

POBLACIONES DE *STREPTOMYCES* EN SUELOS CON CULTIVOS DE CEREALES Y LEGUMINOSAS. I – VARIACIONES POR DIVERSOS TRATAMIENTOS *

A. L. Borghi; C. J. Delgado y B. J. C. de Bracalenti.

Centro de Referencia de Micología (CEREMIC). Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. U. N. de Rosario. Suipacha 531. 2000 Rosario. Santa Fe.

RESUMEN

Se estudiaron poblaciones de *Streptomyces* en muestras de suelo con el objeto de determinar si, sobre las mismas, ejercían o no influencia los cultivos de cereales (trigo y avena) y/o leguminosas (vicia y lupino), como asimismo el agregado o no de fertilizante inorgánico.

Se aislaron selectivamente los *Streptomyces* mediante el tratamiento de la muestra con una solución fenólica, sucesivas diluciones y siembras en medio especial adicionado de cicloheximida. Las colonias fueron contadas después de 10 días de incubación a 28°C y se agruparon aquellas que presentaban similitud morfológica. También se determinó, potenciométricamente, el pH de cada muestra de suelo. Estadísticamente, los resultados obtenidos revelaron que en cuanto a pH no hubo diferencias significativas; sí las hubo, en cambio, en cuanto al número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC · g⁻¹) entre tratamientos (uso o no de fertilizante), y no entre siembras.

Para las muestras de suelo sin fertilizante, el valor promedio de pH fue de 6,21 ± 0,20 y el de UFC · g⁻¹ fue de (14,43 ± 3,12) · 10⁶, y para las muestras con fertilizante dichos valores fueron, respectivamente, 6,14 ± 0,18 y (7,55 ± 2,64) · 10⁶. Para los valores de pH, p < 0,001 y para los valores de UFC · g⁻¹, p < 0,025. Los datos de diversidad poblacional (criterio macromorfológico) presentaron una dispersión tan elevada que no fue posible un tratamiento estadístico comparable al de las otras variables.

Se pudo comprobar un marcado efecto del fertilizante sobre el tamaño poblacional, pero no un efecto de siembra significativo. La diversidad poblacional parece haberse incrementado en las muestras de suelo sembrada, comparándolas con aquellas sin sembrar (testigos), sin que el fertilizante haya mostrado un efecto apreciable sobre la misma.

Palabras clave: cereales, leguminosas, poblaciones de *Streptomyces*, fertilización inorgánica.

STREPTOMYCES POPULATIONS FROM SOILS CULTIVATED WITH CEREALS AND LEGUMES. I – VARIATIONS DUE TO DIFFERENT TREATMENTS.

ABSTRACT

The possible influence of cereals (wheat and oats) and/or legumes (tare and lupine) on the *Streptomyces* populations isolated from soils with or without inorganic fertilizer was studied.

Streptomyces were selectively isolated with a phenolic solution, successive dilutions and plating in a special medium with cicloheximide. After 10 days of growing at 28° C, colonies were counted and those which showed morphologic similarities were clustered. Moreover, the pH of each sample was determined potentiometrically and the results showed no significant difference with respect to pH. However, there were differences in the number of colonial forming units/dried soil g (CFU . d.s.g⁻¹) among treatments (with or without fertilizers) and not among seedings.

The average pH for the samples of soils without fertilizers was $6,21 \pm 0,20$, with $(14,43 \pm 3,12) \cdot 10^6$ CFU . d.s.g⁻¹. For the samples with fertilizers they were $6,14 \pm 0,18$ and $(7,55 \pm 2,64) \cdot 10^6$ respectively. The data about population diversity (macromorphological criterium) showed very high dispersion. A strong effect of the fertilizer on the CFU . d.s.g⁻¹ was detected without significant seeding effect. The population diversity increased in the samples of the cultivated soil compared with the controls, and with no important effect due to the fertilizer.

Key words: cereals, legumes, *Streptomyces* populations, inorganic fertilization.

* Trabajo subsidiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

INTRODUCCION

Es bien conocido que la competición intra-específica e interespecífica entre los organismos es uno de los más importantes factores que determinan la densidad de poblaciones en la naturaleza. Especies relacionadas, o especies que prefieren el mismo nicho ecológico, generalmente son competitivas y ocupan diferentes áreas geográficas o diferentes hábitats en las mismas áreas (Schroth y Hancock, 1981).

Es notable la capacidad del hombre para modificar el medio ambiente a favor de un organismo u otro, como se efectúa muchas veces en la agricultura, por lo general inadvertidamente, a través de los métodos de cultivo.

En estos últimos años se viene dando un proceso de acidificación de los suelos del sur de la provincia de Santa Fe, el cual obedece fundamentalmente a la pérdida de elementos alcalinos como calcio, magnesio, potasio y sodio. Esta pérdida se da por lavado del suelo, por el consumo de los cultivos y además por el uso de fertilizantes de reacción ácida (Delaune y Patrick, 1970; Bolton et al., 1970). La no reposición de aquellos nutrientes exportados con los granos y perdidos por la erosión ha llevado a que un gran número de suelos agrícolas tengan hoy un pH inferior a 6. La condición de acidez de los suelos compromete seriamente el panorama nutricional de la mayoría de los cultivos. Este desequilibrio nutricional afecta a la actividad de los microorganismos, alterándose la descomposición de los rastrojos y retrasándose el retorno de minerales a los cultivos siguientes.

El estudio de los parámetros microbianos del suelo, acerca de los cuales hay una relativa escasez de datos en la República Argentina, es de la mayor importancia (Marengo et al., 1984), pues implica no solamente determinar la evolución desde el

punto de vista químico, sino también la de otros parámetros, como el número de microorganismos actuantes por gramo (Mc Laren, 1973).

Los actinomicetes constituyen un componente significativo de la población microbiana en muchos suelos, y es común obtener recuentos de más de 10^6 por gramo. El género más importante en suelo es *Streptomyces*, pero el estudio de su ecología ha tenido dificultades, por una inadecuada clasificación y por deficiencias técnicas (Griffin, 1972).

El suelo constituye la fuente más prolífica de aislamientos, entre los cuales se incluyen abundantes productores de antibióticos y otros metabolitos. Muchos *Streptomyces* del suelo se comportan como neutrófilos en los cultivos, creciendo entre pH 5,0 y 9,0 con un óptimo cercano a la neutralidad. Como muchos suelos son ácidos, el pH es claramente el mayor factor que determina su distribución y actividad. Es bien conocido que suelos ácidos rinden bajos recuentos de *Streptomyces* neutrófilos (Waksman, 1959; Goodfellow y Williams, 1983).

Los *Streptomyces*, por su amplia distribución, tolerancia térmica, alto potencial metabólico, probada capacidad como antagonistas fúngicos, crecimiento activo filamentoso en suelos y producción de antibióticos, pueden participar activamente en el establecimiento del equilibrio microbiológico del suelo y ser un factor que afecta a la incidencia de ciertos hongos patógenos de plantas del suelo.

El objetivo de este trabajo fue estudiar poblaciones de *Streptomyces* en muestras de suelos agrícolas con diversos tratamientos. Las hipótesis de trabajo se refirieron a: a) posibles efectos de siembra sobre el tamaño y/o la diversidad poblacional y b) posible influencia del agregado de fertilizante inorgánico sobre las mismas variables.

MATERIALES Y METODOS

Muestras de suelos: Se efectuó el muestreo en 3 lotes (I, II y III), cada uno de ellos dividido en 6 parcelas cultivadas con avena, trigo, vicia, lupino, trigo + vicia, trigo + lupino, y un área testigo, de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Oliveros (Santa Fe).

Las muestras provienen del horizonte A11 (0-17 cm) de un Argiudol ácuico con las siguientes características: color pardo grisáceo muy oscuro; materia orgánica 2.72 % ; carbono orgánico 1.58 % ; arcilla 22.5 % ; limo 74 % y arena 3.2 % .

Se incorporó fertilizante a la mitad de las parcelas (78 kg nitrógeno . ha⁻¹ como urea y 39 kg P₂O₅ . ha⁻¹ como fosfato tricálcico) en el mes de junio y los lotes se sembraron al día siguiente. A los 4 meses se incorporó a todos ellos abono verde en la proporción de 4662 kg . ha⁻¹ en los lotes sembrados y 1859 kg . ha⁻¹ en los testigos, y las muestras fueron tomadas dos meses después. A cada muestra de suelo se determinó el pH potenciométricamente (en un aparato Orion Research Digital Ionalyzer 501), por triplicado.

Se utilizó como modelo estadístico para distribución de las siembras el método de bloques completos al azar con tres repeticiones. Cada unidad experimental tuvo una superficie de 2 m de ancho por 5 m de largo.

Técnicas de aislamiento y recuento de colonias de *Streptomyces*: alícuotas de las muestras

de suelos, de 1 g cada una, fueron homogeneizadas en un mortero estéril con una pequeña cantidad de agua y transferidas a un recipiente con una solución preparada disolviendo 631 mg de fenol en 90 ml de agua destilada (Panthier et al., 1979). La suspensión fue colocada en un agitador mecánico a 220 ciclos por minuto durante 10 minutos. Se hicieron sucesivas diluciones al décimo en agua destilada. De ellas fueron incorporadas las correspondientes a 10⁴ y 10⁵ a 10 ml de un medio de agar-glicerina-arginina-sales. Este medio es una modificación del medio para aislamiento preferencial de actinomicetes de Porter et al. (1960). El pH del mismo se fijó entre 6,5 y 7,0 y se agregó cicloheximida a una concentración final de 200 mg l⁻¹. Las suspensiones de suelo con el medio fueron distribuidas en placas de Petri por triplicado, en cantidad de 10 ml por cada placa.

Después de una incubación de 10 días a 28°C, se efectuaron los recuentos, separándose y subcultivándose en el mismo medio todas aquellas que por sus características macromorfológicas fueran diferentes dentro de cada muestra. Para determinar el número de colonias por gramo de suelo se llevaron alícuotas de las muestras a sequedad. En las placas de dilución desarrollaron muy pocas bacterias y ningún hongo contaminante, con lo cual se confirmó la selectividad de la técnica empleada.

RESULTADOS

En las Tablas 1 y 2 se halla un resumen general de los datos obtenidos en este estudio.

Tabla 1. Relación entre los pH de las muestras de suelo con el número de colonias de *Streptomyces* por gramo de suelo y el número total de aislamientos, en parcelas con distintos cultivos sin agregar fertilizante.

Siembra	pH de las muestras de suelo ($\bar{x} \pm s_x$)	Número de colonias de <i>Streptomyces</i> por g de suelo (x 10 ⁶): ($\bar{x} \pm s_x$)	Número total de aislamientos
Avena	6,20 \pm 0,051	22,60 \pm 3,429	22
Trigo	6,14 \pm 0,092	18,60 \pm 9,014	12
Vicia	6,20 \pm 0,060	21,59 \pm 12,204	13
Lupino	6,27 \pm 0,073	12,17 \pm 3,790	22
Trigo + Vicia	6,19 \pm 0,055	14,68 \pm 0,600	20
Trigo + Lupino	6,36 \pm 0,090	7,56 \pm 4,624	26
Sin sembrar (testigo)	6,08 \pm 0,068	11,87 \pm 0,548	17
Media	6,21 \pm 0,0898	15,58 \pm 5,553	18,86

Tabla 2. Relación entre los pH de las muestras de suelo con el número de colonias de *Streptomyces* por gramo de suelo y el número total de aislamientos, en parcelas con distintos cultivos con agregado de fertilizante.

Siembra	pH de las muestras de suelo ($\bar{x} \pm s_x$)	Número de colonias de <i>Streptomyces</i> por g de suelo ($\times 10^6$) ($\bar{x} \pm s_x$)	Número total de aislamientos
Avena	6,21 \pm 0,072	9,61 \pm 7,469	33
Trigo	6,09 \pm 0,055	2,86 \pm 2,988	16
Vicia	6,00 \pm 0,054	16,43 \pm 6,913	8
Lupino	6,21 \pm 0,076	3,11 \pm 1,746	23
Trigo + Vicia	6,14 \pm 0,080	8,41 \pm 7,657	16
Trigo + Lupino	6,14 \pm 0,047	8,70 \pm 8,777	15
Sin sembrar (testigo)	6,16 \pm 0,065	3,73 \pm 1,803	15
Media	6,14 \pm 0,073	7,55 \pm 4,856	18,00

pH de las muestras de suelo

El estudio estadístico de la diferencia de pH entre suelo sin fertilizante y suelo con su agregado, para cada unidad experimental, por análisis de la variancia (Batschelet y Diem, 1965), reveló interacción nula entre siembras y lotes y ausencia de variaciones significativas tanto entre lotes como entre siembras. La estimación de los valores promedio de pH proporcionó los siguientes resultados: para suelo sin fertilizante, $6,21 \pm 0,20$ y para suelo con fertilizante, $6,14 \pm 0,18$ (en ambos casos con un nivel de significación del 0.1 %). Si bien el valor correspondiente a suelo sin fertilizante es algo superior, la diferencia media no se aparta significativamente de cero de acuerdo a la prueba de t-Student.

Número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC . g⁻¹)

Se realizaron comparaciones, mediante la prueba t-Student, dentro de tratamientos (es decir con fertilizante o bien sin él), de cada siembra con la muestra testigo (sin sembrar). Las mismas no arrojaron diferencias significativas, salvo en un caso: avena sin fertilizante ($p < 0,025$).

En base a esto, se efectuó la estimación del número promedio de UFC . g⁻¹ para cada tratamiento, prescindiendo, en el caso del suelo sin fertilizante, del valor correspondiente a la siembra

de avena, por la razón apuntada arriba. Dichas estimaciones, con un nivel de significación del 2,5 %, fueron:

- suelo sin fertilizante: $(14,43 \pm 3,12) \cdot 10^6$ UFC . g⁻¹

- suelo con fertilizante: $(7,55 \pm 2,64) \cdot 10^6$ UFC . g⁻¹

Con el objeto de determinar si ambos promedios difirieron significativamente, se calculó la diferencia en UFC . g⁻¹ entre ambos tratamientos para cada unidad experimental. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Del análisis de la variancia (Batschelet y Diem, op. cit.) para dicha variable (cuya media aritmética resultó $8,59 \cdot 10^6$ UFC . g⁻¹) se comprobó lo siguiente:

a) interacción nula entre siembras y lotes, b) ausencia de variación significativa entre lotes y c) efecto de siembra significativo ($p < 0,05$).

Posteriores contrastes entre siembras (prueba "t") revelaron diferencias significativas entre la siembra de trigo + lupino (cuya media \bar{d}_{6j} fue la única negativa), y las de avena ($p < 0,01$), trigo ($p < 0,05$) y lupino ($p < 0,05$). Por tal razón, se realizó un nuevo análisis de la variancia sin tomar en cuenta los valores correspondientes a la siembra mencionada en primer término, con lo cual se neutralizó la variación significativa entre siembras. La nueva media aritmética obtenida fue de $10,21$ UFC . g⁻¹, y mediante la prueba "t" se verificó que difiere significativamente de cero ($p < 0,001$).

También fueron analizadas las diferencias producidas por la presencia o no de fertilizante, en UFC . g⁻¹, dentro de cada siembra (Fig. 1), hallán-

dose significación estadística en tres casos: con avena (p < 0,01), con lupino (p < 0,025) y con las muestras de control (p < 0,025).

Tabla 3. Diferencias en UFC . g⁻¹ entre suelo con fertilizante y suelo sin él, para cada unidad experimental (x 10⁶ UFC.g⁻¹)

Lote	Siembras							Media entre siembras (d _{i.})
	Avena (1)	Trigo (2)	Vicia (3)	Lupino (4)	Trigo+Vicia (5)	Trigo+Lupino (6)	Test. (7)	
I	17,34	25,96	11,95	--	-0,83	-6,13	10,05	9,58
II	16,88	8,00	0,05	9,76	15,00	0,28	6,55	8,07
III	--	13,05	3,51	7,72	4,65	2,44	--	8,11
Media entre (d _{j.})	17,11	15,67	5,17	8,74	6,27	-1,14	8,30	8,59 (d)

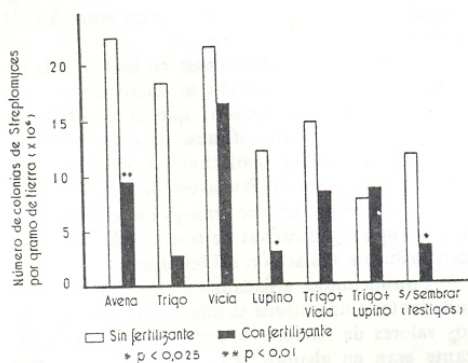


Fig. 1. Comparaciones para cada siembra en UFC . g⁻¹ entre suelo con fertilizante y suelo sin él.

Diversidad poblacional

Como un índice aproximado de diversidad se tomó el número de aislamientos para cada muestra de suelo, ya que fue aislada, de cada placa para recuento, una colonia considerada representativa de alguna particularidad macromorfológica. Este índice brinda, pues, una idea de la cantidad de especies y/o variedades de *Streptomyces* correspondientes a cada siembra y tratamiento. El escaso número de muestras para cada combinación siembra-tratamiento (tres, o a veces dos) y los elevados coeficientes de variación obtenidos, no menores del 43 % para suelos con fertilizante y del 40 % para suelos sin el mismo, impidieron un segundo nivel de tratamiento esta-

dístico.

Aunque la variación entre siembras individuales es muy grande, se obtuvo una relativa homogeneidad entre tratamientos al sumarlas, pues los totales fueron: sin fertilizante, 132 aislamientos y con fertilizante, 126 aislamientos, con medias aritméticas, respectivamente, de 18,86 y 18,00 aislamientos, y una \bar{x} general de 18,43 aislamientos por combinación siembra-tratamiento. Nuevamente, los coeficientes de variación más bajos fueron del orden del 40 al 50 % en todos los casos.

Agrupando las siembras en cereales (avena y trigo), leguminosas (vicia y lupino) y combinaciones de ambos, y comparando sus números promedio de aislamientos con los de las muestras de control, dentro de cada tratamiento, se verificaron siempre números mayores o iguales (esto en un solo caso: cereales sin fertilizante) para las muestras correspondientes a suelo sembrada con respecto a las de suelo sin sembrar: hasta 9,5 aislamientos de diferencia promedio para cereales con fertilizante.

DISCUSION

Efectos atribuibles a la variación entre siembras

a) **Tamaño poblacional:** el hecho de que en un sólo caso (avena sin fertilizante) se halló diferencia significativa, en la estimación del tamaño poblacional, entre suelo sembrado y suelo sin sembrar, permitiría descartar un efecto de siembra sobre el valor de dicho parámetro.

b) Diversidad poblacional: dado que los cultivos aportan al suelo una mayor variedad de nutrientes, cabría esperar un aumento de la diversidad en las muestras correspondientes a los suelos cultivados, con respecto a aquéllas provenientes de las parcelas testigo, y más aún en los casos de rotación de cultivos (trigo + vicia y trigo + lupino) (Primavesi, 1982).

Si bien la hipótesis de trabajo no fue concluyentemente corroborada, los resultados obtenidos indican una tendencia en ese sentido ya que el agrupamiento de siembras por familias o combinación de éstas, dentro de cada tratamiento, y el posterior cálculo de valores promedio, con el objeto de disponer de más datos de posible utilidad, en ningún caso arrojaron un índice de diversidad menor que el obtenido con las muestras testigo. Para las leguminosas en conjunto, la diferencia con dicho índice de diversidad fue la misma (+ 0,5 aislamientos) con ambos tratamientos.

Influencia del agregado de fertilizante inorgánico

a) Tamaño poblacional: era de esperar que el tamaño poblacional se viera disminuído, debido a que el fertilizante utilizado tiene un efecto acidificante del suelo, a causa del residuo no absorbido (Loter y Monsalve, 1970).

La modificación del pH puede activar o —a la inversa— casi inactivar las enzimas de los microorganismos. Aumentos o descensos del pH, por causa de los procesos de nitrificación que tienen lugar, ejercen una influencia muy grande sobre los microorganismos del suelo (Khaziyev, 1966). Los resultados obtenidos evidenciaron una acción limitante del fertilizante agregado sobre el número de colonias. Dado que el recuento fue realizado en forma inespecífica, no fue posible establecer si dicho efecto resultó de la misma magnitud para todas las poblaciones de *Streptomyces*. Las causas del mismo podrían atribuirse al descenso de pH, si bien éste no fue estadísticamente significativo. Otra posibilidad, tal vez en asociación con la que acaba de referirse, consistiría en una acción directa de una o más de las sustancias que componen el fertilizante.

La falta de concordancia en el valor medio de la diferencia en UFC $\cdot g^{-1}$ entre la siembra de trigo + lupino y las restantes se debería, probablemente, a un error de muestreo, ya que se invirtió la relación cualitativa en sólo uno de los tres pares de unidades experimentales. Ello condujo a obviar los datos correspondientes a dicha siembra al cal-

cular la \bar{x} general. De este modo, se comprobó que para las muestras de suelo sin fertilizante el número de UFC $\cdot g^{-1}$ fue prácticamente el doble del obtenido para las muestras con fertilizante, con una diferencia global de alta significación estadística, la cual fue confirmada en tres siembras particulares, al ensayarse la hipótesis nula dentro de las mismas. Estos resultados correspondieron a un cereal (avena), una leguminosa (lupino) y la tierra sin sembrar.

Las muestras habían sido tomadas seis meses después del agregado de fertilizante inorgánico. Ello permite pensar que, si bien el fertilizante puede haber ejercido un importante efecto sobre las poblaciones de *Streptomyces*, ese lapso habría sido suficiente como para que la acidez de los suelos con tal tratamiento se viera moderada por diversos factores, entre ellos la presencia de nitrógeno orgánico a consecuencia de la utilización de abono verde (Hallan y Bartholomew, 1953; Grossman, 1968). Esto explicaría la falta de significación estadística en la diferencia entre los pH promedio para cada tratamiento.

b) Diversidad poblacional: en este caso la hipótesis de trabajo planteaba un incremento en la variable en estudio, puesto que la fertilización es una medida de alta eficacia para asegurar una adecuada diversidad poblacional a los efectos de beneficiar los cultivos (Primavesi, op. cit.).

Sin embargo, en este trabajo no se detectaron alteraciones significativas de la diversidad que puedan atribuirse a la acción del fertilizante.

Considerando aisladamente los pares correspondientes a una misma siembra, se comprobó que los valores de número de aislamientos sin fertilizante eran en algunos casos mayores y en otros menores que los de las muestras con fertilizante. Este hecho se corresponde con la ausencia total de correlación entre UFC $\cdot g^{-1}$ y número de aislamientos para cada combinación siembra-tratamiento. No obstante, considerando la suma de valores de cada tratamiento se hallaron cantidades bastante semejantes, y lo mismo, en consecuencia, ocurrió entre las medias aritméticas parciales y la general. Aunque la elevada dispersión de valores desalentó un análisis estadístico más elaborado, los datos obtenidos permiten descartar toda diferencia significativa.

CONCLUSIONES

De lo expuesto anteriormente puede deducirse que existe un marcado efecto del fertilizante inorgánico sobre el tamaño de las poblaciones de

Streptomyces en general, pues su aplicación redujo el número de UFC $\cdot g^{-1}$ de manera significativa y aproximadamente en un 50 %. En cambio, e independientemente de la presencia o no de dicho fertilizante, no parece haber un efecto de siembra significativo.

En cuanto a la diversidad poblacional, parece haberse visto favorecida en las parcelas sembradas con respecto a aquellas sin sembrar (testigos), en tanto que la adición de fertilizante inorgánico no puso en evidencia, sobre la misma, ningún efecto apreciable.

REFERENCIAS

- Batschelet, E. y K. Diem, 1965. Métodos estadísticos, en Tablas Científicas, 6^o Edic. Ciba-Geigy, Basilea; 784 p.
- Bolton, E.; J. Aylestorth y W. Findlay, 1970. Longtime nitrogen fertilization on soil pH and time requirement of Brookston clay. *Canad. J. Soil. Sci.* 50: 260-261.
- Delaune, R. y W. Patrick, 1970. Urea conversion to ammonia in water-logged soil. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 34: 603-607.
- Goodfellow, M. y S. S. Williams, 1983. Ecology of Actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37: 189-216.
- Griffin, D. M., 1972. Ecology of Soil Fungi. Syracuse Univ. Press. Syracuse; 187 p.
- Grossman, F., 1968. Mode of action of green manure against soil born fungal diseases. *Progr. Biodin. Product. Solo, Sta. María*; p. 339-40.
- Hallan, M. J. y W. V. Bartholomew, 1953. Influence of rate of plant residue addition in accelerating the decomposition of soil organic matter. *Soil. Sci. Soc. Amer. Proc.* 17: 365-368.
- Khaziyev, F. K. H., 1966. Dependence of nuclease activity of soil on the pH and influence of various substances on it. *Doklady Biol. Kauki*, 2: 223-227.
- Lotero, C. J. y S. A. Monsalve, 1970. Effect of N source and application doses on the chemical properties of soil. *Rev. Inst. Colomb. Agropecuar.* 5: 199-220.
- Marengo, G. W.; C. Trossero y S. Toresani, 1984. Evolución de la nitrificación en un ensayo de rotaciones de la E.E.A. Oliveros (INTA). *Ciencia del Suelo* 2: 207-211.
- Mc Laren, A. D., 1973. A need for counting microorganisms in soil mineral cycles. *Environmental Letters* 5: 143-154.
- Panthier, J. J.; H. G. Diem y Y. Dommergues, 1979. Rapid method to enumerate and isolate soil actinomycetes antagonistic towards rhizobia. *Soil. Biol. Biochem.* 2: 443-445.
- Porter, J. N.; J. J. Wilhem y H. D. Tresner, 1960. Method for preferential isolation of actinomycetes from soil. *Applied Microbiology* 8: 174-178.
- Primavesi, A., 1982. Manejo ecológico del suelo. Edit. El Ateneo. Buenos Aires, 499 p.
- Schroth, M. y J. Hancock, 1981. Selected topics in Biological Control. *Ann. Rev. Microbiol.* 35: 453-76.
- Waksman, S. A., 1959. The Actinomycetes, Vol. I. Nature, Occurrence and Activities. Williams y Wilkins. Baltimore: 363 p.