3831	0,4874	0,5206	0,3023
Proteasa	0,2998	0,1090		0,2891	0,0035	0,4701	0,3660	0,0450	0,4760
	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
	0,2593	0,6877		0,2775	0,9896	0,0661	0,1632	0,8686	0,0624
Nitrato r	0,2837	0,7976	0,2891		-0,2252	0,0374	0,2313	0,0106	0,4613
	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
	0,2870	0,0002	0,2775		0,4018	0,8905	0,3887	0,9689	0,0721
FDA	0,0396	0,2158	0,0035	-0,2252		-0,4146	-0,1554	0,0585	0,1796
	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)
	0,8842	0,4221	0,9896	0,4018		0,1103	0,5655	0,8297	0,5057
Amonio	-0,1218	-0,2340	0,4701	0,0374	-0,4146		0,6629	0,2817	-0,1266
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)
	0,6530	0,3831	0,0661	0,8905	0,1103		0,0051	0,2906	0,6403
Nitrato	0,0492	0,1873	0,3660	0,2313	-0,1554	0,6629		0,6598	-0,1657
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)
	0,8564	0,4874	0,1632	0,3887	0,5655	0,0051		0,0054	0,5398
T continua	0,3658	0,1734	0,0450	0,0106	0,0585	0,2817	0,6598		-0,3239
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)
	0,1635	0,5206	0,8686	0,9689	0,8297	0,2906	0,0054		0,2210
C hídrico	0,0761	0,2752	0,4760	0,4613	0,1796	-0,1266	-0,1657	-0,3239	
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	
	0,7794	0,3023	0,0624	0,0721	0,5057	0,6403	0,5398	0,2210	

Correlation
(Sample Size)
P-Value

ANEXO 14. Correlación de Spearman de los datos obtenidos en la parcela P1 para cada par de variables, correspondientes a; celulasa, ureasa, proteasa, nitrato reductasa, reacción de hidrolisis FDA, nitrato, amonio, contenido hídrico y temperatura registro continuo de T° (°C).

	Celulasa	Ureasa	Proteasa	Nitrato r	FDA	Amonio	Nitrato	T continua	C hídrico
Celulasa		0,0353	0,3206	0,2559	0,0044	-0,0706	0,2209	0,3059	0,0794
		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
		0,8913	0,2144	0,3217	0,9863	0,7846	0,3922	0,2361	0,7584
Ureasa	0,0353		-0,0176	0,5265	0,4354	-0,3824	0,1105	0,0912	0,1559
	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
	0,8913		0,9455	0,0414	0,0917	0,1386	0,6688	0,7240	0,5460
Proteasa	0,3206	-0,0176		0,3794	-0,1491	0,3647	0,2710	-0,0471	0,6412
	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
	0,2144	0,9455		0,1417	0,5637	0,1578	0,2939	0,8554	0,0130
Nitrato r	0,2559	0,5265	0,3794		-0,1712	-0,1324	0,0619	-0,2765	0,4471
	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
	0,3217	0,0414	0,1417		0,5072	0,6082	0,8107	0,2843	0,0834
FDA	0,0044	0,4354	-0,1491	-0,1712		-0,3247	-0,0177	0,0723	-0,1107
	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)
	0,9863	0,0917	0,5637	0,5072		0,2085	0,9452	0,7794	0,6681
Amonio	-0,0706	-0,3824	0,3647	-0,1324	-0,3247		0,4978	0,2147	-0,1324
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)
	0,7846	0,1386	0,1578	0,6082	0,2085		0,0539	0,4057	0,6082
Nitrato	0,2209	0,1105	0,2710	0,0619	-0,0177	0,4978		0,5979	-0,1738
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)
	0,3922	0,6688	0,2939	0,8107	0,9452	0,0539		0,0206	0,5009
T continua	0,3059	0,0912	-0,0471	-0,2765	0,0723	0,2147	0,5979		-0,3324
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)
	0,2361	0,7240	0,8554	0,2843	0,7794	0,4057	0,0206		0,1980
C hídrico	0,0794	0,1559	0,6412	0,4471	-0,1107	-0,1324	-0,1738	-0,3324	
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	
	0,7584	0,5460	0,0130	0,0834	0,6681	0,6082	0,5009	0,1980	

Correlation
(Sample Size)
P-Value

ANEXO 15. Correlación de Pearson de los datos obtenidos en la parcela P2 para cada par de variables, correspondientes a; celulasa, ureasa, proteasa, nitrato reductasa, reacción de hidrolisis FDA, nitrato, amonio, contenido hídrico y temperatura registro continuo de T° (°C).

	Celulasa	Ureasa	Proteasa	Nitrato r	FDA	Amonio	Nitrato	T continua	C hidrico
Celulasa		0,6476	0,5629	0,1429	0,6500	0,0443	0,2558	0,0679	0,5628
		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
		0,0067	0,0232	0,5976	0,0064	0,8706	0,3389	0,8027	0,0232
Ureasa	0,6476		0,1717	0,1666	0,5908	-0,1001	0,4971	0,1285	0,3700
	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
	0,0067		0,5248	0,5376	0,0160	0,7123	0,0501	0,6352	0,1584
Proteasa	0,5629	0,1717		-0,1496	0,0654	0,0521	0,0650	0,1030	0,3912
	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
	0,0232	0,5248		0,5802	0,8098	0,8480	0,8110	0,7043	0,1340
Nitrato r	0,1429	0,1666	-0,1496		-0,1118	0,0918	0,2143	-0,4143	0,3156
	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
	0,5976	0,5376	0,5802		0,6803	0,7353	0,4254	0,1106	0,2338
FDA	0,6500	0,5908	0,0654	-0,1118		0,0321	0,3013	0,1902	0,2628
	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)
	0,0064	0,0160	0,8098	0,6803		0,9060	0,2568	0,4806	0,3254
Amonio	0,0443	-0,1001	0,0521	0,0918	0,0321		-0,4489	0,1446	-0,4430
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)
	0,8706	0,7123	0,8480	0,7353	0,9060		0,0811	0,5932	0,0857
Nitrato	0,2558	0,4971	0,0650	0,2143	0,3013	-0,4489		0,2863	0,3378
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)
	0,3389	0,0501	0,8110	0,4254	0,2568	0,0811		0,2823	0,2007
T continua	0,0679	0,1285	0,1030	-0,4143	0,1902	0,1446	0,2863		-0,5031
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)
	0,8027	0,6352	0,7043	0,1106	0,4806	0,5932	0,2823		0,0470
C hídrico	0,5628	0,3700	0,3912	0,3156	0,2628	-0,4430	0,3378	-0,5031	
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	
	0,0232	0,1584	0,1340	0,2338	0,3254	0,0857	0,2007	0,0470	

Correlation
(Sample Size)
P-Value

ANEXO 16. Correlación de Spearman de los datos obtenidos en la parcela P2 para cada par de variables, correspondientes a; celulasa, ureasa, proteasa, nitrato reductasa, reacción de hidrolisis FDA, nitrato, amonio, contenido hídrico y temperatura registro continuo de T° (°C).

	Celulasa	Ureasa	Proteasa	Nitrato r	FDA	Amonio	Nitrato	T continua	C hidrico
Celulasa		0,5735	0,5882	0,1265	0,6112	-0,1339	0,1679	0,1412	0,4765
		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
		0,0263	0,0227	0,6243	0,0179	0,6040	0,5155	0,5845	0,0650
Ureasa	0,5735		0,1765	0,2118	0,4875	-0,0191	0,3814	0,2471	0,1794
	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
	0,0263		0,4943	0,4121	0,0590	0,9409	0,1396	0,3386	0,4871
Proteasa	0,5882	0,1765		-0,0059	0,0943	-0,0338	0,0044	0,1618	0,3441
	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
	0,0227	0,4943		0,9818	0,7151	0,8957	0,9863	0,5310	0,1826
Nitrato r	0,1265	0,2118	-0,0059		-0,1060	0,1280	0,2430	-0,3471	0,4618
	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
	0,6243	0,4121	0,9818		0,6813	0,6200	0,3466	0,1789	0,0737
FDA	0,6112	0,4875	0,0943	-0,1060		0,0192	0,4204	0,3034	0,0751
	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)
	0,0179	0,0590	0,7151	0,6813		0,9408	0,1035	0,2400	0,7711
Amonio	-0,1339	-0,0191	-0,0338	0,1280	0,0192		-0,3360	0,1266	-0,4327
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)
	0,6040	0,9409	0,8957	0,6200	0,9408		0,1931	0,6240	0,0938
Nitrato	0,1679	0,3814	0,0044	0,2430	0,4204	-0,3360		0,3756	0,2607
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)
	0,5155	0,1396	0,9863	0,3466	0,1035	0,1931		0,1458	0,3127
T continua	0,1412	0,2471	0,1618	-0,3471	0,3034	0,1266	0,3756		-0,4765
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)
	0,5845	0,3386	0,5310	0,1789	0,2400	0,6240	0,1458		0,0650
C hídrico	0,4765	0,1794	0,3441	0,4618	0,0751	-0,4327	0,2607	-0,4765	
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	
	0,0650	0,4871	0,1826	0,0737	0,7711	0,0938	0,3127	0,0650	

Correlation
(Sample Size)
P-Value

ANEXO 17. Correlación de Pearson de los datos obtenidos en la parcela P3 para cada par de variables, correspondientes a; celulasa, ureasa, proteasa, nitrato reductasa, reacción de hidrolisis FDA, nitrato, amonio, contenido hídrico y temperatura registro continuo de T° (°C).

	Celulasa	Ureasa	Proteasa	Nitrato r	FDA	Amonio	Nitrato	T continua	C hídrico
Celulasa		0,4146	0,5106	0,8448	0,1188	0,5095	-0,0386	-0,5429	0,8017
		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
		0,1103	0,0433	0,0000	0,6612	0,0438	0,8871	0,0298	0,0002
Ureasa	0,4146		0,2727	0,7830	0,1981	0,1301	-0,0847	-0,1798	0,4055
	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
	0,1103		0,3068	0,0003	0,4621	0,6310	0,7550	0,5052	0,1192
Proteasa	0,5106	0,2727		0,5035	0,0650	0,1770	-0,1718	-0,4779	0,6551
	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
	0,0433	0,3068		0,0468	0,8109	0,5119	0,5247	0,0612	0,0059
Nitrato r	0,8448	0,7830	0,5035		0,0875	0,4393	0,0070	-0,4991	0,7744
	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
	0,0000	0,0003	0,0468		0,7473	0,0887	0,9794	0,0491	0,0004
FDA	0,1188	0,1981	0,0650	0,0875		0,1369	-0,0480	0,0879	-0,0413
	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)
	0,6612	0,4621	0,8109	0,7473		0,6132	0,8598	0,7461	0,8793
Amonio	0,5095	0,1301	0,1770	0,4393	0,1369		0,0216	-0,2746	0,2195
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)
	0,0438	0,6310	0,5119	0,0887	0,6132		0,9366	0,3034	0,4140
Nitrato	-0,0386	-0,0847	-0,1718	0,0070	-0,0480	0,0216		0,0950	-0,1192
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)
	0,8871	0,7550	0,5247	0,9794	0,8598	0,9366		0,7264	0,6603
T continua	-0,5429	-0,1798	-0,4779	-0,4991	0,0879	-0,2746	0,0950		-0,7912
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)
	0,0298	0,5052	0,0612	0,0491	0,7461	0,3034	0,7264		0,0003
C hídrico	0,8017	0,4055	0,6551	0,7744	-0,0413	0,2195	-0,1192	-0,7912	
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	
	0,0002	0,1192	0,0059	0,0004	0,8793	0,4140	0,6603	0,0003	

Correlation
(Sample Size)
P-Value

ANEXO 18. Correlación de Spearman de los datos obtenidos en la parcela P3 para cada par de variables, correspondientes a; celulasa, ureasa, proteasa, nitrato reductasa, reacción de hidrolisis FDA, nitrato, amonio, contenido hídrico y temperatura registro continuo de T° (°C).

	Celulasa	Ureasa	Proteasa	Nitrato r	FDA	Amonio	Nitrato	T continua	C hídrico
Celulasa		0,2252	0,4798	0,8667	0,2165	0,4507	-0,0236	-0,4327	0,6976
		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
		0,3832	0,0632	0,0008	0,4018	0,0809	0,9272	0,0938	0,0069
Ureasa	0,2252		-0,1912	0,4974	0,1236	-0,1266	-0,0044	0,0559	0,1206
	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
	0,3832		0,4590	0,0540	0,6321	0,6240	0,9863	0,8286	0,6405
Proteasa	0,4798	-0,1912		0,3561	0,2252	0,2369	-0,1636	-0,5206	0,6000
	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
	0,0632	0,4590		0,1678	0,3832	0,3588	0,5263	0,0438	0,0201
Nitrato r	0,8667	0,4974	0,3561		0,1885	0,4006	0,1903	-0,4135	0,6711
	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)	(16)
	0,0008	0,0540	0,1678		0,4653	0,1208	0,4612	0,1092	0,0093
FDA	0,2165	0,1236	0,2252	0,1885		0,3947	-0,0310	0,0780	-0,0029
	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)	(16)
	0,4018	0,6321	0,3832	0,4653		0,1263	0,9045	0,7626	0,9909
Amonio	0,4507	-0,1266	0,2369	0,4006	0,3947		-0,1047	-0,3355	0,2355
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)	(16)
	0,0809	0,6240	0,3588	0,1208	0,1263		0,6850	0,1938	0,3618
Nitrato	-0,0236	-0,0044	-0,1636	0,1903	-0,0310	-0,1047		0,2034	-0,1105
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)	(16)
	0,9272	0,9863	0,5263	0,4612	0,9045	0,6850		0,4309	0,6686
T continua	-0,4327	0,0559	-0,5206	-0,4135	0,0780	-0,3355	0,2034		-0,8206
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)		(16)
	0,0938	0,8286	0,0438	0,1092	0,7626	0,1938	0,4309		0,0015
C hídrico	0,6976	0,1206	0,6000	0,6711	-0,0029	0,2355	-0,1105	-0,8206	
	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	(16)	
	0,0069	0,6405	0,0201	0,0093	0,9909	0,3618	0,6686	0,0015	

Correlation
(Sample Size)
P-Value