

Efecto de *Arachis hypogaea* (Papilionaceae) y la alcalinidad del suelo sobre bacterias asociadas con nitrógeno y ureasa

Y. Gómez de Guiñán¹ e I. Nageswara²

¹ Unidad de Cursos Básicos. Departamento de Ciencias, Universidad de Oriente, Anzoátegui, Apdo. 4327, Pto. La Cruz, Venezuela.

² Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Sucre, Apdo. 245, Cumaná, Venezuela.

(Rec. 14-II-1994. Rev. 27-IX-1994. Acep. 1-III-1995)

Abstract: This work discusses the role that peanut rhizosphere (*Arachis hypogaea* L.) and soil alkaline condition exert on the dynamic of the bacterial population involved in the nitrogen cycle and on the urease activity. Plants were cultivated under natural soil conditions. Rhizosphere samples were taken at regular intervals (every 7 days) during 35 days of the growth of the plant and the rhizosphere effect on the nitrogen transformer and nitrogen-fixing bacteria populations and on the urease activity was ascertained (N° of microorganisms or enzymatic activity of rhizosphere / N° of microorganisms or enzymatic activity of soil). The incidence of ammonifying, nitrifying and denitrifying bacteria was determined by the Most Probably Number Method. The Standard Plate Count Method was used to estimate the nitrogen-fixing bacteria. Urease activity was determined by spectrophotometric analysis. The results obtained show that microflora population and urease activity were significantly greater ($p < 0.001$) in the peanut rhizosphere and that plant age exerted a marked rhizosphere effect (R/S). The results demonstrated that microbial populations were stimulated in the rhizosphere in the following order: symbiotic nitrogen-fixing > non symbiotic nitrogen-fixing > ammonifying > denitrifying > nitrifying bacteria. Urease activity was positively correlated with the denitrifying bacteria population ($r = 0.93$, $p < 0.01$) and with symbiotic ($r = 0.91$, $p < 0.001$) and non symbiotic nitrogen-fixing bacteria populations ($r = 0.89$, $p < 0.05$). No correlation was found ($r = 0.83$) between the urease activity and the ammonifying bacteria associated with this activity. It can be concluded that the alkaline condition of soil plays a significant role in the development of the transformer and nitrogen-fixing bacteria and on the urease activity in the peanut rhizosphere and that the magnitude of the rhizosphere effect (R/S) varies with the developmental stage of the plant.

Key words: Ammonifying, nitrifying, denitrifying, nitrogen-fixing bacteria, rhizosphere, urease, alkaline soil, Venezuela.

La naturaleza de las interacciones entre los microorganismos y las plantas determina el efecto rizósfera (R/S), el cual representa la influencia neta que ejerce el sistema radical sobre las poblaciones y la actividad microbiana que se desarrolla en la vecindad de las raíces en relación con su ocurrencia en la fracción del suelo (Katznelson 1946, Alexander 1980, Curl y Truelove 1986); efecto que resulta influenciado por factores tales como la especie de la planta (Bowen y Rovira 1976), la edad (Van Vuurde y De Lange 1978), naturaleza de los exudados (Bowen 1981, Curl y Truelove 1986) y las condiciones edáficas (Schaller, 1978) entre otros.

Hasta la fecha, es poco lo que se conoce referente al efecto rizósfera de maní. En su mayoría estos estudios han estado dirigidos a la determinación de este efecto sobre las poblaciones micóticas (Rao 1962, Kulkarni y Gangawane 1982) y, en forma general, sobre las poblaciones totales de bacterias (Hancock 1981) y algunos grupos microbianos específicos (Kloepper y Bowen 1991). Actualmente, no se tiene información sobre la determinación del efecto rizósfera (R/S) sobre las poblaciones bacterianas implicadas en el ciclo del nitrógeno y sobre la actividad de la ureasa en la rizósfera de maní; no obstante, se conoce la existencia de informaciones controversiales de la influencia

de la rizósfera sobre el desarrollo de las bacterias nitrificantes y desnitrificantes y de sus actividades en otras leguminosas (Stefanson 1972, Schmidt 1982, Haider *et al.* 1985, Berg y Ross-wall 1987, Russell y Nelson 1990).

Si se toma en consideración la reconocida contribución de las raíces en la transferencia del nitrógeno hacia el medio circundante (Les-cure *et al.* 1986, Ta y Faris 1987) y el papel que juega la rizósfera en la transformación de estos compuestos (Curl y Truelove 1986), las investigaciones referentes a estos tópicos podrían contribuir en suelos alcalinos Venezolanos a la obtención de un mayor conocimiento sobre la evaluación del ambiente microbiano y bioquímico de la rizósfera de maní, el cual podría contribuir en estudios posteriores a la manipulación de la dinámica del N en esta zona en favor de incrementar la productividad agrícola en estos suelos. Estos planteamientos, nos conducen a establecer en el presente trabajo los siguientes objetivos: (1) determinar el efecto de la rizósfera de maní y la condición alcalina del suelo sobre la dinámica de la flora bacteriana implicada en el ciclo del nitrógeno y sobre la actividad de la ureasa y (2) establecer las posibles correlaciones existentes entre el desarrollo de estas poblaciones y la actividad de la ureasa.

MATERIAL Y METODOS

Se empleó un suelo arenoso de la localidad de Sabilar, Edo. Sucre-Venezuela (10° 27' 00" N, 64° 12' 00" O) pH 8.6 (KCl 1M), materia orgánica (0.86 %), P (6.2 ppm), capacidad de intercambio catiónico (6.02 meq / 100g), Ca (5.52 meq / 100 g). El suelo fue colectado a una profundidad de 0-20 cm y transferido inmediatamente a recipientes de plástico de 2000 g de capacidad.

Esterilización de las semillas y cultivo de las plantas: Se emplearon semillas de maní (*A. hypogaea* L. Var. Spanish), cuyas superficies fueron esterilizadas con una solución de HgCl₂ (al 0.2%, acidificadas con HCl) durante 3 minutos y enjuagadas repetidamente con cambios de agua destilada estéril (Vincent *et al.* 1977). Posteriormente, fueron sembradas (1 por recipiente) y cultivadas bajo condiciones naturales del suelo a 27 ± 3°C.

Obtención de la fracción del suelo de la rizósfera y no rizósfera: Las plantas se seleccionaron al azar por quintuplicado, a intervalos regulares (7 - 14 - 21- 28 y 35 días de edad), durante los cuales éstas fueron cuidadosamente removidas y el sistema radical vigorosamente agitado, con el objeto de eliminar el exceso de suelo que permanecía adherido al mismo; se dejó sólo la porción que estaba en contacto con el sistema radical (rizósfera). Posteriormente las raíces se introdujeron en recipientes que contenían 500 ml de solución de Ringer (diluida a 1 / 4) y se agitaron a 2000 rpm durante 30 min con el fin de obtener la suspensión correspondiente. En relación con la fracción del suelo de la no rizósfera, la misma fue obtenida en cada período de estudio a partir de recipientes libres de plantas y recibió el mismo tratamiento de la rizósfera; para lo cual se suspendieron 10 g de suelo en 95 ml de solución de Ringer (diluida a 1/4).

Determinación de la incidencia microbiana: Se empleó la técnica del Número Más Probable (N.M.P) para llevar a cabo la cuantificación de las bacterias amonificantes, nitrificantes y desnitrificantes (Benson *et al.* 1981) y se utilizaron para ello, medios selectivos de crecimiento para cada caso (Black *et al.* 1965). Una serie de diez diluciones se emplearon para inocular cinco tubos por cada nivel de dilución. Los cultivos fueron incubados a 28°C durante 7-15 y 21 días para las bacterias desnitrificantes, amonificantes, y nitrificantes respectivamente y su presencia se identificó mediante el empleo de pruebas diagnósticas específicas (Black *et al.* 1965).

La determinación de las poblaciones de las bacterias libres y simbióticas fijadoras del nitrógeno, se llevó a cabo mediante la técnica del conteo en placas por dilución; se empleó el medio de extracto de levadura-manitol y el agar manitol libre de nitrógeno para las bacterias simbióticas y libres respectivamente (Parkinson *et al.* 1971). Las placas inoculadas fueron incubadas por 7 días a 28°C. El desarrollo de la flora micótica fue inhibida en todos los casos mediante la adición de cicloheximida (1 ml al 1 % / 100 ml) previamente esterilizada por filtración milipore (Harrigan y McCance 1965).

Actividad de ureasa: El suelo de las fracciones de la rizósfera y no rizósfera, fue secado

al aire (24°C / 24 h) y posteriormente cernida (2.0 mm). Un g de cada una de las muestras fue tratado con 0.2 ml de tolueno, 2.0 ml del buffer citrato de potasio-ácido cítrico (pH 6.5) y 1 ml de urea al 5.0 % e incubado a 37°C por 4 horas (McGarity y Myers 1967). La determinación del nitrógeno amoniacal se realizó según el método del azul indofenol (Parkinson *et al.* 1971) y la actividad de la ureasa se midió espectrofotométricamente a 630 nm, expresándose en μg de NH_4^+ / g / h a 37°C (Bergmeyer 1965, Burns 1978).

Análisis estadísticos: Las diferencias existentes entre la rizósfera y el suelo, en relación con la incidencia de la flora bacteriana implicada en el ciclo del N, se establecieron mediante análisis de Varianza (Sokal y Rohlf 1981) y la magnitud de la influencia de la edad de la planta sobre el desarrollo de estas poblaciones, se determinó a través de las pruebas a posteriori de Duncan. Los análisis de regresión múltiple, permitieron establecer las posibles relaciones existentes entre la actividad de la ureasa y la incidencia de la flora bacteriana transformadora y fijadora del nitrógeno. La actividad de esta enzima no fue correlacionada con el número poblacional de las bacterias nitrificantes, debido a la condición de quimioautótrofos estrictos de estos organismos (Burges y Raw 1972, Alexander 1980, Ruseell 1980, Holt 1981, Stanier *et al.* 1984).

RESULTADOS Y DISCUSION

A pesar de los reportes controversiales sobre la influencia de la rizósfera en el desarrollo de las bacterias transformadoras del nitrógeno (Russell y Nelson 1990), en la presente investigación estas poblaciones resultaron estimuladas en forma altamente significativa ($p < 0.001$) por la presencia de las raíces y la edad de la planta (Figs. 1 A,C y E).

El incremento poblacional de las bacterias amonificantes (Fig. 1 A) ocurrido en la rizósfera de maní, en contraste con su desarrollo en la fracción del suelo alejada del sistema radical de la planta, puede estar determinado por la disponibilidad de sustratos de carbono y en especial de compuestos nitrogenados solubles y ácidos orgánicos característicos de los exudados radicales y procesos relacionados (Kraffczyk *et al.*

1984, Curl y Truelove 1986, Klein *et al.* 1988, Janzen 1990, Hawes 1990, Lynch y Whipps 1990). El marcado efecto rizósfera (R/S) ocurrido sobre estas poblaciones (Fig. 1B), sugiere el potencial existente en esta zona para llevar a cabo la liberación del amonio, el cual constituye el suministro energético necesario para el desarrollo de las bacterias nitrificantes (Molina y Rovira 1964), cuyas poblaciones y actividades, comúnmente resultan limitadas por la tasa de producción de este ión (Belser 1979).

Contrariamente a lo referido por Schmidt (1982), Slinge y Kerkhof (1984) sobre el efecto inhibitorio causado por la presencia de compuestos orgánicos sobre el desarrollo de las poblaciones nitrificantes, se comprobó en la presente investigación que en la rizósfera, en la cual existe una gran abundancia de compuestos orgánicos, estas poblaciones resultaron estimuladas en forma altamente significativa (Fig 1C), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Molina y Rovira (1964), Berg y Rosswal (1987) para la rizósfera de algunas plantas. Es probable, que su estimulación esté determinada por la elevada concentración de dióxido de carbono en esta zona, producida por la incrementada actividad respiratoria que se desarrolla alrededor de las raíces, lo cual constituye la fuente de carbono indispensable para el desarrollo de estos organismos (Stanier *et al.* 1984, Russell y Nelson 1990).

A pesar del incremento significativo experimentado por las poblaciones de las bacterias nitrificantes en la rizósfera (Fig 1C), su número resultó relativamente bajo en comparación con el desarrollo de las bacterias amonificantes en esta zona (Fig. 1A). Este escaso desarrollo poblacional alcanzado por las bacterias nitrificantes en la rizósfera no es sorprendente; Berg (1986) informa que su número es relativamente bajo y que la edad de la planta interfiere sobre ello. Es probable, que bajo condiciones alcalinas del suelo la incidencia de estas bacterias resulte aún mayormente afectada por la concentración del amonio libre (Christianson *et al.* 1979). Sin embargo, la magnitud del desarrollo mostrado por las bacterias nitrificantes en la rizósfera de maní, en contraste con su desarrollo en la fracción del suelo (Fig. 1C), sugiere que en ella se produce un proceso de nitrificación efectivo (Berg y Rosswal 1987). Woldendorp y Laanbroek (1989) reportan que la tasa de nitrificación es un proceso predominante en la

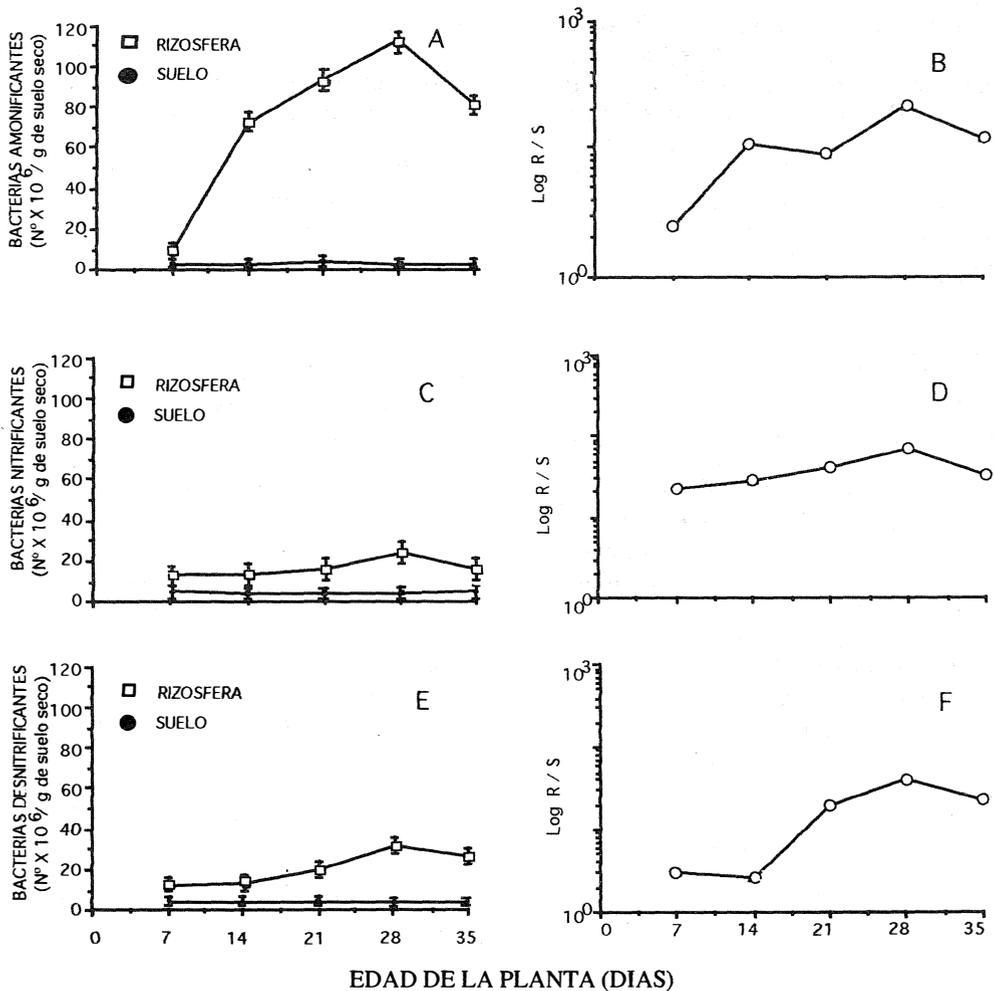


Fig.1. Influencia de la edad de la planta y el efecto rizósfera (R/S) sobre las poblaciones de las bacterias amonificantes (A y B), nitrificantes (C y D) y desnitrificantes (E y F) en la rizósfera de maní.

rizósfera, el cual puede conducir a una considerable producción de nitrato en esta zona. No obstante, resulta difícil hacer una estimación real de la tasa de producción de nitrato en la rizósfera, ya que en ella gran parte del nitrógeno disponible está dirigido hacia la inmovilización y la toma por las raíces (Woldendorp y Laanbroek 1989).

Durante el desarrollo de las poblaciones de las bacterias nitrificantes (Fig. 1 C), se observa la existencia de un período "Lag" comprendido entre los 7 y 14 días del crecimiento vegetal, el cual es completamente independiente de la cantidad de material energético existente en el suelo (Burges y Raw 1971) y representa el

tiempo necesario para que estos organismos alcancen su máxima actividad (Fleisher *et al.* 1987). La lenta tasa de crecimiento característica del desarrollo de las bacterias nitrificantes, suele considerarse como una característica de selección que explica la longevidad de estas bacterias (Woldendorp y Laanbroek 1989).

Las bacterias desnitrificantes también resultaron estimuladas en forma altamente significativa ($p < 0.001$) en la rizósfera de maní (Fig. 1E), incremento poblacional que puede estar determinado no sólo por la gran disponibilidad de compuestos de carbono presentes en la rizósfera (Myrold y Tiedje 1985); sino también por la producción de NO_3^- por parte de las

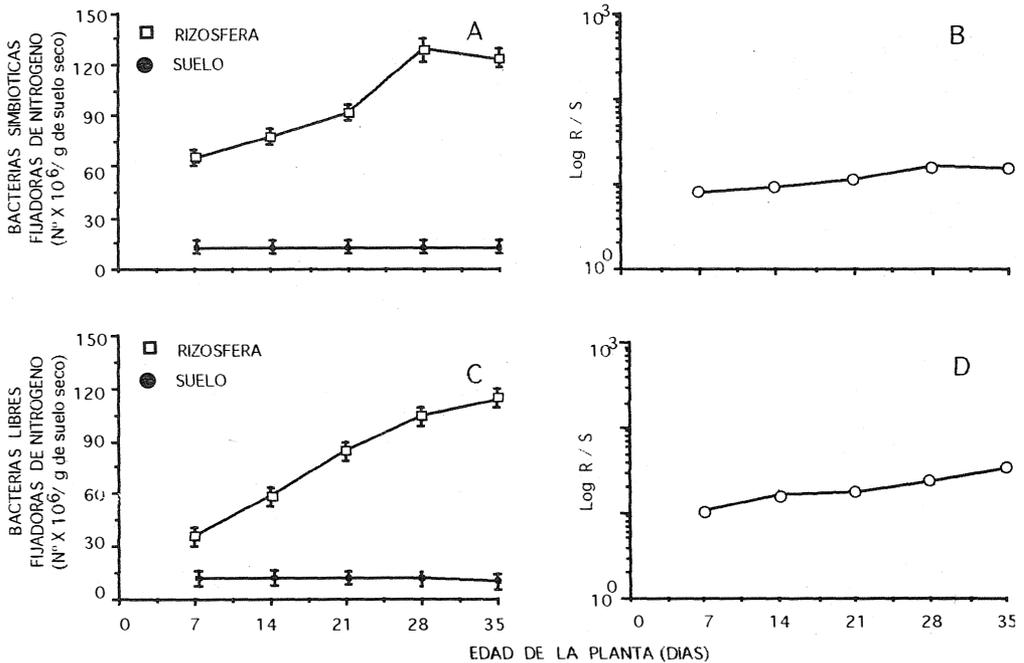


Fig. 2. Influencia de la edad de la planta y el efecto rizósfera (R/S) sobre las poblaciones de las bacterias simbióticas (A y B) y libres fijadoras del N (C y D) en la rizósfera de maní.

bacterias nitrificantes, ya que el mismo es empleado por las bacterias desnitrificantes como aceptor de electrones ante la reducida concentración de oxígeno presente en la rizósfera (Stanier *et al.* 1984). Al igual que las bacterias nitrificantes, éstas mostraron una fase "Lag" durante los primeros 14 días de su desarrollo (Fig. 1E), la cual probablemente esté directamente relacionado con la escasa incidencia de las bacterias nitrificantes durante ese período (Fig. 1C), en el cual el grado de volatilización del amonio disponible puede ser máximo (Fleisher *et al.* 1987) y por lo tanto no susceptible de ser convertido en nitrato utilizable por estas bacterias.

El efecto R/S ocurrido sobre las poblaciones de las bacterias nitrificantes y desnitrificantes (Figs. 1D y F respectivamente), podría interpretarse como un reflejo de la disponibilidad del nitrato en el medio (Blackiere 1986), a la vez que permitiría predecir la variabilidad temporal de la desnitrificación en el suelo (Martin *et al.* 1988), proceso que suele ser elevado en la rizósfera (Woldendorp 1962, Brar 1972, Bailey 1976), debido a la gran disponibilidad de carbono y a la baja concentración de oxígeno en

esta zona (Smith y Tiedje 1979, de Catanzaro y Beauchamp 1985).

Al igual que los grupos microbianos citados anteriormente, las bacterias fijadoras del nitrógeno experimentaron un desarrollo significativo ($p < 0.001$) en la rizósfera de maní (Figs. 2 A y C). La estimulación preferencial por parte de las leguminosas sobre las poblaciones de las bacterias simbióticas fijadoras del N (Fig. 2A) es ampliamente conocida (Vincent 1982, Vetanovetz y Peterson 1987), siendo ésta una condición indispensable para que se produzca una simbiosis efectiva (Vincent 1982, Curl y Truelove 1986). Su desarrollo en la rizósfera, resulta promovido no sólo por la cantidad de sustratos carbonados presentes alrededor de las raíces, sino también por la disponibilidad en ella de compuestos orgánicos específicos tales como la biotina y la tiamina necesarios para su desarrollo (Holt 1981, Curl y Truelove 1986). Asimismo, las raíces de las leguminosas facilitan el desarrollo de esta flora microbiana al liberar sustancias inhibitorias para aquellos organismos potencialmente competidores del *Rhizobium* (Curl y Truelove 1986). Stanier *et al.* (1984) reportan que el elevado número de

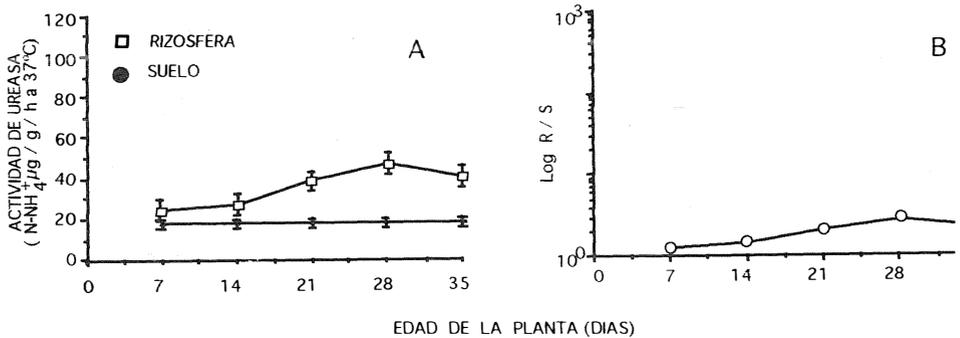


Fig. 3. Influencia de la edad de la planta y el efecto rizósfera (R/S) sobre la actividad de ureasa (A y B) en la rizósfera de maní.

células de *Rhizobium* existente en la rizósfera de las leguminosas representa una estimulación de las células que viven libres en el suelo, más que un incremento de las procedentes de la liberación de los nódulos.

Las bacterias libres fijadoras del N igualmente resultaron estimuladas significativamente ($p < 0.001$) en la rizósfera (Fig. 2C); la abundancia de sustratos de carbono y el elevado pH del suelo probablemente favorecen su desarrollo en esta zona (Smith y Tiedje 1979, Alexander 1980). El incremento de estas poblaciones en la rizósfera de maní, contribuye al desarrollo de la planta, no sólo por su participación activa en la fijación del nitrógeno; sino por la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal como la giberelina, citocinina y el ácido indolacético (Brown 1975, Alexander 1980, Curl y Truelove 1986).

Los resultados obtenidos en esta investigación evidencian que en la rizósfera de maní ocurre una estimulación de la flora microbiana implicada en el ciclo del nitrógeno, efecto que puede ser atribuido no sólo a la disponibilidad de sustratos necesarios para su desarrollo, sino también, en parte, al carácter selectivo que ejercen las células "bordeantes" del sistema radical de la planta sobre estas poblaciones (Lynch y Whipps 1990), cuyos exudados pueden funcionar en el reconocimiento extracelular de los organismos beneficiosos a la planta (Oades 1978), lo cual repercute en la regulación de la composición de la flora microbiana de la rizósfera (Hawes 1990).

La edad de la planta ejerció un marcado efecto rizósfera (R/S) sobre el desarrollo de las poblaciones implicadas en la transformación y

fijación del N (Figs. 1 y 2), en especial durante los 21 y 28 días del desarrollo vegetal, período correspondiente a la iniciación floral del maní, en el cual se suceden una serie de cambios metabólicos que influyen directamente en la naturaleza y cantidad de los exudados liberados al medio, los cuales determinan el desarrollo de estas poblaciones (Curl y Truelove 1986).

Los ensayos realizados sobre la actividad de la ureasa, evidencian como la actividad de esta enzima incrementó en forma significativa ($p < 0.001$) en la rizósfera de maní (Fig. 3A), actividad que constituye un índice de la elevada tasa de mineralización del N que ocurre en esta zona. Estos resultados corroboran los hallazgos de Clarholm (1989), Kiukman y Van Voen (1989), quienes sostienen que la mineralización de los compuestos nitrogenados en la rizósfera es efectiva.

A pesar de la estimulación experimentada por la actividad de la ureasa en la rizósfera (Fig. 3), la concentración del nitrógeno amoniacal en esta zona resultó relativamente baja, debido tal vez a los efectos interactivos de la alcalinidad y la baja capacidad de intercambio catiónico característico de estos suelos (Fleisher *et al.* 1987); lo cual permite inferir que gran parte del nitrógeno orgánico incorporado al suelo a través de las raíces de las plantas de maní, es transformado y posteriormente volatilizado en forma de amoníaco en los suelos alcalinos de Sabilar.

Debido a que la liberación del amonio de los compuestos nitrogenados es un proceso asociado a muchos microorganismos fisiológicamente distintos (Alexander 1980), en el presente trabajo se establecieron los niveles de

relación existentes entre la actividad de la ureasa y las poblaciones bacterianas implicadas en la mineralización del nitrógeno (Cuadro 1). Los análisis arrojaron la existencia de correlaciones positivas entre la actividad de esta enzima y la incidencia de las poblaciones de las bacterias desnitrificantes ($r= 0.93$, $p < 0.01$), simbióticas ($r= 0.91$, $p < 0.05$) y libres fijadoras del N ($r= 0.89$, $p < 0.05$), aunque no se encontró correlación significativa con las poblaciones de las bacterias amonificantes ($r= 0.83$).

CUADRO 1

Correlaciones entre la actividad de la ureasa y la incidencia de las bacterias transformadoras y fijadoras de N en la rizósfera de maní

Microorganismos	Actividad de la ureasa (N-NH ₄ µg/h a 37°C)
Amonificantes	0.83 ^{NS}
Nitrificantes	NES
Desnitrificantes	0.93 **
Simbióticas	0.91 *
Libres fijadoras de N	0.89 *

***: significativo a niveles de 0.05 y 0.01 respectivamente
NS: no significativo. NES: no emplean el sustrato.

Es probable que bajo condiciones alcalinas del suelo, debido a la volatilización del amonio, la actividad de la ureasa posiblemente no refleje el grado de mineralización del nitrógeno orgánico, pudiendo no correlacionarse con el número y la biomasa microbiana responsable de esta actividad.

De la presente investigación concluimos que la rizósfera de maní ejerce una marcada influencia sobre las poblaciones bacterianas implicadas en el ciclo del N y sobre la actividad de la ureasa y que la magnitud de su efecto varió con la edad de la planta. Las poblaciones de las bacterias fijadoras del nitrógeno resultaron las mayormente estimuladas en la rizósfera, seguidas en abundancia por los siguientes grupos bacterianos: amonificantes > desnitrificantes > nitrificantes. La condición alcalina del suelo afectó el desarrollo de estas poblaciones microbianas y la actividad de la ureasa, la cual no refleja bajo estas condiciones la tasa de mineralización del nitrógeno en estos suelos.

RESUMEN

El presente estudio discute el papel que ejercen la rizósfera de maní (*Arachis hypogaea* L.) y la condición alcalina del suelo sobre la dinámica de las poblaciones bacterianas involucradas en el ciclo del nitrógeno y sobre la actividad de la ureasa. Las plantas se cultivaron bajo condiciones naturales del suelo. Las muestras de rizósfera fueron obtenidas a intervalos regulares (cada 7 días) durante los 35 días del crecimiento vegetal y determinado el efecto rizósfera sobre las poblaciones de las bacterias transformadoras y fijadoras del nitrógeno y sobre la actividad de la ureasa (N° de microorganismos o actividad enzimática de la rizósfera / N° de microorganismos o actividad enzimática del suelo). La incidencia de las bacterias amonificante, nitrificantes y desnitrificantes se determinó por el método del Número Más Probable; y el Método Estandar de Conteo en placa se empleó en la estimación de las poblaciones de las bacterias fijadoras del nitrógeno. La actividad de la ureasa se llevó a cabo mediante análisis espectrofotométrico. Los resultados obtenidos muestran que la microflora y la actividad de la ureasa fueron estimuladas en forma significativa ($p < 0.001$) en la rizósfera de maní y que la edad de la planta ejerció un marcado efecto rizósfera (R/S). Las poblaciones microbianas fueron estimuladas en la rizósfera en el siguiente orden: simbióticas fijadoras del nitrógeno > libres fijadoras del nitrógeno > amonificantes > desnitrificantes > nitrificantes. La actividad de la ureasa se correlacionó positivamente con las poblaciones de las bacterias desnitrificantes ($r= 0.93$, $p < 0.01$), simbióticas ($r= 0.92$, $p < 0.01$) y no simbióticas fijadoras del nitrógeno ($r= 0.89$, $p < 0.05$). No hubo correlación ($r= 0.83$) entre la actividad de la ureasa y las bacterias amonificantes asociadas con ésta actividad. Se puede concluir que la condición alcalina del suelo juega un papel importante en el desarrollo de estas poblaciones y sobre la actividad de la ureasa en la rizósfera de maní y que la magnitud del efecto rizósfera (R/S) varió con el estado de desarrollo de la planta.

REFERENCIAS

- Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. Libros y Editoriales, México D.F. 491 p.
- Bailey, L.D. 1976. Effects of temperatures and root on denitrification in soil. *Can. J. Soil Sci.* 56 : 79-87.
- Belser, L.W. 1979. Population ecology of nitrifying bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 3: 309-333.
- Benson, H. J. 1981. *Microbiological Applications*. Brown Company Publishers, Iowa. 397 p.
- Berg, P. 1986. Nitrifier populations and nitrification rate in agricultural soil. Ph. D. Thesis, University of Agricultural Science, Uppsala.
- Berg, P. & T. Rosswall. 1987. Seasonal variations in abundance and activity of nitrifiers in four arable cropping systems. *Microbiol. Ecol.* 13: 75-87.
- Bergmeyer, H.U. 1965. *Methods of enzymatic analysis*. Academic. Nueva York. 956 p.

- Black, C.A., D.O. Evans, I. L. White, L.E. Ensminger & F.E. Clark. 1965. Methods of soil analysis. II. Chemical and microbiological properties. American Society of Agronomy, Wisconsin. 596 p.
- Blacquiére, T. 1986. Nitrate reduction in the leaves and numbers of nitrifiers in the rhizosphere of *Plantago lanceolata* growing in two contrasting sites. *Plant Soil*. 21: 337-380.
- Bowen, G.D. 1981. The root-microorganisms ecosystem, p. 3 - 42. In *Sym. Proc. Ecol. Res. Comm. Biological and Chemical interactions in the rhizosphere*. Swed. Nat. Sc. Res. Council. Estocolmo.
- Bowen, G.D. & A.D. Rovira. 1976. Microbial colonization of plant roots. *Ann. Rev. Phytopathol.* 14: 121-144.
- Brown, M.E. 1975. Rhizosphere microorganism: Opportunists, bandits or benefactors, p. 21 - 28. In N. Walker (ed.). *Soil Microbiology*. Wiley, Toronto.
- Burges, A. & F.A. Raw. 1971. *Biología del suelo*. Omega, Barcelona. 596 p.
- Burns, R.G. 1978. Enzyme activity in soil: Some theoretical and practical considerations, p. 295-340. In R.G. Burns (ed.). *Soil enzyme*. Academic. Nueva York.
- de Catanzaro, J.B. & E.G. Beauchamp. 1985. The effect of some carbon substrates on denitrification rates and carbon utilization in soil. *Biol. Fertil. Soils*. 1: 183 - 187.
- Clarholm, M. 1989. Effects of plant-bacterial-amoebal interactions on plant uptake of nitrogen under field conditions. *Biol. Fertil. Soils*. 8: 373 - 378.
- Cristianson, C.B., R.A. Hedlin & C.M. Cho. 1979. Loss of nitrogen from soil during nitrification of urea. *Can. J. Soil. Sci.* 59: 147 - 154.
- Curl, E.A. & B. Truelove. 1986. *The rhizosphere*. Springer-Verlag, Alemania. 228 p.
- Fleisher, A. Z., A. Kening, I. Rovira & J. Hagin. 1987. Model of ammonia volatilization from calcareous soils. *Plant Soil*. 103: 205 - 212.
- Haider, K. A. Moiser & O. Heinemeyer. 1985. Phytotron experiments to evaluate the effect of growing plants on denitrification. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 49: 636 - 641.
- Hancock, H.G. 1981. Effects of foliar fungicides on the microflora of peanuts. Ms. Thesis, Auburn University, Auburn.
- Harrigan, W.F. & M.E. McCance. 1965. *Métodos de laboratorio de microbiología*. Academia. León, España. 245 p.
- Hawes, M.C. 1990. Living plant cells released from the root cap: A regulator of microbial populations in the rhizosphere?. *Plant soil*. 129: 19 - 27.
- Holt, J.G. 1981. *The shorter Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore. 333 p.
- Janzen, H.H. 1990. Deposition of nitrogen into the rhizosphere by wheat roots. *Soil Biol. Biochem.* 22: 1155-1160.
- Katznelson, H. 1946. "Rhizosphere effect" of mangles on groups of soil microorganisms. *Soil Sci.* 63: 347 - 357.
- Klein, D.A., B.A. Frederick, M. Biondini & M. Trlica. 1988. Rhizosphere microorganism effects on soluble amino acids, sugar and organic acids in the root zone of *Agropiron cristatum*, *A. smithii*, and *Boutelova gram*. *Plant Soil*. 99: 303-319.
- Klopper, J. W. & K. L. Bowen. 1991. Quantification of the geocarposphere effect of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Soil*. 136: 103 - 109.
- Krafczyk, I., G. Trolldenier & H. Beringer. 1984. Soluble root exudates of maize: Influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 16: 315 - 322.
- Kuikman, P. J. & J. A. Van Veen. 1989. The impact of protozoa on the availability of bacterial nitrogen to plants. *Biol. Fertil. Soils*. 8: 13 - 18.
- Kulkarni, L. & L.V. Gangawane. 1982. Rhizosphere mycoflora of groundnut as influenced by household pesticides and sewage components. *Rev. Ecol. Sol.* 19: 525 - 533.
- Lescure, C., A. Chalameit A. & J. P. Maitre. 1986. Transfer direct d'azote dans l'association légumineuse (*Trifolium pratense* L.) -graminée (*Lolium italicum* Lamk.): problèmes soulevés dans son estimation par ¹⁵N. *Oecol. plant.* 7: 213-217.
- Lynch, J.M. & J.M. Whipps. 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil*. 129: 1-10.
- Martin, K., L.L. Pearson, R.E. Murray & M. S. Smith. 1988. Dynamics of soil denitrifier populations: Relationship between enzyme activity, Most-Probable Number counts and actual N gas loss. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2711 - 2716.
- McGarity, L.W. & M.G. Myers. 1967. A survey of urease activity in soil of northern New South Wales. *Plant Soil*. 27: 217 - 238.
- Molina, J.E. & A. D. Rovira. 1964. The influence of plant roots on autotrophic nitrifying bacteria. *Can. J. Microbiol.* 10: 249-257.
- Myrold, D.D. & J.M. Tiedje. 1985. Establishment of denitrification capacity in soil: Effects of carbon, nitrate and moisture. *Soil Biol. Biochem.* 17: 819-822.
- Oades, J.M. 1978. Mucilages at the surface. *J. Soil Sci.* 29: 1-6.

- Parkinson, D., T.R.C. Gray & S.T. Williams. 1971. Methods for studying the ecology of soil microorganism. Blackwell Scientific Publ., Oxford. 116 p.
- Rao, S.A. 1962. Fungal population in the rhizosphere of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Soil*. 27: 260-266.
- Russell, E.W. 1980. Soil Conditions and plant growth. Wiley, Nueva York. 618 p.
- Russell, H.K. & L.N. Nelson. 1990. Interactions among nitrogen-transforming bacteria and nitrogen-fixing *Pisum sativum* L. in laboratory sand columns. *Plant Soil*. 122: 157-167.
- Schaller, G. 1987. pH changes in the rhizosphere in relation to the buffering of soils. *Plant Soil*. 97: 439-444.
- Smith, M.S. & J.M. Tiedje. 1979. The effects of roots on soil denitrification. *Soil. Sci. Soc. Amer. J.* 43: 951-955.
- Schmidt, E. L. 1982. Nitrification in soil, p. 45 - 51 In F.J. Stevenson (ed.). Nitrogen in agricultural Soil. American Society of Agronomy, Madison.
- Slangen, J. H.G. & P. Kerkhoff. 1984. Nitrification inhibitors in agriculture and horticulture: A literature review. *Fert. Res.* 5: 1-76.
- Sokal, R. R. & F.G. Rohlf. 1980. Biometry. Freeman, San Francisco. 776 p.
- Stanier, R.Y., E.A. Adelberg & J.L. Ingraham. 1984. Microbiología. Reverte, Barcelona. 836 p.
- Stefanson, R.C. 1972. Evolution patterns of nitrous oxide and nitrogen in sealed soil-plant systems. *Soil Biol. Biochem.* 5: 167-169.
- Ta, T.C. & Fairs, M.A. 1987. Species variation in the fixation and transfer of nitrogen from legumes to associated grasses. *Plant Soil*. 98: 265 - 274.
- Van Vuurde, J.W.L. & De Lange. 1978. The rhizosphere of microflora of wheat grown under controlled conditions. II. Influence of the stage of growth of the plant. Soil fertility and leaf treatment with urea on the rhizosphere soil microflora. *Plant Soil*. 50: 465-472.
- Vetanovetz, R.P. & J.C. Peterson. 1987. Urease activity and pH changes in a peanut moss- based potting medium as influenced by lime source and lime rate following the addition of urea. *Plant Nutr.* 10: 1989-1985.
- Vincent, J.M. 1982. Nitrogen Fixation in legumes. Academic, Sidney. 288 p.
- Vincent, J.M., A.S. Whitney & J. Bose . 1977. Exploiting The legume-*Rhizobium* symbiosis in tropical agriculture. University of Hawaii. 469 p.
- Woldendorp, J.W. & H.J. Laanbroek. 1989. Activity of nitrifiers in relation to nitrogen of plants in natural ecosystems. *Plant Soil*. 115: 217-228.
- Woldendorp, J.W. 1962. The quantitative influence of the rhizosphere on denitrification. *Plant Soil*. 17: 267-270.