

## ACTIVIDAD NITROGENASA EN RELACION CON EL CARBONO DISPONIBLE Y EL NITROGENO INORGANICO EN UN ARGUUDOL

E B R PEROTTI, G CHAPO, A PIDELLO

Laboratorio de Química Biológica FCV - UN Rosario Bvrd. O. Lagos y Ruta 33 - 2170 Casilda, Santa Fe, Argentina

### NITROGENASE ACTIVITY IN RELATION TO AVAILABLE CARBON AND INORGANIC NITROGEN IN AN ARGUUDOLL

Nitrogenase activity (NA) in agricultural soil from the Centre and South of Santa Fe Province, Argentina, show low values, although diazotrophic microorganisms are present in considerable quantities. In this study this fact is tried to be explained by getting deep into the NA and carbon and inorganic nitrogen relationship using experimental models with different complexity levels. Even though the relationship between both parameters is known this study is aimed at getting useful information: 1) for the microbial processes interpretation in Arguidolls affected to agricultural practices that produce organic matter accumulation (no-tilled system); 2) for a better understanding of the expression of heterotrophic processes with high need of chemical energy. The results showed that: 1) the NA starts with the 0.4 mg C-glucose g<sup>-1</sup> soil addition; without this amount of carbon supply NA was not observed; 2) 40 µg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> g<sup>-1</sup> soil inhibited completely the NA but this total inhibition did not occur when 2 - 4 mg C-glucose g<sup>-1</sup> soil were added. 80 µg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> g<sup>-1</sup> soil inhibited completely the NA even in presence of 4 mg C-glucose g<sup>-1</sup> soil.

**Key words:** Arguidoll - Carbon - Inorganic nitrogen - Nitrogenase activity.

### INTRODUCCION

La actividad fijadora de nitrógeno está condicionada por la disponibilidad de carbono reducido y es inhibida por la presencia de nitrógeno inorgánico (NI) (Burrís *et al.* 1991, Knowles 1977). Este hecho puede explicar la baja actividad nitrogenasa (NA) en muchos suelos del sur de Santa Fe, donde la tala de la población diazotrófica no aparece como limitante (Perotti *et al.* 1985). En este trabajo se trató de precisar la dependencia de la NA con el carbono orgánico y el NI, por las razones siguientes: 1) no hay estudios al respecto con suelos de la región, y el auge reciente de prácticas culturales conservacionistas que conducen a una acumulación de materia orgánica en superficie exige un mejor conocimiento de la composición y funcionalidad del componente microbiano heterótrofo del sistema; 2) el estudio de la NA es un buen modelo para el estudio de otros procesos heterótrofos con altos requerimientos energéticos en los suelos pampeanos.

### MATERIALES Y METODOS

#### Suelo

Se utilizaron Arguidoles bajo siembra directa (SD) y labranza convencional (LC) del centro y sur de la Provincia de Santa Fe (Argentina): San Jorge (SD-barbecho de soja; SD-trigo fertilizado con urea; LC-pastura de 5 años; LC-trigo). Chabás

(SD-barbecho de soja; SD-trigo fertilizado con urea; LC-cama de siembra) y Casilda (barbecho semicubierto de sorgo forrajero; césped de gramíneas). Las muestras fueron tomadas en lotes de productores, en forma aleatoria. En todos los casos las muestras utilizadas corresponden a la capa superficial de 8 cm; se trasladaron al laboratorio inmediatamente luego de su extracción, donde se secaron con aire forzado y se tamizaron por malla de 1 mm.

#### Condiciones experimentales en los estudios de laboratorio

En las experiencias de laboratorio se empleó solamente suelo de la localidad de Casilda (Arguidol vértico, serie Peyrano), que posee las siguientes características: MO: 2,6%; N: 0,2%; pH: 6,12. En las experiencias 1 y 2 se estudió el efecto de la presencia de rastrojo y del sistema radicular sobre la expresión de la NA. Se utilizaron cajas de plexiglass (18x13x2cm) con una cara desmontable, que fueron colocadas verticalmente, mediante soportes especialmente diseñados, en una cámara de crecimiento de plantas con control de temperatura y humedad (26°C y 70% respectivamente) y una iluminación de 274 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (14h/24h) durante 15 días. Cada caja poseía 9 ó 14 sitios para realizar muestreos. El suelo (400 g suelo seco) se mantuvo con agua destilada a una humedad del 50% (p/p). Desde el inicio de las experiencias las cajas fueron cubiertas con papel de aluminio para impedir el desarrollo de algas. En los tratamientos con aporte de rastrojo se utilizó sorgo forrajero (trozos de 2 - 3 mm) que se mezcló con el suelo en una proporción de 936 mg de material seco 400 g-1 suelo. En los tratamientos con planta se sembraron 3 semillas germinadas de maíz (cv. Navajo 213140). Los tratamientos fueron: 1- suelo; 2- suelo + planta; 3- suelo + rastrojo; y 4- suelo + planta + rastrojo. En la experiencia 3 se

estudió el efecto de la suplementación de distintas dosis de carbono como glucosa (C-GLU) (0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0 y 2,0 mg C g<sup>-1</sup> suelo). En la experiencia 4 se estudió el efecto combinado de C-GLU y N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (se empleó 1; 2; 4 mg C-GLU y 40; 80; 160 µg N-NH<sub>4</sub>Cl g<sup>-1</sup> suelo). En ambas experiencias se trabajó con tubos de ensayo (capacidad 23,5 ml) con tapa a rosca con septum de goma para posibilitar el muestreo de gases; 1 g suelo seco por cada tubo se humectó con las soluciones aporte mencionadas, hasta alcanzar una humedad del 50% (p/p). En la experiencia 5 se estudió el efecto de la eliminación del NI endógeno del suelo sobre la expresión de la actividad. Para realizar esta extracción, el suelo (30 g) se mezcló con perlas de vidrio (4 mm de diámetro) y se colocó en una columna de percolación (4 cm de diámetro y 14 cm de longitud). La mezcla fue tratada 5 veces con 100 ml de CaCl<sub>2</sub> 5 mM (Chac, Tabatabai 1986). El análisis del percolato dio 18,7 y 4,7 µg N g<sup>-1</sup> como N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, respectivamente. El suelo luego del tratamiento contenía 5,5 g g<sup>-1</sup> suelo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y no contenía N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. El suelo tratado con CaCl<sub>2</sub> y sin tratar se dividió en dos porciones. En una de ellas se aportó una mezcla de azúcares (2 mg C-GLU + 2 mg C-sacarosa g<sup>-1</sup> suelo) y en la otra porción no se realizó ningún aporte. Los suelos así tratados fueron incubados durante 21 h y luego de ese período se midió la NA.

#### Determinaciones analíticas

La NA se midió a través de la técnica de la reducción del C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (Boddey 1987) y se utilizaron muestras de 1 g de suelo, humectadas al 50% con agua destilada. Las muestras se colocaron en los tubos descriptos precedentemente de 23,5 ml; la atmósfera del tubo fue arrastrada con un flujo de N<sub>2</sub> durante 4 s, y el 10% del volumen del tubo reemplazada por C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> y aire (pO<sub>2</sub> final de 0,02 atm). Los tubos fueron incubados a 32°C durante 24 h, y 48 h en la experiencia 3. El C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> acumulado se midió por cromatografía gaseosa (KONIC Instruments SA, Barcelona, España) equipado con un detector de ionización de llama y columna de Porapak N (Boddey 1987). La actividad nitrogenosa potencial (NAP) se midió de la misma manera que la NA, pero en el inicio de la incubación las muestras fueron suplementadas con diferentes dosis de glucosa o glucosa + sacarosa. El NI se extrajo con KCl 2 N o CaCl<sub>2</sub> (experiencia 5) y se cuantificó por destilación-titulación del filtrado (Bremner, Keeney 1965).

#### Análisis estadísticos

El estudio de las diferencias entre grupos en la experiencia 3 se realizó por el método de análisis de la variancia. En la experiencia 4 las variaciones resultaron no homogéneas, por lo cual se empleó el test de Kruskal-Wallis (Sokal, James Rohlf 1979).

## RESULTADOS

#### Actividad nitrogenosa en suelo bajo diferentes prácticas culturales

La Tabla 1 muestra la producción de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> en muestras obtenidas en las tres localidades estudiadas. Los valores en todos los casos se encuentran en el límite de detección de la técnica, confirmando resultados obtenidos en este laboratorio al analizar otros lotes correspondientes al mismo tipo de suelo (Perotti, Chapo resultados no publicados). En los suelos con barbecho de soja y trigo (fertilizado con urea) de la localidad de Chabás el NI presentó valores de 29,0 y 35,7 µg N g<sup>-1</sup>

suelo respectivamente. El N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> representa más del 80% del NI en ambos casos. En los suelos de San Jorge, muestreados en dos fechas, el NI presenta valores entre 15,3 y 23,3 µg N g<sup>-1</sup> suelo y no se observa un predominio neto de la forma amoniacal (Tabla 1). Aunque en esta oportunidad no se realizaron determinaciones en los lotes de Casilda, los valores normalmente observados se encuentran dentro de estos rangos (Perotti datos no comunicados).

#### Actividad nitrogenosa en suelo rizosférico y no rizosférico suplementado con rastrojo (experiencias 1 y 2)

La NA, en los cuatro tratamientos, presenta valores bajos (Tabla 2). Este resultado confirma los resultados presentados en la Tabla 1. La NAP en los tratamientos 3 y 4 presenta valores significativamente mayores que en 1 y 2 (p<0,01). La incorporación de rastrojo incrementa el N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> del suelo (Tabla 2). El N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de los tratamientos de suelo + rastrojo es superior al suelo control en un 55% y 45% en las experiencias 1 y 2 respectivamente (p<0,01). La presencia de la planta aparece asociada también con una disminución importante del NI del suelo, tanto en ausencia o en presencia de rastrojo.

#### Actividad nitrogenosa luego del aporte de carbono, de amonio o de la eliminación del NI del suelo

La Figura 1 (experiencia 3) muestra los resultados obtenidos al incubar las muestras con distintos aportes de glucosa durante 48 h. La dosis de 0,4 mg de C-GLU g<sup>-1</sup> suelo parece constituir el umbral a partir del cual se observa NA. Esta dosis representa el 50% del contenido de C-GLU que se detecta en el suelo (Menéndez comunicación personal). Cuando esta dosis fue aumentada se registró un 100% de aumento de la actividad a las 25 h, sin que existieran diferencias entre las dosis de 0,8; 1,0 y 2,0 mg C-GLU. Luego de 48 h de incubación, mientras que en el suelo con agregados de 0,4 y 0,8 mg de C-GLU prácticamente no se incrementó el C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> producido durante las primeras 25 h, en el suelo con agregados de 1,0 y 2,0 mg de C-GLU se incrementó 4 y 9 veces, respectivamente. La AN producida por la adición de glucosa en la experiencia 4 confirma los resultados de las medidas realizadas luego de 25 h de incubación en la experiencia 3. La incorporación de 40 g de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> µg<sup>-1</sup> suelo produce una inhibición casi total con las bajas dosis de glucosa, mientras que con 2 y 4 mg de C-GLU se reduce la actividad en un 69 y 41% respectivamente. Con 80 µg de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> g<sup>-1</sup> suelo la NA se expresa débilmente sólo con un aporte de 4 mg de C-GLU, y con 160 µg g<sup>-1</sup> suelo se inhibe totalmente con cualquiera de las dosis de glucosa utilizada (Figura 2). La extracción del NI endógeno (suelo tratado con CaCl<sub>2</sub>), en la experiencia 5, produce una NA similar al suelo sin tratar (datos no presentados), coincidiendo con lo observado

Tabla 1: Actividad nitrogenasa (NA) y contenido de nitrógeno inorgánico NI en Argiudoles bajo diferentes manejos.

Localidad	Muestras de suelo	NA (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> suelo)	NI (µg g <sup>-1</sup> suelo)	
			N-NO <sub>3</sub>	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Casilda	Barbecho semicu- bierto de sorgo forrajero	Trazas	ND	ND
	Césped de gramíneas	Trazas	ND	ND
Chabá	SD-barbecho de soja	0,018 (0,002)	3,4 (0,7)	25,6 (2,8)
	SD-fertilizado con urea	Trazas	6,7 (1,3)	29,1 (1,7)
	LC-cama de siembra	0,012 (0,002)	ND	ND
(A)	SD-barbecho de soja	0,023 (0,002)	7,0 (0,8)	8,3 (2,2)
	LC-pastura de 5 años	0,012 (0,001)	8,8 (1,9)	7,8 (2,0)
San Jorge	SD-trigo fertiliza- do con urea	0,023 (0,001)	9,9* (1,1)	13,4 (1,3)
	(B) LC-trigo	0,017 (0,002)	5,1 (1,4)	11,2 (1,5)

ND: no determinado.

SD: siembra directa.

LC: labranza convencional.

(A) y (B): muestreos de mayo y agosto, respectivamente.

Los números entre paréntesis corresponden a los errores estándares de la media.

\*: P<0,05 (diferencia entre grupos, t Student).

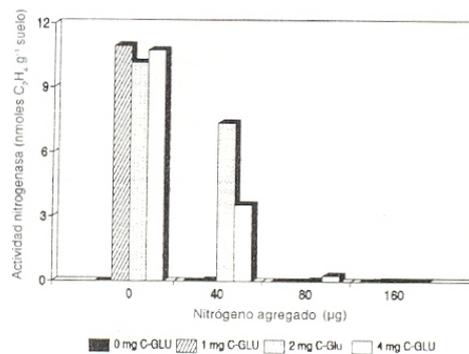
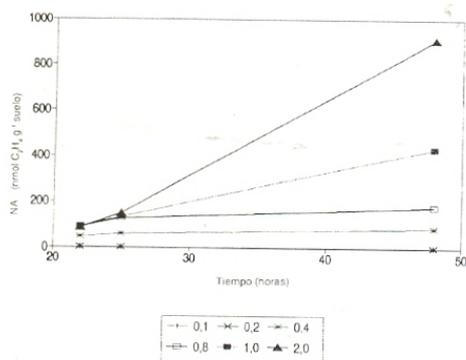


Figura 1. Efecto de la suplementación con C-GLU sobre la cinética de la producción de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (nmol g<sup>-1</sup> suelo). En el recuadro se indican las cantidades de mg C g<sup>-1</sup> suelo utilizadas en la experiencia 3.

Figura 2. Producción de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (nmol g<sup>-1</sup> suelo) en el suelo suplementado con glucosa (mg C g<sup>-1</sup> suelo) y con NH<sub>4</sub>Cl (µg N g<sup>-1</sup> suelo) (experiencia 4).

en las experiencias descriptas precedentemente. La suplementación con 2 mg de C-GLU + 2 mg de C-sacarosa al suelo tratado con CaCl<sub>2</sub> aumenta significativamente la NA más de 3 veces respecto del suelo que no fue tratado (4,46 y 1,26 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> suelo en suelo tratado y sin tratar respectivamente, (p<0,001)).

## DISCUSION

En el estudio a campo y en condiciones de laboratorio se puso en evidencia que en el suelo estudiado, que posee una población de microorganismos diazotróficos importante (Perotti *et al.* 1985) la expresión de la NA está fuertemente influenciada por: a) la disponibilidad de carbono reducido y b) la presencia de NI.

### Disponibilidad de carbono reducido

El suelo estudiado presenta una concentración media de carbono tipo glucosa de 0,784 mg g<sup>-1</sup> suelo (Menéndez comunicación personal) y posee una buena capacidad para sustentar actividades microbianas heterotróficas sin recibir suplementación carbonada (Lescure *et al.* 1992, Pidello 1991, Pidello *et al.* 1993). El proceso de fijación de nitrógeno tiene un elevado costo energético, por lo cual los microorganismos diazotróficos de vida libre o asociativos deben disponer de sustancias orgánicas reducidas. La baja disponibilidad de estos sustratos, especialmente en sistemas naturales, puede limitar la expresión de este grupo funcional microbiano (Burris *et al.* 1991). El agregado de fuentes carbonadas puede revertir esta situación y permite detectar actividad o incrementar la baja actividad de muchos sistemas (Knowles 1977). Los resultados de la Tabla 1, obtenidos en suelos regionales bajo distintas

condiciones de manejo, no muestran valores importantes de NA en ningún caso. Este resultado sugiere que la baja actividad en estos suelos no puede asociarse claramente con una práctica cultural determinada. Los restos de cosecha, los productos de su degradación y los exudados radiculares, son utilizados como sustratos por los microorganismos diazotróficos (Halsall *et al.* 1985). No obstante, los resultados presentados en la Tabla 2, no indican que la incorporación de rastrojo al suelo o la presencia de plántulas haya incrementado la NA respecto al suelo control.

Cuando se determinó la NAP se observó que en presencia de rastrojo y planta + rastrojo, la suplementación carbonada incrementó significativamente los valores respecto al suelo control y del suelo rizosférico control (Tabla 2). Este resultado sugiere que al incorporar carbono fácilmente asimilable, se produce un aumento del componente numérico y funcional de la población microbiana, lo que debe afectar las vías de degradación de los compuestos carbonados endógenos y aumentar la cantidad y diversidad de productos carbonados intermedios que pueden ser utilizados como sustratos. Esta disponibilidad de carbono en el medio puede permitir, entonces, la expresión de grupos funcionales microbianos poco competitivos. Los fijadores de nitrógeno en el suelo estudiado, probablemente estén dentro de este grupo, y el nivel de NA depende más de la aparición de condiciones favorables para la actividad heterotrófica (disponibilidad de carbono reducido) que del número de bacterias (Sawicka 1987; Pidello 1981). La suplementación del suelo estudiado con distintas dosis de glucosa (Figura 1) indica que para observar un incremento en la NA se requiere un aporte de no menos de 0,4 mg C g<sup>-1</sup> suelo. Por otra parte, durante las primeras 24 h después del aporte, la cinética de produc-

Tabla 2. Actividad nitrogenasa (NA), nitrogenasa potencial (NAP), nitrógeno inorgánico NI en las experiencias 1 y 2.

Tratamientos	Experiencia 1				Experiencia 2		
	NA	NAP	NI		NAP	N-IN	
			N-NO <sub>3</sub>	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		N-NO <sub>3</sub>	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
1. suelo	0,022 (0,002)	6,0a (2,9)	3,4a (1,1)	28,6a (4,4)	10,1a (1,8)	3,6a (0,3)	27,6a (2,3)
2. suelo + planta	0,059 (0,02)	17,4a (2,2)	3,9a (1,2)	14,8a (5,0)	8,8a (1,3)	3,5a (0,8)	16,1a (2,8)
3. suelo + rastrojo	0,060 (0,01)	41,7b (6,4)	6,2a (2,1)	44,4b (4,1)	14,4a (4,0)	5,7a (0,9)	40,1b (2,2)
4. suelo + planta + rastrojo	0,069 (0,02)	47,9b (7,0)	3,1a (1,1)	22,9a (5,8)	16,9b (2,0)	5,1a (1,5)	12,1a (1,7)

Tratamientos con distintas letras en cada columna presentan diferencias significativas (P<0,05). Los números entre paréntesis corresponden a los errores estándares de la media.

ción de  $C_2H_4$  en función de dosis crecientes de C-GLU muestra que existió saturación por sustrato a partir de  $0,8 \text{ mg C g}^{-1}$  suelo. Este resultado es importante porque indica que la expresión de la actividad durante algunas horas luego del aumento de la disponibilidad de carbono, también depende de la concentración de enzima presente. El aumento importante de  $C_2H_4$  con las dosis mayores de C-GLU ( $1$  y  $2 \text{ mg C g}^{-1}$  suelo) sólo se observa después de las 24 h, lo que indica que sería reflejo de un aumento de la concentración de enzima (aumento de la talla de la población bacteriana).

#### Presencia de nitrógeno inorgánico

La inhibición de la NA por compuestos nitrogenados ha sido demostrada tanto en cultivos de diazotrofos puros como en sistemas más complejos (Knowles, Denike 1974, Alexander, Zuberer 1989, Burris *et al.* 1991). En sistemas complejos, en los cuales intervienen diferentes componentes bióticos y abióticos, los resultados descriptos en la bibliografía son heterogéneos. Zechmeister y Kinzel (1990) en un estudio con suelos templados de Austria, observaron que la actividad no era afectada por el contenido de nitrógeno combinado del suelo. Knowles (1974) utilizó un suelo con bajo contenido original de  $N-NH_4^+$ , al que suplementó con glucosa y  $N-NH_4^+$ , y observó que la actividad se detectaba recién cuando la concentración del ión era menor de  $35 \mu\text{g g}^{-1}$  suelo. Por otra parte, Pidello (1981) sugirió que la presencia de NI elevado, podría indicar que el sistema tiene poca capacidad para inmovilizarlo y por lo tanto reflejaría condiciones de baja disponibilidad energética, poco favorables para la actividad heterotrófica; en estas condiciones la baja actividad sería producto del efecto inhibitorio del NI y de la poca disponibilidad de sustrato. En la Tabla 1 se muestran los valores de  $N-NO_3^-$  y  $N-NH_4^+$ , que se encuentran entre  $3-9$  y  $7-29 \mu\text{g N g}^{-1}$  suelo respectivamente, y que pueden experimentar incrementos de hasta un 50% luego de la incorporación de rastrojo (Tabla 2). Si bien estas concentraciones podrían tener un efecto inhibitorio sobre la NA, en ese nivel de estudio el agrosistema resulta demasiado complejo y no es posible separar este efecto de otros que podrían ir en el mismo sentido, como por ejemplo, que existieran condiciones de baja disponibilidad de sustratos carbonados o que a nivel de micrositos la cantidad de NI fuera muy superior. Con el propósito de abordar el fenómeno en un sistema más simple se realizaron las experiencias 4 y 5, en las cuales se estudió el efecto de la interacción sustrato carbonado-NI sobre la expresión de la NA. Los resultados de la experiencia 4 (Figura 2) muestran que en presencia de  $40 \text{ g}$  de  $N-NH_4^+ \text{ g}^{-1}$  suelo la actividad comienza a manifestarse sólo en presencia de suplementaciones con  $2$  y  $4 \text{ mg}$  de C-GLU. Este resultado, que es similar al obtenido por Knowles (1974), muestra claramente que el efecto represor del  $N-NH_4^+$  en el suelo estudiado está en

relación con la disponibilidad de carbono. Este hecho fue confirmado en la experiencia 5, donde luego de extraer el NI endógeno del suelo ( $23 \mu\text{g g}^{-1}$  suelo) se observó una actividad 3 veces mayor pero sólo cuando fue suplementado.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración prestada por MI Oyarzábal en el análisis estadístico de los resultados. Este trabajo se realizó con el apoyo financiero del Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Rosario.

#### REFERENCIAS

- Alexander DB, Zuberer DA. 1989. Impact of soil environmental factors on rates of  $N_2$ -fixation associated with roots of intact maize and sorghum plants. Skinner FA, Boddey RM, Frendrik E (Eds.). Nitrogen Fixation with Non-Legumes. Kluwer Academic Publishers. Netherlands, pág: 273-285
- Boddey RM. 1987. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with graminiae. CRC Critical Reviews in Plant Sciences. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 6: 209 - 266
- Burris RH, Hartmann A, Zhang Y, Fu H. 1991. Control of nitrogenase in *Azospirillum* sp. Polsinelli M, Materassi R, Vincenzini (Eds.). Nitrogen Fixation With Non-Legumes. Kluwer Academic Publishers. Netherlands, pág: 89 - 96
- Bremner JM, Keeney DR. 1965. Steam distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite. *An. Chem. Acta.* 32: 485 - 495
- Chae YM, Tabatabai MA. 1986. Mineralization of nitrogen in soils amended with organic wastes. *J. Environ. Qual.* 15: 193 - 198
- Halsall DM, Turner GL, Gibson AH. 1985. Straw and xylan utilization by pure culture of nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 423 - 428
- Knowles R. 1974. Factors affecting dinitrogen fixation by bacteria in natural and agricultural systems. Newton MW and Nyman CJ (Eds.). Nitrogen Fixation. WSU Press. 2: 539 - 555
- Knowles R. 1977. The significance of symbiotic dinitrogen fixation by bacteria. Hardy WF and Gibson AH (Eds.). A treatise on dinitrogen fixation. Agronomy and ecology. John Wiley Sons Inc. New York, pág: 33 - 83
- Knowles R, Denike D. 1974. Effect of  $NH_4^+$ ,  $NO_2^-$  and  $NO_3^-$  on anaerobic nitrogenase activity in soil. *Soil Biol. Biochem.* 6: 353-358
- Lescure C, Menéndez L, Lensi R, Chalameit A, Pidello A. 1992. Effect of addition of various carbon substrates on denitrification in a vertic Mollisol. *Biol. Fertil. Soils.* 13: 125 - 129
- Perotti E, Chapo G, Menéndez L, Pidello A. 1985. Supervivencia de *Azospirillum* en rizosfera de *Festuca arundinacea*. *Rev. Arg. Microbiol.* 17: 103 - 108
- Pidello A. 1981. Influence of combined mineral nitrogen on rhizosphere fixation of nitrogen by maize. Vose PB and Ruschel AP (Eds.). Associative  $N_2$ -Fixation. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 1: 191 - 200
- Pidello A. 1991. Consideraciones sobre la expresión de algunos procesos microbianos heterótrofos en un suelo agrícola. En: XIII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Actas: 38 - 46
- Pidello A, Menéndez L, Lensi R. 1993. *Azospirillum* affects Eh and potential denitrification in a soil. *Plant & Soils.* 157: 31-34
- Sawicka A. 1987. Biological nitrogen fixation in soil under cereals. *Acta Microbiologica Polonica.* 36: 119 - 125
- Sokal RR, James Rohlf F. 1979. Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. HBLumes Ediciones. 832 p.
- Zechmeister-Boltenstern S, Kinzel H. 1990. Non-symbiotic nitrogen fixation associated with temperate soils in relation to soil properties and vegetation. *Soil Biol. Biochem.* 22: 1075-1084