

17.025

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID



* 5 3 0 9 5 8 2 8 1 5 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

ESTUDIO DE GRUPOS FUNCIONALES DE
MICROORGANISMOS EDAFICOS EN LA RIZOSFERA
DE ALNUS GLUTINOSA (L.) GAERTN.

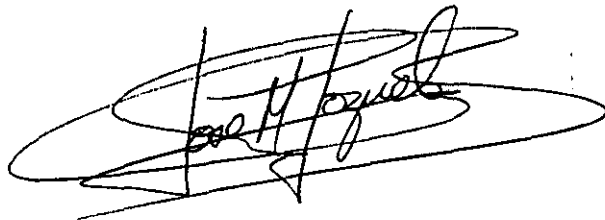
Jose Manuel Pozuelo González
1991



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

ESTUDIO DE GRUPOS FUNCIONALES DE
MICROORGANISMOS EDAFICOS EN LA RIZOSFERA
DE ALNUS GLUTINOSA (L.) GAERTN.

Memoria que para optar al
Grado de Doctor en
Ciencias Biológicas presenta
D. Jose Manuel Pozuelo González



Vº Bº El Director



Dr. D. Francisco Bermúdez de Castro y Naya

Esta Memoria ha sido realizada en el Departamento de Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid y en los laboratorios del Colegio Universitario S. Pablo (C.E.U.) bajo la dirección del Prof. Dr. D. Francisco Bermúdez de Castro y Naya a quien deseo agradecer la orientación e interés que han hecho posible este trabajo.

Quiero agradecer también la ayuda prestada al Dr. D. Nuno Henriques Gil por su colaboración en los análisis estadísticos y a la Dra. M^a Fe Schmitz por el apoyo en la interpretación del análisis de ordenación.

Además deseo expresar mi gratitud a mis compañeros de laboratorio Dr. Francisco Javier Gutiérrez Mañero, Francisco Llinares Pinel, Dolores Muñoz-Mingarro y Agustín Probanza Lobo por su colaboración desinteresada y constante en la realización de esta Memoria.

INDICE

	Página
I	INTRODUCCION..... 1
1.1.	La materia orgánica en el suelo..... 3
1.1.1.	Organización de las comunidades microbianas edáficas que degradan la materia orgánica..... 5
1.1.2.	Influencia del medio abiótico en la degradación de la materia orgánica..... 7
1.2.	Ciclo del nitrógeno..... 10
1.3.	Microorganismos del ciclo del nitrógeno..... 19
1.4.	Influencia del medio abiótico en el ciclo del nitrógeno..... 24
1.5.	Influencia de la vegetación en el ciclo del nitrógeno..... 31
1.5.1.	Interfase raíz-suelo..... 32
1.5.1.1.	Características de la rizosfera..... 33
1.5.1.2.	Colonización de la rizosfera..... 38
1.5.1.3.	Interacciones entre los organismos en la rizosfera..... 40
1.5.1.4.	Efecto rizosfera y microorganismos del ciclo del nitrógeno..... 43
1.5.1.5.	Efecto rizosfera de las plantas fijadoras de nitrógeno..... 46
1.5.2.	Deposición de restos vegetales..... 48
1.6.	Objetivos y plan de trabajo..... 51
II	MATERIALES Y METODOS..... 53
2.1.	Características generales de la zona de muestreo..... 54
2.1.1.	Geología..... 54

2.1.2.	Edafología.....	54
2.1.3.	Hidrografía.....	56
2.1.4.	Clima.....	57
2.1.5.	Vegetación.....	58
2.2.	Zona de muestreo.....	59
2.3.	Recogida y preparación de las muestras.....	64
2.4.	Análisis físico-químicos.....	65
2.4.1.	Medida de la humedad de las muestras.....	66
2.4.2.	Medida del pH.....	67
2.4.3.	Determinación del nitrógeno total.....	67
2.4.4.	Determinación del nitrógeno amonio.....	68
2.4.5.	Determinación del nitrógeno nitrato.....	68
2.4.6.	Determinación de carbono orgánico.....	69
2.4.7.	Textura.....	70
2.5.	Estudio de la densidad microbiana.....	70
2.5.1.	Preparación de las suspensiones-diluciones de suelo.....	71
2.5.2.	Preparación de los medios de cultivo.....	71
2.5.3.	Condiciones de cultivo de los grupos funcionales analizados.....	71
2.5.4.	Cálculo del NMP y de la actividad biológica....	72
2.6.	Tratamiento de la información.....	74
III	RESULTADOS.....	77
3.1.	Tendencias de variación en el conjunto de observaciones.....	78
3.2.	Análisis físico-químicos.....	89
3.2.1.	pH.....	89
3.2.2.	Carbono orgánico.....	93
3.2.3.	Nitrógeno total.....	97
3.2.4.	Relación carbono/nitrógeno.....	100
3.2.5.	Nitrógeno-amonio.....	104
3.2.6.	Nitrógeno-nitrato.....	107
3.2.7.	Humedad.....	111
3.3.	Análisis microbiológicos.....	126
3.3.1.	Densidad de la microflora total.....	126

3.3.2.	Densidad de la microflora proteolítica.....	130
3.3.3.	Densidad de la microflora amonificante.....	134
3.3.4.	Densidad de la microflora nitrificante nitrosa.....	138
3.3.5.	Densidad de la microflora nitrificante nitríca.....	142
3.3.6.	Actividad biológica de la microflora proteolítica.....	158
3.3.7.	Actividad biológica de la microflora amonificante.....	162
3.3.8.	Actividad biológica de la microflora nitrificante nitrosa.....	166
3.3.9.	Actividad biológica de la microflora nitrificante nitríca.....	170
3.4.	Análisis de la covarianza.....	184
IV	DISCUSION.....	186
V	CONCLUSIONES.....	222
VI	BIBLIOGRAFIA.....	227
VII	APENDICE.....	260
7.1.	Medios de cultivo y reactivos.....	261
7.1.1.	Extracto de tierra.....	261
7.1.2.	Solución salina de Winogradsky.....	261
7.1.3.	Solución de oligoelementos.....	262
7.1.4.	Medio para microflora total.....	262
7.1.5.	Medio para microorganismos proteolíticos.....	262
7.1.6.	Medio para microorganismos amonificantes.....	263
7.1.7.	Medio para microorganismos nitrificantes nitrosos.....	263
7.1.8.	Medio para microorganismos nitrificantes nitrícos.....	264
7.1.9.	Reactivo de Nessler.....	264
7.1.10.	Reactivo de la difenilamina sulfúrica.....	264

INTRODUCCION

Los elementos químicos fluyen cíclicamente entre los seres vivos y la parte abiótica de los ecosistemas. Las rutas por las que discurren los distintos elementos se agrupan bajo el nombre de ciclos biogeoquímicos (Hutchinson, 1944 y 1950) y son esenciales para la circulación de los nutrientes a través de los ecosistemas por lo que se pueden considerar como un mecanismo global de soporte de la vida (Tolba y White, 1979).

La mayoría de las etapas que en conjunto constituyen los ciclos biogeoquímicos tienen lugar en el suelo, estrato inferior del ecosistema terrestre (Ghilarov, 1968), y están mediadas por poblaciones de microorganismos que obtienen la energía y los nutrientes necesarios para su desarrollo de las sustancias orgánicas presentes en el medio telúrico. A través de sus procesos metabólicos la microflora edáfica desempeña un papel importante en la circulación cíclica de los nutrientes del suelo y cierra los ciclos biogeoquímicos. La comunidad microbiana que habita en un suelo depende de las características del mismo y de las interacciones con otras comunidades de seres vivos, manteniendo una interdependencia muy estrecha con la comunidad vegetal que se desarrolla allí. Las interacciones, directas e indirectas, entre ambas comunidades resaltan el papel regulador de los microorganismos en la comunidad macrofítica.

Un objetivo fundamental de la microecología del suelo es profundizar en la descripción de las comunidades microbianas, en su composición, en su dinámica y en las interacciones con la vegetación y el medio.

1.1. La materia orgánica en el suelo

La materia orgánica condiciona muchas de las propiedades del medio edáfico que influyen en el sistema suelo-planta y por tanto afecta al crecimiento y desarrollo de la microflora telúrica y de la comunidad vegetal (Fresquez y Lindemann, 1982). La mera presencia de la materia orgánica en el suelo tiene un efecto muy beneficioso debido a que favorece el desarrollo de la estructura del suelo, además la dinámica y las transformaciones de sus componentes representan el factor más importante de influencia del medio edáfico sobre la vegetación.

Tate (1985) destaca entre los efectos de la materia orgánica sobre las características del suelo: el aumento de la capacidad de cambio catiónico, la combinación con las arcillas que incide en la estructura del suelo, la actividad quelante de metales, la capacidad tampón que amortigua las variaciones de pH y el aporte de nutrientes para la microflora.

El contenido de materia orgánica del suelo está determinado por dos procesos, aporte de materiales orgánicos y descomposición microbiana. La entrada de materiales orgánicos depende de la incorporación de restos y desechos vegetales: hojas, ramas, raíces, exudados radicales y productos del lavado de las hojas (Tiessen et al., 1984), así como los de origen animal, cadáveres y excrementos. Hay numerosos organismos telúricos que catabolizan los complejos de origen orgánico, pero los hongos y las bacterias desempeñan el papel principal. Por tanto la materia orgánica edáfica es una fuente vital de energía y de elementos biogénicos esenciales como carbono, nitrógeno, fósforo y

azufre (Jenny, 1980 y Sparling et al., 1982) necesarios para el crecimiento de los microorganismos.

La degradación completa de los sustratos orgánicos discurre a través de un proceso mineralizador que se caracteriza por la transformación de los restos animales y vegetales en formas inorgánicas que utilizan las comunidades vegetal y microbiana (Dalal, 1979). La acumulación de materia orgánica y de nitrógeno se relaciona con una actividad microbiana más intensa que disminuye según desciende el aporte exógeno de dichos materiales (Stroo y Jencks, 1982). Una consecuencia de gran valor ecológico es la aparición de moléculas orgánicas muy estables, las sustancias húmicas, que resisten en gran medida la acción de la mayoría de los organismos telúricos mineralizadores. Los compuestos húmicos muestran un rango variable de susceptibilidad a la acción degradativa de los microorganismos. Los ácidos húmicos y fúlvicos presentan una vida media prolongada, cuantificable en décadas, centurias o milenios (Lynch, 1984). La materia húmica es imprescindible para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos y de las plantas (Khandelwal y Gaur, 1970), supone una fuente de factores de crecimiento que incide en la actividad microbiana, adsorbe metabolitos inhibidores (Martin et al., 1976) y aumenta la capacidad de cambio del suelo (Stevenson, 1965). Tisdall y Oades (1982) señalan que los ácidos húmicos interaccionan con las arcillas y forman agregados estables. Tales complejos contribuyen al desarrollo de la estructura del suelo, pues definen el tamaño y la disposición de las partículas y de los poros, factores esenciales para la actividad de las comunidades de microorganismos y de plantas.

La microflora edáfica y la comunidad macrofítica también intervienen en la evolución de la matriz del suelo. Las raíces de las plantas y las hifas de los hongos se asocian con arcillas y originan agregados de diámetro superior a 10µm

(Tisdall y Oades, 1982). Las bacterias, las raíces y las hifas producen polisacáridos, principalmente mucílagos, que forman complejos estables con las partículas del suelo (Cheshire et al., 1983). Esta acción cementante compensa el efecto de disgregación y de dispersabilidad de los compuestos orgánicos ácidos liberados por los hongos, por el sistema radical de las plantas y por los microorganismos rizosféricos (Reid y Goss, 1982; Reid et al., 1982).

1.1.1. Organización de las comunidades microbianas edáficas que degradan la materia orgánica

La producción de nutrientes a partir de la materia orgánica depende en gran parte de la comunidad microbiana capaz de colonizar y desarrollarse sobre los restos orgánicos.

En la organización de las comunidades microbianas edáficas intervienen dos factores fundamentales: las diferencias en las estrategias de crecimiento y reproducción y la tendencia de las comunidades a cambiar en función del tiempo. Las diferencias en las estrategias de crecimiento implican que los microorganismos manifiestan comportamientos distintos para utilizar algunas fuentes de recursos, bien una afinidad elevada por el sustrato o bien una tasa de crecimiento muy alta. La primera condición favorece a los organismos cuando en el suelo hay escasez de restos orgánicos y la segunda potencia el desarrollo de la microflora en caso contrario, cuando se alcanzan niveles importantes de sustratos orgánicos (Struwe y Kjoller, 1986).

La descomposición progresiva de un conjunto de sustratos se asocia con su colonización por una comunidad de microorganismos que encuentran en la fuente de nutrientes su nicho, por lo tanto éste se define en virtud de la naturaleza

química de la materia orgánica y de las características del medio físico. Ambos factores evolucionan con el tiempo pudiendo variar de forma continua o intermitente (Swift y Heal, 1986).

Los compuestos orgánicos que representan a la vez la base sobre la que se desarrollan los microorganismos y la fuente de energía y nutrientes se pueden compartimentar y constituir unidades de sustratos con límites no siempre nítidos. Por consiguiente, la materia orgánica edáfica constituye un mosaico de unidades de sustrato colonizadas por comunidades de composición diferente.

La biodegradación de cualquier complejo orgánico, a pesar de la heterogeneidad de compuestos que supone, es casi invariable, y aunque los materiales iniciales sean muy diversos y por ello las primeras etapas desintegradoras distintas, los pasos sucesivos implican un rango estrecho de productos de estructura simple y de rutas metabólicas parecidas en muchos casos. Según discurren las etapas degradativas se observan variaciones en las comunidades como reflejo de una selección de los organismos descomponedores (Wood y McCrae, 1978) y dicha selección conduce a un descenso gradual de la diversidad de especies en la estructura de las comunidades y a la aparición de un mosaico de niveles de descomposición (Newell, 1984).

El sustrato inicialmente está constituido por compuestos orgánicos de composición compleja que se degradan por la acción conjunta de toda una serie de actividades enzimáticas que catalizan reacciones diferentes (Burns, 1983). En la naturaleza son pocos los organismos que poseen la variedad necesaria de capacidades metabólicas para mineralizar sustratos potenciales de estructura tan compleja. Por consiguiente en la mayoría de las ocasiones el proceso degradativo es la suma de las actividades funcionales de

muchos organismos que colonizan un sustrato orgánico. Además las capacidades catabólicas no son específicas y para cualquier reacción hay numerosos organismos fisiológicamente equivalentes. Los miembros de una comunidad con frecuencia establecen interacciones que modifican su eficacia para descomponer un sustrato. Las relaciones entre organismos son complejas y se pueden manifestar en un aumento de la actividad degradativa (Levi et al., 1968) o por contra en una inhibición del proceso (Swift, 1978). Se han observado relaciones de complementariedad enzimática (Selby, 1968), de sinergia entre enzimas (Wood y McCrae, 1978) y de regulación enzimática (Blanchette y Shaw, 1978). Las variaciones en la estructura y composición de las comunidades que mineralizan la materia orgánica inducen alteraciones en la tasa de descomposición, lo que representa una fuente de inestabilidad en las características del reciclado de los nutrientes de un ecosistema (Swift y Heal, 1986).

1.1.2. Influencia del medio abiótico en la degradación de la materia orgánica

Las características del medio físico y la naturaleza química de los sustratos orgánicos condicionan la estructura de la comunidad microbiana mineralizadora y por tanto determinan el proceso degradativo de la materia orgánica. Los dos factores mantienen una relación jerárquica respecto a la tasa de descomposición. El medio físico incide en la actividad catabólica de la microflora mientras que la naturaleza de la fuente de compuestos orgánicos y las variaciones en la comunidad de microorganismos tienen un rango de influencia más restringido (Swift y Heal, 1986).

Los factores ambientales definen las características del medio en que se degrada la materia orgánica. Tales factores ejercen numerosos efectos interdependientes sobre la

actividad microbiana del suelo (Griffin, 1972) y modifican la tasa de crecimiento de la microflora así como su metabolismo e influyen en la colonización y en las transformaciones de los compuestos orgánicos. Las relaciones entre los factores ambientales son muy complejas y en ocasiones la valoración de sus efectos sobre las poblaciones de microorganismos es difícil e induce a interpretaciones contradictorias que hacen necesario un conocimiento más profundo de las interacciones entre los factores que alteran la actividad microbiana.

Alexander (1980) considera que los factores principales que modifican la mineralización de las sustancias orgánicas añadidas al suelo son la humedad, la temperatura, el nivel de oxígeno, el pH y los elementos minerales del suelo.

Los metales como el Cu (Kendrick, 1962) o el Zn (Strojan, 1978) o combinaciones de diversos metales (Bhuiya y Cornfield, 1972) inducen la acumulación de la materia orgánica y un descenso de la actividad microbiana. El grado de inhibición de la microflora que mineraliza los restos orgánicos varía según la naturaleza de los elementos minerales presentes en el suelo (Tyler, 1981). Los sustratos orgánicos se pueden asociar con los minerales del suelo y formar compuestos organominerales que estabilizan la fracción orgánica (Tiessen et al., 1984). Duchaufour (1976) detecta el efecto estabilizador del carbonato cálcico y Tisdall y Oades (1982) observan un fenómeno similar con los óxidos de hierro.

Las transformaciones de los sustratos carbonados son más rápidas en suelos neutros o próximos a la neutralidad. Ivarson (1977) indica que, cuando se añade limo a suelos ácidos y se eleva el pH a valores que oscilan entre 6 y 7, la respiración microbiana edáfica aumenta del orden de dos a tres veces. En general se puede afirmar que a pH ácido predominan los hongos, mientras que las bacterias son más

competitivas en suelos neutros (Alexander, 1980).

La humedad del suelo influye sobre la actividad de la microflora telúrica y es uno de los factores que más interviene en el control de la producción de la biomasa en el medio edáfico. La relación entre el estado funcional de las comunidades de microorganismos y la humedad se debe a que ésta determina la cantidad de oxígeno disponible para el desarrollo de la microflora edáfica, pues cuanto mayor es la humedad del suelo menor es el oxígeno disponible (Allison, 1973). Las comunidades de microorganismos mineralizadores presentan respuestas muy diversas ante los niveles de agua del suelo, en función de las condiciones que definen el área donde se desarrolla cada comunidad (Knight y Skujins, 1981). Wilson y Griffin (1975) encuentran poblaciones microbianas muy activas entre -8 y -30 bar y según descende la humedad detectan una actividad respiratoria menor. Los mismos autores en cultivos bacterianos puros observan que a partir de -3 bar disminuye rápidamente la capacidad metabólica y a -20 bar es imperceptible. Las poblaciones microbianas responden a las variaciones en el contenido de agua a niveles tan bajos como -106 y -88 bar (Wildung et al., 1975), pero la humedad, siempre que se mantenga por encima de un valor mínimo, no será un condicionante crítico (Miller y Johnson, 1964).

Los compuestos orgánicos se mineralizan mejor bajo condiciones de aerobiosis que en ausencia de oxígeno (Gottschal, 1986), aunque se han detectado algunas excepciones en la descomposición de compuestos aromáticos y alifáticos halogenados (Bouwer y McCarty, 1983; Shelton y Tiedje, 1984).

La alternancia de ciclos húmedos y secos afecta también a la degradación de la materia orgánica. Sorensen (1974) y Lund y Gokosoyr (1980) señalan un incremento en la oxidación de la fuente de sustratos orgánicos en tales condiciones.

Otro factor ambiental que incide en la velocidad degradativa de los materiales orgánicos es la temperatura. Sain y Broadbent (1977) observan que la paja de arroz se oxida mejor según asciende la temperatura desde 8°C hasta 25°C y Choudhury y Cornfield (1978) encuentran que la tasa de carbono mineralizado aumenta con la temperatura hasta cerca de los 70°C. Jenkinson y Ayanaba (1977) observan una tasa superior del proceso degradativo en climas tropicales respecto a suelos localizados en climas fríos.

1.2. Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno es uno de los macronutrientes en circulación más significativo en ecosistemas terrestres, tanto desde un punto de vista ecológico como económico. Junto con el agua y el fósforo, es el principal factor limitante de las plantas (Vitousek et al., 1982) y, aunque elementos como el potasio y el fósforo aumentan la productividad primaria en algunas circunstancias (Wight y Black, 1979), el nitrógeno es el nutriente que más eleva la producción primaria (Risser y Parton, 1982). En la esfera económica resalta la importancia del nitrógeno porque de él depende en gran parte la obtención de alimentos, piensos para el ganado, fibras naturales y combustibles.

En cualquier caso el nitrógeno es fundamental en la litosfera, atmósfera, hidrosfera y biosfera. La litosfera supone la reserva más importante ya que se concentra principalmente en las rocas ígneas (16200×10^7 Tg). En la atmósfera se encuentra en proporción inferior, mientras que en la hidrosfera y en la biosfera aparece en cantidades muy pequeñas (Stevenson, 1982). Estos reservorios son una fuente de nitrógeno inerte y su biodisponibilidad es baja. La mayoría de los seres vivos sólo pueden utilizar el nitrógeno

combinado, por eso la fracción orgánica edáfica supone el potencial de nitrógeno disponible más elevado, que Jenkinson (1990) cifra en 1.5×10^5 Tg.

A pesar de que la mayoría de los ecosistemas terrestres tienden a conservar un ciclo del nitrógeno cerrado, las pérdidas de nitrógeno con frecuencia son importantes (Vitousek et al., 1982). Resulta difícil cuantificar estas pérdidas, pues a las dificultades propias de los análisis se une la variabilidad a lo largo del tiempo, debida a los cambios climáticos y a la sucesión. Los datos que cuantifican las pérdidas de nitrógeno son dispares. Rosswall y Panstian (1984) consideran que por volatilización se pierden anualmente 13 - 23 Tg, por lixiviación alrededor de 30 Tg N/año, a través de los óxidos de nitrógeno originados en la desnitrificación 1 - 44 Tg N/año y por erosión 2 - 20 Tg N/año. Söderlund y Svenson (1976) estiman que por volatilización se pierden 113 - 244 Tg N/año, por lixiviado 18 - 33 Tg N/año y por desnitrificación 107 - 161 Tg N/año.

Las transformaciones del nitrógeno en la biosfera consisten en una serie de reducciones y oxidaciones sucesivas entre los estados de oxidación -3 y +5, que convierten el nitrógeno molecular en formas metabolizables por las plantas, animales y microorganismos. A nivel edáfico en torno al 95% del nitrógeno que circula al año se localiza en el sistema suelo-microorganismos-plantas (Rosswall, 1976).

Las etapas principales que constituyen el ciclo del nitrógeno son: Fijación, mineralización, nitrificación y desnitrificación (fig. 1.1).

La fijación biológica es una propiedad exclusiva de ciertos procariotas, unos de vida libre y otros que viven en asociaciones simbióticas. El proceso consiste en una reducción del nitrógeno atmosférico hasta amoníaco,

asimilable por los microorganismos en forma orgánica como glutamina (Wolk et al., 1976). Constituye la fuente más importante de nitrógeno combinado de origen natural en los ecosistemas (Söderlund y Svenson, 1976) que supone un aporte que varía entre 139 Tg N/año (Söderlund y Rosswall, 1982) y 175 Tg N/año (Sevillano y Rodríguez-Barrueco, 1987) y junto con la fotosíntesis constituye las etapas claves en la producción de los ecosistemas (Worthington, 1975).

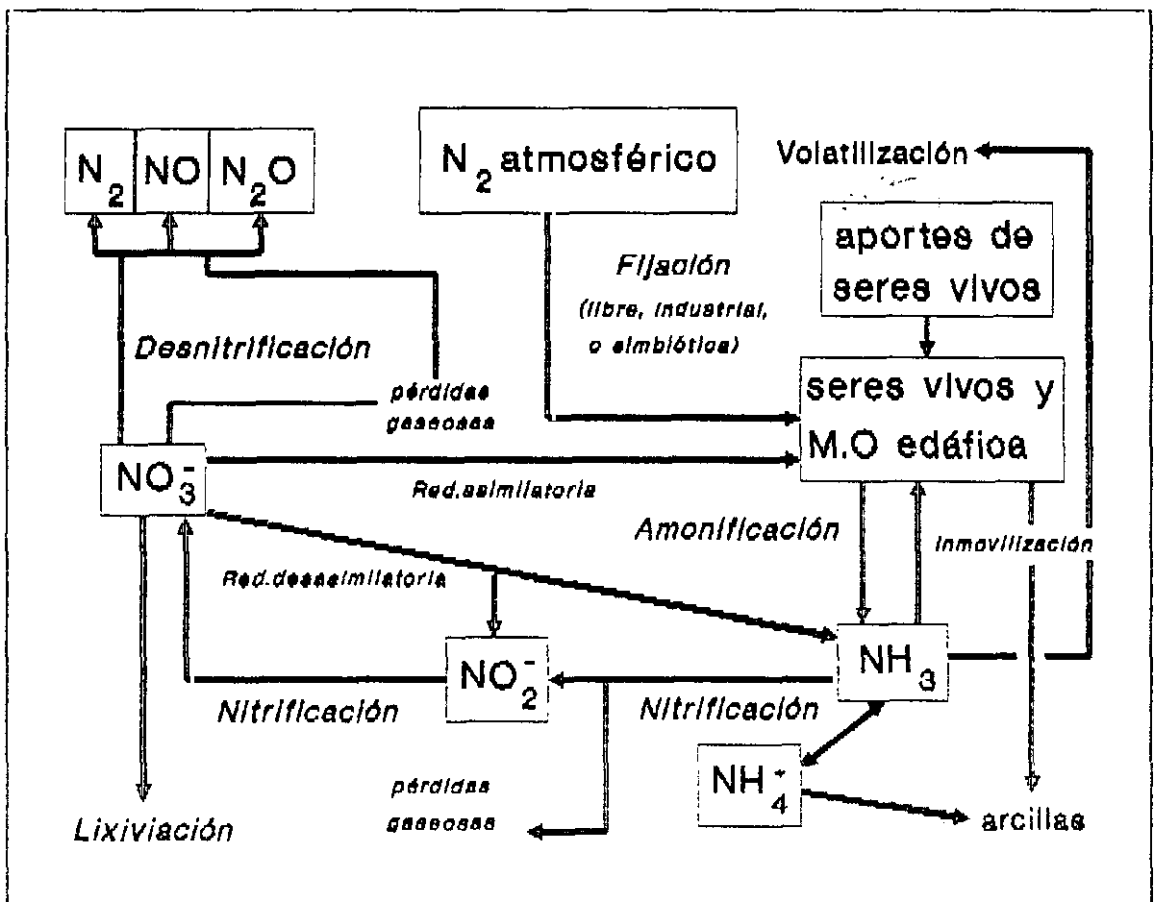


Fig. 1.1. Ciclo del nitrógeno

La precipitación, que deposita NH_4^+ y NO_3^- (Sasser y Binkley, 1989), y la adsorción gaseosa de NH_3 son otras vías de entrada del nitrógeno atmosférico en el medio telúrico, que introducen en los ecosistemas desde cantidades insignificantes hasta 50 kg N/ha.año, en virtud de la situación geográfica y de la proximidad a la fuente de nitrógeno (Stevenson, 1986).

Los depósitos orgánicos, esencialmente desechos vegetales y restos de animales, representan un aporte considerable de nitrógeno y mantienen el balance del ciclo en el suelo. Los sustratos orgánicos sufren un largo proceso de degradación, mediado por la microflora edáfica, que culmina con la transformación de los restos orgánicos en nitrógeno inorgánico asimilable por los vegetales y por los propios microorganismos (Dalal, 1979). Este proceso mineralizador, esencial para los vegetales y a menudo factor limitante de la productividad primaria (Gillespie y Chaney, 1989), lo realiza la comunidad microbiana telúrica, aunque no todas las transformaciones de los compuestos nitrogenados están reguladas por microorganismos. Bernhard-Reversat (1977) indica que la cantidad de nitrógeno mineral que se produce cada año oscila entre el 5 y el 10% del nitrógeno total del suelo, mientras que Alexander (1980) calcula una tasa de transformación entre el 1 y el 4%. Smith et al. (1986) señalan que en suelos no fertilizados el nitrógeno necesario para la producción primaria se obtiene principalmente a través de la mineralización. Por ello esta etapa del ciclo del nitrógeno a nivel edáfico es de vital importancia para la producción vegetal.

En el suelo existe una ruta simultánea e inversa a la mineralización que es la inmovilización del nitrógeno mineral (Cochran et al., 1980). La importancia de esta vía radica en que los microorganismos heterótrofos utilizan el nitrógeno mineral y al competir con la comunidad vegetal disminuyen la

fertilidad del suelo. Smith y Patrick (1983) observaron que, debido a la inmovilización, casi todo el $N-NH_4^+$ añadido al suelo se transforma en N-orgánico después de 56 días y datos similares encuentran Power y Legg (1984). Hadas et al. (1989) observan un descenso del 13 - 26% en la mineralización a causa de la inmovilización y Hsieh (1988) indica que en zonas pantanosas el nitrógeno añadido en forma de nitrato amónico es inmovilizado durante más de ocho meses.

Las transformaciones biológicas del nitrógeno a través de la mineralización e inmovilización constituyen una parte crucial del ciclo del nitrógeno en el suelo y suponen un flujo continuo entre formas orgánicas e inorgánicas de nitrógeno.

Como consecuencia inmediata de la mineralización del nitrógeno orgánico se produce amonio, proceso que algunos autores denominan amonificación. La ruta mineralizadora, según las circunstancias del medio, puede continuar con una segunda etapa, nitrificación, también biológica (Azhar et al., 1986a), en la que el amonio (estado de oxidación -3), forma relativamente inmóvil de nitrógeno, se oxida a través del paso intermedio de nitrito (estado de oxidación +3), hasta nitrato (estado de oxidación +5), forma aniónica más móvil. El paso de nitrógeno orgánico a nitrógeno amonio es la etapa limitante de la velocidad de conversión de nitrógeno orgánico en nitrógeno nitrato (Stanford et al., 1975). La nitrificación es una vía oxidativa que los microorganismos realizan en dos etapas, pues no poseen el juego enzimático completo capaz de producir nitrógeno nitrato a partir de nitrógeno amonio. En una primera etapa el amonio se oxida hasta nitrito y, posteriormente, el nitrito es oxidado a nitrato. Ambos procesos son exergónicos y suministran energía tanto a la microflora nitrificante nitrosa, que produce nitrito, como a los microbios nitrificantes nítricos, que originan nitrato. Mientras que la última etapa ocurre en un

solo paso, la oxidación de NH_3 a NO_2^- sucede a través de varios compuestos intermedios no identificados perfectamente que difieren en su estado de oxidación (Bremner y Blackmer, 1981). En la nitrificación también se origina N_2O en un proceso biológico que tiene lugar cuando se forman ambientes microaerofílicos (Ritchie y Nicholas, 1974; Vitousek et al., 1982). Las pérdidas de nitrógeno por este camino pueden ser más importantes que las causadas por la desnitrificación (Bremner y Blackmer, 1981).

Aunque la fuente principal de nitrógeno asimilable por las plantas es el nitrato (Wollum y Davey, 1975), los vegetales también utilizan el amonio como fuente de nitrógeno. Por ejemplo, en bosques de clima templado se ha observado que la forma de nitrógeno mineral que predomina en el suelo es el amonio (Keeney, 1980) y los árboles obtienen el nitrógeno como N-NH_4^+ mediante la asociación con hongos heterotrófos (Adams y Attiwill, 1982) en clara competencia con los microorganismos, incluida la microflora amonificante que emplea el sustrato de la mineralización como fuente de nitrógeno y de carbono. La competencia por el amonio se amplía con la población microbiana nitrificante, mayoritariamente autótrofa (Jones y Richards, 1977), que lo utiliza como sustrato. Como consecuencia, el tamaño y la tasa de renovación de la biomasa microbiana influyen en la disponibilidad del nitrógeno para el crecimiento de las plantas (Andersson y Domsch, 1980). Los niveles de nitrógeno amonio útiles para la comunidad vegetal y para la microflora edáfica dependen además de varios procesos de naturaleza no biológica. Las arcillas fijan en las superficies interlamelares cantidades significativas de N-NH_4^+ que reemplaza a cationes como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ . El amonio retenido no es susceptible de escapar del ecosistema por lixiviado e incluso representa un depósito de nitrógeno mineral que supone un aporte continuo de este elemento para el desarrollo de las plantas (Nommik y Vahtras, 1982).

Simón-Sylvestre y Calvet (1987) indican que el amonio adsorbido por las arcillas no es sustrato para la nitrificación y por tanto las arcillas modifican la cinética de este proceso. La unión electrostática del nitrógeno amonio con las arcillas y con los coloides del suelo dificulta las pérdidas por volatilización (Stevenson, 1986) que son importantes en suelos secos y básicos, donde el equilibrio amonio-amoniaco se desplaza hacia la forma neutra (Freney et al., 1981). La volatilización del amoniaco puede alcanzar hasta un 47% del nitrógeno añadido al suelo en forma de fertilizante (De Datta, 1987).

El ión nitrato que se produce en la nitrificación, a diferencia del amonio que se origina en la mineralización, no se une a las arcillas del suelo, por lo que constituye una forma de nitrógeno mineral móvil que por lixiviado sale del ecosistema y en ocasiones supone pérdidas cuantiosas (Gillespie y Chaney, 1989). El nitrato es objeto de la actividad biológica de otros microorganismos que habitan en el suelo. Blackburn (1983) registra la existencia de procariotas que poseen el equipo enzimático necesario para reducir NO_3^- dando lugar a NH_3 que es inmovilizado por los propios microorganismos en competencia con la comunidad macrófita. Otros microorganismos edáficos llevan a cabo una reducción desasimilatoria del nitrato que origina amonio, pero que en este caso no se incorpora a la estructura celular, sino que se excreta al medio favoreciendo la dinámica del nitrógeno amonio en el suelo. La reducción desasimilatoria, a diferencia del proceso asimilatorio, no discurre en condiciones aerobias ni está regulada por los niveles de amonio y además supone un aporte suplementario de energía en una ruta acoplada con la producción de ATP (Yordy y Ruoff, 1981). La vía desasimilatoria no solo suministra nitrógeno mineral al ecosistema sino que también reduce el nitrito hasta amonio y contribuye a disminuir los niveles de este ión que en proporciones elevadas ejerce un efecto tóxico

(Yordy y Ruoff, 1981). El nitrito es una forma fácilmente inmovilizable del nitrógeno mineral del suelo por su capacidad de reaccionar con la materia orgánica (Azhar et al., 1986b), en especial con los compuestos fenólicos. Tales reacciones tienen lugar en todo tipo de suelos pero se ven favorecidas por un contenido elevado de materia orgánica y por la acidez del suelo (Smith y Chalk, 1980). Estos datos sugieren que la nitrificación puede desempeñar un papel importante en la inmovilización del nitrógeno mineral del suelo en formas orgánicas que no integran las estructuras celulares, como corroboran Azhar et al. (1986a), quienes observan, tras abonar un suelo de pradera, que el 55% del nitrógeno amonio añadido es inmovilizado en un plazo de dos meses.

En condiciones anaerobias el nitrato puede servir como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria, en una reducción desasimilatoria que genera ATP y que rinde formas gaseosas reducidas de nitrógeno como NO, N₂O y N₂, que escapan del ecosistema. Esta ruta de reducciones y oxidaciones de las formas minerales de nitrógeno que constituye la desnitrificación es un proceso biológico que Payne (1973) esquematiza con la siguiente secuencia como la vía más probable:



Ingraham (1981) considera como microorganismos desnitrificantes en sentido estricto a aquellos que producen N₂ a partir de NO₃⁻. Sin embargo hay numerosas bacterias sin la actividad enzimática necesaria para realizar el último paso y por tanto rinden como producto final N₂O, que puede escapar del suelo. En cada etapa de este proceso interviene una enzima distinta y son pocos los microorganismos que poseen la capacidad enzimática para realizar todas las transformaciones, pero en cualquier caso en el suelo se

complementan las actividades desnitrificadoras parciales de la microflora y se produce N_2 que se libera a la atmósfera.

La desnitrificación y la reducción desasimilatoria o fermentación del nitrato (Broda, 1975) son dos procesos biológicos importantes y el predominio de una u otra ruta reductora de nitrógeno nitrato en anaerobiosis depende de factores diversos, pero Tiedje et al. (1982) destacan los niveles de carbono disponible y de aceptores de electrones que hay en el suelo. A concentraciones elevadas de sustratos carbonados y bajas de aceptores de electrones se favorece la reducción desasimilatoria en perjuicio de la desnitrificación (Catanzaro et al., 1987). Katyal et al., (1988) consideran que entre el 16.8 y el 18.9% del nitrato producido en un suelo se pierde como dinitrógeno. Sin embargo Jagnow y Söchtig (1983) aprecian que entre el 30 y el 50% del nitrógeno que se aplica como fertilizante se pierde a través de la desnitrificación y Mikkelsen (1987) eleva esta tasa hasta el 70%. Si se consideran todas las formas nitrogenadas gaseosas, las fugas se elevan hasta $10 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (Mosier et al., 1986). Este aporte de nitrógeno a la atmósfera equilibra la pérdida que se produce en la fijación biológica del dinitrógeno y de ahí la importancia geoquímica de la desnitrificación. La mayoría del nitrógeno molecular atmosférico ha circulado al menos una vez a través de la microflora desnitrificante (Stevenson, 1986).

El desarrollo normal de los ciclos biogeoquímicos es imprescindible para la conservación de los recursos. Cualquier factor que perturbe su integridad destruyendo los mecanismos biológicos de renovación cíclica induce a la alteración de los ecosistemas, pues dependen de tales transformaciones, y puede conducir a situaciones imprevisibles y, en cualquier caso, no deseables. Actualmente, el hombre altera, directa o indirectamente, la velocidad de los ciclos e introduce otros paralelos con la

adición de sustancias difícilmente biodegradables, rompiendo el equilibrio de los ecosistemas.

1.3. Microorganismos del ciclo del nitrógeno

Una característica común de los ciclos biogeoquímicos a nivel edáfico es que los microorganismos desempeñan un papel fundamental en las numerosas transformaciones que tienen lugar en el suelo.

En cada una de las etapas del ciclo del nitrógeno interviene un conjunto de microorganismos de distintas especies, que desarrollan una actividad metabólica similar. Esta propiedad permite englobar a los microorganismos implicados en grupos funcionales o fisiológicos que despliegan su actividad en una etapa determinada. Tales grupos corresponden a las categorías de microorganismos siguientes: fijadores de dinitrógeno o diazotróficos, proteolíticos, amonificantes, nitrificantes y desnitrificantes.

Citamos los grupos funcionales según la clasificación propuesta en la 8ª edición de "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (1974), ya que su nomenclatura es la que se utiliza en las publicaciones actuales sobre temas afines al presente estudio y éste, por otra parte, no pretende profundizar en los datos relativos a las clasificaciones sistemáticas de la microflora que puebla el medio edáfico.

Los microorganismos diazotróficos o fijadores de dinitrógeno atmosférico constituyen un grupo que ha sido estudiado con gran detalle debido a su significación ecológica como responsable de la entrada biológica de nitrógeno más importante en los ecosistemas terrestres. Es un

grupo muy heterogéneo, compuesto por microorganismos de características muy diferentes y que desarrollan su actividad funcional en condiciones distintas.

La microflora diazotrófica comprende organismos de vida libre y otros que actúan asociados con plantas. En los primeros encontramos bacterias tanto autótrofas como heterótrofas. Gallon (1980) señala que Chlorobium limicola, Chromatium venosum y Rhodospirillum rubrum son microorganismos fotoautótrofos que fijan dinitrógeno. También se encuentran microorganismos diazotróficos en la microflora metanotrofa como Methylosinus trichosporium (Chen y Yoch, 1988), Methylococcus capsulatus y Methylosinus sporium (Colin Murrell, 1988). Entre la microflora heterótrofa aparecen fijadoras de dinitrógeno aerobias obligadas como Azotobacter sp. (Drozd y Postgate, 1970) que, en contraste con otros fijadores de la familia Azotobacteriaceae como Beijerinckia, Derrxia y Azotomonas, es capaz de producir cistos dotados de una pared suplementaria (Lin y Sadoff, 1969) resistentes a la desecación. El género Clostridium reúne a microorganismos diazotróficos muy frecuentes en los suelos bajo condiciones de anaerobiosis estrictas (Rosenblum y Wilson, 1949) pero también hay bacterias anaerobias facultativas fijadoras como las del género Bacillus (Line y Loutit, 1971).

Entre las cianobacterias, grupo primitivo de organismos, podemos destacar Nostoc, Aulosira y Anabaena (Rinaudo et al., 1971). Nostoc sp. establece simbiosis con Cycadaceae (Tredici et al., 1989) y Anabaena que habita en los frondes de Azolla y forma una simbiosis de gran impacto agronómico en los arrozales de China, ya que supone una de las fuentes principales de nitrógeno para los cultivos (Chu, 1979). Entre los líquenes también existen sistemas diazotróficos, estudiados por numerosos autores (Bermúdez de Castro et al., 1991), como Lobaria pulmonaria que tapiza las partes inferior

y media de los troncos de hayedos y robledales y representa un aporte significativo de nitrógeno en los bosques caducifolios de zonas templadas (Müller et al., 1989). La relación más estudiada y que mejor se conoce es la establecida entre leguminosas y *Rhizobium*, de cuya actividad simbiótica, según Hardy y Holsten (1972), surgen 90 millones de toneladas de nitrógeno cada año, aunque el grado de efectividad de esta asociación varía con numerosos factores (Campbell, 1985). Existen además gran número de simbiosis entre plantas criptógamas y fanerógamas con bacterias, como la formada entre no-leguminosas y actinomicetos del género *Frankia* (Becking, 1974) que frecuentemente se desarrolla en suelos pobres donde actúan como sistemas colonizadores (Bermúdez de Castro y Schmitz, 1990), aunque otros autores les confieren un papel pionero (Campbell, 1985).

Los microorganismos proteolíticos fragmentan las proteínas en unidades menores hasta aminoácidos libres (Anderson, 1978). Esta etapa se puede considerar como un primer paso dentro del complejo proceso de la degradación de la materia orgánica, en el que interviene una amplia variedad de microorganismos con actividades enzimáticas dispares y específicas para cada sustrato orgánico (Ladd y Jackson, 1982). La microflora proteolítica actúa en las etapas iniciales de la mineralización de los compuestos orgánicos nitrogenados y a continuación participan los microorganismos amonificantes que rinden amonio como producto final del proceso degradativo (Anderson, 1978). Hay que tener en cuenta, además, que proteolisis y amonificación son dos procesos sucesivos que *in situ* están asociados, pues existen estirpes de microorganismos que son, a la vez, proteolíticos y amonificantes. Alexander (1980) señala actividad proteolítica en hongos, bacterias aerobias, anaerobias estrictas y facultativas, lo que refleja un grupo funcional muy diverso y heterogéneo. En especies de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Serratia* y *Micrococcus* hay bacterias

que degradan fácilmente proteínas puras (Alexander, 1980). En los géneros Alternaria, Aspergillus, Mucor, Penicillium y Rhizopus hay hongos que presentan enzimas proteolíticos (Garret, 1963).

Los amonificantes, que liberan amonio como producto final de la mineralización, constituyen un grupo fisiológico que, como los anteriores, es muy dispar. Son numerosos los hongos y bacterias que atacan alguna forma de nitrógeno orgánico liberando amonio y la velocidad de descomposición de los sustratos nitrogenados varía con los géneros y especies (Clarck, 1967). La mayoría de las bacterias heterótrofas del suelo liberan amonio cuando utilizan compuestos orgánicos nitrogenados como fuente de carbono (Alef y Kleiner, 1986). Los microorganismos amonificantes son tanto aerobios como anaerobios y hay algunos capaces de formar esporas de resistencia viables tras periodos adversos, bien por falta de humedad, carencia de nutrientes o condiciones desfavorables de aerobiosis o de anaerobiosis (Alexander, 1980).

Focht y Verstraete (1977) señalan que numerosas bacterias heterótrofas y hongos pueden oxidar formas reducidas de nitrógeno y producir nitrito y nitrato. Sin embargo las bacterias nitrificantes que predominan en la naturaleza son autótrofas (Kelly, 1978) y quimiolitótrofas. Las bacterias nitrificantes, tanto nitrosas como nítricas, pertenecen a la familia Nitrobacteriaceae, con microorganismos de cinco géneros que oxidan el nitrógeno amonio hasta nitrógeno nitrito y con microorganismos de cuatro géneros que oxidan éste último hasta nitrato (tabla 1.1). Entre los primeros, Nitrosomonas sp. tiene actividad superior, mientras que en el segundo caso Nitrobacter sp. son las bacterias más activas. Numerosos autores indican que las bacterias nitrificantes autótrofas son las únicas responsables de este proceso oxidativo en la mayoría de los

ecosistemas (Kelly, 1978; Alexander, 1980). Solo en aquellos hábitats donde el crecimiento autotrófico está inhibido, la microflora heterótrofa puede aumentar la concentración de nitratos en el suelo. Las bacterias de la familia Nitrobacteriaceae, a diferencia de los microorganismos del grupo amonificante, son aerobias y en ningún caso se conocen formas de resistencia.

TABLA 1.I. Géneros principales de bacterias nitrificantes

Oxidantes de amonio	Oxidantes de nitrito
<u>Nitrosomonas</u>	<u>Nitrobacter</u>
<u>Nitrosobolus</u>	<u>Nitrospira</u>
<u>Nitrosospira</u>	<u>Nitrococcus</u>
<u>Nitrosococcus</u>	<u>Nitrospina</u>
<u>Nitrosovibrio</u>	

La reducción de los compuestos oxidados de nitrógeno hasta formas gaseosas que pueden salir del ecosistema es un proceso que solo realizan las bacterias (Ingraham, 1981). Según Jeter e Ingraham (1979) las bacterias de más de 70 géneros son capaces de reducir alguna forma de nitrógeno combinado. La mayoría de las bacterias reductoras nitrógeno son aerobias facultativas, pero también las hay anaerobias estrictas (Van Gent-Ruyters et al., 1975). Los microorganismos desnitrificantes son fundamentalmente heterótrofos, pero algunas especies son autótrofas (Firestone, 1982). La microflora desnitrificante, al igual que los grupos fisiológicos antes citados, es muy heterogénea, con microorganismos que pueden desarrollarse en circunstancias muy diferentes.

Es importante recordar que existen microorganismos de los géneros mencionados anteriormente que reúnen el juego

enzimático indispensable para realizar más de una actividad funcional y por tanto forman parte de varios grupos fisiológicos, por lo que son bacterias que pueden desempeñar un papel clave en la dinámica del ciclo del nitrógeno. Es el caso de Azospirillum, que agrupa bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico como *A. lipoferum* que además puede actuar como bacteria desnitrificante (Neyra et al., 1977). Bradyrhizobium japonicum es diazotrófica y puede crecer utilizando el hidrógeno como fuente de energía (Kimou y Drevon, 1989) y también manifiesta una actividad reductora de compuestos oxidados de nitrógeno (Zablotowicz et al., 1978). *Bacillus* sp. suma la actividad amonificante a la acción proteolítica y García (1977) considera que son las bacterias que más contribuyen al proceso desnitrificante en ambientes naturales. Otro ejemplo similar es Pseudomonas sp., que comprende bacterias muy abundantes en el suelo, sobre todo en la rizosfera, con especies que se distribuyen en los grupos de microorganismos proteolíticos, amonificantes y desnitrificantes. Por último se debe mencionar Clostridium sp. que agrupa bacterias anaerobias también muy abundantes en el suelo en condiciones normales (Tiedje et al., 1984). A este género pertenecen microorganismos fijadores de nitrógeno, hay otros con actividad mineralizadora muy intensa capaces de fermentar carbohidratos, proteínas y de liberar amonio, e incluso también se encuentran bacterias desnitrificantes.

1.4. Influencia del medio abiótico en el ciclo del nitrógeno

Muchos factores abióticos que definen las características de los ecosistemas terrestres inciden en la circulación y en las pérdidas de nutrientes determinando la autorregulación de los ciclos biogeoquímicos.

La fijación del nitrógeno atmosférico es un proceso que realizan los microorganismos poseedores de la enzima nitrogenasa que sufre una inhibición irreversible cuando se expone a la acción del oxígeno (Wong y Burris, 1972). Los microorganismos diazotróficos que obtienen energía mediante un metabolismo aerobio superan este problema desarrollando sistemas protectores que les permiten mantener la enzima en un ambiente anaerobio (Weisz y Sinclair, 1987; Silvester et al., 1988). Este problema no se plantea con la microflora reductora del nitrógeno atmosférico anaerobia obligada, como Clostridium, que solo fija nitrógeno en condiciones anaerobias (Knowles, 1978). Magdoff y Bouldin (1970) estudiaron este proceso en suelos encharcados y señalaron que la fijación aerobia y la anaerobia son perfectamente compatibles en el mismo suelo, pues se forma un mosaico de microambientes aerobios y anaerobios que permite el desarrollo de ambas microfloras. Los mismos autores reflejan la necesidad de una fuente de energía abundante para que se realice la actividad diazotrófica. En esta línea Child (1981) indica que los microorganismos fijadores metabolizan grandes cantidades de carbono orgánico, mientras que Blackburn (1983) observa que los fijadores libres fotótrofos son reductores muy eficaces y Davey (1983) detecta que la tasa de fijación de las cianobacterias en oscuridad se reduce del orden de 100 veces.

El intervalo idóneo de pH para los microorganismos diazotróficos es amplio, aunque en general se admite que la fijación libre está inhibida a pH ácido (Evans et al., 1980; Francis, 1982). Velasco y Lozano (1979) en estudios sobre cambios sinecológicos de la microflora telúrica observan que ante un descenso del pH predomina Clostridium frente a Azotobacter, pues la tolerancia del primero a la acidez permite su proliferación, mientras que Azotobacter requiere suelos próximos a la neutralidad (Granhall, 1981).

Como vimos en el apartado 3, la microflora edáfica que degrada los compuestos orgánicos para rendir nitrógeno mineral constituye un grupo complejo, el más heterogéneo de todos los que intervienen en el flujo de nitrógeno en el suelo. Por esto la actividad mineralizadora se manifiesta en condiciones ambientales muy diversas, aunque por supuesto la efectividad del proceso oscilará según los microorganismos predominantes y las circunstancias del hábitat en que se localizan. La degradación de los sustratos proteicos varía según la temperatura del medio. O'Brien (1972) registra cambios significativos en la actividad proteolítica que se incrementa del orden de tres veces cuando la temperatura se eleva de 20°C a 37°C. El sustrato también determina la acción proteolítica de los microorganismos, como sugieren Gutiérrez Mañero y Bermúdez de Castro (1983) cuando estudian las fluctuaciones de los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno y observan que la actividad proteolítica aumenta con la concentración de materia orgánica.

Risser y Parton (1982) consideran que la humedad y la temperatura son los factores abióticos primarios que influyen en la mineralización del nitrógeno en el sistema suelo-planta. El intervalo de humedad durante el cual los microorganismos amonificantes se muestran activos es muy amplio (Miller y Johnson, 1964). Los niveles óptimos se sitúan entre -0.5 y 0.15 bar, aunque en suelos saturados la actividad es considerable. El papel de la humedad en la amonificación resalta en el trabajo de Stanford y Epstein (1974), quienes en suelos secados al aire aprecian que el 80-90% de la transformación de nitrógeno orgánico en nitrógeno mineral ocurre gracias a la humedad retenida en el complejo poroso del suelo. Moorhead et al. (1988) en experimentos de laboratorio observan tasas superiores de mineralización según se eleva la humedad de la materia orgánica que se añade al medio de incubación. En suelos con bajo contenido en agua la microflora no se desarrolla

plenamente y la producción de nitrógeno mineral decrece (Jones y Woodmansee, 1979). Sin embargo hay microorganismos que permanecen activos durante estos periodos y continúan degradando el sustrato, como reflejan González Vázquez y Gutiérrez Rueda (1983), quienes detectan una población amonificante más alta en verano que en otoño, en suelos de bosque repoblados con *Pinus pinaster* Ait. Pérez Hernández et al (1989) encuentran que la microflora amonificante es más elevada en verano que en primavera, en suelos de ribera poblados con *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.

La actividad amonificante es óptima dentro de un rango de temperaturas similar al que se registró para la proteólisis. Entre los 50 y 60°C no se observa mineralización, hasta los 40°C aumenta progresivamente (Choudhury y Cornfield, 1978) y por debajo de 35°C disminuye la actividad microbiana (Stanford et al., 1975). El pH es otro factor a considerar. En suelos tropicales la tasa de amonificación aumenta según disminuye el pH. En el intervalo de pH entre 5.5 y 6.0 Sahrawat (1982) señala la actividad máxima, incluso a pH 4.4 se mantiene en unos niveles considerables. Lozano y Velasco (1972) registran resultados similares en suelos de clima templado poblados con *Pinus radiata* D. Don.

Hadas et al. (1986) detectan que el nitrógeno total disponible en el suelo y la mineralización están asociados. Vlassak (1970) observa que el nitrógeno total disponible afecta a la actividad mineralizadora. Delphin (1986) y Adams y Attiwil (1982) registran el mismo efecto, e incluso por experiencias de laboratorio señalan que en presencia de un sustrato adecuado la tasa de mineralización máxima se alcanza en un plazo corto de tiempo, que oscila entre los 4 y los 16 días. La estructura física del suelo, como citaron Stanford y Epstein (1974), influye en el proceso de mineralización del nitrógeno, pero no solo a través del grado de humedad, sino

también mediante las asociaciones organominerales (Delphin, 1986).

Las condiciones que determinan los hábitats óptimos para la actividad nitrificante son más estrictas que en los restantes grupos fisiológicos, ya que la nitrificación es una etapa que realiza un grupo restringido de bacterias. Focht y Verstraete (1977) consideran que los parámetros más importantes que controlan la nitrificación son: pH, humedad, presión parcial de oxígeno y temperatura. A ellos podríamos añadir textura, contenido de materia orgánica, concentración de dióxido de carbono y capacidad de cambio del suelo (Mahendrappa et al., 1976). Los niveles de carbono orgánico y de nitrógeno total afectan a los potenciales de nitrificación que muestran una correlación negativa con el cociente C/N (Coats et al., 1976). Otro factor que actúa sobre la actividad nitrificante es la concentración de amonio (Montagnini y Buschbacher, 1989). La concentración de sustrato mínima en que tiene lugar la nitrificación según Verstraete (1981) es de 10 ppm, y por el contrario, niveles de amonio que sean superiores a 800 ppm inhiben el desarrollo de la microflora nitrificante autótrofa (Jones y Hedlin, 1970), aunque Wetselaar et al. (1972) indican valores límites próximos a 3000 ppm. Probablemente la disparidad entre ambos datos refleje la influencia de otros factores abióticos, como el pH que modifica el efecto de la concentración de amonio (Montagnini y Buschbacher, 1989).

El pH es el factor que manifiesta un control más estricto sobre los microorganismos que oxidan el $N-NH_4^+$ (Dommergues et al., 1978). El intervalo idóneo de pH para Nitrobacter es de 6.2 a 7.0, mientras que para Nitrosomonas la actividad máxima se encuentra a pH superior a 7.6 (Alexander, 1980). A pH inferior a 5.0 la nitrificación autótrofa desciende drásticamente (Katyal et al., 1988), mientras que se mantiene la acción heterótrofa que es

considerable en suelos ácidos con pH entre 3.0 y 5.4 (Sahrawat, 1982). Este último autor destaca que la nitrificación autótrofa óptima ocurre entre 6.0 y 7.5.

Seifert (1972) aprecia el efecto de la humedad del suelo y considera que un contenido entre 1/2 y 2/3 de capacidad de retención de agua es el más favorable para que se forme nitrógeno nitrato. Reichman et al. (1966) encuentran una relación directamente proporcional entre la nitrificación y la humedad, dentro del intervalo comprendido entre -15.0 y 0.2 bar. El oxígeno es un requerimiento obligatorio para todas las bacterias nitrificantes autótrofas, pues son aerobias estrictas y necesitan una aireación adecuada del suelo (Alexander, 1980). Tate (1985) sugiere que los microorganismos nitrificantes se dispondrían sobre la superficie de las partículas del suelo de tal manera que su actividad evitaría la difusión del oxígeno hacia el interior de las partículas, lugar donde ocurrirían otras etapas del ciclo del nitrógeno, como la desnitrificación, proceso que realizan microorganismos que se desarrollan en los espacios deficitarios en oxígeno (Focht, 1979).

Niemiera y Wright (1987) detectan en laboratorio la nitrificación máxima entre 20 y 30°C, datos que corroboran también Malhi y McGill (1982). Sin embargo Bremner y Blackmer (1981) registran la actividad idónea entre 30 y 37°C y Verstraete (1981) amplía el intervalo a 25-40°C. A temperaturas superiores a 40°C e inferiores a 10°C desciende la oxidación de amonio de forma muy acusada (Niemiera y Wright, 1987). Como la nitrificación es tan escasa a temperaturas bajas, conviene usar en proporción menor los fertilizantes amoniacales en los meses fríos, ya que se puede acumular el amonio y ejercer un efecto tóxico sobre los cultivos de plantas de interés agrícola (Niemiera y Wright, 1987). Pero Malhi y McGill (1982) postulan que existe un control climático sobre las relaciones temperatura-actividad

en la nitrificación, produciéndose en climas fríos adaptaciones de los microorganismos para mantener la actividad a temperaturas bajas. En este sentido González Vázquez y Gutiérrez Rueda (1983) encuentran mayor densidad de microorganismos nítricos en otoño que en verano y la microflora nitrosa no aparece en los suelos que estudian en verano. Pérez Hernández et al (1989) observan en suelos de ribera que la densidad y actividad de las poblaciones nitrificantes, tanto nitrosa como nítrica, disminuye durante el verano, aunque las diferencias con las demás estaciones no son significativas.

La desnitrificación depende de numerosos factores abióticos y, a pesar de que la producción de compuestos de nitrógeno en forma gaseosa es consecuencia de la actividad cometabólica de una población de microorganismos muy heterogénea, algunos de estos factores ejercen un control estricto sobre la microflora desnitrificante. Tal es el caso del oxígeno que se considera como el principal regulador de los procesos desnitrificantes en el suelo (Focht, 1979). El rango de concentración de oxígeno en que ocurre la desnitrificación varía entre 0.7 $\mu\text{g/ml}$ (Goering y Cline, 1970) y 2 $\mu\text{g/ml}$ (Wheatland et al., 1959). En íntima relación está la humedad del suelo, pues el contenido de agua condiciona la presión parcial de oxígeno. Por tanto la lluvia influye en esta actividad que, según Craswell (1978), manifiesta un aumento importante con 20-30 mm de precipitación. Los datos acerca de la temperatura ideal para la actividad desnitrificante son muy variables. Colbourn y Dowdell (1984) registran actividad desnitrificante nula a 0°C y máxima en torno a los 40°C. Nömmik (1956) y McKenney et al. (1980) señalan los 65°C como temperatura idónea. El margen de pH es amplio. Entre 3.5 y 11.2 se detecta actividad (Prakasam y Loehr, 1972) aunque la desnitrificación máxima corresponde a suelos alcalinos y se observa como aumenta con el pH entre valores de 3.8 y 9.0 (George y Antoine, 1982).

La concentración de nitratos (Breitenbeck y Bremner, 1987), como sustrato de la actividad desnitrificante, y los niveles de carbono orgánico en el suelo (Starr y Parlange, 1975), como sustrato orgánico oxidable, también limitan este proceso y el segundo factor más que el primero regula el grado de actividad desnitrificante (Limmer y Steele, 1982).

1.5. Influencia de la vegetación en el ciclo del nitrógeno

La vegetación es uno de los factores más importante que incide en la dinámica de las comunidades microbianas del suelo y que actúa como regulador de la microflora edáfica (Remacle y De Leval, 1975). El papel fundamental de la comunidad macrofítica se debe al aporte de materia orgánica mediante la deposición de las hojas y de otros restos vegetales, también por el lavado de las hojas a través del agua de lluvia, así como por la liberación radical de sustratos carbonados (Franklin y Waring, 1980).

Por efecto dosel las plantas promueven el desarrollo de microclimas, regulan la intensidad y la frecuencia de los ciclos de humedad y secado en el suelo (Campbell et al., 1971) y modifican la composición florística, la diversidad, el pH, los niveles de nitrógeno y los cationes de cambio del suelo (González-Bernáldez et al., 1969). Las raíces inducen cambios en la estructura del suelo, en los niveles de humedad, de aireación y de nutrientes del medio telúrico, e incluso determinan la composición iónica de la zona de contacto raíz-suelo (Turner y Franz, 1985). La vegetación también dificulta la erosión del terreno y disminuye las pérdidas de nutrientes en el ecosistema (Vitousek et al., 1982).

1.5.1. Interfase raíz-suelo

La raíz se puede considerar como la interfase entre la vida terrestre y el sustrato mineral que aporta un número elevado de elementos esenciales (Epstein, 1972). El estudio de la interacción entre el sistema radical de una planta y su inmediato entorno edáfico es técnicamente difícil e implica un enfoque multidisciplinario para evaluar los factores que influyen sobre las características de la zona de contacto directo entre suelo y raíz.

La estructura del suelo es un factor fundamental que influye sobre las condiciones en que se desarrollan las raíces y por tanto define en parte la interfase raíz-suelo. La porosidad, las características físico-químicas de los agregados que constituyen la estructura del suelo y la estabilidad de éste determinan el grado de resistencia mecánica al crecimiento de las raíces. El efecto es recíproco ya que el aparato radical de la planta determina parcialmente la composición mecánica y mineral del suelo de varias formas: acelera la disgregación de los minerales, sobre todo en las fracciones de arcillas menos voluminosas (Sarkar et al., 1979), modifica el estado de agregación del suelo a través de interacciones físicas, químicas y biológicas (Harris et al., 1966) y altera las uniones físicas de las partículas del suelo mediante la liberación de sustancias orgánicas radicales sobre todo polisacáridos (Monroe y Kladuko, 1987) aumentando la estabilidad de los agregados telúricos (Reid y Goss, 1980).

La dinámica compleja de la interfase raíz-suelo se desarrolla en una zona tridimensional donde interrelacionan poblaciones dispares de organismos, que se extienden en

profundidad en el córtex de las raíces y en sentido opuesto en el suelo mineral. Los microorganismos son una parte importante de este sistema y desempeñan un papel esencial en la rizosfera, que se define como la zona del suelo donde el sistema radical de cualquier planta incide sobre la población y actividad microbiana. Es una zona sin límites definidos, que difiere física, química y biológicamente del suelo no rizosférico. En la rizosfera se pueden distinguir dos zonas a pesar de que el límite entre ambas es difuso. La primera, la más próxima a la raíz, se caracteriza por un enriquecimiento de compuestos orgánicos. La zona siguiente recoge la influencia de las raíces sobre las presiones parciales de oxígeno, dióxido de carbono y otros gases (Klemedtson et al., 1987b). La interacción entre microorganismos y raíces es intensa en la zona superficial de las raíces, región denominada rizoplano, y en algunos casos se extiende a las capas corticales y epidérmicas de la raíz formando la endorrizosfera.

1.5.1.1. Características de la rizosfera

El medio que forman las raíces para la comunidad microbiana es muy inestable. Las raíces cuando crecen cambian y evolucionan creando muchos tipos de hábitats; por ello determinan la densidad y diversidad de la comunidad bacteriana rizosférica junto con las condiciones físico-químicas del medio edáfico.

El suelo de la rizosfera difiere del suelo no rizosférico debido no solo al efecto de la microflora sino también a que el crecimiento de las raíces provoca alteraciones profundas que modifican las características mineralógicas y mecánicas (Sarkar et al., 1979) y además las raíces liberan cantidades apreciables de materia orgánica.

El intercambio gaseoso en la rizosfera es muy complejo y los niveles de oxígeno y de dióxido de carbono dependen de la actividad de las raíces, de los organismos del suelo y del potencial de agua en la interfase raíz-suelo (Campbell, 1985). La captación de agua por las raíces condiciona la presión parcial de oxígeno del suelo que las rodea y cualquier cambio en el contenido de agua influye profundamente en la tasa de difusión de oxígeno (Currie, 1984). Concentraciones bajas de oxígeno en el entorno edáfico de las raíces pueden estimular la liberación de materias orgánicas del aparato radical de las plantas (Crawford, 1978). La transpiración condiciona un flujo elevado de agua desde el suelo hacia la superficie radical, pero el potencial de agua del suelo que rodea las raíces varía muy poco del potencial del suelo libre de ellas (Campbell, 1985). Este flujo de agua transporta algunos elementos químicos hacia la superficie radical, que bien se absorben en su totalidad (Mn^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , N , P) o bien se acumulan en el entorno edáfico de las raíces (Al^{3+} , Cl^- y Na^+) (Prenzel, 1979).

Los compuestos orgánicos que producen las plantas regulan el pH del medio rizosférico a través de los ácidos orgánicos liberados (Oades, 1984). La acción de las raíces sobre el pH del suelo también es consecuencia del balance de cationes y aniones que absorben las plantas, en un proceso en que se liberan H^+ , OH^- o HCO_3^- (Kirkby, 1981). Gutiérrez Mañero y Bermúdez de Castro (1983) encuentra que *Myrica gale* L. induce una acidificación del suelo bajo su dosel, y Schmitz et al. (1990) observan que el pH del suelo bajo *Elaeagnus angustifolia* L. es ligeramente superior al de fuera del dosel. Las variaciones del pH influyen en los niveles de fósforo soluble en la rizosfera (Tate, 1985). El sistema radical modifica también la disponibilidad del fósforo en su entorno por medio de los exudados que pueden formar complejos fosforados solubles (Barber, 1968) o quelatos que compiten

por los fosfatos adsorbidos en la caolinita y en los óxidos de aluminio (Nagarajah et al., 1970).

La materia orgánica es el factor principal que incide en las características del sistema raíz-suelo y representa una de las diferencias más importantes entre el suelo rizosférico y no rizosférico. El espectro de materiales orgánicos en esta zona es muy amplio y constituye los sustratos potenciales para el desarrollo de los microorganismos telúricos (Krotzky et al., 1986). Las raíces muertas aportan cantidades significativas de compuestos orgánicos y de nutrientes al suelo (Joslin y Henderson, 1987) que influyen decisivamente sobre la biomasa, en la dinámica del ciclo del nitrógeno (McClaugherty et al., 1984) y en la producción primaria neta de los ecosistemas forestales (McClaugherty et al., 1982). Las raíces vivas también contribuyen al desarrollo de los microorganismos mediante la liberación de sustratos orgánicos (Janzen y Bruinsma, 1989). Algunas de estas sustancias ejercen un efecto opuesto sobre los organismos de la interfase raíz-suelo (Tang et al., 1987), como los tiofenos que son inhibidores alelopáticos (Campbell et al., 1982), insecticidas (Arnason et al., 1981), nematocidas (Gommers et al., 1980), germicidas (Wat et al., 1980) y citotóxicos (Yamamoto et al., 1979). En general estos productos, que desempeñan un papel similar a las ecomonas (Whittaker, 1970), son de nomenclatura confusa y durante mucho tiempo se denominaron "exudados" (Rovira y McDougall, 1967), aunque hoy se pueden reconocer según la clasificación de Rovira et al. (1979) que los agrupa en exudados, secreciones, mucílagos, mucigeles y lisados.

La estructura química de estos aportes orgánicos de origen radical es muy diversa. Se identifican hidratos de carbono, tanto monosacáridos como polisacáridos, aminoácidos, enzimas, ácidos orgánicos, nucleótidos, vitaminas, hormonas (Rovira, 1965) y polifenoles (Swift, 1978). La composición de

los exudados depende de la planta que se estudie (Van Egeraat, 1979) y de su edad (Campbell et al., 1982).

Es difícil estimar la proporción en que se encuentran tales productos. Los datos experimentales reflejan variaciones entre los niveles de materiales liberados bien en cultivos axénicos o bien a partir de plantas crecidas en presencia de microorganismos. Bajo condiciones axénicas las raíces liberan un 7-8% menos del carbono fijado fotosintéticamente que en cultivos con microorganismos (Barber y Martin, 1976), donde se libera el 17% del carbono fijado por la planta (Martin, 1977). Estos productos suponen un 20% del peso seco de toda la planta y provienen del carbono translocado a las raíces, que en un 39% se libera al suelo por lisis de las células radicales y no por exudación a través de las paredes celulares intactas (Martin, 1977). Barber y Lynch (1977) sugieren que los microorganismos rizosféricos favorecen el aporte de sustratos utilizables por ellos mismos, bien porque los microorganismos formen sustancias que estimulan la exudación o bien de forma indirecta porque al usar los exudados evitan que se concentren y promueven su difusión.

Respecto al aporte de compuestos nitrogenados, Janzen y Bruinsma (1989) observan en trabajos de laboratorio con *Triticum aestivum* L. que el sistema radical libera al medio edáfico entre el 25 y el 32% del nitrógeno absorbido en forma de NH_3 por la parte aérea de la planta.

Los microorganismos metabolizan con facilidad las sustancias solubles, azúcares y aminoácidos, y provocan un cambio cualitativo importante en la rizosfera por el aumento de CO_2 y de los productos que resultan de su metabolismo. Además los niveles de compuestos no difusibles en torno a la raíz aumentan y la microflora que coloniza las raíces puede utilizarlos (Leppard, 1974). Las bacterias son más eficaces

que los hongos utilizando como sustratos los compuestos orgánicos de peso molecular bajo. Estas sustancias constituyen una parte importante de los exudados radicales y son poco abundantes en las primeras etapas descomponedoras de los restos vegetales muertos. Por el contrario los hongos metabolizan fácilmente los polímeros de peso molecular elevado que son muy abundantes en los restos vegetales muertos y por tanto son más eficientes en los estadios iniciales de la mineralización de las raíces muertas (Nakas y Klein, 1980). Tales características metabólicas justifican que las bacterias dependan de los exudados radicales y los hongos de las células de las raíces muertas.

La humedad del suelo influye en la composición y en los niveles de los materiales orgánicos que excretan las raíces (Martin, 1977). En situaciones de estrés hídrico aumenta la cantidad de carbono orgánico en el suelo que rodea la raíz. El incremento del aporte orgánico se refiere sobre todo a los materiales solubles en agua que proceden en primer lugar de la autólisis de las células de los tejidos radicales y en menor grado de la producción de mucílagos de peso molecular bajo (Martin, 1977), además la desecación del suelo afecta a la viabilidad de las raíces jóvenes que constituyen una fuente adicional de sustratos carbonados (Nakas y Klein, 1980).

Otros factores como la temperatura (Martin, 1977), la intensidad de la luz que incide sobre las plantas (Peterson, 1961), los tratamientos con productos químicos de uso agrícola (Hale y Moore, 1979), la acción abrasiva del medio telúrico (Kepert et al., 1979) y la disponibilidad de nutrientes, también alteran la naturaleza y la cantidad de los exudados radicales (Bowen, 1969). Graham et al. (1981) y Turner y Newman (1984) observan un aumento de la exudación de aminoácidos y azúcares a causa de los niveles muy bajos de fósforo, sin embargo Rovira y Ridge (1978) registran que la

deficiencia de fósforo reduce la liberación de compuestos carbonados en raíces de plantas jóvenes de trigo. Los niveles de nitrógeno, tanto en forma amoniacal como en forma de nitrato, y el pH influyen también en los exudados radicales (Huber y Watson, 1974).

1.5.1.2. Colonización de la rizosfera

La comunidad microbiana en esta región hipogea suele ser abundante, muy superior a la del suelo alejado de las raíces (Curl, 1982). Los datos experimentales son numerosos y en su mayoría registran valores para la relación R/S (densidad de bacterias en la rizosfera/densidad de bacterias en suelo sin raíces) que oscilan entre 2 y 25 (Azad et al., 1985), aunque en ocasiones son mayores de 100 (Bazin et al., 1990).

En la rizosfera se desarrollan poblaciones de organismos de vida libre, simbióticos y parásitos. La microflora telúrica comprende bacterias y hongos. Los hongos predominan en el suelo carente de raíces (Newman, 1985) y también en la biomasa del entorno radical (Shields et al., 1971) aunque en ocasiones las bacterias rizosféricas alcanzan una biomasa superior a la de origen fúngico (Newman, 1985). El aspecto más importante reside en el estado fisiológico y en el grado de actividad de los distintos tipos de microorganismos. Söderstrom (1977) determinó que solo entre el 1 y el 5% de la biomasa fúngica fue capaz de hidrolizar diacetato de fluoresceína, lo que representa una actividad baja y realza el papel de la población bacteriana en la rizosfera.

Los estudios ecológicos de la colonización microbiana indican que las bacterias se distribuyen irregularmente en el rizoplano en función del tipo de planta, del suelo y de las especies de microorganismos (Asanuma et al., 1979). Las

bacterias se unen a los polisacáridos o glicoproteínas de la superficie radical que constituyen una matriz delgada de fibrillas que engloba gran número de organismos (Elliot et al., 1979). Ligados a esta capa mucilaginosa los microorganismos se localizan de forma preferente en las uniones intercelulares (Bowen, 1979) y en los sitios de alta exudación recubriendo solo el 10% de la superficie radical (Bowen 1981). Sin embargo Bennet y Lynch (1981) observan microcolonias que se desarrollan por igual en la superficie de las células epidérmicas y en las zonas de contacto entre células.

Entre las rizobacterias (bacterias de la zona rizosférica) saprófitas predominan las Gram negativas y entre éstas Pseudomonas sp. (Alström, 1987), pero Achromobacter sp., Alcaligenes sp., Nocardia sp., Enterobacter sp. y Flavobacterium sp. están presentes en número elevado (Brown, 1972). La mayoría de las Pseudomonas aisladas del suelo rizosférico son Pseudomonas fluorescens (Burr y Caesar, 1984). Por el contrario en suelos sin raíces las bacterias más abundantes son las Gram positivas (Chan et al., 1963).

El efecto rizosfera influye en el tiempo de generación de las bacterias. Bowen y Foster (1978) observan que Pseudomonas sp. se reproducen en suelos sin raíces cada 77 h y Bacillus sp. sobrepasan las 100 h. En la interfase suelo-raíz Pseudomonas sp. tiene una generación cada 5.2 h y Bacillus sp. cada 39 h.

Mención especial requieren las simbiosis entre raíces y microorganismos fijadores de nitrógeno y entre raíces y micorrizas. En ambos casos las plantas representan la fuente de sustratos carbonados y obtienen a cambio un aporte significativo de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo. También se establece la simbiosis entre plantas noduladas con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico y

micorrizas (Azcon et al., 1979).

1.5.1.3. Interacciones entre los organismos en la rizosfera

Las interacciones entre los organismos que habitan en la rizosfera son complejas, reflejan la existencia de poblaciones muy dinámicas y heterogéneas e influyen en la densidad y diversidad de las poblaciones de bacterias en la comunidad rizosférica. A continuación citamos algunos ejemplos que aparecen en la bibliografía relativos a la gran variedad de interacciones que se pueden establecer en esta zona.

La actividad depredadora a cargo de los protozoos (Wiggins y Curl, 1979) que se observa en la rizosfera es por lo general intensa debido a la mayor densidad bacteriana y desempeña un papel importante en el control de las poblaciones de microorganismos. Entre *Bacillus* sp. y cianobacterias aparece un antagonismo mediado por la liberación de productos derivados del metabolismo bacteriano (Wright y Thompson, 1985). Chan et al. (1963) indican que ciertas bacterias liberan productos de su metabolismo que actúan como antibióticos para los microorganismos próximos. Dichos productos del metabolismo bacteriano pueden inhibir, favorecer o no afectar el desarrollo de los hongos en la rizosfera y este efecto depende de los hongos y bacterias que interaccionen. En experiencias de laboratorio Bowen y Theoderou (1979) encuentran que *Bacillus* sp. estimula la colonización de las raíces por *Telephora terrestris* e inhibe el crecimiento de *Pisolithus tinctorius*.

Los microorganismos de las rizosferas de plantas próximas interaccionan entre sí y la rizosfera de una planta puede influir en la de la otra. La microflora de la rizosfera de *Anthoxanthum* sp. inhibe la actividad de las micorrizas de

Trifolium sp., hecho este último muy importante, ya que las micorrizas en la interfase raíz-suelo alteran el crecimiento de la planta (Barea y Azcon, 1983). Sin embargo la población rizosférica de Lolium sp. no modifica la comunidad de la rizosfera de Trifolium sp. (Christie et al., 1978). Lawley et al. (1983) registran que el porcentaje de Bacillus spp. en la rizosfera de Lolium perenne L. desciende de forma significativa bajo la influencia de Trifolium repens L. y Plantago lanceolata L. Bennet y Lynch (1981) indican que en la interfase suelo-raíz de plantas de trigo, entre Curtobacterium sp. y Mycoplasma sp. se establece una competencia fuerte por los mismos nutrientes. Sin embargo cuando ambos microorganismos se inoculan en la rizosfera de plantas de maíz la población de Curtobacterium sp. aumenta de forma significativa, bien porque Mycoplasma sp. estimula el flujo de exudados radicales distintos a los que se excretan en ausencia de este microorganismo o bien porque Mycoplasma sp. elabora metabolitos que actúan como factores de crecimiento de Curtobacterium sp. Los mismos autores observan un efecto antagónico entre Pseudomonas sp. y Curtobacterium sp. en la rizosfera del trigo. Por lo tanto el efecto no solo depende de las especies microbianas en cuestión sino también de la especie vegetal, estableciéndose una relación recíproca.

Los exudados radicales son fuentes de nutrientes esenciales en las interacciones entre microorganismos como señalan Elad y Baker (1985), que observan que Pseudomonas sp. incrementa su acción inhibitoria sobre Eusarium sp. cuando aumentan los niveles de productos de origen radical. D'Arcy Lameta (1986) encuentra en los exudados radicales de la soja compuestos polifenólicos, isoflavonoides que se hallan a nivel rizosférico en una concentración de 10^{-7} a 10^{-6} M y que tienen un efecto importante sobre la microflora de la rizosfera. Uno de estos compuestos, el cumestrol, favorece en un 30% el crecimiento de Bradyrhizobium japonicum USDA 138 e

inhibe en torno al 20% el desarrollo de Pseudomonas sp. (D'Arcy Lameta y Jay, 1987). Este hecho supone que los rizobios sean más competitivos en proximidad al aparato radical (Kosslak et al., 1983) y que por tanto el proceso de nodulación se vea favorecido (Hossain y Alexander, 1984).

La microflora rizosférica incrementa la resistencia de la planta huésped a las alteraciones de origen patógeno y constituye un control biológico de la actividad de los parásitos que proliferan en la zona de contacto entre las raíces y el suelo (Burr y Caesar, 1984). Las bacterias pueden inducir la lisis de las hifas de algunos hongos patógenos como Gaeumannomyces graminis o como Phytophthora cinnamoni y en experiencias de laboratorio se ha observado que plantas de leguminosas noduladas con Rhizobium son más resistentes a Phytophthora megasperma que plantas sin nodular (Campbell, 1985).

El efecto de las rizobacterias (Suslow et al., 1979) sobre las plantas está unido a su capacidad de colonizar, sobrevivir y producir metabolitos activos como consecuencia de su desarrollo en asociación con las raíces. Pseudomonas sp. y Serratia sp. son las bacterias principales que inciden en el desarrollo de las plantas (Gerhardson et al., 1985). Pseudomonas sp. altera el crecimiento de las mismas e inhibe numerosos patógenos de las plantas (Burr y Caesar, 1984). Serratia sp. también dificulta el desarrollo de hongos patógenos (Sneh et al., 1985).

Muchos microorganismos rizosféricos pueden producir sustancias análogas a las hormonas de las plantas que actúan como factores de crecimiento (Beck y Gilmour, 1983). Ciertas bacterias producen y liberan etileno (Swanson et al., 1979) que se comporta como un factor importante del desarrollo de las plantas (Roberts y Tucker, 1985). Bacterias del género Azospirillum producen en la rizosfera de plantas de trigo

sustancias estimulantes del crecimiento diferentes al etileno (Kapulnik et al., 1985). En otras ocasiones las rizobacterias desprenden sustancias fitotóxicas que inhiben el crecimiento de las plantas (Fredrickson y Elliot, 1985). La cepa S241 de Pseudomonas fluorescens libera niveles elevados de HCN que dificultan el desarrollo del aparato radical de plantas de Lactuca sativa L. var. Sativa cv. Montana y de Phaseolus vulgaris cv. Bonita, que se manifiesta a los 28 días de cultivo en un descenso del peso seco de las plantas del 49.2 y del 52.9% respectivamente (Alström y Burns, 1989). Bolton y Elliot (1989) observan que Pseudomonas sp. produce en la rizosfera de Triticum aestivum L. una toxina que inhibe el sistema radical y su colonización por otros microorganismos. Las cepas RC1, B8 y NT15 de Pseudomonas sp. liberan una toxina que actúa selectivamente sobre las raíces de plantas diferentes (Fredrickson et al., 1987) y que presenta también una actividad antibiótica específica pues inhibe el crecimiento de Geotrichum candidum, Escherichia coli (C1A), Erwinia chrysantemi (W3CH1) y Pseudomonas solanacearum (PS108) pero no afecta a Bacillus subtilis y Pseudomonas syringae bv syringae (B301D) (Bolton et al., 1989). Este comportamiento puede suponer una ventaja competitiva en la colonización del rizoplasma de determinadas plantas.

La microflora de la interfase suelo-raíz interviene también en la disponibilidad y en la captación de nutrientes para las plantas (Powell, 1982).

1.5.1.4. Efecto rizosfera y microorganismos del ciclo del nitrógeno

El efecto rizosfera sobre los microorganismos que intervienen en las etapas del ciclo del nitrógeno exige una atención particular.

Las bacterias libres fijadoras de nitrógeno atmosférico aportan al medio edáfico cantidades importantes de nitrógeno por lo que constituyen un punto clave en la producción de los ecosistemas (Worthington, 1975). La interfase raíz-suelo es un lugar óptimo para el desarrollo de la microflora diazotrófica porque suministra abundantes sustratos carbonados que suponen una fuente esencial de energía para la actividad nitrogenásica. Arima y Yoshida (1982) observan mayor densidad microbiana en el entorno radical de especies como: *Sagittaria trifolia* L., *Oryza sativa* L. cv. Koshihikarsi, Coix Ma-Yuen Roman y *Juncus effusus* L. Otras asociaciones rizosféricas fijadoras de nitrógeno importantes son las estudiadas por Vlassak (1975) en bosques de zonas templadas, Döbereiner (1976), Krotzky et al. (1986), Rao y Venkateswarlu (1985), en gramíneas tropicales asociadas con *Azospirillum* sp., Beck y Gilmour (1983) en *Triticum aestivum* cv. Nugaines y Rao et al. (1984) en arroz.

De gran importancia son las asociaciones que estimulan la actividad diazotrófica en la rizosfera de 17 plantas pertenecientes a las familias: *Compositae*, *Rosaceae*, *Chenopodiaceae*, *Krameriaceae*, *Zygophyllaceae*, *Solanaceae*, *Oleaceae*, *Rutaceae*, *Liliaceae* y *Poaceae*, pues habitan en suelos pobres de zonas áridas de Norteamérica con contenidos bajos en sustratos para la microflora heterótrofa (Farnworth et al., 1978). También se ha detectado actividad nitrogenásica en la rizosfera de muchas plantas entre las que destacamos *Ammophila* sp. en Africa (Abdel Wahab, 1975) y *Eragrostis* sp. en Asia (Nioh, 1979).

El incremento de la actividad fijadora de nitrógeno atmosférico en la zona de contacto raíz-suelo no solo puede deberse a una mayor disponibilidad de sustratos carbonados sino también a la estimulación quimiotáctica del movimiento de las bacterias microaerófilas hacia las zonas bajo la influencia de las raíces, a causa del déficit de oxígeno

motivado por la respiración de las mismas (Brar, 1972) y al mayor contenido en agua del suelo en esta zona (Barak et al., 1983). Werner et al. (1982) y Krotzky et al. (1983) encuentran en la rizosfera ciertos compuestos orgánicos, algunos aromáticos, procedentes de la exudación radical que activan la nitrogenasa sin ser un sustrato. En la mayoría de los sistemas de fijación asociativa estudiados, el nitrógeno fijado por este mecanismo no representa una fuente significativa de nitrógeno para el desarrollo de las plantas en cuya rizosfera prolifera la población diazotrófica (Giller et al., 1988), pero supone una entrada importante para el ecosistema y contrarresta las pérdidas por lixiviado y desnitrificación (Campbell, 1985).

Las plantas en general actúan sobre la microflora edáfica mineralizante. Destacan los estudios realizados por Adams y Attiwill (1982) sobre la influencia de *Acacia dealbata* Link., *Eucalyptus regnans* P.Muell, *E. obliquata* L'Habit y *Pinus radiata* D. Don en la capacidad mineralizadora en suelos de bosque; por Robertson y Vitousek (1981) sobre los factores que regulan la nitrificación en la sucesión primaria y secundaria; por Vitousek et al. (1982) sobre la movilidad del nitrato y la nitrificación en ecosistemas de bosque, y por Turner y Franz (1985) sobre la nitrificación y la mineralización bajo el dosel de *Tsuga heterophylla* Sarg. y *Thuja plicata* D. Don.

Parece que en la rizosfera no se dan las condiciones idóneas para la nitrificación pues las concentraciones altas de sustancias de poder energético elevado favorecen los organismos heterótrofos que inmovilizan el nitrógeno. Se establece una competencia no solo entre la microflora heterótrofa y nitrificante sino también con las raíces por el amonio disponible en el suelo (Klemedtson et al., 1987a). Los efectos inhibidores de las raíces sobre la microflora que oxida el amonio y el nitrito han sido citados por varios

autores (Rice y Pancholy, 1972; Jordan et al., 1979; Montagnini y Buschbacher, 1989) y sin embargo hay datos de efectos favorables sobre la nitrificación en suelos de ecosistemas agrícolas (Molina y Rovira, 1963).

Las raíces afectan a la población desnitrificante al inducir cambios físicos y químicos en el suelo, en especial de las concentraciones de nitratos, oxígeno y carbono orgánico disponible (Klemedtson et al., 1987b). En general, en la interfase raíz-suelo se observa una disponibilidad baja de oxígeno como resultado de la respiración radical (Brar, 1972), de la densidad elevada de la microflora heterotrófa (Fillery, 1983) y del mayor contenido en agua del suelo (Barak et al., 1983). Por tanto, en estas condiciones los microorganismos desnitrificantes encuentran un ambiente idóneo para su desarrollo. Así Mikkelsen (1987) observa que se estimula la tasa de desnitrificación en la rizosfera del arroz. Además el hábitat rizosférico favorece la desnitrificación a través de la concentración mayor de compuestos carbonados y de nitratos (Smith y Tiedje, 1979). Woldendorp (1962) indica que los aminoácidos liberados por las raíces suponen un sustrato muy valioso para la microflora desnitrificante y Bailey y Beauchamp (1973) observan que la desnitrificación se eleva de forma significativa cuando se incuban suelos a los que se añaden macerados de maíz.

1.5.1.5. Efecto rizosfera de las plantas fijadoras de nitrógeno

La rizosfera de plantas noduladas fijadoras de nitrógeno atmosférico constituye un caso particular. Van Egeraat (1979) y Foster y Rovira (1978) registran una elevación, especialmente acusada en especies actinorrizas, del número de poblaciones microbianas y de la microflora total a medida que los recuentos se efectúan a menor distancia de la raíz.

Las plantas actinorrizas ejercen una influencia notoria sobre los microorganismos cercanos a sus raíces. Así, *Alnus rubra* Bong. estimula el crecimiento de *Streptomyces* sp., *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. e inhibe hongos fitopatógenos como *Poria weiri* y *Fomes annosus* (Bollen y Lu, 1968; Tarrant y Trappe, 1971), gracias a las excretas radicales ricas en compuestos nitrogenados, polifenoles, aminoácidos y taninos. Igualmente se ha visto que *A. incana* (L.) Moench favorece el crecimiento de los microorganismos amonificantes y nitrificantes en los bosques europeos (Danière et al., 1986). Bermúdez de Castro et al. (1984) indica que *A. glutinosa* (L.) Gaernt. estimula el desarrollo de la microflora nitrificante, y resultados similares se observan bajo *Myrica gale* L., que también favorece el crecimiento de los microorganismos proteolíticos, amonificantes, desnitrificantes y diazotróficos (Bermúdez de Castro y Gutiérrez Mañero, 1987).

En los nódulos de las plantas actinorrizas se han encontrado auxinas (Silver et al., 1966 y Dullart, 1970) y citoquininas (Bermúdez de Castro y Rodríguez-Barrueco, 1976 y Rodríguez-Barrueco et al., 1979) que se liberan al suelo y, junto con los productos nitrogenados que se desprenden en la necrosis nodular, pueden regular el equilibrio de las comunidades microbianas presentes en el hábitat rizosférico (Leaf et al., 1959). A su vez el consumo de oxígeno por parte de los microorganismos rizosféricos puede tener una importancia vital en el rendimiento de la fijación de nitrógeno, ya que, además de estimular la exudación de compuestos orgánicos, lo que en definitiva supone una pérdida de fotosintatos a nivel radical, se ha comprobado que los niveles de oxígeno en la rizosfera tienen una influencia decisiva sobre el ARA de las plantas fijadoras (Silvester et al., 1988), pues una restricción en el flujo de oxígeno del suelo hacia los nódulos trae como consecuencia una limitación para producir la energía necesaria para la fijación del

nitrógeno. El problema resulta difícil de estudiar ya que los nódulos parecen tener mecanismos adecuados para amortiguar cambios bruscos en la concentración de O_2 y adecuar el rendimiento de la cadena de transporte electrónico al oxígeno disponible, de manera que el rendimiento de la nitrogenasa permanecería a largo plazo más o menos constante. Estos estudios sugieren la importancia que el ambiente rizosférico tiene sobre la fijación simbiótica de nitrógeno.

1.5.2. Deposición de restos vegetales

Los restos vegetales representan la entrada de energía más importante para la microflora telúrica en numerosos hábitats (Struwe y Kjoller, 1986).

El estudio de los materiales orgánicos de origen vegetal refleja la existencia de compuestos muy variados, de complejidad dispar y con grados distintos de labilidad a la acción mineralizadora de los microorganismos edáficos. Haider (1986) indica que la microflora del suelo mineraliza alrededor del 60-70%, e incluso más, de los sustratos orgánicos depositados por las plantas en el intervalo de un año. La descomposición está controlada por factores diversos (Sharma y Ambasht, 1987), pero la naturaleza de la fuente de sustratos influye de forma significativa en el proceso degradativo (Berg y Staaf, 1980). Los residuos vegetales que contienen lignina en proporción elevada se descomponen con lentitud (Schwintzer, 1984). Los taninos muestran un grado muy elevado de resistencia a la actividad degradativa de la microflora telúrica por lo que se acumulan en los suelos (Rice, 1979). Lignina, taninos y, en general, los compuestos polifenólicos que se encuentran en los restos vegetales caídos al suelo son importantes porque inciden sobre la actividad de los microorganismos edáficos. En particular Olson y Reiners (1983) observaron que los compuestos

polifenólicos inhiben la actividad nitrificante.

La deposición de hojas y de otros restos vegetales de las plantas que fijan nitrógeno supone una fuente de energía y nutrientes esencial para el desarrollo de la microflora heterótrofa del suelo así como una vía de entrada de nitrógeno de gran relieve para el ecosistema, sobre todo porque este macronutriente se libera en las primeras semanas de descomposición (Berg y Staaf, 1981). Para Hunt et al. (1988) el lecho de hojarasca regula la tasa de mineralización y por ello incide en la producción primaria de los ecosistemas. Franklin y Waring (1980) calculan que las cantidades de fragmentos de troncos caídos al suelo en bosques de coníferas puede exceder de $500 \text{ t ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ y alcanzar entre el 10 y el 25% de la biomasa total. Sin embargo estos fragmentos se descomponen con lentitud a causa de la proporción tan baja en nutrientes como nitrógeno y fósforo (Cowling y Merrill, 1966). Woodmansee et al (1978) encuentran, al analizar la distribución del nitrógeno en un pastizal semiárido, que los restos de plantas depositados en el lecho de hojarasca y las raíces muertas contenían el 6.5% del nitrógeno total.

Las características abióticas y bióticas del sustrato edáfico influyen en la descomposición de las hojas caídas. Aranda et al. (1990) observan que el cociente C/N desciende durante el proceso degradativo del lecho de hojarasca de tres choperas de *Populus nigra* L. y encuentran diferencias en la riqueza de nutrientes de la hojarasca según el microclima, pues la variabilidad y la cantidad de los micronichos donde compiten las comunidades microbianas edáficas inciden en la tasa de degradación de las hojas caídas en la superficie del suelo.

Silvester (1977) realiza una revisión de trabajos de diversos autores, en los que aparecen datos sobre los niveles

de nitrógeno en hojas de plantas actinorrizas y de otros árboles asociados. Las hojas caídas de especies europeas, americanas y asiáticas de *Alnus* contienen por lo general porcentajes dobles de nitrógeno que las hojas caídas de otras especies como *Betula* sp, *Tilia cordata* Miller, *Acer platanoides* L., *Corylus avellana* L., *Pinus silvestris* L., *Picea* sp. y *Tsuga* sp. Otra planta actinorriza *Myrica gale* L. contiene en torno al 1.69% de nitrógeno (Schwintzer, 1984), que supone una riqueza inferior a la de *A. glutinosa* (Bocock, 1964) y semejante a la de *A. rubra* (Edmons, 1980). Mientras que la degradación completa de las hojas de aliso se realiza en menos de un año (Danière et al., 1986), la descomposición de las hojas de *M. gale* es más lenta debido a su elevada proporción de lignina. El contenido en nitrógeno total del lecho de hojarasca de ciertas plantas actinorrizas proporciona valores de 30-157 kg de nitrógeno ha⁻¹ año⁻¹ en *A. rubra* Bong., 183 kg ha⁻¹ año⁻¹ en *Elaeagnus orientalis* y 290 kg ha⁻¹ año⁻¹ en *Casuarina littoralis*. El aporte de nitrógeno por estas vías en suelos donde las plantas actinorrizas aparecen como dominantes es considerable. A continuación se mencionan algunos ejemplos y las cantidades de nitrógeno que proporcionan: *Alnus* 36-325 kg N ha⁻¹ año⁻¹; *Coriaria*, 192; *Hippophae*, 56-197; *Casuarina*, 58; *Ceanothus*, 60-140; *Dryas*, 12 (datos recopilados por Bermúdez de Castro, 1981). Otra especie actinorriza, *M. gale* aporta entre 9 y 34 kg N ha⁻¹ año⁻¹ (Bond, 1951; Schwintzer, 1979) y *Elaeagnus angustifolia* L. 34.5 kg N ha⁻¹ año⁻¹ (Bermúdez de Castro et al., 1990).

Esta circunstancia se refleja también en el agua de lluvia, que al lavar las superficies externas de las zonas aéreas de las plantas, arrastra nutrientes hacia el suelo. El agua de lluvia que ha lavado hojas, ramas y troncos de aliso contiene de dos a diez veces más nitrógeno que el agua caída lejos de los árboles (Bollen y Lu, 1968).

Las características abióticas y bióticas del sustrato edáfico influyen en la descomposición de las hojas caídas. Aranda et al. (1991) observan que el cociente C/N desciende durante el proceso degradativo del lecho de hojarasca de tres choperas de *Populus nigra* L. y encuentran diferencias en la riqueza de nutrientes de la hojarasca según el microclima, pues la variabilidad y la cantidad de los micronichos donde compiten las comunidades microbianas edáficas inciden en la tasa de degradación de las hojas caídas en la superficie del suelo.

1.6. Objetivos y plan de trabajo

Como se ha explicado en los apartados anteriores, la interacción entre el sustrato edáfico y las plantas actinorrizas inducen alteraciones en las comunidades microbianas que intervienen en el ciclo del nitrógeno.

Con el fin de alcanzar una comprensión mayor de dichos procesos el presente trabajo se sumariza en los puntos siguientes:

1. Estudio del efecto que induce *A. glutinosa* L. (Gaertn.) sobre las variables físico-químicas que caracterizan la dinámica de los compuestos orgánicos nitrogenados en el suelo.

2. Estudio del efecto que induce *A. glutinosa* L. (Gaertn.) sobre la densidad y actividad biológica de las comunidades proteolítica, amonificante, nitrificante nitrosa y nitrificante nítrica.

3. Estudio del efecto rizosfera de *A. glutinosa* L. (Gaertn.) sobre las variables físico-químicas, los grupos

fisiológicos de microorganismos antes citados y la densidad de la microflora total.

4. Estudio del efecto rizosfera de plantas de *A. glutinosa* L. (Gaertn.) en estado arbustivo y en estado arbóreo sobre las variables abióticas y las comunidades de los microorganismos referidos.

5. Estudio de la variación estacional de las variables físico-químicas y de los microorganismos que transforman los compuestos orgánicos nitrogenados en formas de nitrógeno inorgánico asimilable por las plantas.

Para constatar estos apartados el plan de trabajo incluye el análisis en muestras de suelo de las variables físico-químicas, de la densidad de la microflora total, de la densidad y actividad biológica de los microorganismos proteolíticos, amonificantes, nitrificantes nitrosos y nitrificantes nítricos.

Con el fin de evaluar el efecto de los alisos y de su estado de desarrollo se recogieron las muestras de suelo en una aliseda poblada por ejemplares arbustivos y árboles, y como controles de referencia en una chopera y en un bosque con numerosos sauces, así como en dos zonas libres de vegetación arbórea.

El muestreo se realizó bajo dosel, en la rizosfera y en el rizoplano de las plantas para determinar el papel de las raíces.

Las muestras se recogieron en las cuatro estaciones del año a fin de observar la variación estacional.

MATERIALES Y METODOS

2.1. Características generales de la zona de muestreo

El estudio que recoge esta Memoria se realizó en un bosque de *Alnus glutinosa* L. (Gaertn.) situado en la ribera del río Sorbe, cerca de su desembocadura en el Henares, en el término municipal de Humanes (Guadalajara), coordenadas UTM 30TVL882217 (figura 2.1.).

2.1.1. Geología

La zona de estudio se encuadra en una extensa área de relleno del Mioceno, donde la erosión de las aguas dismanteló el nivel de las calizas pontienses, que de manera excepcional se conserva en forma de cerros testigos (Cerro de la Muela, Cerro del Colmillo, etc.).

La litología típica la constituyen los yesos y margas yesíferas del Mioceno Sarmatiense y del Oligoceno, sobre todo, que se entremezclan en un paisaje de lomas, que en algunas situaciones más abruptas es interrumpido por conglomerados, areniscas, yesos y calizas del Oligoceno.

La representación del Cuaternario, comprende distintos niveles de terraza y diluvios a lo largo del Henares y sus afluentes.

2.1.2. Edafología

Sobre terrenos del Oligoceno se distinguen dos situaciones definidas: la primera sobre el Oligoceno Inferior, en la que, a partir de margas yesíferas, se han

desarrollado Entisols y la segunda, sobre el Oligoceno Superior, formado por areniscas y margas yesosas coronadas por calizas duras con fuerte buzamiento, que han dado lugar a Inceptisols asociados con Entisols.

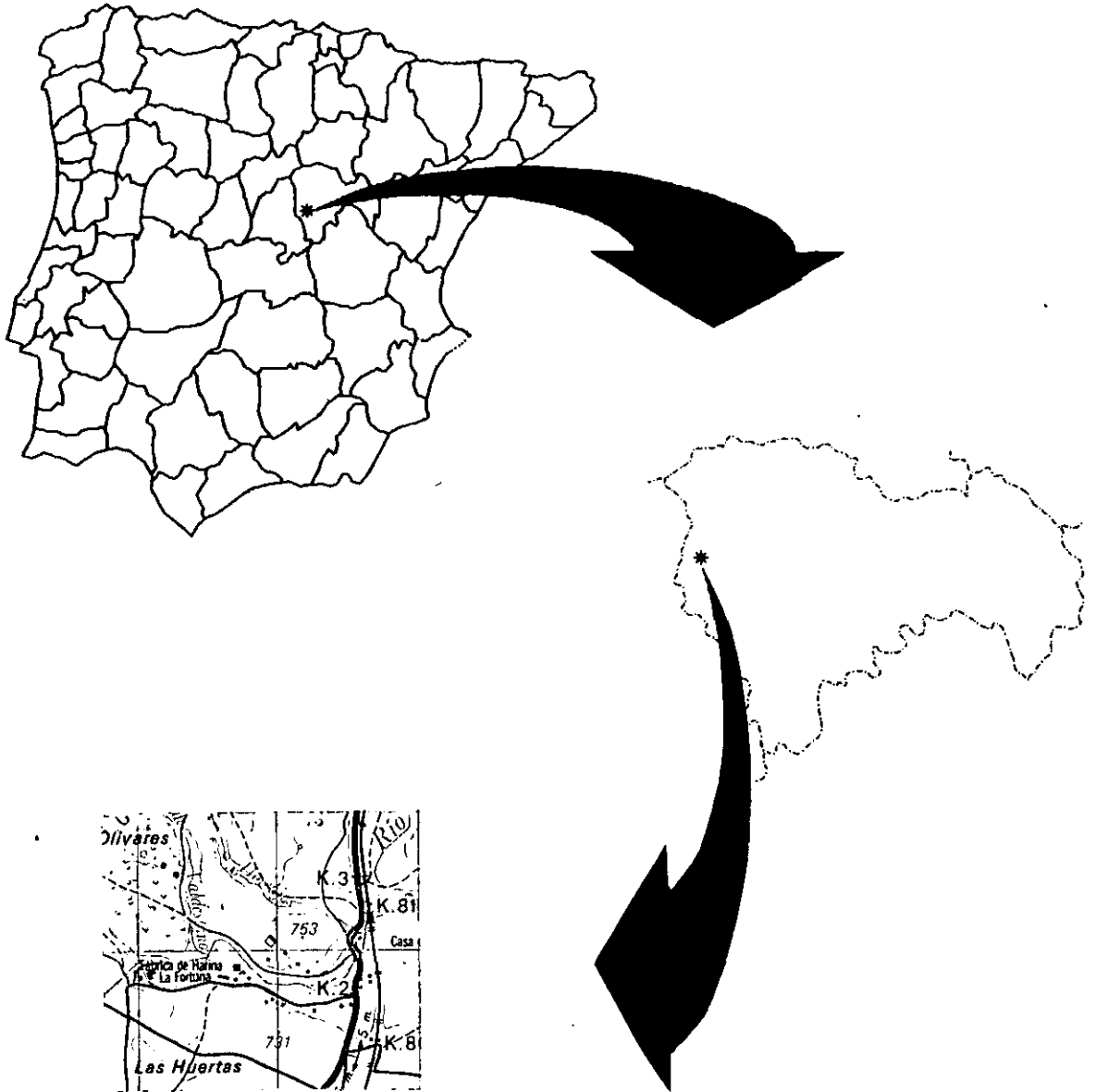


Fig. 2.1 Situación del área de estudio

En los valles y en las primeras terrazas de los ríos son frecuentes los suelos formados sobre sedimentos fluviales de gran heterogeneidad. Tales suelos, en general poco evolucionados se clasifican como Xerofluvents (Ministerio de Agricultura, 1977b).

En general son suelos que han sufrido una amplia desintegración química, con formación de arcillas ilíticas y caoliníticas, por lo que su capacidad de cambio es realmente baja. Estas arcillas suelen estar saturadas por iones calcio y también puede darse el caso, por especiales condiciones topográficas, que se presenten arcillas montmorilloníticas de neoformación, lo que implica una variabilidad sustancial en el valor agronómico de estos suelos (Mapa de Suelos de la Provincia de Guadalajara, 1970).

2.1.3. Hidrografía

El principal río que recorre el Noroeste de Guadalajara es el Henares, que próximo a Humanes entrega sus aguas al canal del mismo nombre. En este área los cursos de agua presentan un régimen pluvial con un estiaje en verano muy acusado, quedando muchos de ellos prácticamente secos en dicho periodo (Ministerio de Agricultura, 1977a). En la zona de muestreo esto no ocurre pues el caudal del río Sorbe, afluente del Henares, está regulado por una presa situada aguas arriba.

El río Sorbe es el más sinuoso de la red hidrológica del Tajo y el de máxima pendiente. Por su anchura media de 10.9 m se considera como un río estrecho (Catalán, 1965). En su curso alto es de carácter torrencial y en su zona media va encajonado abriéndose camino por pizarras y arcillas

silúricas. En las cercanías de la desembocadura discurre por un paisaje de parameras, a través de un cuaternario diluvial cuyos materiales remueve fácilmente.

2.1.4. Clima

Según Forteza del Rey en su libro "Caracterización Agroclimática de la Provincia de Guadalajara" (1981), esta zona se encuentra prácticamente en la isolinia que delimita un clima mediterráneo templado y un clima mediterráneo continental templado. El régimen de humedad, la duración, intensidad y situación estacional del periodo seco, lo califican como mediterráneo seco.

Las características climáticas de la región Noroeste de Guadalajara se exponen en la tabla 2.1 y el diagrama climático de la estación de Humanes aparece en la figura 2.2.

Tabla 2.1. Características climáticas de la zona de muestreo (Forteza del Rey, 1981)

Temperatura media anual.....	13°C
Temperatura media del mes más frío.....	4°C
Temperatura media del mes más cálido.....	23°C
Duración media del periodo frío.....	6 meses
Duración media del periodo cálido.....	2 meses
Duración media del periodo seco.....	4 meses
Precipitación media anual.....	458.3 mm
Precipitación media otoño.....	134.3 mm
Precipitación media invierno.....	137.0 mm
Precipitación media primavera.....	130.9 mm
Precipitación media verano.....	56.1 mm
Evapotranspiración potencial media anual.....	825.2 mm
Evapotranspiración potencial media otoño.....	178.4 mm
Evapotranspiración potencial media invierno....	31.1 mm
Evapotranspiración potencial media primavera..	167.6 mm
Evapotranspiración potencial media verano.....	448.2 mm

2.1.5. Vegetación

Según los autores del Mapa de Cultivos y Aprovechamientos de Jadraque (1977) en el término municipal de Humanes se pueden distinguir zonas con diferentes utilidades: labor intensiva sin arbolado (barbecho blanco), mosaico de labor y viñedo, mosaico de labor y matorral, labor intensiva con arbolado de encina, olivar, viñedo, mosaico de olivar y matorral, pastizal, pastizal-matorral, matorral, matorral con arbolado de encina y choperas de ribera acompañadas frecuentemente por *Salix* sp., *Fraxinus angustifolia* Vahl y *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.

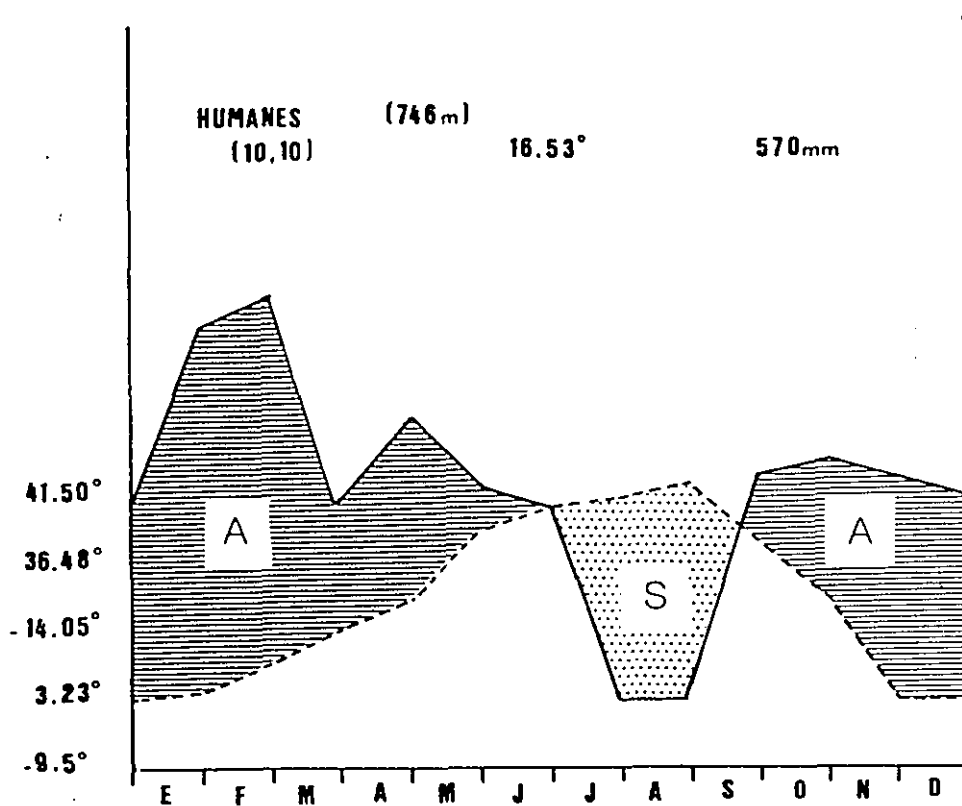


Fig. 2.2 Diagrama climático de la zona de Humanes (Forteza del Rey, 1981)

La vegetación natural de la comarca que recoge el área de estudio es típica de la formación Durilignosa (bosques esclerófilos) con características más o menos continentales y se encuadra sintaxonómicamente en la serie mesosupramediterránea de la encina (*Junipero oxycedri-Querceto rotundifoliae sigmetum*). Sin embargo en los márgenes de los ríos el curso de agua y en menor grado el clima general de la región condicionan la existencia de geoserias riparias. En el contexto de esta geoserie, la vegetación de las orillas del río Sorbe a su paso por el término de Humanes responde a la serie supramediterránea riparia del aliso (*Galio broteriani-Alneto glutinosae sigmetum*) que se caracteriza porque la clímax edáfica es una formación silvática umbrosa, caducifolia, riparia e higrofítica en la que domina el aliso (*A. glutinosa*) y que la mayoría de las veces está junto a agrupaciones de sauces (*Salix* sp.). La serie destaca también por la presencia de *Galium broterianum* Baiss. & Reuter que se extiende por los márgenes del cauce de agua (Fuente, 1985). Entre sus etapas seriales se puede encontrar el zarzal higrófilo (*Rubo-Rosetum corymbiferae franquletosum alni*) que cubre grandes superficies.

2.2. Zona de muestreo

Es un área próxima al núcleo urbano de Humanes que tiene por eje central el río Sorbe. Está rodeada de terrenos de labor y delimitada al este por la carretera local que comunica Humanes con Cogolludo, al oeste por una fábrica de harina abandonada, al norte por una zona antropomorfizada con urbanizaciones de casas de campo y al sur por una pista que delimita los terrenos de labor (figura 2.3).



Fig. 2.3 Demarcación de la zona de muestreo

En este tramo del río Sorbe se diferencia una aliseda plenamente establecida como ripisilva monoespecífica que se extiende desde la fábrica de harina hasta el puente de la carretera local Humanes - Cogolludo y constituye la zona 1 (Z 1) del muestreo (figura 2.4). La aliseda es un bosque en galería de árboles de altura media de 19 m, con una circunferencia media a 1.30 m de 57 cm, edad que oscila entre los 17 y 22 años y una densidad de 0.7 árboles/m. Sobre un sustrato de textura franco-arenosa (65.8 % de arena, 21.0 % de limo y 13.2 % de arcilla), junto con los alisos, aparecen

diversas herbáceas, anuales y vivaces, entre las que destacan por su presencia mayor: *Urtica urens* L., *Scirpus holoschoenus* L., *Geranium robertianum* L., *Mentha suaveolens* Ehrh., *Rubus ulmifolius* Schott., *Brachypodium sylvaticum* (Huds.) Beauv., *Daphne gnidium* L., *Solanum dulcamara* L., *Poa nemoralis* L. y *Gallium broterianum* Baiss. & Reuter.

La continuidad de la aliseda se interrumpe en pequeños claros debidos a la deforestación y por la presencia de una mancha de 40 m de longitud de *Phragmites communis* Trim y *Typha latifolia* L. que también aparece en la lengua de río que separa la orilla derecha de una isla poblada por matorrales de aliso que surgieron espontáneos a partir de semillas traídas por el agua y el viento y ocupan una extensión de 93 m de longitud y 20 m de ancho, que representa la zona 2 (Z 2), con un suelo franco-arcillo-arenoso (47.4 % de arena, 28.9 % de limo y 23.7 % de arcilla). La edad de las plantas oscila entre 5 y 8 años, la altura media es de 3 m y la circunferencia media a 1.30 m es de 16 cm. Entre los matorrales de aliso crecen *Scirpus holoschoenus* L., *Geranium robertianum* L., *Lotus corniculatus* L., *Melilotus alba* Medicus y *Trifolium repens* L., como especies de mayor cobertura.

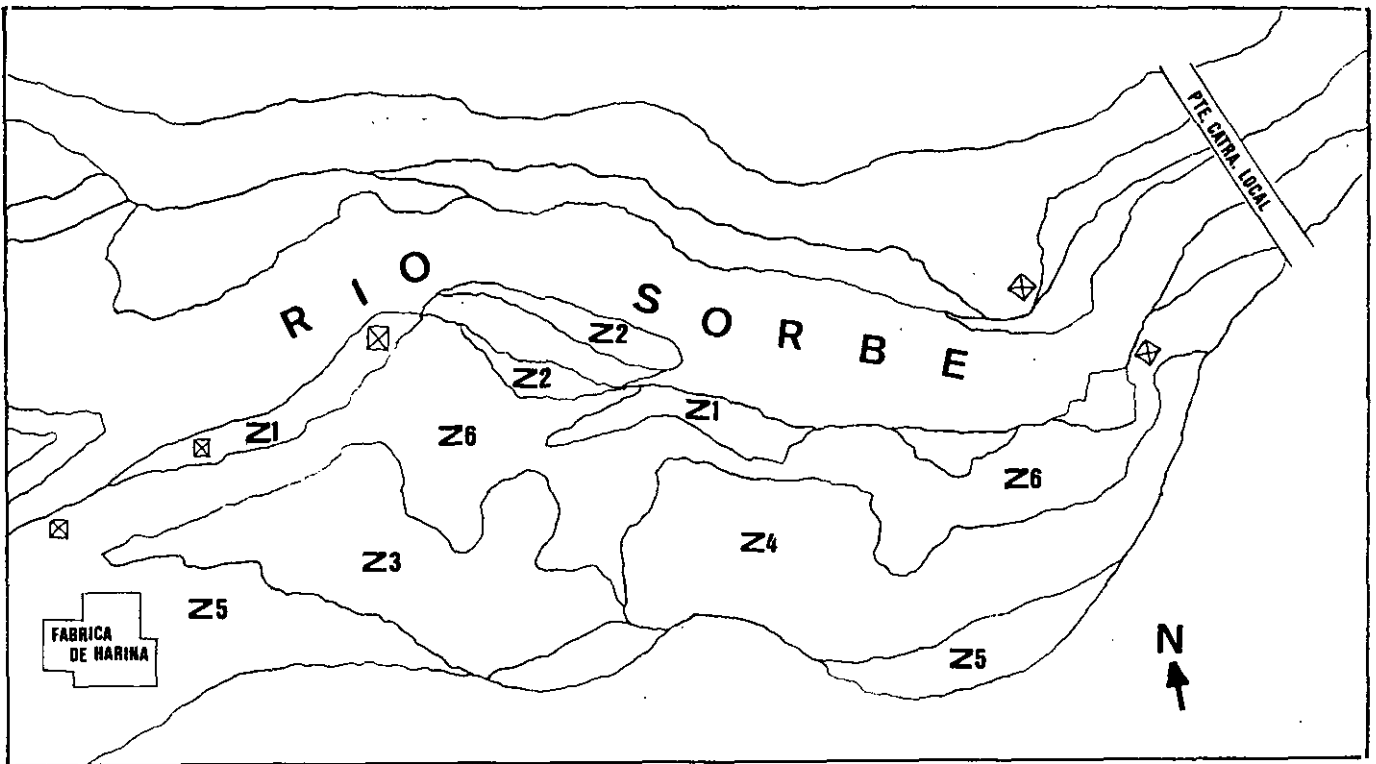
En los alisos, tanto viejos como jóvenes, se observaban nódulos en buen estado y con actividad nitrogenásica.

Cercano a los alisos más jóvenes, aunque separado por un terreno sin árboles, se extiende un bosquete de chopos clónicos (*Populus x hybrida* Moench I-214 clónico) constituido por ejemplares de 6 a 8 años de edad, entre 5 y 6 m de altura, con una circunferencia media a 1.30 m de 18 cm y una densidad de 0.4 árboles/m². Es la zona 3 (Z 3) que alcanza los 44 m de anchura y los 116 m de longitud, con textura franco-arenosa (arena 65.8 %, limo 18.4 % y arcilla 15.8 %).

Entre los chopos se observan ejemplares de *Bromus diandrus* Roth, *Poa pratensis* L., *Avena sterilis* L., *Solanum dulcamara* L., *Plantago major* L., *Sanguisorba* *minor* Scop., *Galium broterianum* Baiss. & Reuter, *Geranium robertianum* L., *Trifolium pratense* L., *Vicia sativa* L. y *Ononis natrix* L..

En el tramo próximo a la carretera local alternan los alisos con chopos (*Populus alba* L.), chopos clónicos (*Populus x hybrida* Moench I-214 clónico), sauces (*Salix alba* L.) y fresnos (*Fraxinus angustifolia* Vahl) que conforman un bosque denso silvático y umbrío donde predominan los sauces. Además aparecen con gran cobertura, zarzales de *Rubus ulmifolius* Schott. En menor medida se encuentran *Crataegus monogyna* Jacq., *Climatis vitalba* L., *Rosa* sp., *Senecio vulgaris* L. y *Poa nemoralis* L. El suelo del bosque, zona 4 (Z 4), es de textura franco-arenosa (57.9 % de arena, 26.3 % de limo y 15.8 % de arcilla) y tiene un contorno irregular con 150 m de longitud y 40 m en la zona más ancha que disminuye hacia los extremos y desaparece a 50 m del puente que cruza la carretera local.

En la zona sur se observa un desmonte en ladera sobre la terraza fluvial que se extiende de oeste a este en paralelo al cauce del río y delimita la región arbolada que comprende las cuatro zonas antes descritas. La ladera representa la zona 5 (Z 5) de suelo franco-arcillo-limoso (con 13.4 % de arena, 47.0 % de limo y 39.6 % de arcilla), carece de árboles y esta dominada por vegetación de terófitos: *Bromus ramosus* Hudson (Zerna r.), *Lolium* sp.; caméfitos como *Thymus mastichina* L. y nanofanerófitos: *Daphne gnidium* L., *Osyris alba* L. y *Refama spherocarpa* (L.) Boiss.. En algunos puntos la flora de la chopera asciende por la ladera encontrándose rodales densos de *Scirpus holoschoenus* L. y de *Rubus ulmifolius* Schott.



- | | |
|-----------------------|---------------------|
| Z 1 Aliseda arbórea | Z 4 Saucedá |
| Z 2 Matorral de aliso | Z 5 Ladera |
| Z 3 Chopera | Z 6 Pastizal húmedo |

Fig. 2.4 Localización de las zonas de muestreo

Entre los matorrales de aliso y el bosque de chopos se encuentra un área, zona 6 (Z 6), que discurre en paralelo al cauce del río a lo largo de 230 m y de anchura irregular que en su punto máximo llega a los 25 m mientras que en la zona más estrecha se extiende 10 m. Es un suelo franco-arenoso (73.7 % de arena, 15.8 % de limo y 10.5 % de arcilla) donde se desarrolla un pastizal húmedo de composición florística análoga al sotobosque de la chopera. Además aparecen otros elementos como *Genista scorpius* (L.) DC. e *Hypericum perforatum* L.

Las seis zonas definidas se indican en la figura 2.4.

2.3. Recogida y preparación de las muestras

Las muestras se recogieron entre el otoño de 1985 y el verano de 1986. Para ello se eligieron las épocas más representativas de las cuatro estaciones del año en función de los datos climatológicos de la región en los últimos años.

El área de estudio descrita se dividió en las seis zonas citadas donde se recogieron las muestras que se usaron en los análisis físico-químicos y microbiológicos.

Las seis zonas se dividieron en cinco subzonas. En cada subzona de Z 5 y Z 6 se recogieron aleatoriamente cuatro fracciones de tierra. En las subzonas con árboles se eligió uno al azar (en la zona cuarta solo se consideraron los sauces) y se recolectaron las fracciones del rizoplano, de la rizosfera y del dosel orientadas en los cuatro puntos cardinales (figura 2.5).

Para realizar el muestreo de las zonas 5 y 6 y del dosel de los árboles se procedió a retirar la capa superficial de hojarasca con una azada previamente flameada a fin de mantener las condiciones asépticas. Posteriormente en los 15 primeros centímetros se recolectaron las cuatro fracciones de suelo que se trasladaron al laboratorio en bolsas de plástico nuevas conservadas entre 0 y 4°C. En el laboratorio se mezclaron las cuatro fracciones de cada subzona para constituir una réplica y homogeneizar las muestras. Por ello en todas las zonas se dispuso de cinco réplicas para confrontar los resultados mediante las pruebas estadísticas

que se describen posteriormente.

En las muestras de la rizosfera se procedió de forma similar, las raíces se recogieron al azar en los 15 cm primeros y según el método de Lawley et al. (1983) se agitaron para desprender el suelo adherido y luego se lavaron con agua estéril. El rizoplaneo se recolectó, una vez obtenidas las muestras de la rizosfera, mediante agitación magnética durante 20 minutos de 10 g de raíces en 100 ml de agua destilada y estéril con 25 g de perlas de vidrio de 2 mm de diámetro (Sivasithamparam et al., 1979).

Las muestras destinadas a los análisis físico-químicos, excepto las fracciones en que se determinaron la textura y la humedad, se secaron a 55°C a fin de evitar pérdidas significativas de nitrógeno inorgánico, se tamizaron luego por una malla de 2 mm y se almacenaron en frigorífico entre 2 y 4°C en recipientes de vidrio con cierre hermético. El análisis microbiológico de las mismas muestras se realizó con fracciones de suelo que se extendieron sobre papeles de filtro hasta su completo secado. Después se tamizaron por mallas de 2 mm y 0.2 mm de luz. Se almacenaron en recipientes de vidrio cerrados con algodón entre 2 y 4°C, pero en ningún caso se conservaron más de 72 h en el refrigerador.

2.4. Análisis físico-químicos

Se determinaron humedad, pH, nitrógeno total, amonio, nitrato, carbono orgánico y textura.

2.4.1. Medida de la humedad de las muestras

Se realizó por el método gravimétrico. Las muestras de tierra destinadas a este fin se trasladaron al laboratorio en recipientes herméticos. Posteriormente, se pesaron en balanza de tres cifras decimales y se secaron en estufa a 110°C. Después se volvieron a pesar en días sucesivos hasta la obtención de una pesada constante.

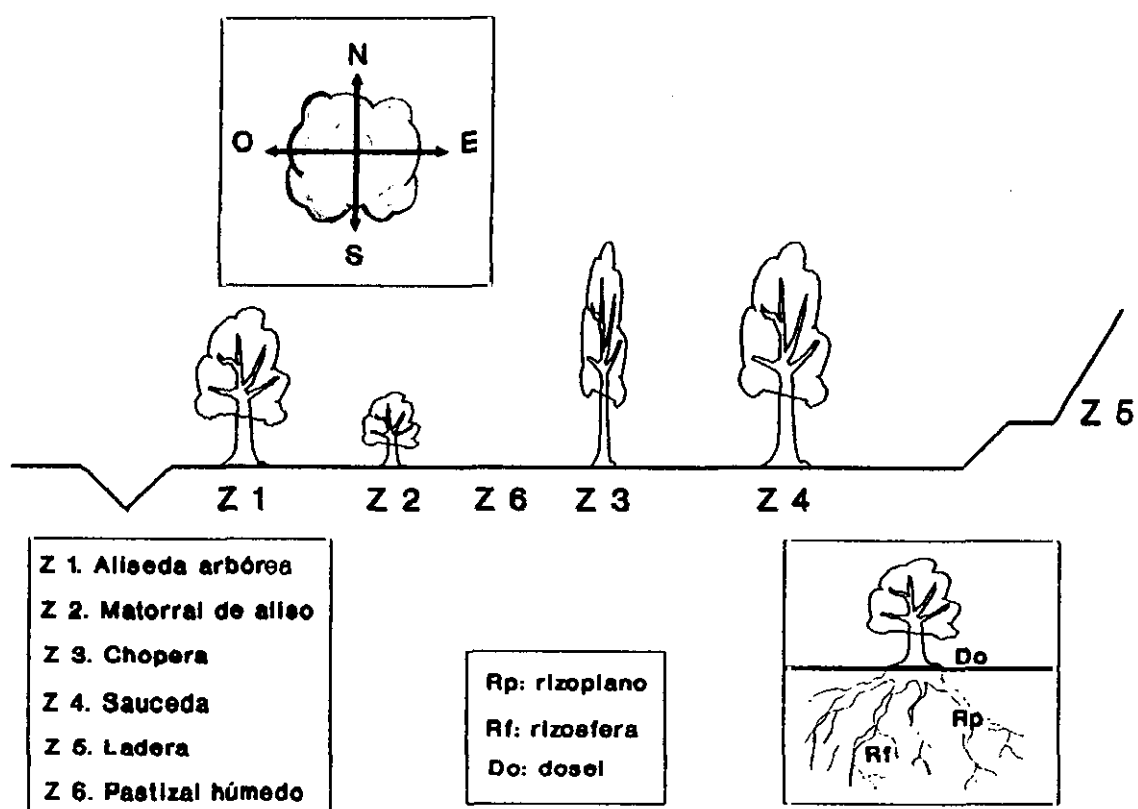


Fig. 2.5 Localización de las muestras respecto al sistema radical de las plantas

2.4.2. Medida del pH

Se realizó frente a agua destilada. Se mezclaron 20 g de tierra y 20 ml de agua destilada por agitación vigorosa durante 20 minutos. Después se midió con un peachimetro CRISON digit 501 provisto de un electrodo combinado de vidrio modelo Radiometer GK 2401 C.

2.4.3. Determinación del nitrógeno total

Se realizó la digestión de las muestras de suelo según el método de Kjeldhal (1883) y a continuación se evaluó el ión amonio producido.

La muestra de suelo se secó en horno a 55°C hasta peso constante en las tres primeras cifras decimales. A 0.2 g de la muestra de suelo se añadieron 25 ml de H₂SO₄ concentrado y 10 g de catalizador (K₂SO₄ y CuSO₄, 15:0.5). La mezcla se mantuvo a 500°C durante 1 h para que el ácido oxidara los distintos componentes y todo el nitrógeno de la muestra pasara a (NH₄)₂SO₄. Una vez frío se extrajo 1 ml del líquido digerido y se diluyó con 45 ml de agua destilada. Se añadieron 5 ml de NaOH 10 M y se agitó para facilitar la sustitución del amonio. El amonio liberado se determinó con un electrodo específico, modelo ORION 95-10-00 conectado a un mv/pHmetro CRISON digit 501.

Los datos obtenidos se llevaron a una recta patrón con el fin de transformarlos en unidades de nitrógeno total. La recta patrón se trazó a partir de diluciones sucesivas de una solución estándar de 100 ppm de NH₄Cl. Los valores correspondientes se ajustaron a una recta por el método de

los mínimos cuadrados.

2.4.4. Determinación del nitrógeno amonio

El método utilizado fue similar al descrito en el apartado anterior, aunque en este caso no se realiza la digestión previa de las muestras.

Se partió de 5 g de suelo a los que se añadieron 45 ml de agua destilada y 5 ml de NaOH 10 M. La mezcla se agitó y el amonio liberado se determinó con un electrodo específico para este ión, modelo ORION 95-10-00 conectado a un mv/pHmetro CRISON digit 501.

También se trazó una recta patrón a partir de diluciones sucesivas de una solución estándar de 100 ppm de NH_4Cl como fuente de amonio. Los valores correspondientes se ajustaron a una recta por el método de los mínimos cuadrados.

2.4.5. Determinación del nitrógeno nitrato

Se utilizó el método de Milham et al. (1970). Se basa en el empleo de una solución extractora del ión nitrato.

Se tomaron 4 g de suelo y se disolvieron en 20 ml de solución extractora. Mediante agitación vigorosa durante 20 minutos se consigue que los nitratos contenidos en la muestra difundan hacia el medio acuoso. La solución se dejó sedimentar y se procedió a medir el nivel de nitrato.

Se empleó, como en los casos anteriores, un mv/pHmetro CRISON digit 501 provisto de un electrodo específico para

nitrate ORION 93-07-00 y de un electrodo de referencia 90-02-00.

La recta patrón se realizó a partir de diluciones sucesivas de una solución estándar de 200 ppm de KNO_3 en solución extractora. Los valores obtenidos se ajustaron a una recta por el método de los mínimos cuadrados.

La composición de la solución extractora es la siguiente:

$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$	16.66 g
H_3BO_3	1.24 g
Ag_2SO_4	4.67 g
$\text{NH}_4\text{SO}_3\text{H}$	2.43 g
Agua destilada.....	1000.00 ml

2.4.6. Determinación de carbono orgánico

Se utilizó el método de Walkley y Black (1934) modificado. Se basa en la oxidación del material del suelo fácilmente oxidable con dicromato potásico. La muestra de suelo se trató con exceso de oxidante y la proporción gastada del mismo se determinó por retroceso con una solución valorada de sal ferrosa.

A 1 g de tierra secada previamente en estufa a 55°C hasta pesada constante en las tres primeras cifras decimales se le incorporaron 15 ml de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1 N y 20 ml de H_2SO_4 concentrado, agitando la mezcla durante un minuto para dejarla reposar después durante 30 minutos. A continuación se diluyó la solución con 200 ml de agua destilada, con el objeto de facilitar la observación del punto final de la titulación. Se añadieron 25 ml de H_3PO_4 al 50% (v/v) para hacer más patente el viraje y 20 gotas de difenilamina

sulfúrica como indicador y se valoró con FeSO_4 0.5 N por retroceso.

Simultáneamente se realizó una prueba control sin suelo y con los mismos reactivos, a fin de considerar también los productos oxidantes de los reactivos.

El porcentaje de carbono orgánico de la muestra de suelo se obtuvo teniendo en cuenta que 1 ml de la solución de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ equivale a 0.003 g de carbono y que el método es efectivo en un 75%, por lo cual el factor de corrección al 100% es 1.33 (García, 1981).

2.4.7. Textura

La textura del suelo se determinó por el método Bouyoucos, basado en la dispersión de las partículas en un medio líquido, utilizando una solución acuosa de metafosfato sódico y carbonato sódico en concentración suficiente para obtener una concentración 0.5 N de sodio. Previamente la materia orgánica de la muestra se elimina con peróxido de hidrógeno, filtración y lavado con agua. Mediante el densímetro de Bouyoucos se comprueba la densidad de la suspensión a determinados tiempos y aplicando la ecuación de Stokes se obtiene el diámetro de las partículas sedimentadas (Day, 1965).

2.5. Estudio de la densidad microbiana

Se estudiaron por el método de las suspensiones - diluciones de suelo (Pochon y Tardieux, 1962) los siguientes grupos funcionales: microflora total, microorganismos

proteolíticos, microorganismos amonificantes, microorganismos nitrificantes nitrosos y microorganismos nitrificantes nítricos.

2.5.1. Preparación de las suspensiones-diluciones de suelo

Se procedió a elaborar un banco de diluciones sucesivas partiendo de 10 g de suelo. Para ello, se depositó la tierra en un mortero estéril y se trituró finamente. Se agregaron 20 ml de agua destilada estéril continuando con la trituración de la muestra, que se homogeneizó y trasvasó a un erlenmeyer estéril, lavando varias veces el mortero con pequeñas fracciones de agua destilada también estéril, hasta completar en el erlenmeyer 100 ml. Las siguientes diluciones se obtuvieron a partir de la suspensión de 10^{-1} .

2.5.2. Preparación de los medios de cultivo

Todos los medios de cultivo empleados en el análisis de los distintos grupos funcionales (ver apéndice) se elaboraron según las técnicas de Pochon y Tardieux (1962), excepto el medio para proteolíticos, en cuya preparación se utilizó el medio de cultivo Difco para proteolíticos enriquecido con solución salina (5 ml/l).

2.5.3. Condiciones de cultivo de los grupos funcionales analizados

Las distintas comunidades estudiadas se inocularon en los medios de cultivo mediante cantidades variables de las suspensiones-diluciones de suelo, según la densidad relativa

previsible de los diferentes grupos y la posibilidad de contaminación química del medio de cultivo a través del inóculo que pudiera falsear el análisis de los metabolitos durante la lectura de los resultados. El número de réplicas por dilución y el de diluciones se escogió en función del número de microorganismos de cada grupo que normalmente pueblan los suelos, considerando, sin embargo, un amplio margen de posibles variaciones (Tabla 2.II).

Tabla 2.II Condiciones de cultivo para los grupos funcionales analizados

Grupo funcional	Número de réplicas	Inóculo (ml)	Diluciones	Temperatura (°C)
Microflora total	5	1	10 ⁻⁴ a 10 ⁻¹⁰	28
Proteolíticos	3	0.5	10 ⁻¹ a 10 ⁻⁸	28
Amonificantes	3	1	10 ⁻¹ a 10 ⁻⁸	28
N. nitrosos	5	2.5	10 ⁻¹ a 10 ⁻⁶	28
N. nítricos	5	2.5	10 ⁻¹ a 10 ⁻⁶	28

2.5.4. Cálculo del NMP y de la actividad biológica

El NMP de microorganismos se evaluó según el método de McCrady (1918). Para ello se calculó el número característico en función de los tubos positivos que aparecieron en cada prueba, pero siempre teniendo en cuenta que este método indirecto estima que, para la aparición de resultados positivos, basta con un único microorganismo por inóculo.

Como indicativo de la actividad biológica utilizamos un parámetro denominado T50 (Gutiérrez Mañero, 1987).

Para evaluar el T50 es necesario confrontar el tiempo de incubación con el crecimiento bacteriano expresado en unidades del índice de dilución medio límite, $ID = N/n$, donde N representa el número total de tubos positivos y dudosos y n , el número de réplicas por dilución. A los tubos positivos se les da el valor 1 y 0.5 a los dudosos. Las lecturas se efectuaron los días 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11 y 15 en el caso de los microorganismos proteolíticos y amonificantes. Para las microfloras nitrificante nitrosa y nítrica las lecturas se realizaron los días 10, 20, 30, 40 y 50.

El resultado son curvas de tipo acumulativo que se pueden transformar en rectas susceptibles de un análisis de regresión lineal tomando el crecimiento en unidades Probit y el tiempo en $\log(\text{día}+1)$. El método de transformación en unidades Probit ha sido descrito por Fisher y Yates (1963). En resumen este procedimiento consiste en cambiar cada valor del crecimiento por el correspondiente porcentaje del crecimiento final y realizar luego un cambio a unidades de desviación típica.

Con los datos transformados se calculan las rectas de regresión del crecimiento sobre el tiempo según los métodos usuales de mínimos cuadrados (Sokal y Rohlf, 1979; Steel y Torrie, 1980) cuyo ajuste se expresa a través del coeficiente de correlación (r). Su nivel de significación depende exclusivamente del número de grados de libertad, que es función del número de días en los cuales el crecimiento no se ha estabilizado.

En estas rectas se calcula el tiempo que se tarda en alcanzar el crecimiento medio bacteriano (5 unidades Probit), que debe coincidir con el punto de inflexión de la curva acumulativa, que es el T50. Es importante señalar que la

ventaja de este parámetro como medida de la actividad estriba en que su valor no está influenciado por el valor del crecimiento final y no está directamente relacionado con el NMP, que se analiza independientemente. El T50 es una predicción de la variable independiente (tiempo) a partir de la dependiente (crecimiento). Según Sokal y Rohlf (1979), el intervalo de confianza para este tipo de predicciones no es simétrico, lo que podría dificultar posteriores análisis. Sin embargo, dado que la magnitud de los errores obtenidos es bastante baja, lo es también dicha asimetría. Además este ligero sesgo es ciertamente independiente de los factores a comparar. Por estos motivos se ha considerado que la pequeña asimetría teórica no constituye un impedimento para contrastes paramétricos como lo es el anova.

2.6. Tratamiento de la información

En el presente estudio hemos trabajado con variables físico-químicas y con variables bióticas como el NMP y la actividad biológica. La evaluación de estas variables está expuesta a posibles errores experimentales, si bien los métodos empleados son de uso bastante generalizado por lo que su eficacia y sus limitaciones están suficientemente probadas. El error experimental, en estos casos es aleatorio, por lo que la distribución de mediciones para una variable determinada y sus errores se pueden considerar como aleatorios, o por lo menos, lo suficientemente parecidos como para permitir el uso de pruebas paramétricas para el contraste de las hipótesis formuladas.

Los factores estudiados son las estaciones del año, la proximidad al sistema radical de las plantas y la zona con vegetación leñosa y si ésta es diazotrófica.

Para la comparación de los datos, tanto bióticos como abióticos, se ha utilizado el análisis de la varianza (anova) bidireccional con réplicas y tres factores de variación (Sokal y Rohlf, 1979). Cuando dichos factores influyen significativamente al nivel del 95 (*) o 99 % (**), se procede a la comparación de los valores medios mediante el test estadístico LSD (mínima diferencia significativa) (Sokal y Rohlf, 1979).

Los datos físico-químicos se agruparon en tres matrices de información que se sometieron al análisis de la varianza y LSD con objeto de evaluar las diferencias entre la rizosfera y el dosel de las plantas y de cada una de ellas respecto a las áreas control. En la primera se consideran los resultados de la rizosfera y del dosel de las cuatro muestras recogidas bajo los alisos, chopos y sauces. La segunda se refiere a los valores de la rizosfera y de las dos zonas sin vegetación arbórea. La tercera comprende los datos del dosel y de las dos zonas control.

Los datos microbiológicos se agruparon en cuatro matrices. En la primera se prescindió de los datos de las zonas 5 y 6. Los valores del rizoplano y de ambas zonas carentes de árboles constituyen la segunda matriz. Las matrices tercera y cuarta se realizaron como la segunda reemplazando los resultados del rizoplano por los de la rizosfera y del dosel de las plantas respectivamente para determinar las diferencias entre las tres zonas, rizoplano, rizosfera y dosel y posteriormente entre cada una de ellas y los controles.

De esta manera se consiguen matrices equilibradas que permiten apreciar la variación estacional, el efecto de la

vegetación, las diferencias entre plantas y el impacto del sistema radical sobre cada variable, tanto biótica como abiótica.

Además, con el propósito de comprobar si dos variables son independientes o covarían, se han hecho análisis de covarianza según Sokal y Rohlf (1979). Este método permite comprobar si una variable covaría con otra o si la correlación entre ambas está alterada por efecto de las fuentes de variación que influyen en ellas.

También se han considerado los valores medios de los datos, tanto físico-químicos como bióticos y se ha empleado el análisis de componentes principales (Harman, 1967), con el fin de descomponer la varianza total de la muestra en una serie de factores de variación, donde quede reflejada la importancia de cada una de las variables, así como la influencia del conjunto de variables en la dispersión de las muestras analizadas.

RESULTADOS

3.1. Tendencias de variación en el conjunto de observaciones

Los análisis de las variables bióticas y abióticas, realizados tal y como se ha descrito en el capítulo anterior, han permitido su estudio individualizado para determinar la relación entre su variabilidad y los factores objeto de estudio en el presente trabajo. Previo a este análisis detallado, con los datos obtenidos se ha procedido a determinar las tendencias de variación que muestra el conjunto de observaciones y las variables que ejercen mayor peso y que por tanto caracterizan los diferentes grupos de observaciones. Para ello se ha utilizado el análisis de componentes principales.

El análisis de ordenación se ha efectuado con dos estructuras diferentes en función de los procesos que se quieren observar y por ello se han realizado dos matrices de datos. En la primera se incluyen todas las observaciones que presentan datos de las variables físico-químicas y microbiológicas (por tanto no se consideran las observaciones efectuadas en el rizoplano) lo que da como resultado una matriz de variables \times etapa de muestreo \times zona \times proximidad al sistema radical que refleja las tendencias de variación que se deben al efecto de las tres fuentes de variabilidad citadas sobre las muestras que se han analizado. La segunda matriz se centra en las variables microbiológicas a nivel del rizoplano, de la rizosfera y del dosel, con el fin de diferenciar la interrelación entre la comunidad microbiológica y las tres fuentes de variabilidad.

El análisis de componentes principales realizado sobre la matriz de 16 variables (abióticas y bióticas) \times 40 observaciones permite representar las muestras en un espacio

Tabla 3.I Porcentaje de absorción de varianza por los ejes

EJE	% Varianza	% Acumulado
1	51.99	51.99
2	15.98	67.97
3	8.50	76.47

Tabla 3.II Factores de carga de las variables en los tres primeros ejes

Variable	EJE 1	EJE 2	EJE 3
pH	0.17	0.36	-0.36
C orgánico	-0.28	0.11	0.36
N total	-0.30	0.10	0.15
C/N	0.16	-0.09	0.31
N-Amonio	-0.31	0.06	0.02
N-Nitrato	-0.06	0.56	0.05
Humedad	-0.25	-0.06	0.47
NMP Mt	-0.32	0.11	-0.19
NMP P	-0.33	0.08	-0.11
NMP A	-0.33	-0.03	-0.17
NMP No	0.14	0.42	0.45
NMP Ni	0.29	0.27	-0.008
T50 P	0.24	-0.21	0.12
T50 A	0.29	-0.02	0.26
T50 No	-0.21	-0.06	0.18
T50 Ni	-0.02	-0.45	0.04

Mt = Microflora total; P = Microflora Proteolítica;
 A = Microflora Amonificante; No = Microflora Nitrificante Nitrosa; Ni = Microflora Nitrificante Nítrica

Fig. 3.1 Análisis de componentes principales efectuado con las variables bióticas y abióticas, eliminada la variabilidad debida al rizoplasma.

a) Espacio definido por los tres ejes primeros que ordenan las observaciones según su proximidad al sistema radical.

□ Rizosfera

⊗ Ladera

○ Dosel

⊕ Pastizal húmedo

b) Espacio definido por los ejes 1-2. Muestra tres grupos de observaciones que corresponden a los datos de la aliseda y de los controles.

Aliseda arbórea ■ Rizosfera
● Dosel

Chopera ■ Rizosfera
● Dosel

Matorral de aliso ■ Rizosfera
● Dosel

Sauceda ■ Rizosfera
● Dosel

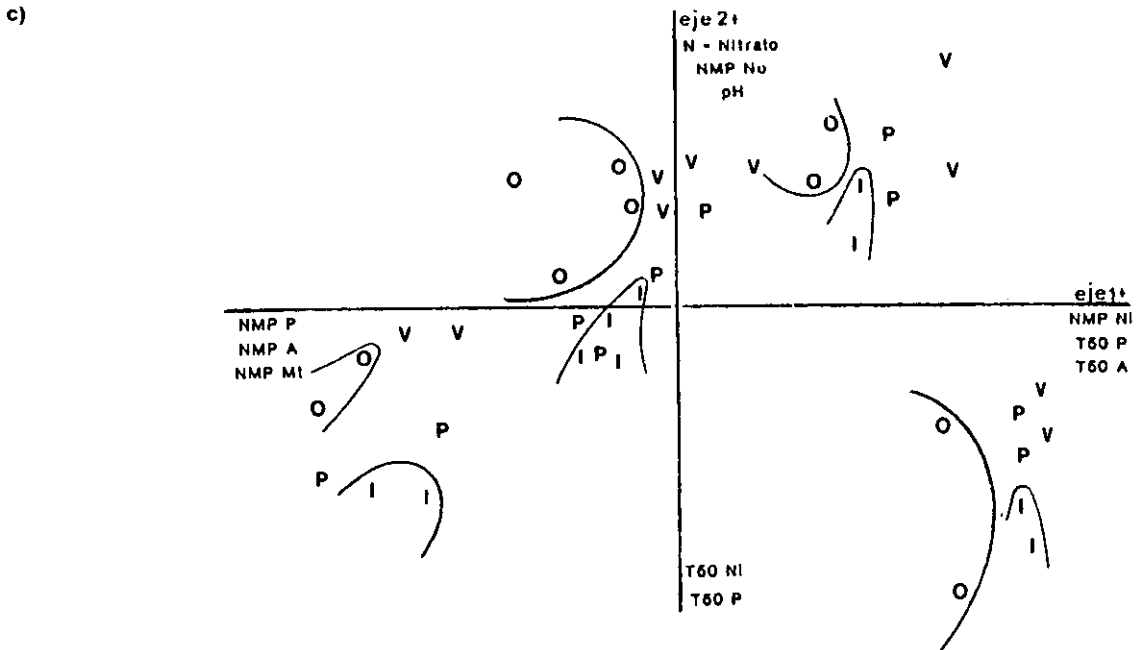
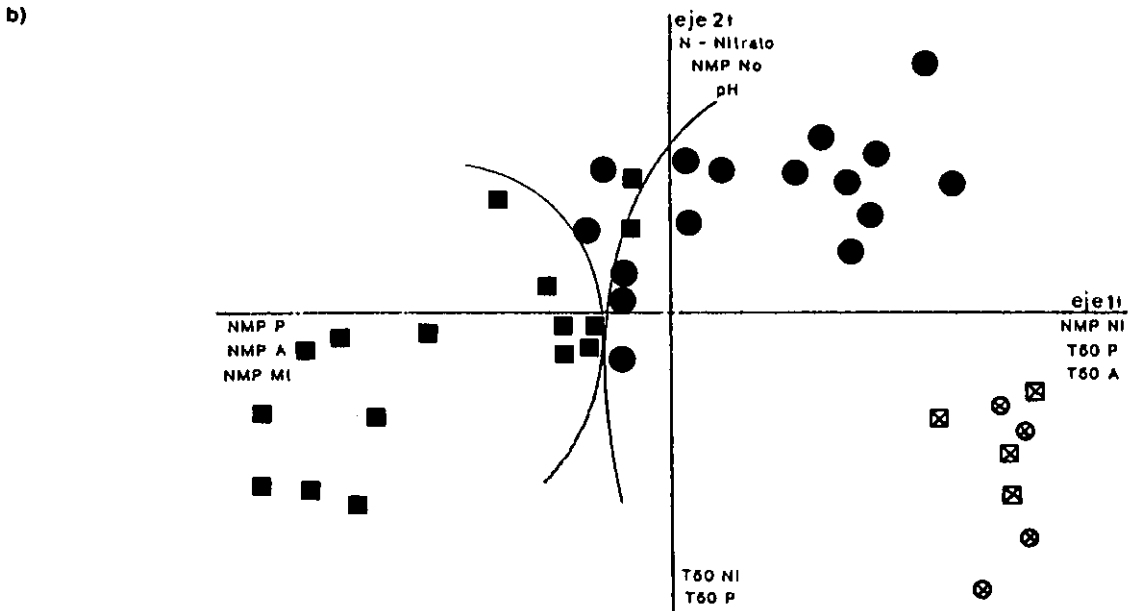
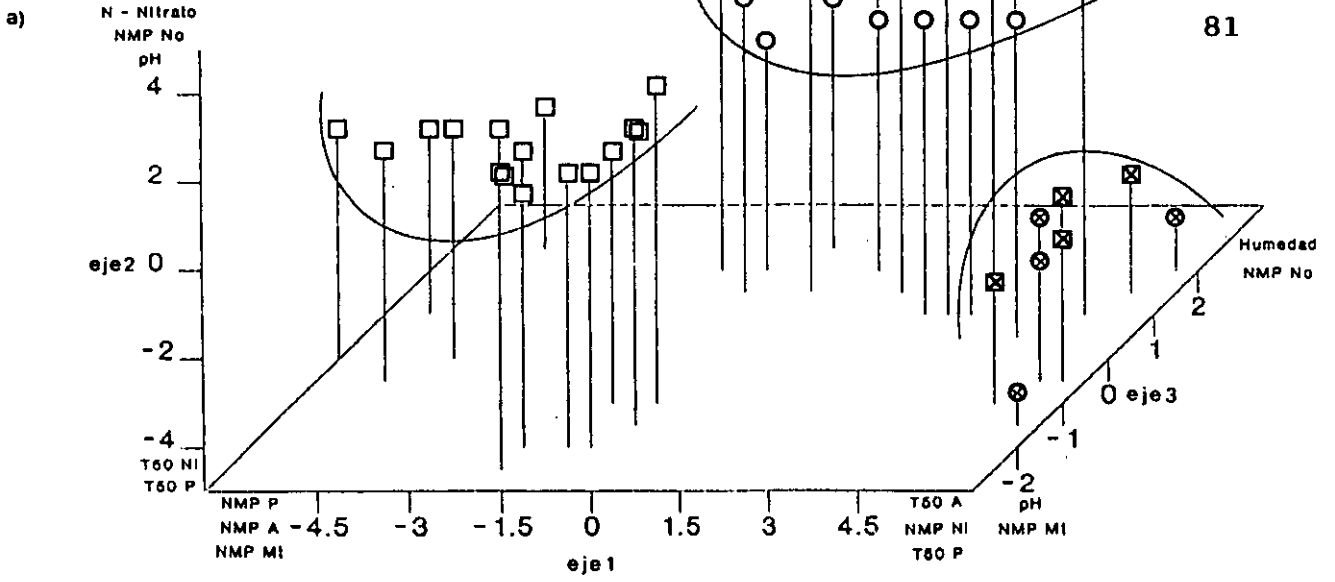
Ladera ⊗

Pastizal húmedo ⊕

c) Proyección de las observaciones en plano de los ejes 1-2. Las agrupaciones definen la variabilidad estacional.

O Otoño I Invierno P Primavera V Verano

En las tres figuras se indican las variables que definen los ejes.



definido por tres y por dos ejes principales que absorben un porcentaje de varianza acumulado del 76.47% y 67.97% respectivamente (tabla 3.I) y por tanto la ordenación se refiere a estos ejes principales.

Los factores de carga de las 16 variables en los tres ejes se exponen en la tabla 3.II. Las variables de mayor peso en la dispersión de las muestras en el eje principal 1 son la actividad de la comunidad amonificante, la densidad de microorganismos nitrificantes nítricos y la actividad de la microflora proteolítica (hacia el extremo positivo) y el NMP de microorganismos proteolíticos, amonificantes y microflora total (hacia el extremo negativo). En el eje 2 las variables de más influencia son en el polo positivo la concentración de nitrógeno-nitrato, la densidad de microorganismos nitrificantes nitrosos y el pH, mientras que en el extremo negativo destacan las bajas actividades biológicas de los grupos nitrificante nítrico y proteolítico. En el eje 3 son la humedad y el NMP de microorganismos nitrificantes nitrosos (hacia el extremo positivo) y el pH y el NMP de microflora total (hacia el extremo negativo), aunque la distribución de las muestras en la figura 3.1a indica que este eje no representa una tendencia de variación suficientemente marcada.

En la figura 3.1a se observan tres áreas bien delimitadas que corresponden a las observaciones localizadas respectivamente en la rizosfera, en el dosel y en las dos zonas carentes de vegetación arbórea. La nube de puntos de las muestras rizosféricas está desplazada hacia el eje 2, lo que indica que la zona rizosférica se caracteriza por altas contribuciones en el extremo negativo del primer eje de los grupos de microorganismos proteolíticos, amonificantes y

microflora total. El conjunto de muestras de las zonas control se encuentra próximo al eje 3, que coincide con el extremo positivo del eje 1, y por tanto las muestras sin vegetación arbórea se caracterizan por la densidad de microorganismos nitrificantes nítricos, la actividad de la microflora amonificante y en menor grado la actividad proteolítica. La concentración de nitratos, la actividad de los microorganismos nitrificantes nítricos y la densidad de la microflora nitrificante nitrosa con factores de carga bajos en el eje 1 se pueden considerar que identifican las observaciones del dosel que se localizan en la zona media del eje 1.

En las tres áreas citadas se diferencian otras dos tendencias de agrupación de las observaciones (figuras 3.1b y 3.1c). La segunda tendencia (figura 3.1b) se refiere a las observaciones de las zonas de muestreo y nos permite separar las muestras de la aliseda de las muestras de las zonas de los chopos y de los sauces, dentro de las áreas descritas en la figura 3.1a. Por tanto la variación que induce el sistema radical de las plantas tiene mayor peso en la ordenación de las observaciones que la zona. En estas condiciones las muestras de la rizosfera de los alisos ordenadas en el extremo negativo del eje 1 se caracterizan por la densidad de microorganismos proteolíticos, amonificantes y microflora total. Los elevados pesos de la actividad amonificante, de la densidad de microorganismos nitrificantes nítricos y de la actividad proteolítica en el polo positivo del eje 1 permite identificar estos grupos como característicos del dosel de los chopos y de los sauces.

En la figura 3.1c se aprecia en las nubes de puntos de la zona rizosférica, del dosel y de los controles que las observaciones de otoño aparecen desplazadas hacia el extremo

negativo del eje 1, por el contrario las muestras de invierno se orientan hacia el extremo negativo del eje 2. Esta tendencia, basada en la variación estacional, no está muy marcada y por tanto podemos indicar que la variabilidad estacional se encuentra eclipsada por las variaciones que se deben al sistema radical y al efecto zona.

El análisis de los componentes principales de las observaciones de la matriz de los datos exclusivamente microbiológicos del rizoplano, de la rizosfera y del dosel de las zonas pobladas con alisos, chopos y sauces se representan en un espacio definido por dos ejes que en conjunto absorben un 76.41% de varianza (tabla 3.III).

La representación gráfica (figura 3.2a) indica que las observaciones se localizan en dos zonas claramente definidas. Las muestras del dosel se agrupan hacia el polo negativo del eje 1 que se caracteriza por la actividad de la microflora amonificante, la densidad de los microorganismos nitrificantes nitrosos y con menor peso relativo la actividad proteolítica (tabla 3.IV). Las observaciones del rizoplano y de la rizosfera tienden a ocupar el extremo positivo del eje uno que presenta la densidad de los microorganismos amonificantes, de la microflora total y de los microorganismos proteolíticos como las variables con mayor peso entre los factores de carga.

En la figura 3.2b se observa una segunda tendencia de ordenación que manifiesta la variabilidad que se debe a la zona de muestreo, aunque es menos patente que la descrita en el párrafo anterior. Así, entre las muestras del rizoplano y de la rizosfera las observaciones de la aliseda se

Tabla 3.III Porcentaje de absorción de varianza por los ejes

EJE	% Varianza	% Acumulado
1	64.69	64.69
2	11.72	76.41

Tabla 3.IV Factores de carga de las variables en los dos ejes primeros

Variable	EJE 1	EJE 2
NMP Mt	0.40	-0.10
NMP P	0.38	-0.15
NMP A	0.40	-0.09
NMP No	-0.35	-0.06
NMP Ni	0.35	-0.24
T50 P	-0.26	0.43
T50 A	-0.35	0.29
T50 No	0.23	0.46
T50 Ni	0.20	0.65

Mt = Microflora total; P = Microflora Proteolítica;
 A = Microflora Amonificante; No = Microflora Nitrificante Nitrosa; Ni = Microflora Nitrificante Nítrica

distribuyen hacia el extremo positivo del eje 1 y aparecen definidas por la densidad de los microorganismos amonificantes, de la microflora total y de la microflora proteolítica. Sin embargo las observaciones del dosel de los alisos se localizan próximas a la zona media del eje 1, orientadas hacia el polo negativo, y se caracterizan por los factores de carga más bajos que corresponden a la actividad de los microorganismos proteolíticos.

La presencia de los T50 de los microorganismos nitrificantes con bajos pesos en el extremo positivo del eje 1 identifica a estos microorganismos como característicos del rizoplano y de la rizosfera de los chopos y de los sauces. Mientras que las observaciones del dosel de los chopos y sauces aparecen en el extremo negativo del eje 1 donde la actividad de la comunidad amonificante y la densidad de microorganismos nitrificantes nitrosos son los factores de carga de mayor peso relativo.

Al igual que sucedía en el análisis de componentes principales de la matriz de datos abióticos y bióticos, las variaciones estacionales no representan una tendencia de variación marcada. Solo las observaciones que corresponden a la etapa de invierno se diferencian porque tienden a ocupar el extremo positivo del eje 2 (figura 3.2c). Este eje absorbe una varianza muy inferior al eje 1 (tabla 3.3) y su extremo positivo se identifica por la contribución alta de los T50 de los microorganismos nitrificantes nítricos, nitrosos y proteolíticos.

Fig. 3.2 Análisis de componentes principales de las variables bióticas de las observaciones del rizoplano, rizosfera y dosel de los alisos, chopos y sauces.

a) Proyección de las observaciones en el plano definido por los ejes 1-2. Se diferencian dos grupos: uno formado por el dosel y otro por el rizoplano y rizosfera.

△ Rizoplano □ Rizosfera ○ Dosel

b) Espacio definido por los ejes 1-2 que diferencia las observaciones que corresponden a la aliseda de las que se localizan en la chopera y sauceda.

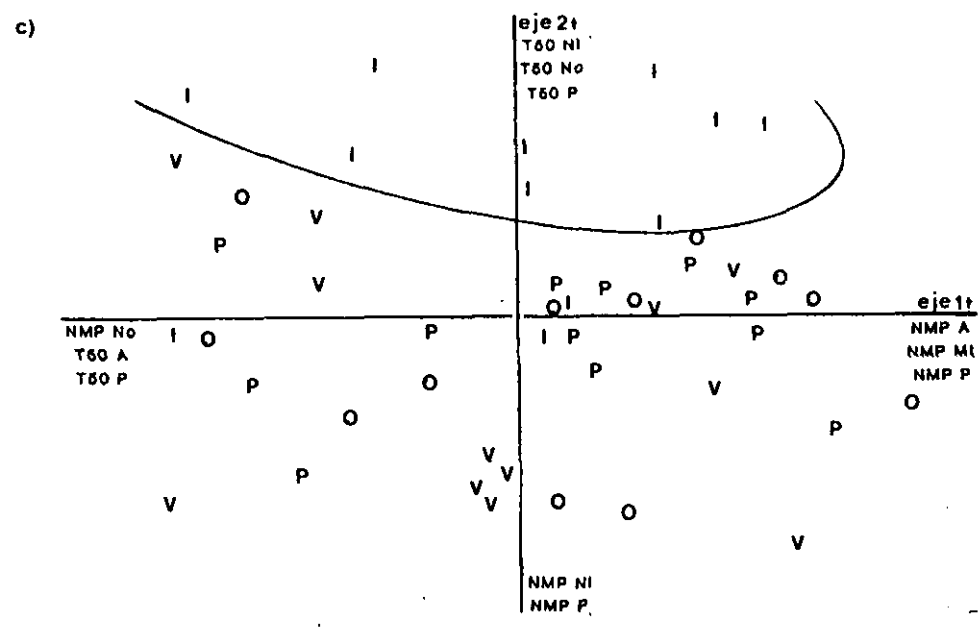
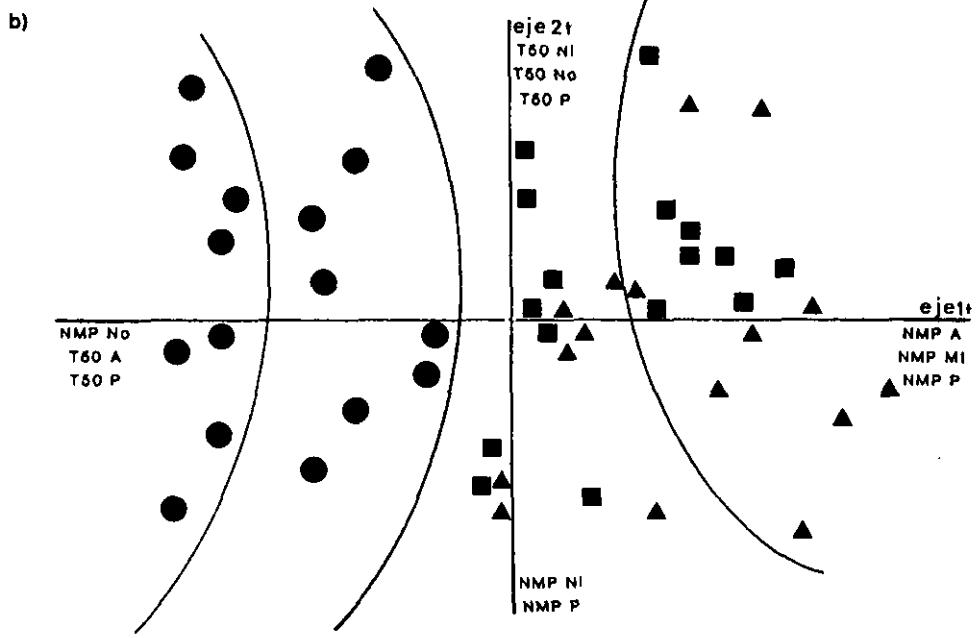
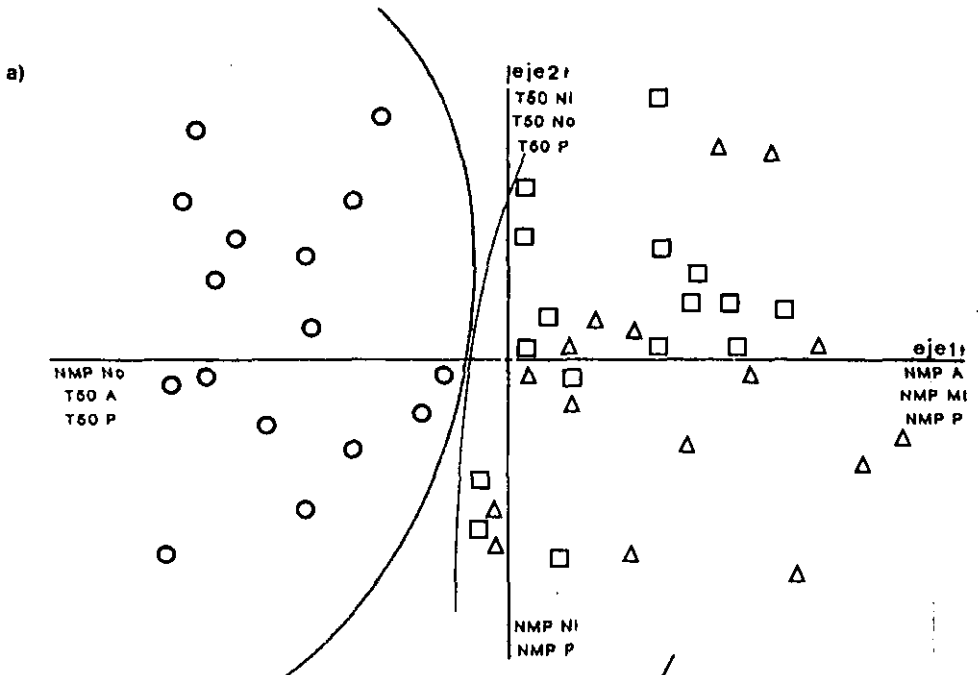
Aliseda arbórea	▲ Rizoplano	Chopera	▲ Rizoplano
	■ Rizosfera		■ Rizosfera
	● Dosel		● Dosel

Matorral de aliso	▲ Rizoplano	Sauceda	▲ Rizoplano
	■ Rizosfera		■ Rizosfera
	● Dosel		● Dosel

c) Ordenación de las observaciones en el plano definido por los ejes 1-2 que refleja la variación estacional.

O Otoño I Invierno P Primavera V Verano

En las tres figuras se indican las variables que definen los ejes.



3.2. Análisis físico-químicos

Para entender mejor las vías edáficas por las que circula el nitrógeno y determinar las condiciones del medio en que se desarrollan los microorganismos mineralizadores se procedió a realizar los análisis de las variables físico-químicas citadas anteriormente.

El conocimiento de los valores de tales variables y de las diferencias espaciales que presentan respecto al sistema radical, así como de su evolución temporal, contribuye a explicar las variaciones en la densidad y en la actividad de los de microorganismos.

Los resultados de las pruebas estadísticas (ANOVA y LSD) de cada variable analizada se expresan al final del capítulo en las tablas 3.XII a 3.XXI.

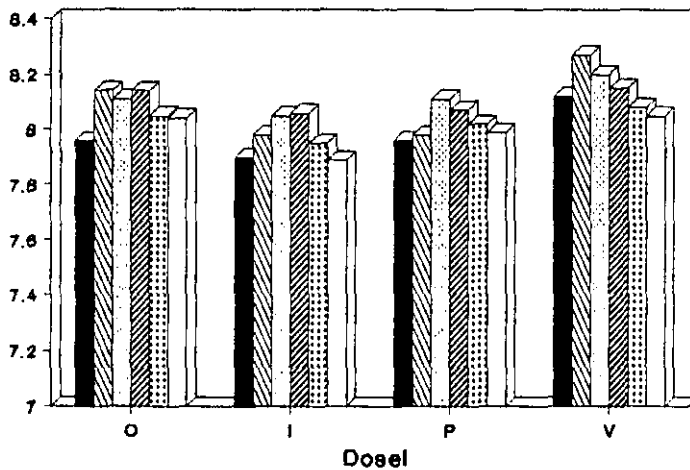
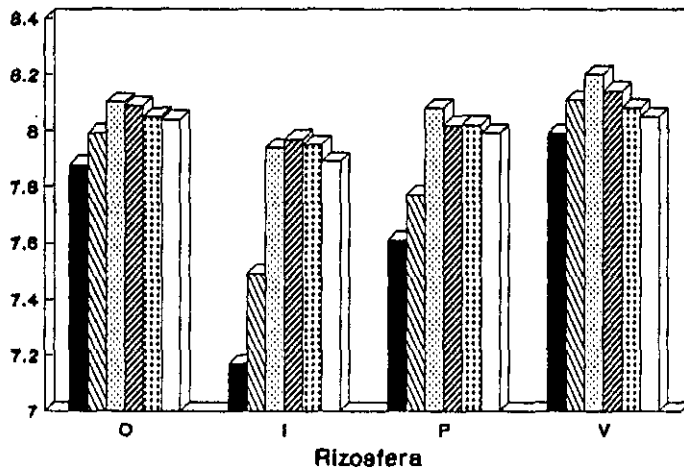
3.2.1. pH

En todos los suelos examinados se observa un carácter ligeramente básico (tabla 3.V). Los resultados extremos aparecen cerca de los alisos. El pH más bajo se registra en la rizosfera de la aliseda arbórea en invierno, 7.17, mientras que el dato más elevado, 8.27, se observa bajo el dosel de los matorrales de aliso en verano.

En la figura 3.3 se aprecia que, bajo los chopos, se hallan los suelos más básicos y los más ácidos en la aliseda, fundamentalmente en la rizosfera de los alisos de porte arbóreo. El análisis de la varianza de los datos de las

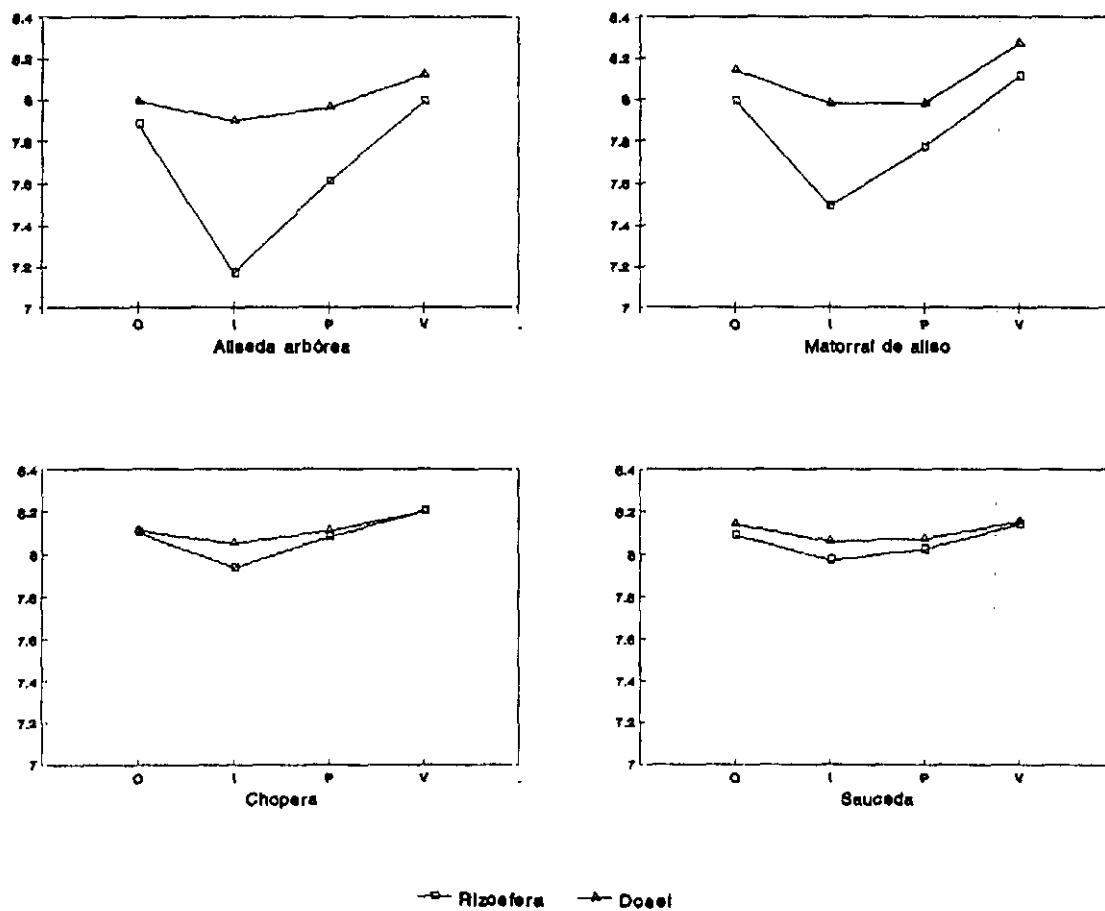
Tabla 3.V Resultados medios del pH. Se indica la media de cinco réplicas \pm su error estándar

		Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 5	Z 6
O	Rf	7.88 \pm 0.02	7.99 \pm 0.02	8.10 \pm 0.02	8.09 \pm 0.01		
	Do	7.96 \pm 0.01	8.14 \pm 0.01	8.11 \pm 0.01	8.14 \pm 0.01	8.05 \pm 0.01	8.04 \pm 0.01
I	Rf	7.17 \pm 0.02	7.49 \pm 0.01	7.94 \pm 0.03	7.97 \pm 0.02		
	Do	7.90 \pm 0.03	7.98 \pm 0.02	8.05 \pm 0.05	8.06 \pm 0.02	7.95 \pm 0.01	7.89 \pm 0.02
P	Rf	7.61 \pm 0.02	7.77 \pm 0.02	8.08 \pm 0.02	8.02 \pm 0.01		
	Do	7.96 \pm 0.02	7.98 \pm 0.02	8.11 \pm 0.01	8.07 \pm 0.01	8.02 \pm 0.03	7.99 \pm 0.02
V	Rf	7.99 \pm 0.03	8.11 \pm 0.01	8.20 \pm 0.02	8.14 \pm 0.02		
	Do	8.12 \pm 0.01	8.27 \pm 0.01	8.20 \pm 0.01	8.15 \pm 0.02	8.08 \pm 0.01	8.05 \pm 0.01



Aliseda arborea
 Matorral de aliso
 Chopera
 Sauceda
 Ladera
 Pastizal

Fig. 3.3 Variaciones entre las zonas y las estaciones de los resultados medios del pH



O Otoño ; I Invierno ; P Primavera ; V Verano

Fig. 3.4 Variaciones entre la rizosfera y el dosel de los resultados medios del pH

fracciones de suelo del dosel y de la rizosfera (tabla 3.XII) indica que las diferencias entre zonas no se deben al azar ($p < 0.01$, $F=274.6$). En el cuadro de comparación entre medias (tabla 3.XV) se observa que todas difieren significativamente entre sí ($p < 0.01$), a excepción de la chopera y sauceda. En los ANOVA de las zonas rizosférica (tabla 3.XIII) y del dosel (tabla 3.XIV) con los controles se aprecian diferencias significativas ($p < 0.01$, $F=208.6$ y $F=39.3$ respectivamente). Los cuadros de comparación entre medias de ambos grupos de observaciones indican que las diferencias con respecto a las zonas 5 y 6 son significativas en todos los casos excepto la rizosfera de los sauces y el dosel de los alisos más desarrollados. Al comparar la chopera y la sauceda tanto a nivel rizosférico como de dosel no se detectan diferencias significativas, sin embargo las rizosferas de ambas zonas y de los alisos presentan variaciones ($p < 0.01$) e igual ocurre con las muestras del dosel ($p < 0.01$).

Las variaciones estacionales (fig. 3.3) son significativas ($p < 0.01$) tanto si se consideran solo las fracciones rizosféricas y del dosel ($F=335.1$) como en el agrupamiento de las zonas sin arbolado con las muestras rizosféricas ($F=298.1$) y del dosel ($F=91.2$). En los cuadros de comparación entre medias se observa que el invierno es la estación con pH menor y la época de estío el momento en que el pH es más elevado.

La tercera fuente de variabilidad es la zona de influencia del sistema radical de los alisos, chopos y sauces. La gráfica 3.4 representa estos datos. En todos los casos la concentración de protones de la rizosfera es mayor que la del dosel de las mismas plantas. Los análisis de la varianza señalan que estas diferencias son significativas ($p < 0.01$) entre ambas zonas y que las interacciones entre las

tres fuentes de variación son significativas ($p < 0.01$) en todos los casos.

3.2.2. Carbono orgánico

El contenido de carbono orgánico de las fracciones de suelo analizadas se expresa en tanto por ciento (tabla 3.VI).

El resultado más elevado, 5.12 %, se encuentra en la rizosfera de los árboles de aliso en invierno. Por el contrario, las fracciones de suelo del pastizal de verano registran el porcentaje inferior de carbono orgánico, 1.07 %.

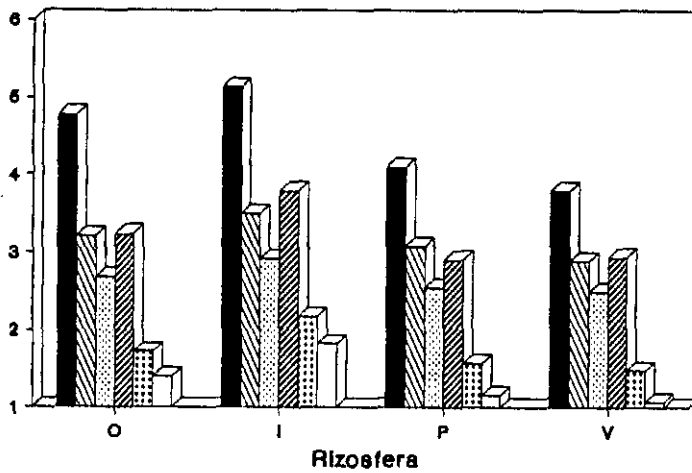
La figura 3.5 representa las variaciones entre zonas en la rizosfera y en el dosel, durante las cuatro estaciones. Cerca de los alisos más desarrollados se observan los niveles más altos de carbono orgánico y en la zona poblada con los chopos las concentraciones más bajas de las cuatro zonas con vegetación arbórea, que son superiores a los encontrados en los controles sin árboles.

Cuando se agrupan los datos de la rizosfera y del dosel, el análisis de la varianza significa que las diferencias entre zonas no se deben al azar ($p < 0.01$) con un valor de $F=138.4$. En el ANOVA de las zonas libres de arbolado con los resultados de la rizosfera y del dosel se encuentran diferencias significativas ($p < 0.01$) con unos valores de $F=253.1$ y de $F=142.4$ respectivamente (tablas 3.XIII y 3.XIV).

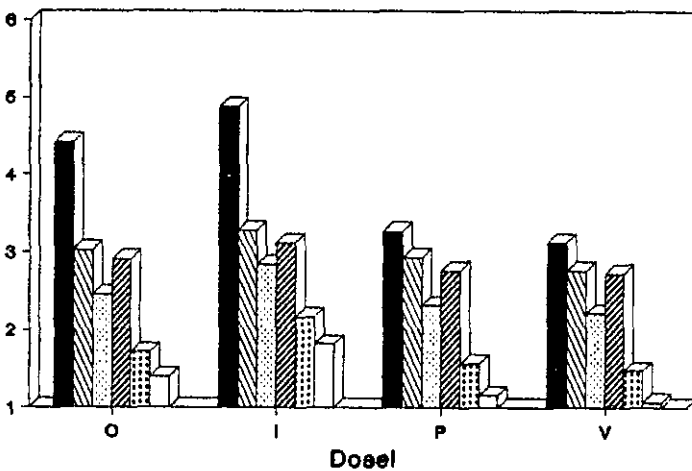
Los cuadros de comparación de medias (tabla 3.XVI) señalan que la zona de los alisos es la más rica en carbono

Tabla 3.VI Concentraciones medias de carbono orgánico (%). Se indica la media de cinco réplicas ± su error estándar

	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 5	Z 6
D. Rf	4.77±0.17	3.20±0.13	2.67±0.16	3.23±0.09		
Do	4.41±0.20	3.02±0.17	2.45±0.09	2.91±0.21	1.71±0.07	1.39±0.10
I. Rf	5.12±0.17	3.49±0.12	2.91±0.07	3.78±0.10		
Do	4.87±0.12	3.27±0.08	2.84±0.07	3.12±0.21	2.16±0.07	1.81±0.08
P. Rf	4.09±0.19	3.07±0.12	2.54±0.12	2.90±0.10		
Do	3.26±0.25	2.93±0.16	2.31±0.09	2.76±0.16	1.56±0.12	1.15±0.09
V. Rf	3.78±0.21	2.88±0.13	2.48±0.13	2.93±0.08		
Do	3.12±0.21	2.76±0.16	2.21±0.09	2.73±0.14	1.47±0.10	1.07±0.05



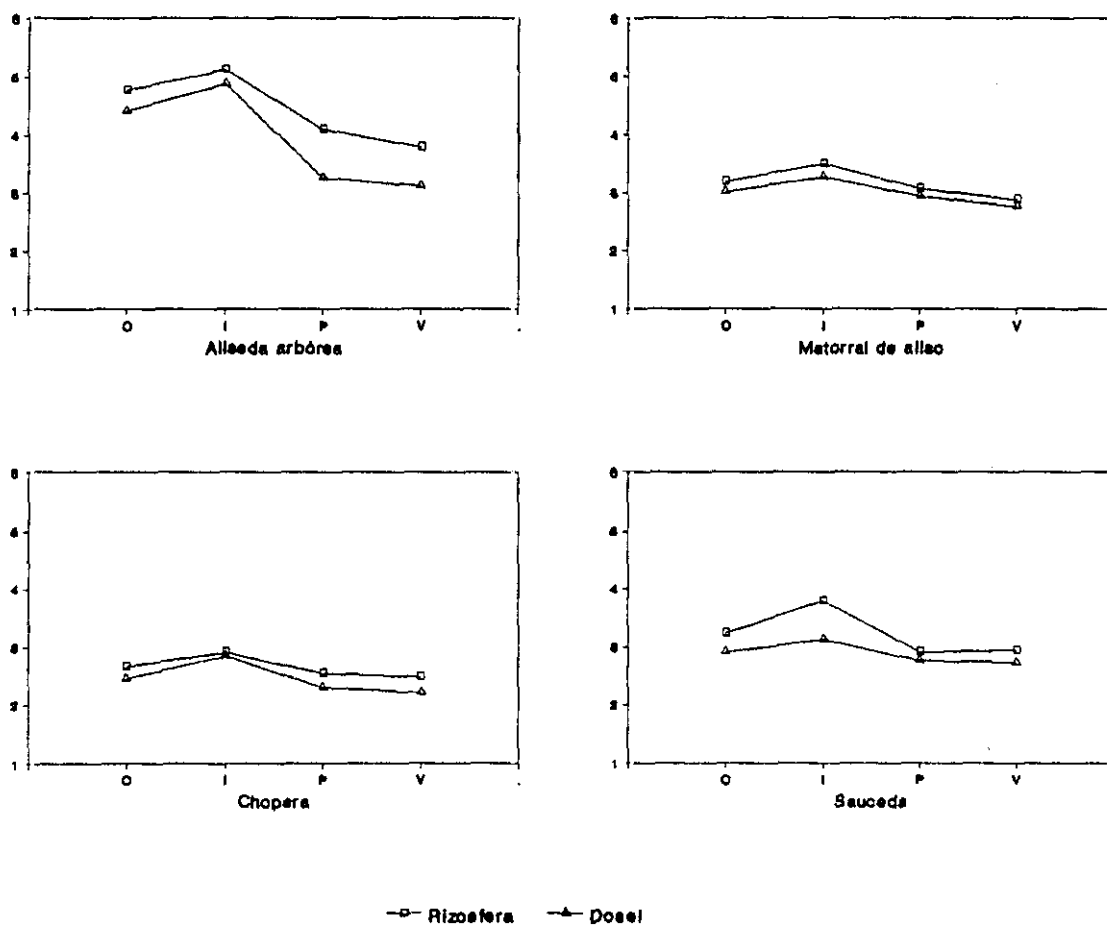
Z 1 Aliseda arbórea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera
 Z 4 Saucedá
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo



Rf Rizosfera
 Do Dosel
 O Otoño
 I Invierno
 P Primavera
 V Verano

■ Aliseda arbórea ▨ Matorral de aliso ▤ Chopera
 ▩ Saucedá ▦ Ladera □ Pastizal

Fig. 3.5 Variaciones entre las zonas y las estaciones de las concentraciones medias de carbono orgánico (%)



O Otoño ; I Invierno ; P Primavera ; V Verano

Fig. 3.6 Variaciones entre la rizosfera y el dosel de las concentraciones medias de carbono orgánico (%)

orgánico y que no hay variaciones significativas entre los suelos de los alisos arbustivos y de los sauces.

Las variaciones estacionales aparecen en la figura 3.5. Los ANOVA reflejan diferencias significativas ($p < 0.01$) con una $F=39.5$ para el caso de las muestras rizosféricas y del dosel (tabla 3.XII), mientras que en el agrupamiento de las zonas sin vegetación leñosa con las fracciones de la rizosfera se obtiene un valor de $F=35.5$ (tabla 3.XIII) y en relación al dosel, $F=30.8$ (tabla 3.XIV). Tanto en la rizosfera como en el dosel, los niveles de carbono orgánico varían de forma similar durante todo el año y en los cuadros de comparación entre medias aparece el invierno como la época de concentración más alta de carbono orgánico, que desciende en primavera y verano sin que existan variaciones significativas entre ambas estaciones.

El contenido de carbono orgánico en la rizosfera y en el dosel de cada zona se refleja en la figura 3.6. Todas las gráficas manifiestan que la rizosfera es la región con niveles más elevados de carbono orgánico. El análisis de la varianza confirma que el contenido de carbono orgánico de la rizosfera y del dosel difieren en un 99% ($F=27.5$).

Las interacciones entre los factores de variación no son significativas excepto la interacción estación-zona ($p < 0.01$) cuando se observa por una parte el conjunto de las muestras del dosel y de la rizosfera y por otra cuando se consideran los datos de las zonas 5, 6 y del dosel.

3.2.3. Nitrógeno total

Los niveles de nitrógeno total aparecen en la tabla 3.VII y se expresan como miligramos de nitrógeno total por gramo de suelo analizado.

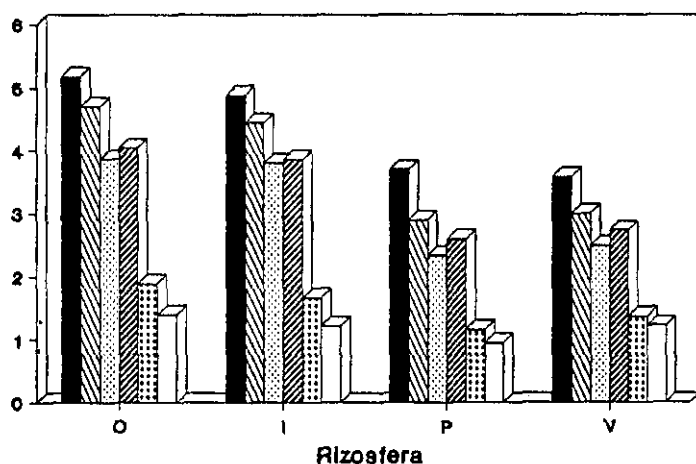
La fracción de suelo que contiene menos nitrógeno total se recogió en primavera en el pastizal húmedo (0.95 mg/g). La concentración más elevada se registra en otoño en la rizosfera de los árboles de aliso (5.18 mg/g).

Las variaciones entre las seis zonas se representan en la figura 3.7. Se observa una evolución similar a la que se registra en el contenido de carbono orgánico (apartado 3.2.2.) . Los resultados más altos aparecen bajo los alisos, y los inferiores en la ladera y en el pastizal. Los análisis de la varianza señalan que existen diferencias no debidas al azar ($p < 0.01$) entre las zonas, tanto si se reúnen los datos de la rizosfera y del dosel ($F=250.9$), como si se asocian con las zonas 5 y 6 ($F=614.4$ para las fracciones rizosféricas y $F= 349.6$ para el suelo del dosel).

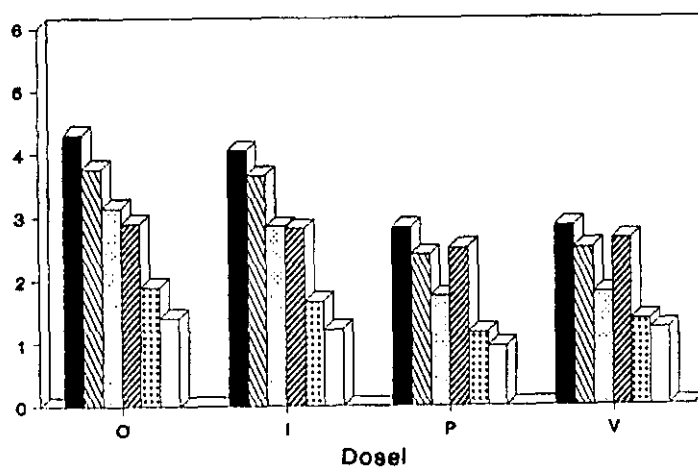
Los cuadros de comparación de medias (tabla 3.XVII) establecen que las alisedas son las zonas con proporción mayor de nitrógeno total y que entre los chopos se encuentran niveles menores a los detectados entre los sauces. En la comparación de las muestras rizosféricas con las zonas libres de arbolado se observa la misma tendencia que en el caso anterior e igual ocurre en los doseles. En todos los casos las fracciones de suelo del pastizal y de la ladera presentan concentraciones significativamente menores.

Tabla 3.VII Concentraciones de nitrógeno total (mg/g). Se indica la media de cinco réplicas \pm su error estándar

	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 5	Z 6
O Rf	5.18 \pm 0.13	4.70 \pm 0.09	3.86 \pm 0.06	4.04 \pm 0.04		
Do	4.28 \pm 0.08	3.75 \pm 0.08	3.14 \pm 0.06	2.89 \pm 0.06	1.88 \pm 0.05	1.40 \pm 0.14
I Rf	4.88 \pm 0.07	4.44 \pm 0.05	3.80 \pm 0.04	3.85 \pm 0.05		
Do	4.04 \pm 0.04	3.64 \pm 0.08	2.84 \pm 0.07	2.81 \pm 0.06	1.66 \pm 0.10	1.21 \pm 0.06
P Rf	3.69 \pm 0.11	2.89 \pm 0.09	2.33 \pm 0.06	2.58 \pm 0.07		
Do	2.82 \pm 0.05	2.39 \pm 0.08	1.74 \pm 0.05	2.50 \pm 0.05	1.16 \pm 0.09	0.95 \pm 0.07
V Rf	3.57 \pm 0.13	2.99 \pm 0.07	2.48 \pm 0.12	2.73 \pm 0.09		
Do	2.85 \pm 0.08	2.50 \pm 0.16	1.79 \pm 0.10	2.64 \pm 0.07	1.37 \pm 0.15	1.22 \pm 0.07



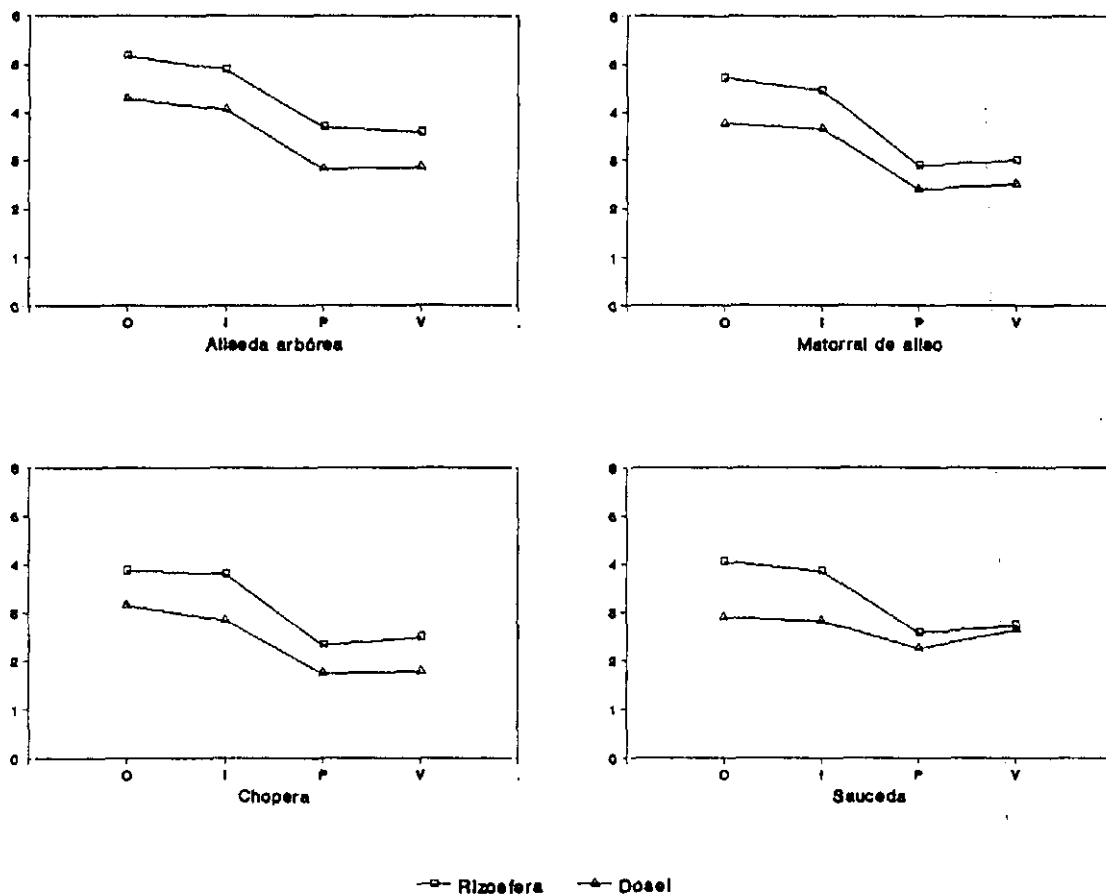
Z 1 Aliseda arbórea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera
 Z 4 Saucedá
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo



Rf Rizosfera
 Do Dose
 O Otoño
 I Invierno
 P Primavera
 V Verano

■ Aliseda arbórea ▨ Matorral de aliso ▤ Chopera
 ▩ Saucedá ▧ Ladera □ Pastizal

Fig. 3.7 Variaciones entre las zonas y las estaciones de las concentraciones medias de nitrógeno total (mg/g)



O Otoño ; I Invierno ; P Primavera ; V Verano

Fig. 3.8 Variaciones entre la rizosfera y el dosel de las concentraciones medias de nitrógeno total (mg/g)

La gráfica 3.7 refleja las variaciones estacionales. Los análisis de la varianza indican que tales diferencias no se deben al azar ($p < 0.01$) con valores de $F=496.9$ en el agrupamiento rizosfera-dosel, de $F=234.7$ cuando se considera el conjunto rizosfera-zonas sin vegetación leñosa y de $F=157.2$ en el caso dosel-zonas sin árboles. Los cuadros de comparación de medias señalan que el otoño es la época del año en que se alcanzan niveles más altos de nitrógeno total. En invierno los resultados son inferiores y en verano y primavera se encuentran las concentraciones más bajas.

Las diferencias entre la región rizosférica y las fracciones de suelo del dosel se representan en la figura 3.8. En las cuatro estaciones la proporción de nitrógeno total alcanza los resultados mayores en la zona rizosférica. El análisis de la varianza señala que la variación entre ambas zonas no se debe al azar ($p < 0.01$ y $F=501.0$).

Las interacciones entre las tres fuentes de variación que se estudian, son significativas ($p < 0.01$) en todos los casos salvo la interacción zona-sistema radical cuando se analiza el conjunto de datos rizosfera-dosel, lo que indica que en la rizosfera la concentración de nitrógeno total es significativamente mayor que en el dosel.

3.2.4. Relación carbono/nitrógeno

Los resultados de la relación carbono/nitrógeno se determinan a partir de los datos de carbono orgánico y de nitrógeno total de las fracciones de suelo analizadas y se expresan en la tabla 3.VII. El valor más bajo, 6.81, corresponde a la rizosfera de los matorrales de aliso

recogida en otoño, y la relación carbono/nitrógeno máxima, 14.9, se registra en el pastizal en invierno.

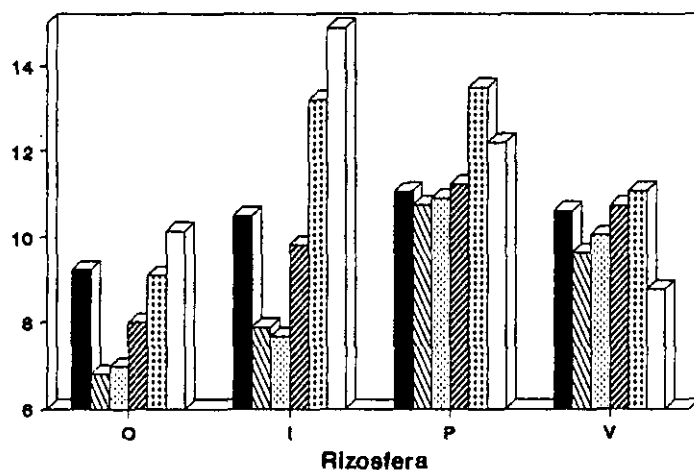
Las variaciones entre zonas se representan en la figura 3.9. Los resultados más elevados se observan en las zonas 5 y 6. Entre las zonas pobladas con árboles los alisos más desarrollados presentan la relación carbono/nitrógeno superior. Estas variaciones son significativas ($p < 0.01$) (tablas 3.XII, 3.XIII y 3.XIV). En los cuadros de comparación de medias (tabla 3.XVIII) se aprecia que, si consideramos solo los valores de las zonas con plantas, la relación carbono/nitrógeno mínima corresponde a las fracciones de suelo de las zonas con matorrales de aliso y chopos. Si los datos de la rizosfera se reúnen con las zonas 5 y 6, el cuadro de comparación entre medias señala que los controles sin árboles tienen las relaciones carbono/nitrógeno más elevadas. Estos resultados se repiten cuando se comparan las medias de las zonas sin árboles y de las fracciones de suelo recogidas bajo el dosel.

Las variaciones estacionales (gráfica 3.9) son significativas en todos los casos ($p < 0.01$). Entre las cuatro primeras zonas, tanto en la rizosfera como en el dosel, la primavera es la época del año en que los niveles son mayores y sin embargo en la ladera y en el pastizal la relación carbono/nitrógeno es mayor en el invierno. Las tablas de comparación entre medias indican que en la primavera se obtienen los datos más altos y en el otoño el cociente carbono/nitrógeno desciende de forma significativa.

En el análisis de la varianza de los datos de la rizosfera y del dosel se advierten diferencias no debidas al azar ($p < 0,01$ y $F = 62,7$). Los valores aparecen en la gráfica 3.10, donde se aprecia que en las zonas 1, 2, 3 y 4 durante

Tabla 3.VIII Resultados de la relación C/N. Se indica la media de cinco réplicas \pm su error estándar

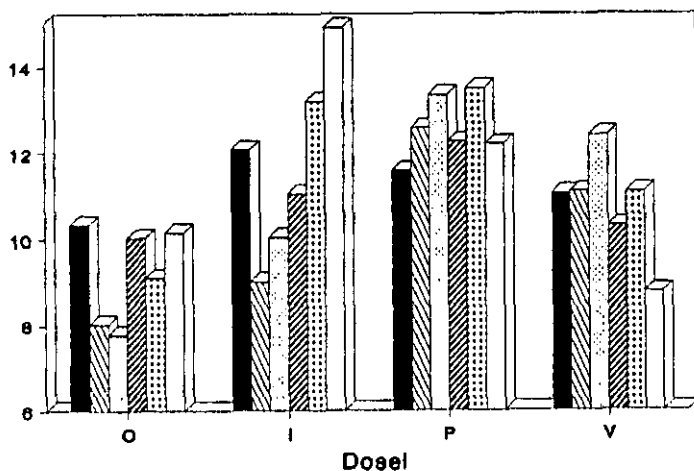
	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 5	Z 6
Q						
Rf	9.24 \pm 0.42	6.81 \pm 0.22	6.97 \pm 0.50	7.99 \pm 0.18		
Do	10.33 \pm 0.50	8.02 \pm 0.33	7.78 \pm 0.20	10.02 \pm 0.56	9.10 \pm 0.26	10.13 \pm 0.36
I						
Rf	10.49 \pm 0.26	7.88 \pm 0.30	7.67 \pm 0.24	9.81 \pm 0.15		
Do	12.06 \pm 0.28	9.01 \pm 0.35	10.03 \pm 0.35	11.03 \pm 0.56	13.19 \pm 0.55	14.90 \pm 0.16
P						
Rf	11.06 \pm 0.24	10.74 \pm 0.69	10.89 \pm 0.38	11.23 \pm 0.09		
Do	11.57 \pm 0.86	12.55 \pm 0.44	13.32 \pm 0.20	12.25 \pm 0.54	13.49 \pm 0.43	12.19 \pm 0.53
V						
Rf	10.60 \pm 0.49	9.63 \pm 0.36	10.04 \pm 0.31	10.72 \pm 0.17		
Do	11.03 \pm 0.86	11.08 \pm 0.39	12.39 \pm 0.20	10.29 \pm 0.29	11.07 \pm 0.55	8.77 \pm 0.12



Z 1 Aliseda arbórea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera
 Z 4 Saucedá
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo

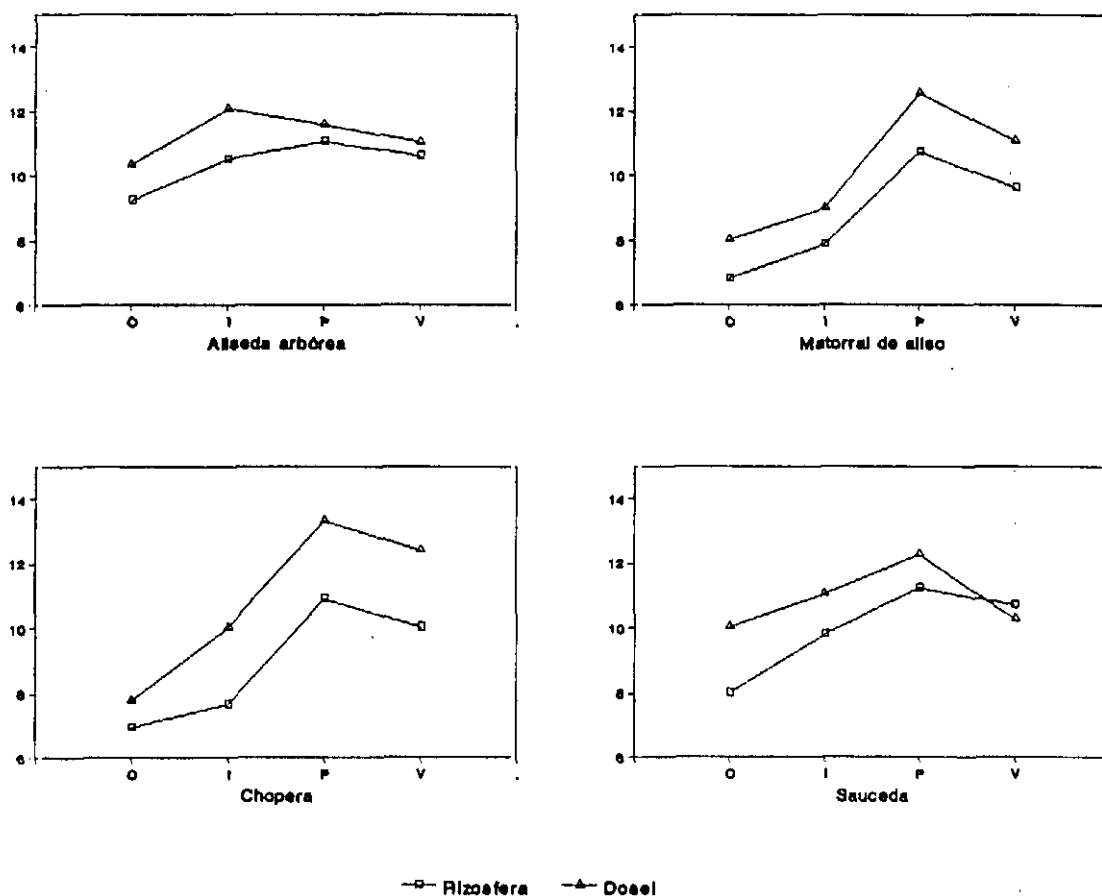
Rf Rizosfera
 Do Dosel

O Otoño
 I Invierno
 P Primavera
 V Verano



■ Aliseda arbórea ▨ Matorral de aliso ▩ Chopera
 ▧ Saucedá ▤ Ladera □ Pastizal

Fig. 3.9 Variaciones entre las zonas y las estaciones de los resultados medios de la relación C/N



O Otoño ; I Invierno ; P Primavera ; V Verano

Fig. 3.10 Variaciones entre la rizosfera y el dosel de los resultados medios de la relación C/N

todo el año la proporción carbono/nitrógeno es más elevada bajo el dosel, excepto en las fracciones de suelo de la saucedada de la temporada estival.

La interacción de los dos primeros factores de variación, estación y zona, siempre es significativa ($p < 0.01$), pero no así las interacciones restantes (tablas 3.XII, 3.XIII y 3.XIV).

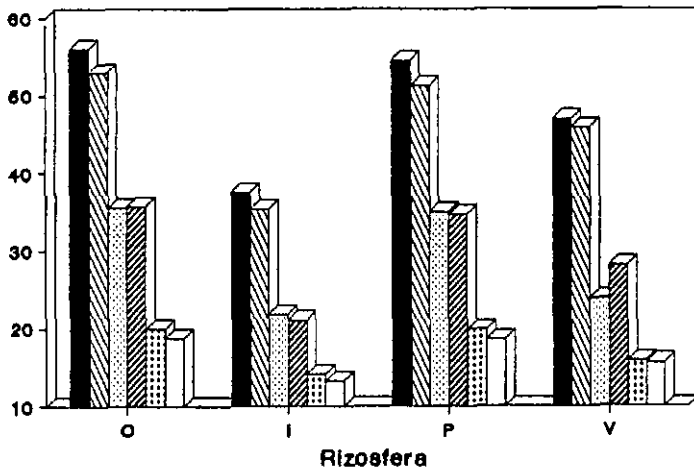
3.2.5. Nitrógeno-amonio

Los niveles de nitrógeno-amonio de las fracciones de suelo analizadas se detallan en la tabla 3.IX y se expresan en μg de nitrógeno-amonio por gramo de suelo. Las concentraciones oscilan entre 56.03 $\mu\text{g/g}$ en la rizosfera de los alisos arbóreos recogida en otoño, y 13.21 $\mu\text{g/g}$ en las fracciones de suelo de invierno del pastizal.

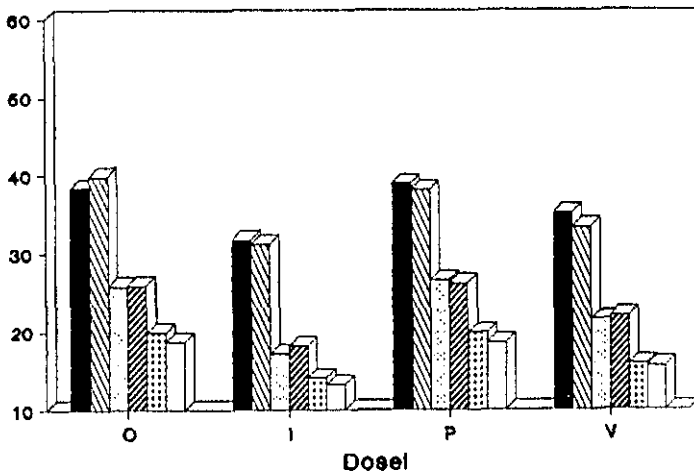
Las diferencias en los niveles de nitrógeno-amonio cuando la fuente de variación es la zona se representan en la gráfica 3.11. Los análisis de la varianza indican que las variaciones en ningún caso se deben al azar con una probabilidad superior al 99%. El cuadro de comparación entre medias (tabla 3.XIX) de las cuatro primeras zonas expresa que no hay diferencias entre los chopos y los sauces, que son las dos zonas con niveles más bajos de nitrógeno-amonio, mientras que ambas alisedas tienen cantidades superiores. Si se comparan las zonas de las fracciones rizosféricas y de las zonas 5 y 6, aparece el nitrógeno-amonio en proporción mayor en las muestras de la zona rizosférica. El cuadro de comparación de medias de los datos del dosel y de las zonas libres de vegetación leñosa refleja que no hay variaciones

Tabla 3.IX Concentraciones medias de nitrógeno-amonio (µg/g). Se indica la media de cinco réplicas ± su error estándar

	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 5	Z 6
O						
Rf	56.03±1.52	52.88±1.61	35.55±1.01	35.78±1.13		
Do	38.36±1.26	39.91±1.51	25.78±1.38	25.89±1.25	19.90±0.58	18.67±0.43
I						
Rf	37.42±1.21	35.47±1.35	21.81±1.44	21.00±1.25		
Do	31.70±1.54	31.16±1.41	17.17±1.58	18.20±0.92	14.14±0.68	13.21±0.34
P						
Rf	54.54±1.91	51.27±1.49	35.09±1.33	34.69±1.49		
Do	38.91±1.66	45.86±1.58	26.55±0.95	26.12±1.25	19.84±0.54	18.57±0.42
V						
Rf	46.95±2.16	45.86±1.58	23.77±1.56	28.14±1.45		
Do	35.13±1.79	33.27±1.77	21.50±1.69	21.95±0.78	15.82±0.50	15.57±0.59



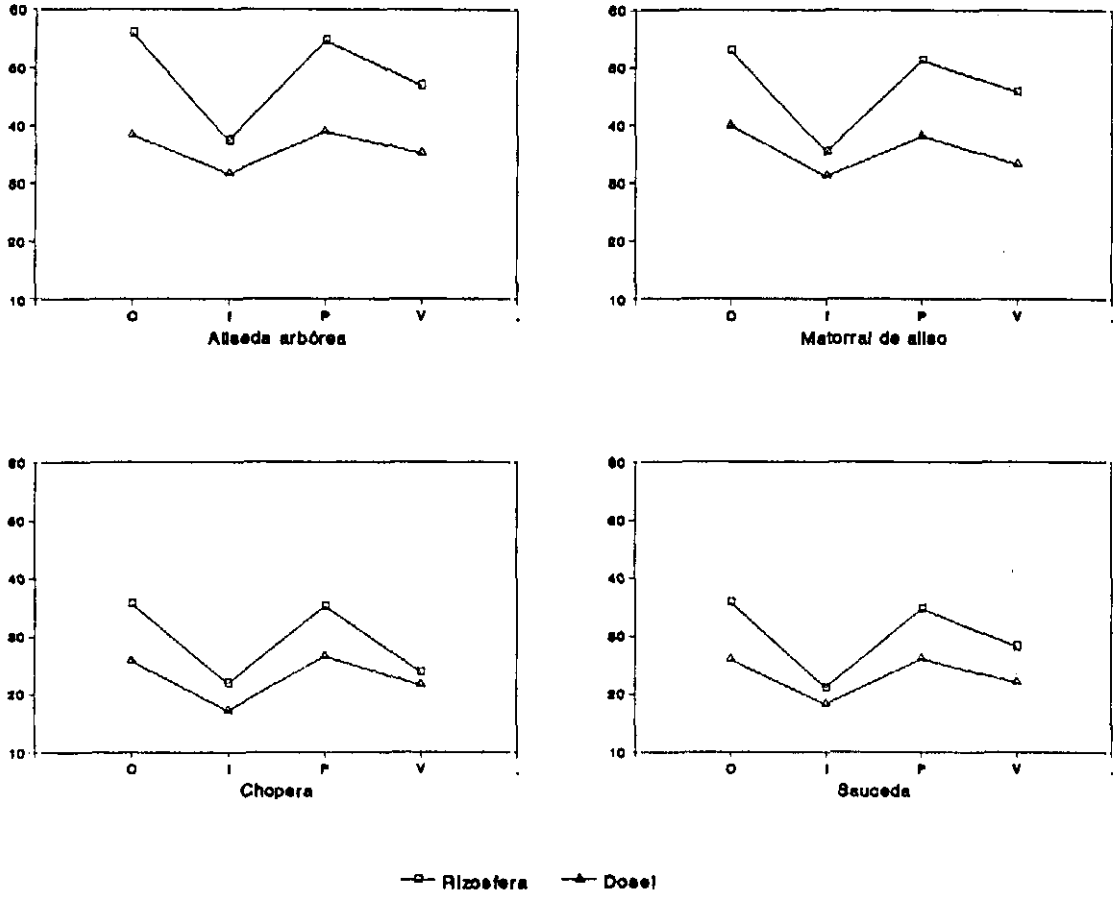
Z 1 Aliseda arborea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera
 Z 4 Sauceda
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo



Rf Rizosfera
 Do Dose
 O Otoño
 I Invierno
 P Primavera
 V Verano

Aliseda arborea Matorral de aliso Chopera
 Sauceda Ladera Pastizal

Fig. 3.11 Variaciones entre las zonas y las estaciones de las concentraciones medias de nitrógeno-amonio (µg/g)



O Otoño ; I Invierno ; P Primavera ; V Verano

Fig. 3.12 Variaciones entre la rizosfera y el dosel de las concentraciones medias de nitrógeno-amonio (µg/g)

entre la chopera y la sauceda, ni entre los matorrales de aliso y los de porte arbóreo.

La figura 3.11 corresponde a las diferencias estacionales. En las dos gráficas los resultados menores se encuentran en invierno. Los análisis de la varianza recogen las variaciones como significativas ($p < 0.01$) con valores de $F=91.4$ para el conjunto de las cuatro primeras zonas, de $F=106.8$ para las zonas 5 y 6 y las fracciones rizosféricas, y de $F=35.8$ para el dosel y las zonas 5 y 6. En los tres casos las tablas de comparación entre medias indican que el otoño y la primavera no difieren de forma significativa en la proporción de amonio, y son los resultados más elevados de todo el año. En el verano descienden las cantidades de amonio y en invierno aparecen las concentraciones inferiores.

Las diferencias a lo largo del año entre la rizosfera y el dosel de las distintas plantas se representan en la gráfica 3.12. La rizosfera es la zona de contenido mayor de nitrógeno-amonio. El análisis de la varianza con una $F=240.9$ confirma que las diferencias son significativas con una probabilidad del 99%.

Las interacciones zona-sistema radical ($F=6.2$) y estación-sistema radical ($F=11.3$) también son significativas.

3.2.6. Nitrógeno-nitrato

Los datos de la tabla 3.X expresan los μg de nitrógeno-nitrato por gramo de suelo analizado. Las concentraciones oscilan entre $0.92 \mu\text{g}$ en el pastizal durante el invierno y $19.90 \mu\text{g}$ en el dosel de la sauceda durante el verano.

El primer factor de variación que se estudia es la zona. Las variaciones en los resultados se representan en la figura 3.13. En el pastizal y en la ladera se observan resultados muy bajos y las concentraciones mayores corresponden a las zonas con chopos y sauces. Los ANOVA de las muestras rizosféricas y del dosel ($F=1697.7$), de las zonas 5 y 6 junto con la rizosfera ($F=4468.1$) y del dosel junto con las zonas 5 y 6 ($F=9083.5$) confirman que las diferencias no se deben al azar con una significación del 99%.

En las tablas de comparación entre medias (tabla 3.XX) no aparecen diferencias entre ambas zonas sin vegetación leñosa, donde los niveles de nitrato son los más bajos de todas las fracciones de suelo. Entre las zonas 1, 2, 3 y 4 hay variaciones significativas y las concentraciones más altas se encuentran en la sauceda.

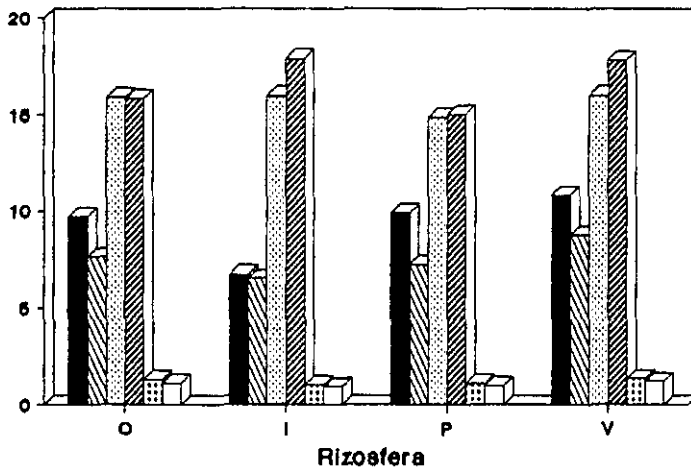
La variación estacional (figura 3.13) es significativa ($p<0.01$) en los tres análisis de la varianza. Las tablas de comparación entre medias indican que los datos más elevados se alcanzan en el verano y por el contrario el invierno es la época del año en que se detectan las concentraciones menores de nitrato.

Las diferencias entre la rizosfera y el dosel de las plantas se expresan en la figura 3.14. Se aprecia que el dosel alcanza concentraciones de nitrato superiores a las rizosféricas. El contraste es mayor en las alisedas. El análisis de la varianza refleja que estas diferencias son significativas ($p<0.01$).

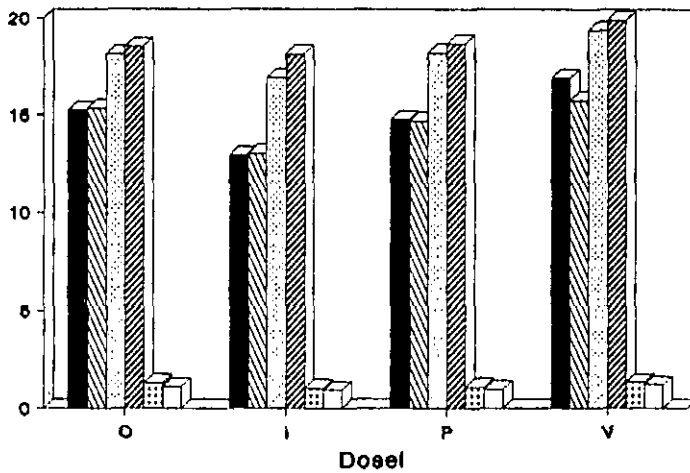
Las interacciones entre los tres factores de variación difieren de forma significativa ($p<0.01$) en todos los casos.

Tabla 3.X Concentraciones medias de nitrógeno-nitrato (µg/g). Se indica la media de cinco réplicas ± su error estándar

	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 5	Z 6
O	Rf 9.70±0.34	7.61±0.13	15.88±0.21	15.85±0.12		
	Do 15.25±0.18	15.35±0.16	18.11±0.21	18.52±0.20	1.30±0.03	1.10±0.03
I	Rf 6.72±0.15	6.53±0.22	16.00±0.10	17.90±0.11		
	Do 12.92±0.22	13.03±0.17	16.93±0.19	18.15±0.16	1.02±0.04	0.92±0.02
P	Rf 9.89±0.28	7.24±0.21	14.86±0.25	15.02±0.36		
	Do 14.76±0.25	14.68±0.20	18.21±0.15	18.69±0.21	1.09±0.03	0.98±0.02
V	Rf 10.79±0.11	8.74±0.25	16.00±0.26	17.79±0.21		
	Do 16.94±0.09	15.78±0.14	19.38±0.19	19.90±0.21	1.34±0.04	1.20±0.03



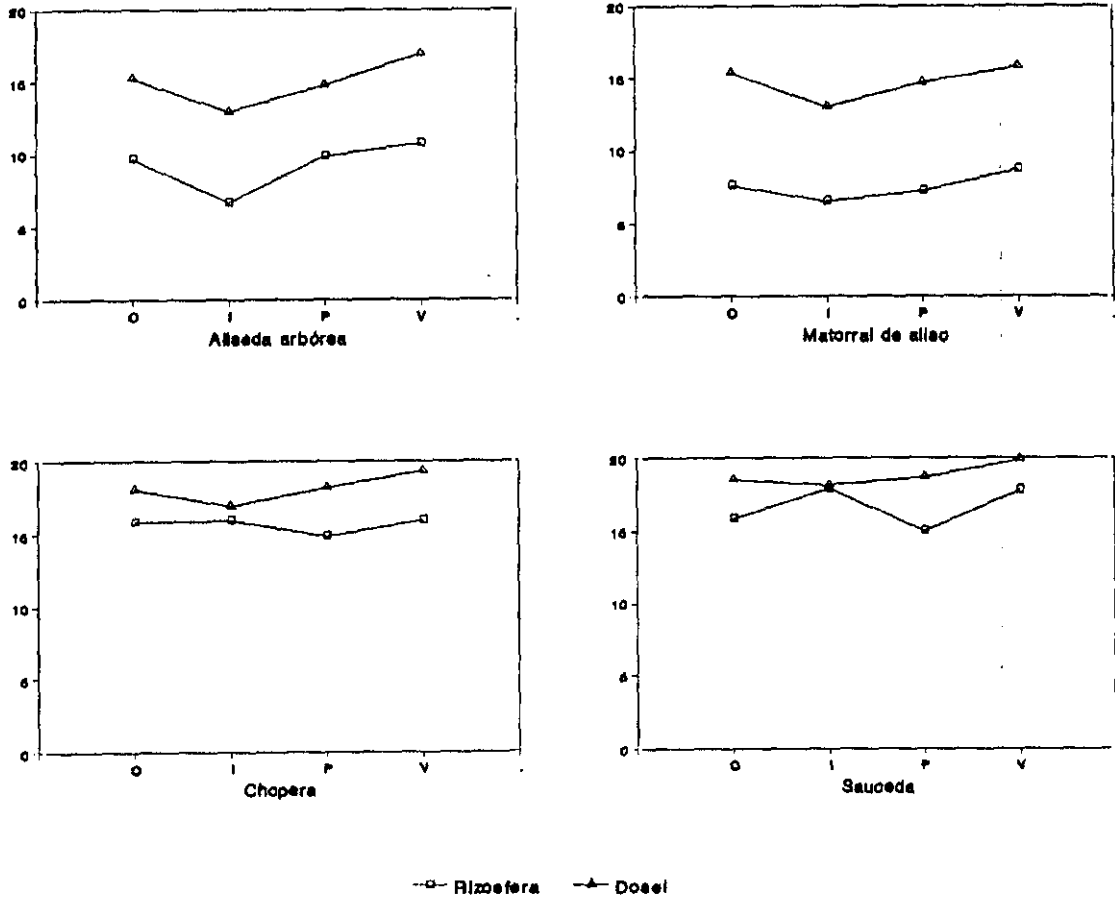
Z 1 Aliseda arborea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera
 Z 4 Sauceda
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo



Rf Rizosfera
 Do Doseel
 O Otoño
 I Invierno
 P Primavera
 V Verano

■ Aliseda arborea ▨ Matorral de aliso ▩ Chopera
 ▧ Sauceda ▤ Ladera □ Pastizal

Fig. 3.13 Variaciones entre las zonas y las estaciones de las concentraciones medias de nitrógeno-nitrato (µg/g)



O Otoño ; I Invierno ; P Primavera ; V Verano

Fig. 3.13 Variaciones entre las zonas y las estaciones de las concentraciones medias de nitrógeno-nitrato (µg/g)

3.2.7. Humedad

El nivel de humedad de las fracciones de suelo se expresa en tanto por ciento en la tabla 3.XI. Los resultados oscilan entre el 3.71% del dosel de la chopera durante el estío y el 40.20% de la rizosfera de los alisos más jóvenes en invierno.

Las variaciones entre zonas aparecen en la figura 3.15. Durante todo el año las dos alisedas mantienen el grado de humedad más elevado. Los análisis de la varianza registran que las diferencias no se deben al azar ($p < 0.01$) y los cuadros de comparación entre medias (tabla 3.XXI) concretan estas variaciones e indican que entre los matorrales de aliso está la humedad máxima. En las zonas 3, 5 y 6 el porcentaje de humedad desciende hasta los niveles más bajos.

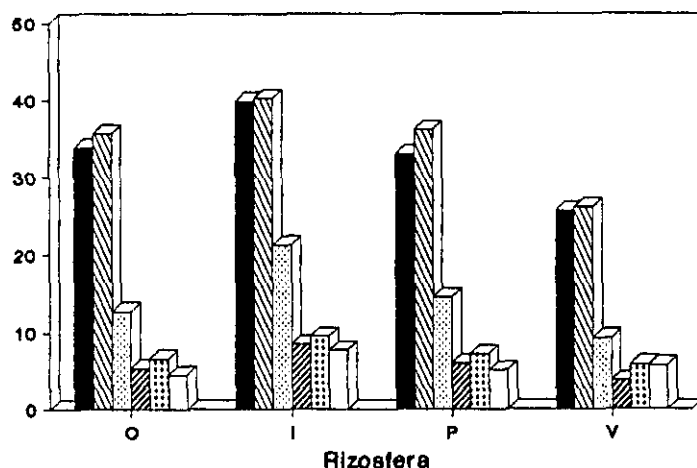
Los ANOVA también señalan diferencias significativas entre estaciones ($p < 0.01$). La variación estacional se recoge en la figura 3.15. Las gráficas y los cuadros de comparación entre medias muestran que en el verano el suelo está más seco; la humedad aumenta en la primavera y en el otoño, estaciones que no difieren de forma significativa, y en el invierno el nivel de humedad es muy superior.

Entre la rizosfera y el dosel se advierten también diferencias no debidas al azar ($p < 0.01$ y $F=20.1$). La rizosfera es la zona con mayor humedad (figura 3.16).

Las interacciones entre los tres factores de variación solo indican diferencias significativas en el caso estación-zona ($p < 0.01$ y $F=33.6$).

Tabla 3.XI Porcentajes medios de humedad (%). Se indica la media de cinco réplicas ± su error estándar

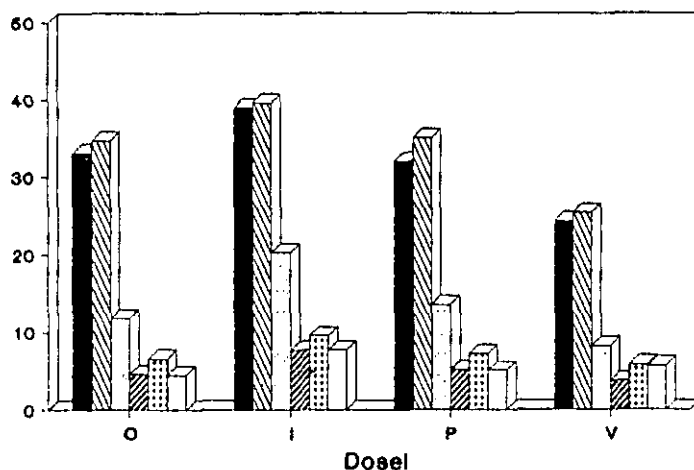
	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 5	Z 6
O Rf	33.78±0.32	35.64±0.35	5.31±0.14	12.70±0.17		
Do	33.08±0.45	34.65±0.51	4.60±0.17	11.76±0.28	6.56±0.16	4.46±0.24
I Rf	39.78±0.90	40.20±1.12	8.46±0.16	21.18±0.30		
Do	39.00±0.99	39.53±1.06	7.67±0.20	20.26±0.30	9.47±0.39	7.65±0.21
P Rf	32.90±0.82	36.07±0.81	5.96±0.31	14.50±0.41		
Do	32.01±0.81	35.01±0.80	5.19±0.30	13.49±0.40	7.24±0.21	5.04±0.25
V Rf	25.60±0.13	26.10±0.22	5.27±0.10	9.17±0.14		
Do	24.30±0.24	25.39±0.15	3.71±0.12	8.19±0.22	5.80±0.08	5.69±0.12



Z 1 Aliseda arbórea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera
 Z 4 Saucedá
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo

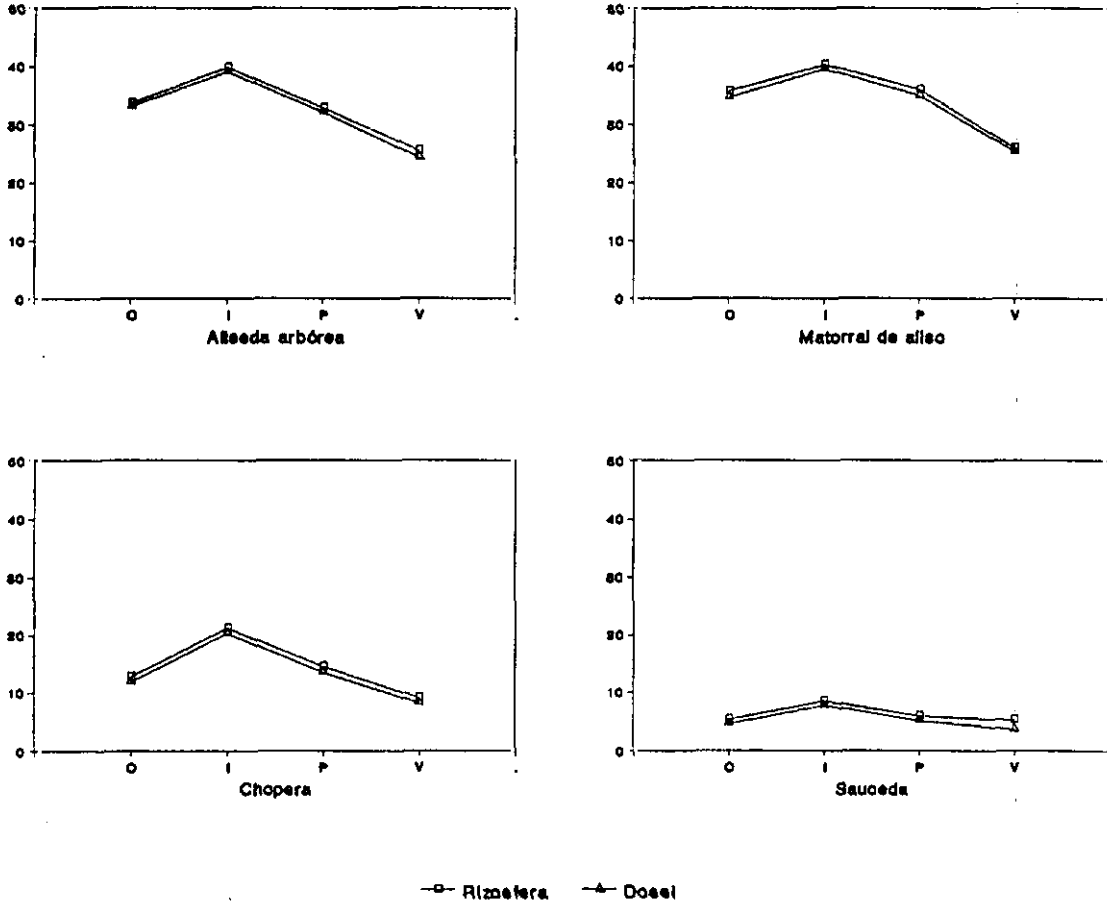
Rf Rizosfera
 Do Dosel

O Otoño
 I Invierno
 P Primavera
 V Verano



Aliseda arbórea Matorral de aliso Chopera
 Saucedá Ladera Pastizal

Fig. 3.15 Variaciones entre las zonas y las estaciones de los porcentajes medios de humedad (%)



O Otoño ; I Invierno ; P Primavera ; V Verano

Fig. 3.16 Variaciones entre la rizosfera y el dosel de los porcentajes medios de humedad (%)

Tablas 3.XII a 3.XIV. Significación de los ANOVA (F)
de las variables físico-químicas

Tabla 3.XII ANOVA de las variables físico-químicas de rizosfera y dosel. Se indica la F y la significación

FUENTES DE VARIACION							
	1	2	3	4	5	6	7
pH	335.1 (**)	274.6 (**)	462.9 (**)	30.6 (**)	87.5 (**)	74.9 (**)	16.5 (**)
C orgánico	39.5 (**)	138.4 (**)	27.5 (**)	4.8 (**)	1.9 (NS)	0.04 (NS)	0.8 (NS)
N total	496.9 (**)	250.9 (**)	501.0 (**)	6.5 (**)	1.5 (NS)	11.9 (**)	3.0 (**)
C/N	72.7 (**)	12.5 (**)	62.7 (**)	6.3 (**)	2.3 (NS)	0.7 (NS)	1.3 (NS)
N-amonio	91.4 (**)	241.5 (**)	240.9 (**)	0.4 (NS)	6.2 (**)	11.3 (**)	1.1 (NS)
N-nitrato	123.4 (**)	1697.7 (**)	2903.8 (**)	22.7 (**)	226.0 (**)	14.1 (**)	8.2 (**)
Humedad	480.9 (**)	4607.4 (**)	20.1 (**)	33.6 (**)	0.01 (NS)	0.1 (NS)	0.09 (NS)

Fuentes de variación:

- 1 Estación
- 2 Zona
- 3 Sistema radical
- 4 Interacción Estación - Zona
- 5 Interacción Zona - Sistema radical
- 6 Interacción Estación - Sistema radical
- 7 Interacción Estación - Zona - Sistema radical

Significación: ** $p < 0.01$
 NS no significativo

Tabla 3.XIII ANOVA de las variables físico-químicas de la rizosfera y de las zonas sin árboles. Se indica la F y la significación

FUENTES DE VARIACION			
	1	2	3
pH	298.1 (**)	208.6 (**)	34.2 (**)
C orgánico	35.5 (**)	253.1 (**)	1.4 (NS)
N total	234.7 (**)	614.4 (**)	11.2 (**)
C/N	65.1 (**)	36.9 (**)	11.3 (**)
N-amonio	106.8 (**)	385.5 (**)	3.9 (**)
N-nitrato	41.5 (**)	4468.1 (**)	22.8 (**)
Humedad	284.3 (**)	3055.5 (**)	28.6 (**)

Fuentes de variación:

- 1 Estación
- 2 Zona
- 3 Interacción Estación - Zona

Significación: ** $p < 0.01$
 NS no significativo

Tabla 3.XIV ANOVA de las variables físico-químicas del dosel y de las zonas sin árboles. Se indica la F y la significación

FUENTES DE VARIACION			
	1	2	3
pH	91.2 (**)	39.3 (**)	5.4 (**)
C orgánico	30.8 (**)	142.4 (**)	2.8 (**)
N total	157.2 (**)	349.6 (**)	9.6 (**)
C/N	46.9 (**)	4.6 (**)	8.5 (**)
N-amonio	35.8 (**)	163.9 (**)	0.5 (NS)
N-nitrato	127.3 (**)	9083.5 (**)	13.9 (**)
Humedad	277.0 (**)	2719.1 (**)	25.9 (**)

Fuentes de variación:

- 1 Estación
- 2 Zona
- 3 Interacción Estación - Zona

Significación: ** $p < 0.01$
 NS no significativo

Tablas 3.XV a 3.XXI. Significación de las diferencias de las variables físico-químicas entre las estaciones del año y las zonas de muestreo.

En cada tabla se presentan tres apartados:

- a) Significación de los datos de las observaciones de la rizosfera y del dosel.
- b) Significación de los datos de las observaciones de las zonas sin árboles y de la rizosfera de las zonas arboladas.
- c) Significación de los datos de las observaciones de las zonas sin árboles y del dosel de las zonas arboladas.

En todas las tablas los resultados medios de las observaciones se disponen en orden creciente de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo.

Significación: ** $p < 0.01$
 * $p < 0.05$
 NS no significativo

Tabla 3.XV Significación de las diferencias entre los resultados medios de pH

a)

Z 2	**		
Z 4	**	**	
Z 3	**	**	NS
	Z 1	Z 2	Z 4

P	**		
O	**	**	
V	**	**	**
	I	P	O

b)

Z 2	**				
Z 6	**	**			
Z 5	**	**	*		
Z 4	**	**	**	NS	
Z 3	**	**	**	**	NS
	Z 1	Z 2	Z 6	Z 5	Z 4

P	**		
O	**	**	
V	**	**	**
	I	P	O

c)

Z 6	NS				
Z 5	**	**			
Z 2	**	**	**		
Z 4	**	**	**	NS	
Z 3	**	**	**	*	NS
	Z 1	Z 6	Z 5	Z 2	Z 4

P	**		
O	**	**	
V	**	**	**
	I	P	O

Z 1 Aliseda arbórea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera

Z 4 Saucedá
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo

O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Tabla 3.XVI Significación de las diferencias entre las concentraciones medias de carbono orgánico

a)

Z 4	**		
Z 2	**	NS	
Z 1	**	**	**
	Z 3	Z 4	Z 2

P	NS		
O	**	**	
I	**	**	**
	V	P	O

b)

Z 5	**				
Z 3	**	**			
Z 2	**	**	**		
Z 4	**	**	**	NS	
Z 1	**	**	**	**	**
	Z 6	Z 5	Z 3	Z 2	Z 4

P	NS		
O	**	**	
I	**	**	**
	V	P	O

c)

Z 5	**				
Z 3	**	**			
Z 4	**	**	**		
Z 2	**	**	**	NS	
Z 1	**	**	**	**	**
	Z 6	Z 5	Z 3	Z 4	Z 2

P	NS		
O	**	**	
I	**	**	**
	V	P	O

Z 1 Aliseda arbórea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera
 Z 4 Saucedá
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo

O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Tabla 3.XVII Significación de las diferencias entre las concentraciones medias de nitrógeno total

a)

Z 4	**		
Z 2	**	**	
Z 1	**	**	**
	Z 3	Z 4	Z 2

V	NS		
I	**	**	
O	**	**	**
	P	V	I

b)

Z 5	**			
Z 3	**	**		
Z 4	**	**	**	
Z 2	**	**	**	**
Z 1	**	**	**	**
	Z 6	Z 5	Z 3	Z 4

V	NS		
I	**	**	
O	**	**	**
	P	V	I

c)

Z 5	**			
Z 3	**	**		
Z 4	**	**	**	
Z 2	**	**	**	**
Z 1	**	**	**	**
	Z 6	Z 5	Z 3	Z 4

V	**		
I	**	**	
O	**	**	**
	P	V	I

Z 1 Aliseda arbórea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera

Z 4 Saucedá
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo

O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Tabla 3.XVIII Significación de las diferencias entre los resultados medios de la relación C/N

a)

Z 3	NS			
Z 4	**	*		
Z 1	**	**	NS	
	Z 2	Z 3	Z 4	

I	**		
V	**	**	
P	**	**	**
	O	I	V

b)

Z 2	**				
Z 4	**	**			
Z 1	**	**	NS		
Z 6	**	**	**	**	
Z 5	**	**	**	**	NS
	Z 3	Z 2	Z 4	Z 1	Z 6

V	**		
I	**	*	
P	**	**	**
	O	V	I

c)

Z 3	NS				
Z 4	NS	NS			
Z 1	**	NS	NS		
Z 6	**	NS	NS	NS	
Z 5	**	*	*	NS	NS
	Z 2	Z 3	Z 4	Z 1	Z 6

V	**		
I	**	**	
P	**	**	**
	O	V	I

Z 1 Aliseda arbórea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera

Z 4 Sauceda
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo

O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Tabla 3.XIX Significación de las diferencias entre las concentraciones medias de N - amonio

a)

Z 4	NS		
Z 2	**	**	
Z 1	**	**	NS
	Z 3	Z 4	Z 2

V	**		
P	**	**	
O	**	**	NS
	I	V	P

b)

Z 5	NS				
Z 3	**	**			
Z 4	**	**	NS		
Z 2	**	**	**	**	
Z 1	**	**	**	**	*
	Z 6	Z 5	Z 3	Z 4	Z 2

V	**		
P	**	**	
O	**	**	NS
	I	V	P

c)

Z 5	NS				
Z 3	**	**			
Z 4	**	**	NS		
Z 2	**	**	**	**	
Z 1	**	**	**	**	NS
	Z 6	Z 5	Z 3	Z 4	Z 2

V	**		
P	**	**	
O	**	**	NS
	I	V	P

Z 1 Aliseda arbórea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera

Z 4 Sauceda
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo

O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Tabla 3.XX Significación de las diferencias entre las concentraciones medias de N - nitrato

a)

Z 1	**			
Z 3	**	**		
Z 4	**	**	**	
	Z 2	Z 1	Z 3	

P	**		
O	**	**	
V	**	**	**
	I	P	O

b)

Z 5	NS				
Z 2	**	**			
Z 1	**	**	**		
Z 3	**	**	**	**	
Z 4	**	**	**	**	**
	Z 6	Z 5	Z 2	Z 1	Z 3

P	NS		
O	**	**	
V	**	**	**
	I	P	O

c)

Z 5	NS				
Z 2	**	**			
Z 1	**	**	*		
Z 3	**	**	**	**	
Z 4	**	**	**	**	**
	Z 6	Z 5	Z 2	Z 1	Z 3

P	**		
O	**	*	
V	**	**	**
	I	P	O

Z 1 Aliseda arbórea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera
 Z 4 Saucedá
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo

O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Tabla 3.XXI Significación de las diferencias entre los porcentajes medios de humedad

a)

Z 4	**		
Z 1	**	**	
Z 2	**	**	**
	Z 3	Z 4	Z 1

O	**		
P	**	NS	
I	**	**	**
	V	O	P

b)

Z 3	NS				
Z 5	**	**			
Z 4	**	**	**		
Z 1	**	**	**	**	
Z 2	**	**	**	**	**
	Z 6	Z 3	Z 5	Z 4	Z 1

O	**		
P	**	NS	
I	**	**	**
	V	O	P

c)

Z 6	NS				
Z 5	**	**			
Z 4	**	**	**		
Z 1	**	**	**	**	
Z 2	**	**	**	**	**
	Z 3	Z 6	Z 5	Z 4	Z 1

O	**		
P	**	NS	
I	**	**	**
	V	O	P

Z 1 Aliseda arbórea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera

Z 4 Saucedá
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo

O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

3.3. Análisis microbiológicos.

A continuación se detalla el estudio de las comunidades de microorganismos edáficos que desempeñan un papel fundamental en la degradación de la materia orgánica nitrogenada al mineralizar el nitrógeno dentro de los ecosistemas terrestres. Los análisis se dirigen a dilucidar el tamaño y la actividad de dichas comunidades en las fracciones de suelo donde se determinaron las variables físico-químicas citadas, estudiando las variaciones estacionales y espaciales.

Se incluye un análisis de la densidad de la microflora total a fin de conocer la proporción relativa de las poblaciones que se estudian.

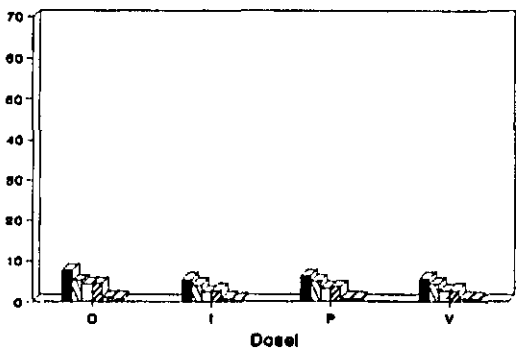
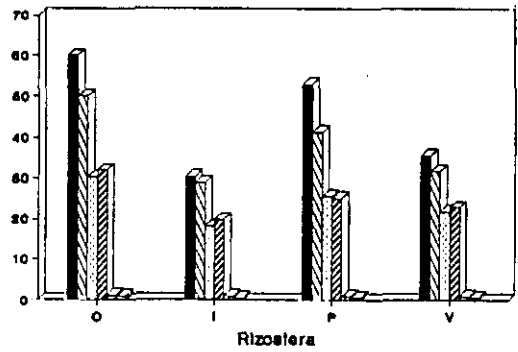
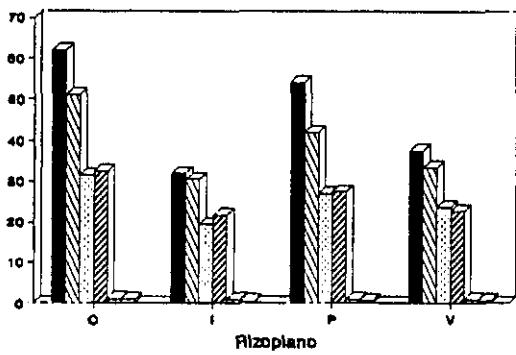
3.3.1. Densidad de la microflora total

El número más probable de microorganismos totales en las fracciones de suelo analizadas es del orden de 10^7 microorganismos/g de suelo (tabla 3.XXII). Los datos oscilan entre 62×10^7 microorganismos/g de suelo en el rizoplano de los árboles de aliso en el otoño y los 0.54×10^7 en el pastizal durante el invierno, que representa el 0.87% de la densidad máxima bajo los alisos.

En las cuatro estaciones y en las tres zonas referidas al sistema radical los resultados más altos se registran entre los alisos sobre todo en la zona 1, aunque entre los chopos y los sauces el NMP es elevado. La densidad descende en los controles sin vegetación leñosa, con diferencias escasas entre ambos (figura 3.17). El análisis de la varianza

Tabla 3.XXII Densidad media de la microflora total ($\times 10^7$)

	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 5	Z 6	
O	Rp	62.00±8.79	51.00±10.9	31.60±7.49	32.50±4.00		
	Rf	60.00±8.37	50.00±10.5	30.30±6.52	32.00±4.60		
	Do	7.80±1.12	5.20±1.13	4.39±1.04	4.52±1.51	1.13±0.15	0.96±0.20
I	Rp	32.00±5.40	30.50±4.15	19.60±3.86	21.80±6.27		
	Rf	30.40±9.31	28.90±6.06	18.20±3.57	19.90±5.16		
	Do	5.50±1.01	4.20±0.76	2.46±0.59	2.84±0.72	0.88±0.14	0.54±0.09
P	Rp	54.00±10.5	42.00±5.40	26.90±6.09	27.50±3.87		
	Rf	53.00±9.44	41.40±7.67	25.70±5.86	25.20±4.34		
	Do	6.40±0.79	5.00±0.81	3.34±0.61	3.63±0.94	0.95±0.10	0.70±0.12
V	Rp	37.50±9.43	33.40±5.87	23.80±5.21	22.80±4.51		
	Rf	35.60±11.5	31.80±7.65	22.00±5.54	22.90±5.45		
	Do	5.70±1.01	4.40±0.71	2.79±0.48	2.86±0.65	0.94±0.17	0.77±0.15



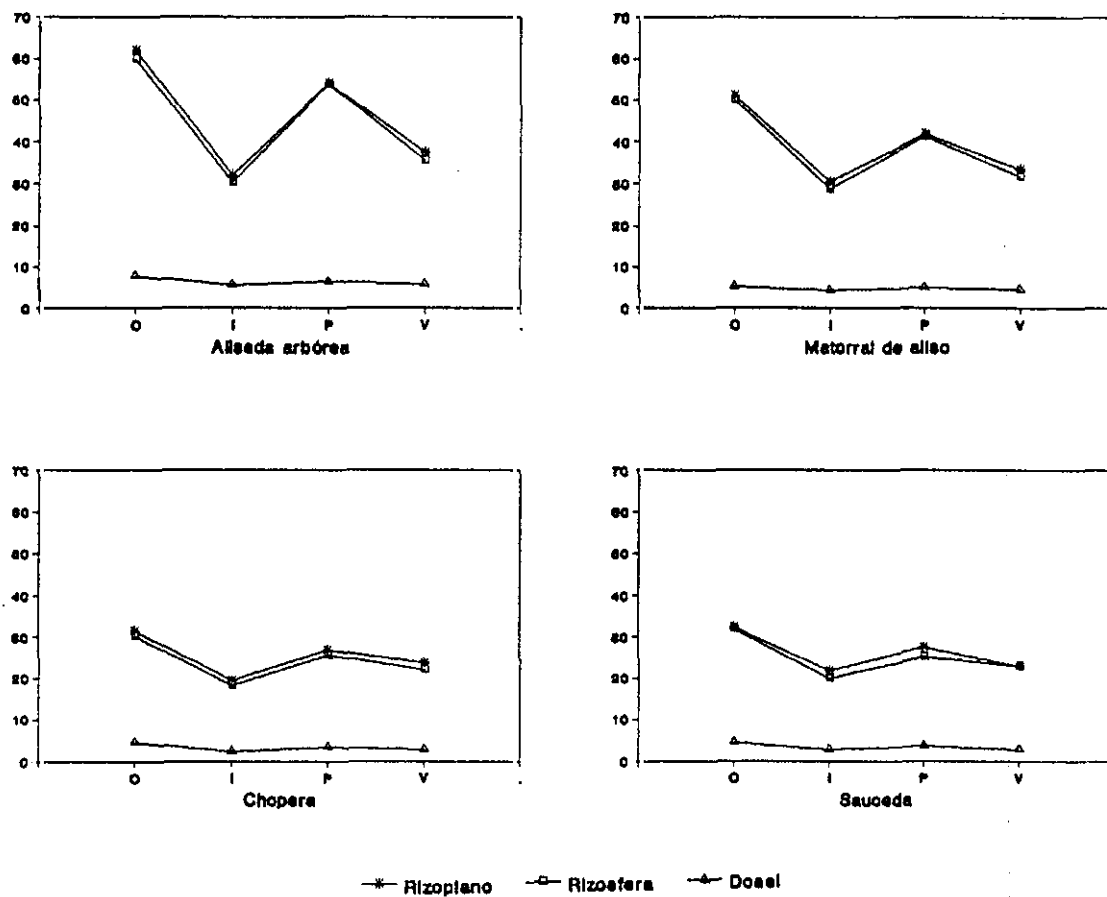
Z 1 Alameda arborea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera
 Z 4 Saucedá
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo

Rp Rizoplano
 Rf Rizosfera
 Do Dosel

O Otoño
 I Invierno
 P Primavera
 V Verano

Alameda arborea Matorral de aliso Chopera
 Saucedá Ladera Pastizal

Fig. 3.17 Variaciones estacionales y entre zonas de la densidad media de la microflora total ($\times 10^7$)



O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Fig. 3.18 Variaciones entre el rizoplano, rizosfera y dosel de la densidad de microflora total (x10⁷)

de las zonas con árboles (tabla 3.XXVII) indica que las diferencias son significativas ($p < 0.01$ y $F = 15.1$). Los ANOVA de los datos del rizoplano, de la rizosfera y del dosel junto con las zonas 5 y 6 ratifican que las variaciones no se deben al azar. En el caso del rizoplano la F es 37.9 (tabla 3.XXVIII), en la rizosfera, 30.1 (tabla 3.XXIX) y en el agrupamiento del dosel, 26.8 (tabla 3.XXX), datos que se corresponden con un grado de significación superior al 99%. En las tablas de comparación entre medias (tabla 3.XXXI) no aparecen variaciones entre la chopera y la sauceda, pero sí entre éstas, la aliseda y las zonas sin arbolado. El NMP de la microflora total de los alisos de porte arbóreo, tanto en la rizosfera como en el rizoplano es mayor que el NMP de microorganismos en los alisos arbustivos, aunque las diferencias no son significativas. Sin embargo, cuando se considera el dosel de los alisos, aparecen diferencias sensibles ($p < 0.01$).

Los cambios estacionales se indican en la figura 3.17. En las tres gráficas aparece el otoño como la época más favorable para el desarrollo de los microorganismos y el invierno como la estación en que se detecta el NMP menor. En las zonas 5 y 6 las diferencias son mínimas. Los análisis de la varianza de los resultados de las seis zonas detectan diferencias muy significativas ($p < 0.01$), salvo cuando se asocian los datos del dosel y de las zonas sin vegetación leñosa ($p < 0.05$). En los cuadros de comparación entre medias se observa que la densidad de la microflora total es elevada en otoño y en primavera, estaciones entre las que no se aprecian variaciones significativas, mientras que en verano e invierno, en mayor grado en esta última, disminuye el NMP de microorganismos. Ambas estaciones son muy homogéneas y no se diferencian entre sí.

La gráfica 3.18 refleja las fluctuaciones del NMP en el rizoplano, la rizosfera y el dosel de las plantas durante el año. La densidad de la microflora total desciende bajo el dosel de las plantas en las cuatro estaciones y el rizoplano y la rizosfera apenas difieren. El ANOVA señala variaciones no debidas al azar ($F=108.9$ y $p<0.01$) y la tabla de comparación entre medias indica que la densidad de microorganismos en el rizoplano es mayor que la media rizosférica, a pesar de que estos datos no expresan variaciones significativas. La media del NMP bajo dosel es del orden de 7 veces inferior a la media de densidad en el rizoplano y en la rizosfera. Estas variaciones no se deben al azar.

Las interacciones de los tres factores de variación detallados difieren en el grado de significación. Los ANOVA no detectan variaciones significativas en las interacciones estación-zona y estación-sistema radical, ni cuando se considera el efecto triple, estación-zona-sistema radical. La interacción zona-sistema radical ($F=2.5$) es significativa al nivel de $p<0.05$.

3.3.2. Densidad de la microflora proteolítica

El NMP de microorganismos proteolíticos se expone en la tabla 3.XXIII. La densidad de los microorganismos es del orden de 100 veces menor que la densidad de la microflora total y los resultados oscilan entre 58×10^5 microorganismos/g de suelo en el rizoplano de los árboles de aliso durante el otoño y 0.8×10^5 en el pastizal y ladera durante el verano.

Las variaciones entre zonas (figura 3.19) se caracterizan porque son muy uniformes. Los datos más altos se aprecian en ambas poblaciones de alisos. En las cuatro zonas control (chopera, saucedá, ladera y pastizal) no aparecen cambios de gran relieve. En las cuatro estaciones la densidad inferior se observa en las zonas carentes de vegetación arbórea.

El análisis de la varianza (tabla 3.XXVII) revela que las diferencias entre los alisos y las zonas control con vegetación leñosa son significativas ($F=33.44$, $p<0.01$). Los ANOVA de las zonas 5 y 6 con el rizoplano, la rizosfera y el dosel, señalan variaciones entre zonas no debidas al azar ($p<0.01$). La comunidad proteolítica de los árboles de aliso es significativamente mayor ($p<0.01$) a la que se encuentra en los matorrales de aliso, chopos y sauces (tabla 3.32). En la aliseda más joven la densidad de microorganismos es intermedia entre los resultados de la aliseda arbórea y de los chopos y de los sauces, entre los que no hay diferencias.

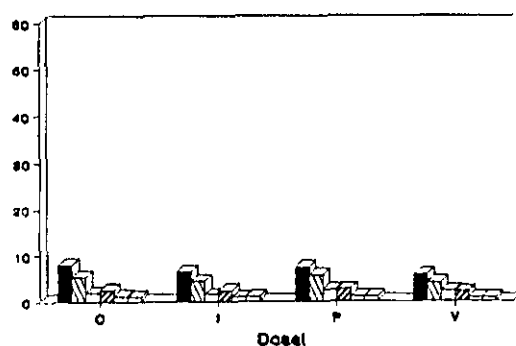
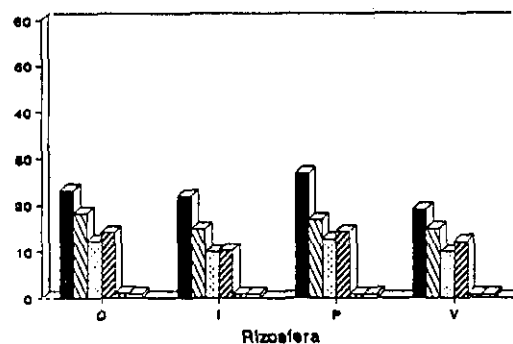
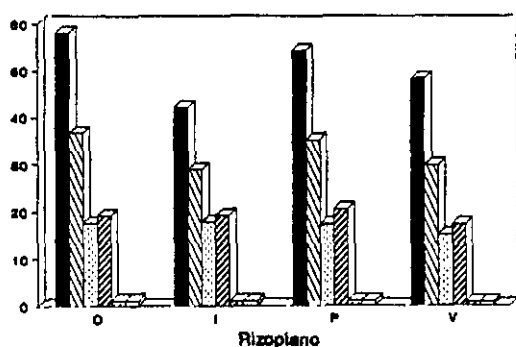
Los cambios estacionales se representan en la figura 3.19. En el rizoplano la densidad más elevada se aprecia en el otoño, sin embargo, en la rizosfera y en el dosel el NMP mayor de microorganismos corresponde a la primavera. En invierno y verano desciende el NMP de microorganismos, pero de forma poco importante, pues en invierno la comunidad proteolítica alcanza el 82% de la que aparece en el otoño.

Los análisis de la varianza de los cuatro conjuntos de datos no revelan diferencias grandes entre las estaciones, porque en ningún caso p es inferior a 0.05.

Las variaciones entre el rizoplano, la rizosfera y el dosel se representan en la figura 3.20. La densidad

Tabla 3.XXII Densidad media de la microflora proteolítica ($\times 10^5$)

		Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 5	Z 6
O	Rp	58.00±16.4	36.60±5.02	17.60±3.12	19.20±3.18		
	Rf	23.20±5.01	18.40±3.55	12.40±2.03	14.20±3.85		
	Do	8.00±2.23	5.30±1.40	2.00±0.27	2.46±0.46	1.18±0.24	1.06±0.24
I	Rp	42.00±5.22	28.80±3.27	17.80±1.56	19.20±4.87		
	Rf	22.00±4.31	14.80±2.57	10.00±1.60	10.40±1.37		
	Do	6.50±2.21	4.36±1.17	1.50±0.35	2.26±0.34	0.92±0.18	0.94±0.26
P	Rp	54.00±9.21	35.00±4.14	17.20±4.79	20.40±4.81		
	Rf	26.80±4.66	17.00±1.60	12.80±1.80	14.40±4.22		
	Do	7.44±1.59	5.80±0.72	2.54±0.61	2.60±0.46	1.02±0.46	0.94±0.26
V	Rp	48.00±7.69	29.60±4.35	15.00±2.47	17.20±3.20		
	Rf	19.20±4.30	15.00±1.70	10.00±1.55	12.20±2.16		
	Do	5.86±1.70	4.00±1.18	2.22±0.51	2.02±0.36	0.80±0.13	0.80±0.17



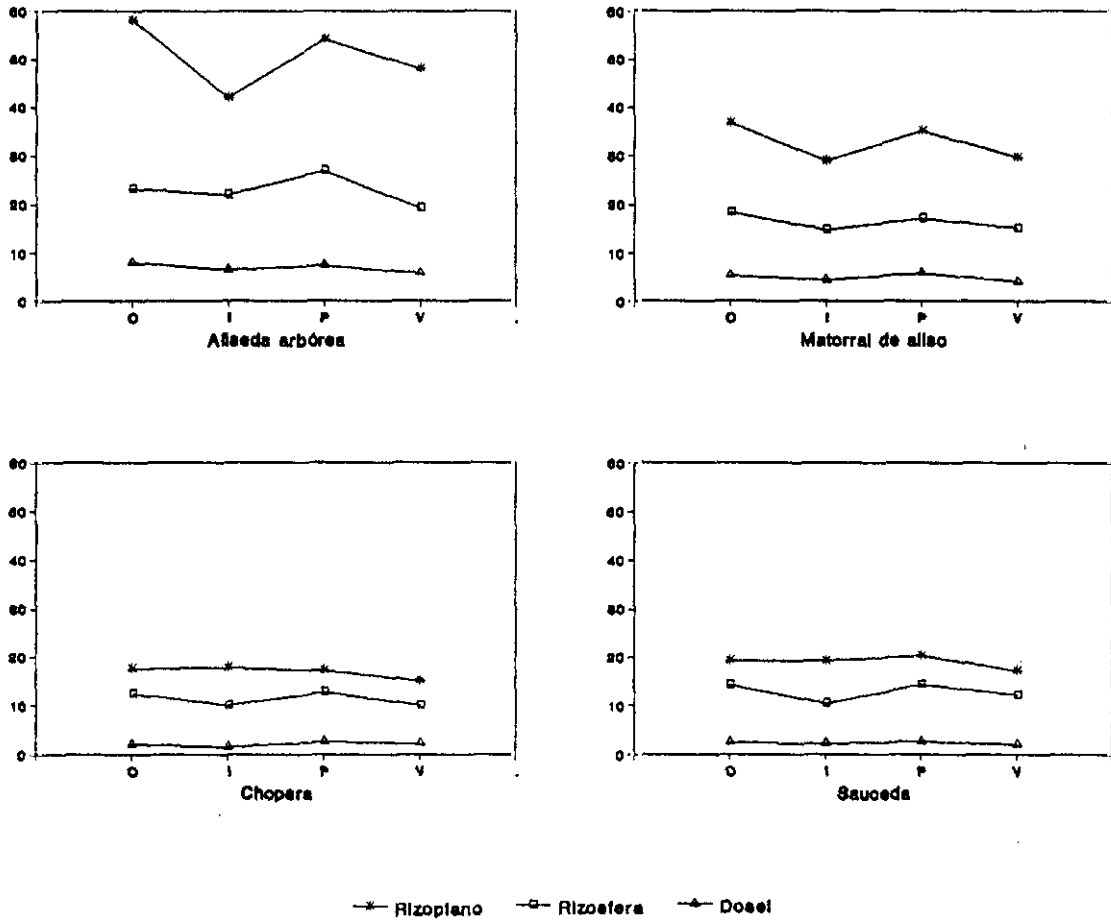
Z 1 Aliseda arborea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera
 Z 4 Sauceda
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo

Rp Rizoplano
 Rf Rizosfera
 Do Dosel

O Otoño
 I Invierno
 P Primavera
 V Verano

Aliseda arborea Matorral de aliso Chopera
 Sauceda Ladera Pastizal

Fig. 3.19 Variaciones estacionales y entre zonas de la densidad media de la microflora proteolítica ($\times 10^5$)



O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Fig. 3.20 Variaciones entre el rizoplano, rizosfera y dosel de la densidad de microflora proteolítica (x10⁵)

proteolítica es superior cerca de los alisos, chopos y sauces en todas las épocas de muestreo. En el rizoplano aparecen los resultados más altos del NMP, descienden en la rizosfera y en el dosel la comunidad proteolítica es menos abundante. El ANOVA manifiesta que estas diferencias no se deben al azar, con $F=126.7$ y $p<0.01$. El cuadro de comparación entre medias indica que la densidad de la microflora proteolítica en la rizosfera es significativamente menor que en el rizoplano (46.86% menor) y desciende aún más bajo dosel.

Las interacciones estación-zona y estación-sistema radical no son significativas, pero, con $F=9.28$, la interacción zona-sistema radical varía significativamente ($p<0.01$).

3.3.3. Densidad de la microflora amonificante

La microflora amonificante es 10 veces menor que la microflora total y superior en el mismo nivel a los microorganismos proteolíticos (tabla 3.XXIV).

Los valores del NMP oscilan entre 67×10^6 microorganismos/g de suelo en las fracciones del rizoplano de los alisos más desarrollados durante el otoño y 0.57×10^6 microorganismos del pastizal en invierno, lo que indica fuertes variaciones entre los puntos de muestreo.

La densidad de microorganismos amonificantes en las cuatro zonas arboladas y en las dos zonas sin vegetación leñosa durante el año aparece en la figura 3.21. Las variaciones del NMP discurren paralelas a las registradas en la comunidad proteolítica. Las comunidades más numerosas de microorganismos amonificantes se localizan en la aliseda, la densidad desciende en la chopera y saucedada y los resultados

menores se registran en la zona en pendiente y en el pastizal húmedo. Los análisis de la varianza indican que las diferencias entre las seis zonas son significativas ($p < 0.01$) y la tabla de comparación entre medias (tabla 3.XXXIII) de los datos de las zonas con alisos, chopos y sauces manifiesta que la densidad mayor de microorganismos productores de amonio se localiza bajo los alisos de porte arbóreo y que entre la sauceda y la chopera no hay diferencias significativas.

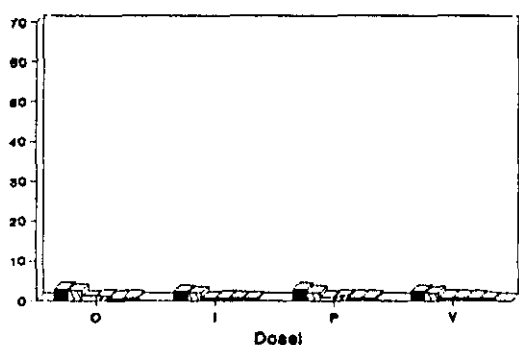
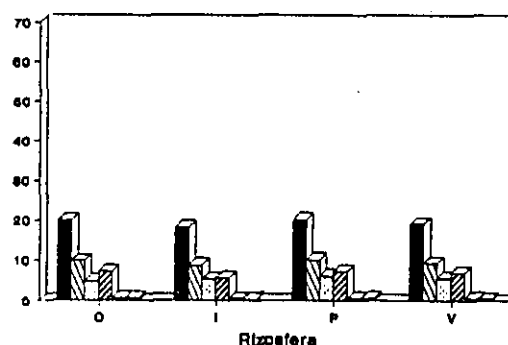
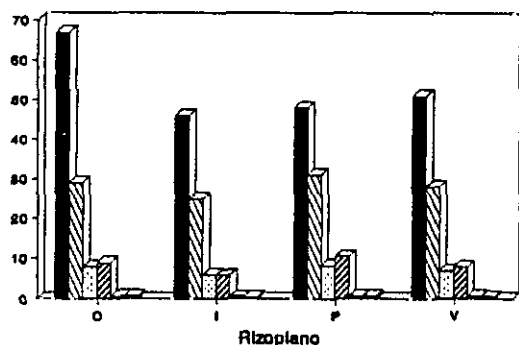
Los cuadros de comparación entre medias de los resultados del rizoplano, rizosfera y de las zonas sin árboles también reflejan densidades mayores de microflora amonificante en torno a los alisos, resultados intermedios en los chopos y sauces y las comunidades menores en el pastizal y ladera. Entre los alisos y las zonas restantes las variaciones son significativas ($p < 0.01$), pero no así entre los chopos, sauces y ambas zonas sin vegetación leñosa, excepto en la asociación de los datos rizosféricos y del pastizal y ladera ($p < 0.01$).

La gráfica 3.21 refleja los cambios estacionales. Las comunidades de microorganismos aumentan en el otoño y en la primavera y en las dos estaciones de temperaturas más extremas descende el NMP de microorganismos. Estas variaciones son escasas como se refleja en los ANOVA, pues no manifiestan diferencias significativas en ningún caso.

El efecto del sistema radical se observa en la figura 3.22. La microflora productora de amonio es muy superior en el rizoplano de las plantas durante todo el año. La densidad de microorganismos descende según aumenta la distancia al sistema radical de las plantas y, bajo el dosel, aparecen las comunidades menos numerosas. El análisis de la varianza indica para esta fuente de variación una $F=85.5$ y $p < 0.01$. La tabla de comparación entre medias señala que la microflora

Tabla 3.XXII Densidad media de la microflora amonificante ($\times 10^6$)

	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 5	Z 6	
O	Rp	67.00±16.0	29.00±3.85	8.10±0.54	9.10±0.67		
	Rf	20.00±2.00	9.90±0.67	5.00±0.60	7.40±1.28		
	Do	2.90±0.30	2.42±0.38	1.02±0.15	1.14±0.21	0.79±0.19	0.65±0.14
I	Rp	46.00±14.8	25.00±2.00	6.10±0.61	5.90±0.99		
	Rf	18.20±1.73	8.90±0.78	5.40±0.61	5.70±0.87		
	Do	2.15±0.46	1.92±0.78	0.62±0.10	0.66±0.09	0.58±0.10	0.57±0.08
P	Rp	48.00±14.2	31.00±3.29	8.50±0.80	10.60±1.13		
	Rf	20.20±1.91	10.20±1.26	6.20±0.87	7.40±1.28		
	Do	2.80±1.54	2.12±0.25	0.93±0.09	1.08±0.13	0.72±0.19	0.65±0.15
V	Rp	51.00±13.7	28.00±4.15	7.10±0.73	8.10±0.54		
	Rf	19.20±1.58	9.50±0.80	5.80±0.59	7.10±0.73		
	Do	2.40±0.43	1.95±0.31	0.79±0.11	0.79±0.11	0.67±0.12	0.64±0.10



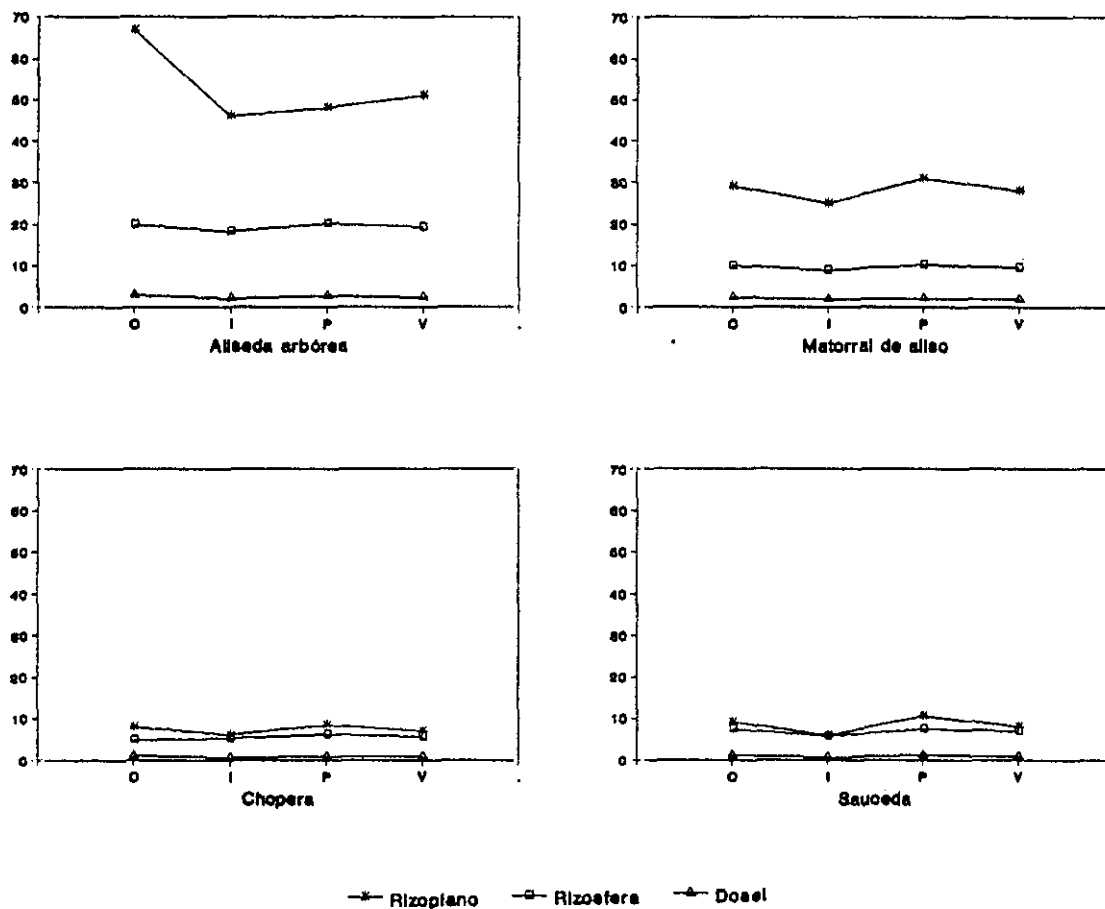
Z 1 Aliseda arbórea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera
 Z 4 Saucedá
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo

Rp Rizoplano
 Rf Rizosfera
 Do Dosel

O Otoño
 I Invierno
 P Primavera
 V Verano

Aliseda arbórea Matorral de aliso Chopera
 Saucedá Ladera Pastizal

Fig. 3.21 Variaciones estacionales y entre zonas de la densidad media de la microflora amonificante ($\times 10^6$)



O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Fig. 3.22 Variaciones entre el rizopiano, rizosfera y dosel de la densidad de microflora amonificante ($\times 10^6$)

amonificante del dosel es inferior de la que se encuentra en el rizoplano y en la rizosfera ($p < 0.01$). Por su parte la densidad de microorganismos de la rizosfera representa el 42.75% de la que habita en el rizoplano.

Las interacciones de las tres fuentes de variación no son significativas salvo cuando se analiza la interacción zona-sistema radical ($p < 0.01$).

3.3.4. Densidad de la microflora nitrificante nitrosa

La densidad de microorganismos que oxidan el amonio hasta nitrito es baja (tabla 3.XXV) y menor que la registrada en los grupos fisiológicos antes citados pues los datos del NMP de este grupo oscilan entre 37400 microorganismos/g de suelo del dosel de la aliseda más desarrollada en el verano y 1840 microorganismos/g de suelo de la rizosfera de las zonas con matorrales de aliso y sauces en el invierno y en la primavera, respectivamente.

La figura 3.23 refleja variaciones importantes entre las seis zonas estudiadas. Los resultados más elevados aparecen en la chopera y sauceda. Por el contrario los resultados inferiores del NMP se registran en las dos zonas sin vegetación arbórea, mientras que bajo los alisos, zonas 1 y 2, los datos son intermedios.

El ANOVA de los datos de las cuatro zonas arboladas indica que las diferencias no se deben al azar ($p < 0.01$ y $F = 4.8$). La prueba LSD (tabla 3.XXXIV) refleja que las variaciones entre las plantas diazotróficas no son significativas pero que hay diferencias ($p < 0.01$) entre la zona 1 y las zonas 3 y 4. La comunidad nitrificante nitrosa de la zona con árboles de aliso supone el 74.29% y el 74.76%

del NMP de microorganismos de las zonas con sauces y chopos respectivamente.

Los análisis de la varianza de las dos zonas sin árboles y de cada una de las tres zonas delimitadas respecto al sistema radical presentan también diferencias significativas ($p < 0.01$).

La densidad de microorganismos que aparecen en el rizoplano y en la rizosfera de todas las zonas es menor que en el pastizal y en la ladera. Los cuadros de comparación entre medias manifiestan que dichas variaciones son significativas. Pero no se observan diferencias en el rizoplano de las zonas con alisos, chopos y sauces, ni tampoco a nivel de rizosfera.

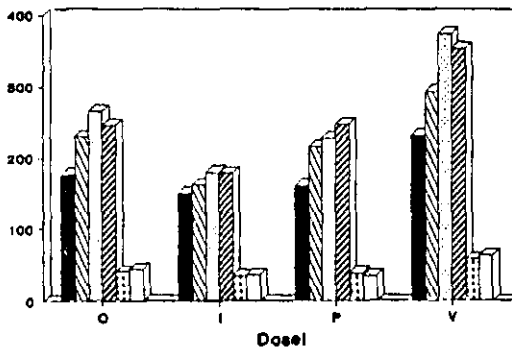
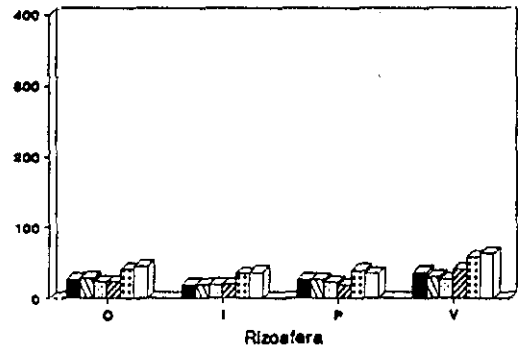
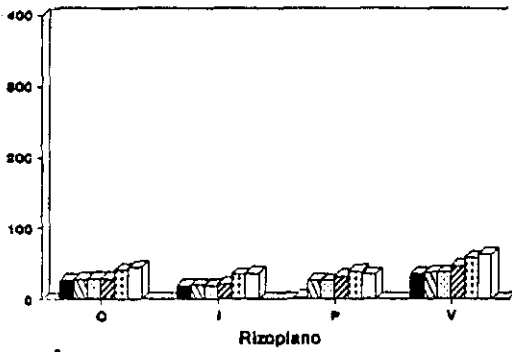
La tabla de comparación entre medias de los datos del dosel, del pastizal y de la zona en ladera señala que, como en los casos anteriores, los controles sin vegetación leñosa presentan resultados significativamente menores ($p < 0.01$).

Las variaciones en el segundo factor objeto de estudio, la estación, se reflejan en la figura 3.23. La densidad más elevada de microorganismos se encuentra en verano, descende en otoño y es menor en primavera y en invierno. Los análisis de la varianza establecen diferencias estacionales significativas en un 99%.

Los cuadros de comparación entre medias indican que hay variaciones ($p < 0.01$) entre el verano, la época con NMP mayor, y las demás estaciones. La densidad de microorganismos descende en otoño y en primavera, estaciones que no difieren de forma significativa, y es más baja en invierno.

Tabla 3.XXV Densidad media de la microflora nitrificante nitrosa ($\times 10^2$)

	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 5	Z 6
O	Rp	26.20±3.25	27.60±2.84	29.90±5.57	29.20±3.50	
	Rf	26.20±2.94	28.20±3.58	23.40±3.04	23.60±1.82	
	Do	176.00±12.2	230.00±43.8	266.00±22.9	246.00±26.5	40.60±6.69
I	Rp	18.80±2.92	19.80±2.37	19.40±2.22	21.60±1.46	
	Rf	19.00±2.56	18.40±1.73	18.80±1.66	19.60±1.34	
	Do	150.00±27.1	162.00±15.1	180.00±12.3	178.00±32.1	34.40±4.09
P	Rp	27.80±2.05	26.20±2.38	25.60±2.48	33.04±4.23	
	Rf	26.60±2.15	25.60±3.55	22.20±2.54	18.40±1.85	
	Do	160.00±34.1	216.00±36.8	228.00±33.3	248.00±25.5	39.20±8.94
V	Rp	36.00±4.42	37.00±3.53	37.80±10.4	46.40±6.56	
	Rf	36.60±5.45	30.40±4.43	26.60±6.42	41.00±6.79	
	Do	232.00±33.3	294.00±19.5	374.00±32.9	354.00±57.2	58.00±14.5



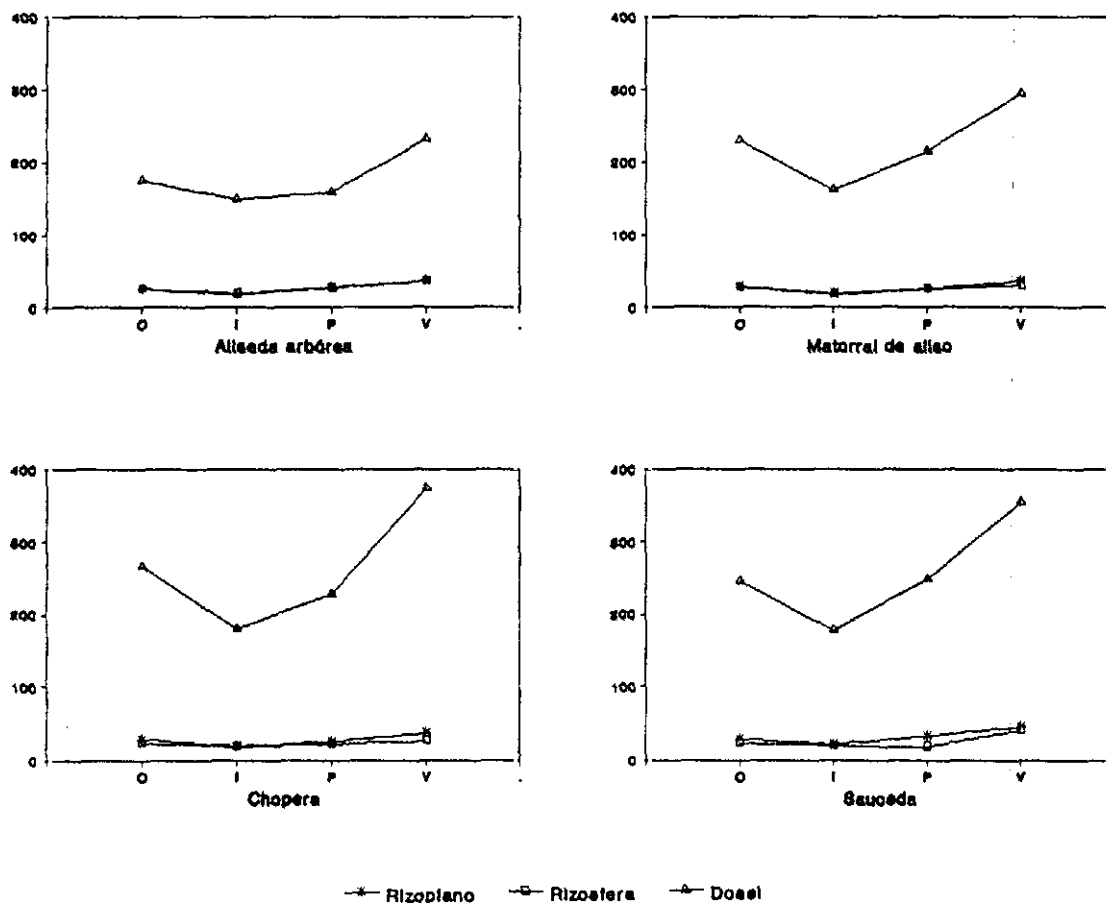
Aliseda arbórea
 Matorral de aliso
 Chopera
 Saucedo
 Ladera
 Pastizal

Z 1 Aliseda arbórea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera
 Z 4 Saucedo
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo

Rp Rizoplano
 Rf Rizosfera
 Do Dosel

O Otoño
 I Invierno
 P Primavera
 V Verano

Fig. 3.23 Variaciones estacionales y entre zonas de la densidad media de la microflora nitrificante nitrosa ($\times 10^2$)



O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Fig. 3.24 Variaciones entre el rizoplano, rizosfera y dosel de la densidad de microflora nitrificante nitrosa ($\times 10^2$)

Las variaciones entre el rizoplano, la rizosfera y el dosel de las zonas 1, 2, 3 y 4 durante todo el año se observa en la figura 3.24. El análisis de la varianza revela diferencias significativas ($p < 0.01$) entre rizoplano, rizosfera y dosel. La prueba LSD confirma que la densidad mayor de microorganismos aparece en el dosel de las cuatro zonas con árboles y es superior en un 87.51 % y en un 89.05 % al NMP de la microflora nitrificante nitrosa que aparece en el rizoplano y en la rizosfera. Entre estas dos últimas zonas no se observan variaciones significativas.

Los análisis de la varianza indican que la interacción estación-zona no es significativa en ningún caso, pero sin embargo las interacciones zona-sistema radical y estación-sistema radical varían por causas ajenas al azar ($p < 0.01$).

3.3.5. Densidad de la microflora nitrificante nítrica

Los valores del NMP de microorganismos que oxidan el ión nitrito hasta nitrato se expresan en la tabla 3.XXVI.

El NMP de microorganismos nitrificantes nítricos supera la densidad de la microflora nitrificante nitrosa en todos los puntos de muestreo. Los datos del NMP oscilan entre 10600 microorganismo/g de suelo en la rizosfera de los matorrales de aliso durante el invierno y 140000 en el dosel de los sauces durante la época de estío.

A pesar de que la densidad de microorganismos nítricos es más elevada que la de la microflora nitrosa las variaciones en ambos grupos evolucionan de forma parecida.

Las diferencias entre las zonas se representan en la gráfica 3.25. Los suelos más ricos en microorganismos que producen nitrato pertenecen a las zonas con chopos y sauces. En las alisedas se observa la densidad menor, mientras que en los puntos de muestreo carentes de vegetación arbórea aumenta el NMP de microorganismos. Los ANOVA demuestran que las variaciones entre las zonas no se deben al azar ($p < 0.01$).

En todos los casos los cuadros de comparación entre medias (tabla 3.XXXV) no señalan diferencias significativas entre las dos alisedas, ni entre los chopos y los sauces.

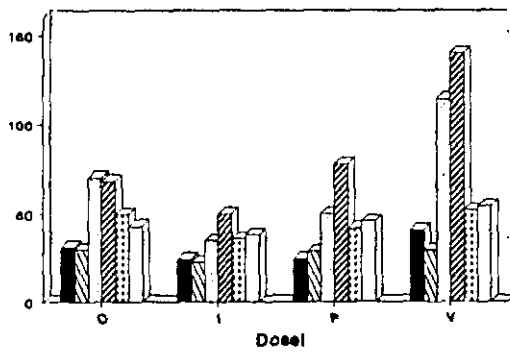
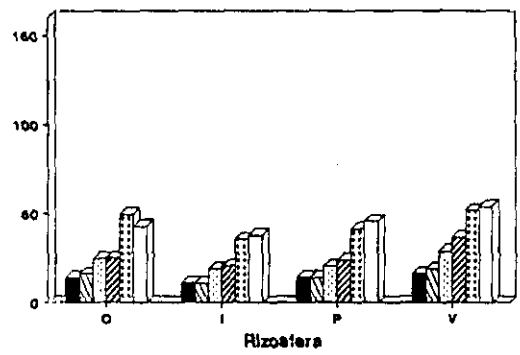
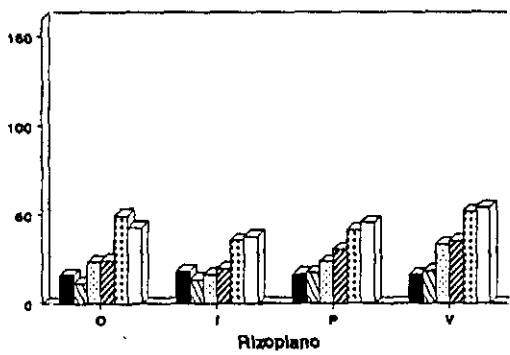
La gráfica 3.25 ilustra las diferencias entre las estaciones. El verano es la época del año más favorable para el desarrollo de estos microorganismos. Las variaciones estacionales son significativas ($p < 0.01$).

Las tablas de comparación entre medias muestran que la densidad de microorganismos en verano es significativamente mayor que en las restantes estaciones y también establecen que los valores más bajos se alcanzan en la época invernal. Sin embargo los datos de la primavera a nivel del rizoplano y del otoño en la rizosfera superan los resultados del estío.

Las variaciones en el rizoplano, rizosfera y dosel se observan en la gráfica 3.26. La densidad menor de microflora nitrificante nítrica aparece cerca del sistema radical y el análisis de la varianza indica que las diferencias son grandes ($p < 0.01$). El cuadro de comparación entre medias señala que, entre rizoplano y rizosfera, no se aprecian variaciones significativas. En ambas zonas el nivel de microorganismos que oxidan el nitrito no alcanza el 50 % de la comunidad detectada en el dosel.

Tabla 3.XXVI Densidad media de la microflora nitrificante nitrica ($\times 10^3$)

	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 5	Z 6	
O	Rp	16.40±4.26	11.60±1.54	23.40±3.24	24.40±2.96		
	Rf	14.20±2.60	16.40±4.58	24.60±5.23	25.20±3.03		
	Do	30.80±5.98	29.60±5.26	70.00±7.48	68.00±5.93	49.60±6.58	42.80±6.64
I	Rp	18.20±4.12	13.60±4.74	16.60±2.55	19.80±2.20		
	Rf	10.80±1.37	13.60±4.74	19.00±4.71	20.80±1.84		
	Do	24.00±4.53	22.26±3.08	34.60±3.77	49.60±6.58	35.60±3.89	37.80±5.44
P	Rp	16.60±4.06	17.20±2.30	23.80±4.56	30.60±4.85		
	Rf	14.40±2.48	13.80±2.78	20.40±2.96	24.00±2.67		
	Do	24.40±10.4	28.20±1.93	49.65±6.58	77.60±16.6	41.40±5.27	45.40±7.37
V	Rp	16.20±1.71	18.20±1.45	33.40±4.30	35.40±3.73		
	Rf	16.40±2.69	19.00±3.84	28.80±2.09	36.80±3.56		
	Do	40.40±7.89	29.00±5.59	114.00±38.0	140.00±37.1	52.00±10.8	53.80±10.0



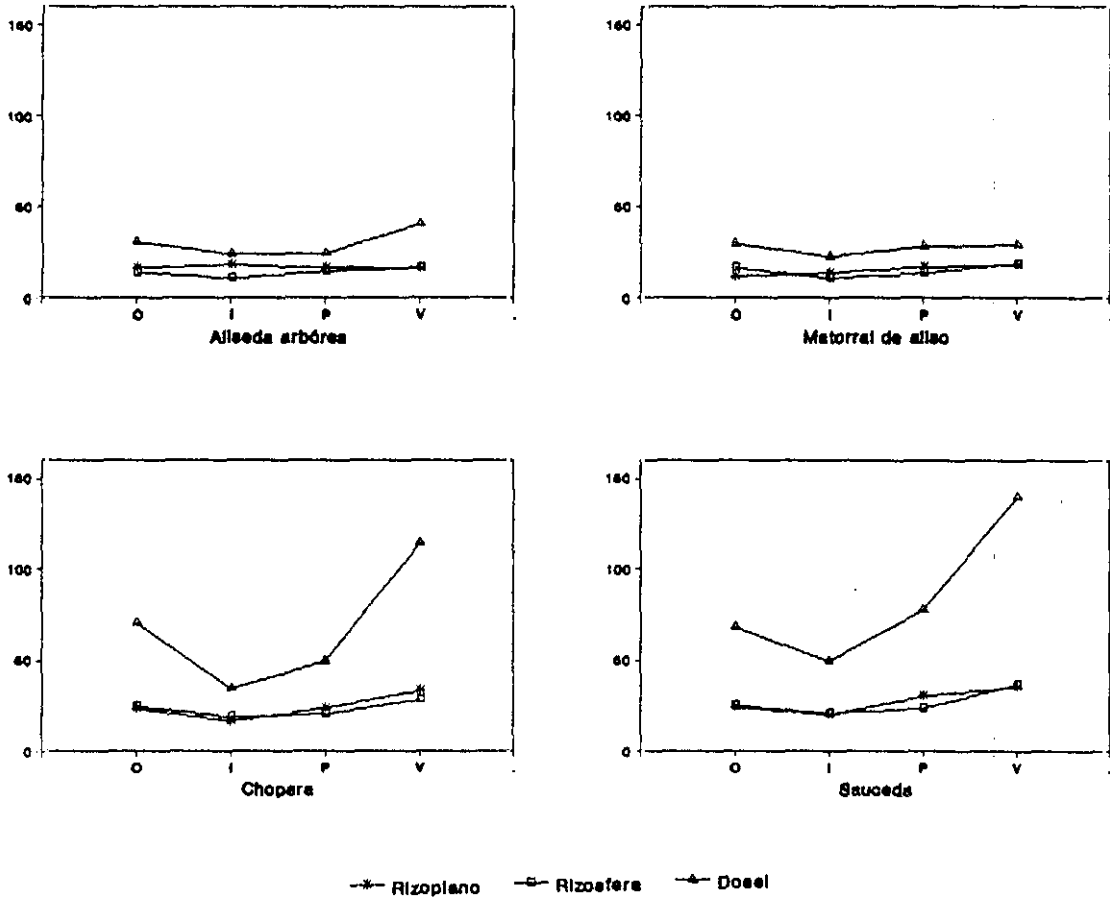
Aliseda arborea
 Matorral de aliso
 Chopera
 Saucedada
 Ladera
 Pastizal

Z 1 Aliseda arborea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera
 Z 4 Saucedada
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo

Rp Rizoplano
 Rf Rizosfera
 Do Dosel

O Otoño
 I Invierno
 P Primavera
 V Verano

Fig. 3.25 Variaciones estacionales y entre zonas de la densidad media de la microflora nitrificante nitrica ($\times 10^3$)



O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Fig. 3.26 Variaciones entre el rizoplano, rizosfera y dosel de la densidad de microflora nitrificante nítrica ($\times 10^3$)

Las interacciones estación-sistema radical y zona-sistema radical son significativas ($p < 0.01$). Por el contrario la interacción estación-zona y la interacción de los tres factores no lo son.

Tablas 3.XXVII a 3.XXX. Significación de los ANOVA (F) del
NMP de microorganismos

Tabla 3.XXVII ANOVA de los datos del NMP del rizoplano, rizosfera y dosel. Se indica la F y la significación

FUENTES DE VARIACION							
	1	2	3	4	5	6	7
Microflora total	9.7 (**)	15.1 (**)	108.9 (**)	0.6 (NS)	2.5 (*)	1.8 (NS)	0.2 (NS)
Proteolíticos	1.8 (NS)	33.4 (**)	126.7 (**)	0.2 (NS)	9.3 (**)	0.3 (NS)	0.2 (NS)
Amonificantes	0.8 (NS)	43.8 (**)	85.5 (**)	0.3 (NS)	18.8 (**)	0.4 (NS)	0.3 (NS)
Nitrificantes nitrosos	17.9 (**)	4.8 (**)	529.9 (**)	0.4 (NS)	4.5 (**)	9.3 (**)	0.4 (NS)
Nitrificantes nítricos	10.6 (**)	20.9 (**)	52.9 (**)	1.9 (NS)	6.3 (**)	3.6 (**)	0.9 (NS)

Fuentes de variación:

- 1 Estación
- 2 Zona
- 3 Sistema radical
- 4 Interacción Estación - Zona
- 5 Interacción Zona - Sistema radical
- 6 Interacción Estación - Sistema radical
- 7 Interacción Estación - Zona - Sistema radical

Significación:

- ** p<0.01
 * p<0.05
 NS no significativo

Tabla 3. XXVIII ANOVA de los datos del NMP del rizoplano y zonas sin árboles. Se indica la F y la significación

FUENTES DE VARIACION			
	1	2	3
Microflora total	4.8 (**)	37.9 (**)	0.8 (NS)
Proteolíticos	0.7 (NS)	59.9 (**)	0.7 (NS)
Amonificantes	0.5 (NS)	35.5 (**)	0.3 (NS)
Nitrificantes nitrosos	10.3 (**)	5.5 (**)	0.2 (NS)
Nitrificantes nítricos	4.4 (**)	22.6 (**)	0.5 (NS)

Fuentes de variación:

- 1 Estación
- 2 Zona
- 3 Interacción Estación - Zona

Significación: ** $p < 0.01$
 NS no significativo

Tabla 3. XXVIX ANOVA de los datos del NMP de la rizosfera y de las zonas sin árboles. Se indica la F y la significación

FUENTES DE VARIACION			
	1	2	3
Microflora total	4.3 (**)	30.1 (**)	0.7 (NS)
Proteolíticos	1.2 (NS)	35.7 (**)	0.2 (NS)
Amonificantes	0.9 (NS)	162.4 (**)	0.2 (NS)
Nitrificantes nitrosos	8.8 (**)	8.9 (**)	0.5 (NS)
Nitrificantes nítricos	4.9 (**)	24.8 (**)	0.2 (NS)

Fuentes de variación:

- 1 Estación
- 2 Zona
- 3 Interacción Estación - Zona

Significación: ** $p < 0.01$
 NS no significativo

Tabla 3. XXX ANOVA de los datos del NMP del dosel y de las zonas sin árboles. Se indica la F y la significación

	FUENTES DE VARIACION		
	1	2	3
Microflora total	2.7 (*)	26.8 (**)	0.2 (NS)
Proteolíticos	0.8 (NS)	19.7 (**)	0.2 (NS)
Amonificantes	2.6 (NS)	36.5 (**)	0.2 (NS)
Nitrificantes nitrosos	14.0 (**)	48.4 (**)	1.2 (NS)
Nitrificantes nítricos	7.2 (**)	9.2 (**)	1.3 (NS)

Fuentes de variación:

- 1 Estación
- 2 Zona
- 3 Interacción Estación - Zona

Significación: ** p<0.01
 * p<0.05
 NS no significativo

Tablas 3.XXXI a 3.XXXV. Significación de las diferencias de la densidad microbiana entre las estaciones del año, las zonas de muestreo y las zonas respecto al sistema radical.

En cada tabla se presentan cuatro apartados:

- a) Significación de los datos de las observaciones del rizoplano, de la rizosfera y del dosel.
- b) Significación de los datos de las observaciones de las zonas sin árboles y del rizoplano de las zonas arboladas.
- c) Significación de los datos de las observaciones de las zonas sin árboles y de la rizosfera de las zonas arboladas.
- d) Significación de los datos de las observaciones de las zonas sin árboles y del dosel de las zonas arboladas.

En todas las tablas los resultados medios de las observaciones se disponen en orden creciente de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo.

Significación: ** $p < 0.01$
* $p < 0.05$
NS no significativo

Tabla 3.XXXI Significación de las diferencias entre los resultados medios del NMP de microflora total

a)

Z 4	NS																		
Z 2	**	**																	
Z 1	**	**	NS																
	Z 3	Z 4	Z 2																

V	NS																		
P	**	*																	
O	**	**	NS																
	I	V	P																

Rf	**																		
Rp	**	NS																	
	Do	Rf																	

b)

Z 6	NS																		
Z 3	**	**																	
Z 4	**	**	NS																
Z 2	**	**	**	**															
Z 1	**	**	**	**	NS														
	Z 6	Z 5	Z 3	Z 4	Z 2														

V	NS																		
P	*	NS																	
O	**	**	NS																
	I	V	P																

c)

Z 6	NS																		
Z 3	**	**																	
Z 4	**	**	NS																
Z 2	**	**	**	**															
Z 1	**	**	**	**	NS														
	Z 6	Z 5	Z 3	Z 4	Z 2														

V	NS																		
P	*	NS																	
O	**	*	NS																
	I	V	P																

d)

Z 6	NS																		
Z 3	**	**																	
Z 4	**	**	NS																
Z 2	**	**	*	*															
Z 1	**	**	**	**	**														
	Z 6	Z 5	Z 3	Z 4	Z 2														

V	NS																		
P	NS	NS																	
O	*	*	NS																
	I	V	P																

Z 1 Aliseda arborea Z 2 Matorral de aliso Z 3 Chopera
 Z 4 Saucedá Z 5 Ladera Z 6 Pastizal húmedo

O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Rp Rizoplano; Rf Rizosfera; Do Dosel

Tabla 3.XXXII Significación de las diferencias entre los resultados medios del NMP de microflora proteolítica

a)

Z 4	NS																			
Z 2	**	**																		
Z 1	**	**	**																	
	Z 3	Z 4	Z 2																	

V	NS																			
P	NS	NS																		
O	NS	NS	NS																	
	I	V	P																	

Rf	**																			
Rp	**	**																		
	Do	Rf																		

b)

Z 6	NS																			
Z 3	**	**																		
Z 4	**	**	NS																	
Z 2	**	**	**	**																
Z 1	**	**	**	**	**															
	Z 6	Z 6	Z 3	Z 4	Z 2															

V	NS																			
P	NS	NS																		
O	NS	NS	NS																	
	I	V	P																	

c)

Z 6	NS																			
Z 3	**	**																		
Z 4	**	**	NS																	
Z 2	**	**	*	NS																
Z 1	**	**	**	**	**															
	Z 6	Z 6	Z 3	Z 4	Z 2															

I	NS																			
O	NS	NS																		
P	NS	NS	NS																	
	V	I	O																	

d)

Z 5	NS																			
Z 3	NS	NS																		
Z 4	NS	NS	NS																	
Z 2	**	**	**	**																
Z 1	**	**	**	**	**															
	Z 6	Z 6	Z 3	Z 4	Z 2															

I	NS																			
O	NS	NS																		
P	NS	NS	NS																	
	V	I	O																	

Z 1 Aliseda arbórea Z 2 Matorral de aliso Z 3 Chopera
 Z 4 Saucedá Z 5 Ladera Z 6 Pastizal húmedo

O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Rp Rizoplano; Rf Rizosfera; Do Dosel

Tabla 3.XXXIII Significación de las diferencias entre los resultados medios del NMP de microflora amonificante

a)

Z 4	NS			V	NS			Rf	**	
Z 2	**	**		P	NS	NS		Rp	**	**
Z 1	**	**	**	O	NS	NS	NS	Do	**	**
	Z 3	Z 4	Z 2		I	V	P			

b)

Z 6	NS			V	NS		
Z 3	NS	NS		P	NS	NS	
Z 4	NS	NS	NS	O	NS	NS	NS
Z 2	**	**	**	**	**	**	
Z 1	**	**	**	**	**	**	**
	Z 6	Z 6	Z 3	Z 4	Z 2		
				I	V	P	

c)

Z 5	NS			V	NS		
Z 3	**	**		O	NS	NS	
Z 4	**	**	NS	P	NS	NS	NS
Z 2	**	**	**	**	**	**	
Z 1	**	**	**	**	**	**	**
	Z 6	Z 6	Z 3	Z 4	Z 2		
				I	V	P	

d)

Z 6	NS			V	NS		
Z 3	NS	NS		P	NS	NS	
Z 4	NS	NS	NS	O	NS	NS	NS
Z 2	**	**	**	**	**	**	
Z 1	**	**	**	**	**	*	
	Z 6	Z 6	Z 3	Z 4	Z 2		
				I	V	P	

Z 1 Aliseda arborea Z 2 Matorral de aliso Z 3 Chopera
 Z 4 Saucedá Z 5 Ladera Z 6 Pastizal húmedo

O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Rp Rizoplano; Rf Rizosfera; Do Dosel

Tabla 3.XXXIV Significación de las diferencias entre los resultados medios del NMP de microflora nitrificante nitrosa

a)

Z 2	NS																		
Z 3	**	NS																	
Z 4	**	NS	NS																
	Z 1	Z 2	Z 3																

P	*																		
O	**	NS																	
V	**	**	**																
	I	P	O																

Rp	NS																		
Do	**	**																	
	Rf	Rp																	

b)

Z 2	NS																		
Z 3	NS	NS																	
Z 4	NS	NS	NS																
Z 6	**	**	**	*															
Z 6	**	**	**	*	NS														
	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 6														

P	NS																		
O	NS	NS																	
V	**	**	**																
	I	P	O																

c)

Z 4	NS																		
Z 2	NS	NS																	
Z 1	NS	NS	NS																
Z 6	**	**	**	**															
Z 6	**	**	**	**	NS														
	Z 3	Z 4	Z 2	Z 1	Z 6														

P	NS																		
O	NS	NS																	
V	**	**	**																
	I	P	O																

d)

Z 6	NS																		
Z 1	**	**																	
Z 2	**	**	*																
Z 3	**	**	**	NS															
Z 4	**	**	**	NS	NS														
	Z 5	Z 6	Z 1	Z 2	Z 3														

P	NS																		
O	*	NS																	
V	**	**	**																
	I	P	O																

Z 1 Aliseda arbórea Z 2 Matorral de aliso Z 3 Chopera
 Z 4 Saucedá Z 5 Ladera Z 6 Pastizal húmedo

O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Rp Rizoplano; Rf Rizosfera; Do Dosel

Tabla 3.XXXV Significación de las diferencias entre los resultados medios del NMP de microflora nitrificante nítrica

a)

Z 1	NS																		
Z 3	**	**																	
Z 4	**	**	NS																
	Z 2	Z 1	Z 3																

P	NS																		
O	NS	NS																	
V	**	**	**																
	I	P	O																

Rp	NS																		
Do	**	**																	
	Rf	Rp																	

b)

Z 1	NS																		
Z 3	**	NS																	
Z 4	**	NS	NS																
Z 6	**	**	**	**															
Z 6	**	**	**	**	NS														
	Z 2	Z 1	Z 3	Z 4	Z 5														

O	NS																		
P	NS	NS																	
V	**	*	NS																
	I	O	P																

c)

Z 2	NS																		
Z 3	**	**																	
Z 4	**	**	NS																
Z 5	**	**	**	**															
Z 6	**	**	**	**	NS														
	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 5														

P	NS																		
O	NS	NS																	
V	**	*	NS																
	I	P	O																

d)

Z 1	NS																		
Z 5	NS	NS																	
Z 6	NS	NS	NS																
Z 3	**	**	*	*															
Z 4	**	**	**	**	NS														
	Z 2	Z 1	Z 6	Z 6	Z 3														

P	NS																		
O	NS	NS																	
V	**	**	**																
	I	P	O																

Z 1 Aliseda arbórea Z 2 Matorral de aliso Z 3 Chopera
 Z 4 Saucedá Z 5 Ladera Z 6 Pastizal húmedo

O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Rp Rizoplano; Rf Rizosfera; Do Dosel

3.3.6. Actividad biológica de la microflora proteolítica

Los T50 que se expresan en la tabla 3.XXXVI reflejan las variaciones en la actividad biológica de los microorganismos proteolíticos. Los datos oscilan entre 0.68 en el rizoplano de los alisos de porte arbóreo durante el verano y 0.75 en las zonas control sin vegetación arbórea del invierno.

En la figura 3.27 se observan las diferencias entre las seis zonas. Los T50 inferiores aparecen en las fracciones de suelo que corresponden a las alisedas, por el contrario la microflora proteolítica de las zonas sin árboles manifiesta una actividad menor, mientras que en los chopos y en los sauces los resultados son intermedios.

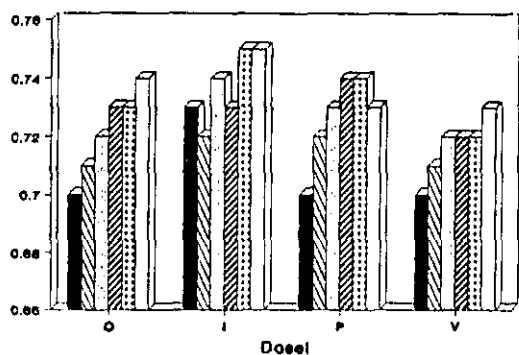
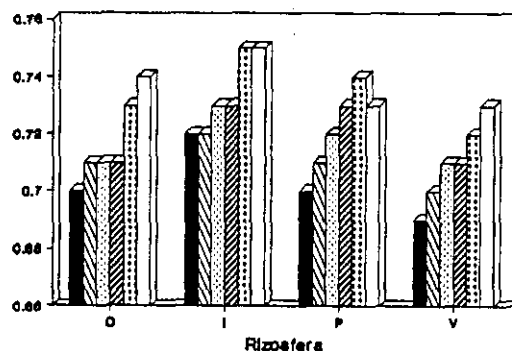
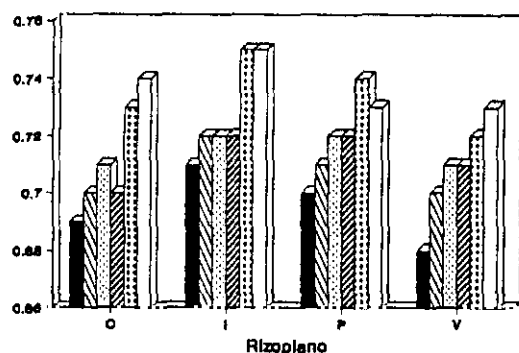
El análisis de la varianza de los T50 de las cuatro zonas primeras (tabla 3.XL) indica que hay diferencias significativas ($F=7.4$ y $p<0.01$).

Los ANOVA de los datos del rizoplano, rizosfera y dosel, junto con los controles sin árboles reflejan variaciones significativas ($p<0.01$), con F de 8.4, 6.2 y 3.7 respectivamente (tablas 3.XLI, 3.XLII y 3.XLIII).

Los cuadros de comparación entre medias (tabla 3.XLIV) señalan que la actividad biológica mayor de la microflora proteolítica corresponde al bosque de alisos más desarrollados y las diferencias respecto a los sitios restantes son significativas ($p<0.05$ y $p<0.01$). Sin embargo, cuando se consideran los resultados del rizoplano y de las zonas sin vegetación leñosa no se observan variaciones entre las superficies radicales de los alisos con respecto a los chopos y los sauces. Entre los datos rizosféricos y las muestras del pastizal y de la ladera se advierten diferencias

Tabla 3.XXXVI Resultados medios del T50 de la microflora proteolítica

	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 5	Z 6	
O	Rp	0.69±0.01	0.70±0.02	0.71±0.01	0.70±0.01		
	Rf	0.70±0.01	0.71±0.01	0.71±0.01	0.71±0.02		
	Do	0.70±0.01	0.71±0.01	0.72±0.01	0.73±0.01	0.73±0.01	0.74±0.01
I	Rp	0.71±0.01	0.72±0.01	0.72±0.01	0.72±0.01		
	Rf	0.72±0.01	0.72±0.01	0.73±0.01	0.73±0.01		
	Do	0.73±0.01	0.72±0.01	0.73±0.01	0.73±0.01	0.75±0.01	0.75±0.01
P	Rp	0.70±0.01	0.71±0.01	0.72±0.01	0.72±0.01		
	Rf	0.70±0.01	0.71±0.01	0.72±0.01	0.73±0.01		
	Do	0.70±0.01	0.72±0.02	0.73±0.01	0.74±0.01	0.74±0.01	0.73±0.01
V	Rp	0.68±0.01	0.70±0.01	0.71±0.01	0.71±0.01		
	Rf	0.69±0.01	0.70±0.01	0.71±0.01	0.71±0.01		
	Do	0.70±0.01	0.71±0.01	0.72±0.02	0.72±0.02	0.72±0.01	0.73±0.01



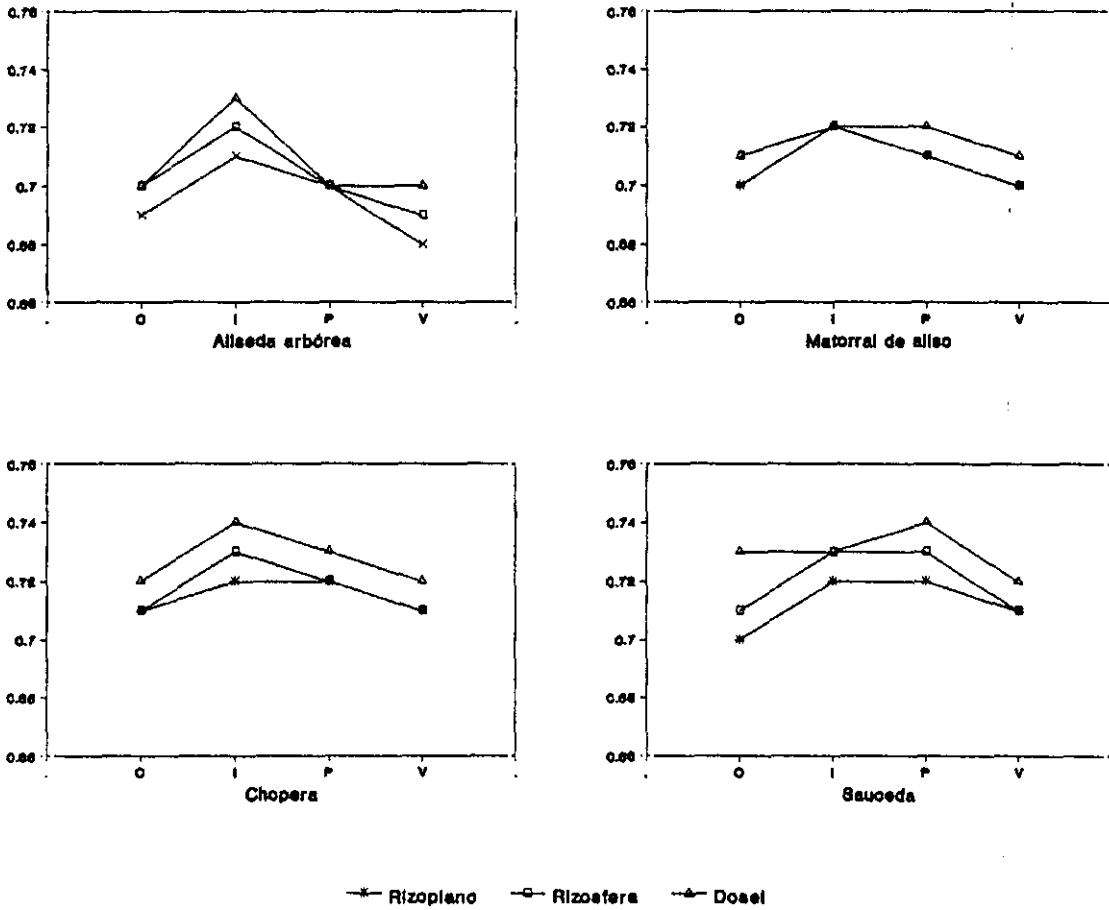
■ Alameda arbórea ▨ Matorral de aliso ▩ Chopera
 ▤ Sauceda ▧ Ladera □ Pastizal

Z 1 Alameda arbórea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera
 Z 4 Sauceda
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo

Rp Rizoplano
 Rf Rizosfera
 Do Dosel

O Otoño
 I Invierno
 P Primavera
 V Verano

Fig. 3.27 Variaciones estacionales y entre zonas del T50 de la microflora proteolítica



O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Fig. 3.28 Variaciones entre el rizoplano, rizosfera y dosel del T50 de la microflora proteolítica

solo en el caso de los alisos e igual sucede con el conjunto de datos del dosel.

Las variaciones estacionales a lo largo del año se representan en la figura 3.27. En las gráficas no se aprecian grandes diferencias entre las cuatro estaciones. La actividad biológica máxima aparece en la estación más calurosa. Por el contrario, en invierno se registran los T50 más elevados.

Los análisis de la varianza muestran que las variaciones entre estaciones no se deben al azar. El ANOVA de los datos de la aliseda, chopera y sauceda presenta una $F=5.6$ y una $p<0.01$. Los ANOVA de los T50 de las dos zonas sin vegetación leñosa y de cada una de las tres zonas delimitadas respecto al sistema radical de los alisos, chopos y sauces reflejan diferencias significativas ($p<0.05$) entre las estaciones.

En el cuadro de comparación entre medias de la rizosfera y de las zonas 5 y 6, la actividad de los microorganismos proteolíticos en invierno difiere significativamente ($p<0.01$) de la que se registra en verano. En los demás conjuntos de datos la variación entre ambas estaciones es significativa al 95%. Las medias de los T50 del invierno y del otoño varían en un nivel de $p<0.05$, excepto cuando se agrupan los resultados de las fracciones de suelo del dosel y de ambas zonas sin vegetación arbórea.

La figura 3.28 representa la actividad biológica de los microorganismos proteolíticos en el rizoplano, rizosfera y dosel. En el dosel aparecen los valores más elevados, mientras que entre el rizoplano y la rizosfera las diferencias son escasas. El análisis de la varianza de los T50 muestra que las variaciones entre rizoplano, rizosfera y dosel no se deben al azar ($F=4.0$ y $p<0.01$).

El cuadro de comparación entre medias indica que, según nos alejamos del sistema radical, aumentan los valores de los T50. Aunque no hay diferencias significativas entre el rizoplano y la rizosfera, existen entre el rizoplano y el dosel ($p < 0.01$).

Los análisis de la varianza de los distintos conjuntos de valores de los T50 indican que en las interacciones de los tres factores de variación no se registran diferencias significativas, por tanto la actividad biológica de la microflora proteolítica de todas las zonas evoluciona de forma similar durante el año.

3.3.7. Actividad biológica de la microflora amonificante

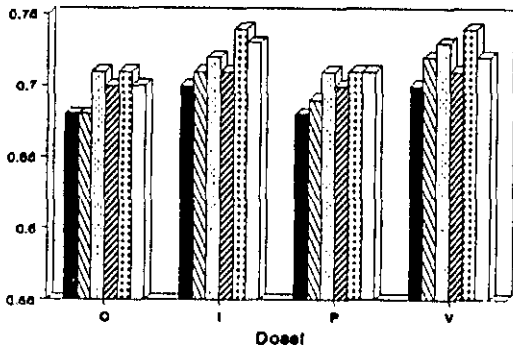
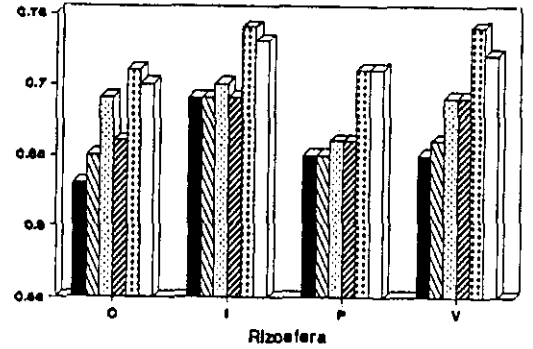
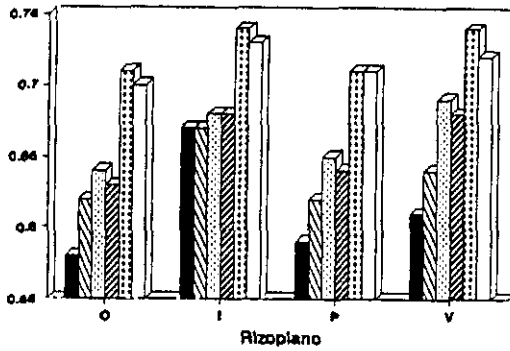
La actividad biológica de los microorganismos amonificantes se expresa en la tabla 3.XXXVII. Los T50 oscilan entre 0.58 en el rizoplano de los árboles de aliso en otoño y 0.74 en la ladera en verano e invierno.

En la figura 3.29 se representa la variación de la actividad amonificante en las distintas zonas. Las gráficas resaltan los T50 más elevados en las zonas sin árboles, mientras que en la aliseda constituida por ejemplares más desarrollados se observan los resultados menores.

El análisis de la varianza de los T50 de las zonas con alisos, sauces y chopos señala diferencias con $F=8.3$ y $p < 0.01$ (tabla 3.XL). El ANOVA de los datos del rizoplano y de las zonas sin vegetación leñosa manifiesta también variaciones no debidas al azar entre los puntos de muestreo (tabla 3.XLI). Lo mismo sucede en los ANOVA de las muestras rizosféricas y de ambas zonas libres de arbolado, y de éstas con los datos del dosel (tablas 3.XLII y 3.XLIII). Para el rizoplano la F

Tabla 3.XXXVII Resultados medios del T50 de la microflora amonificante

		Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 5	Z 6
O	Rp	0.58±0.01	0.62±0.01	0.64±0.02	0.63±0.02		
	Rf	0.63±0.01	0.65±0.02	0.69±0.02	0.66±0.01		
	Do	0.68±0.02	0.68±0.01	0.71±0.02	0.70±0.01	0.71±0.01	0.70±0.01
I	Rp	0.67±0.02	0.67±0.02	0.68±0.03	0.68±0.02		
	Rf	0.69±0.02	0.69±0.01	0.70±0.01	0.69±0.02		
	Do	0.70±0.02	0.71±0.01	0.72±0.02	0.71±0.02	0.74±0.01	0.73±0.01
P	Rp	0.59±0.02	0.62±0.01	0.65±0.01	0.64±0.02		
	Rf	0.65±0.02	0.65±0.02	0.66±0.02	0.66±0.01		
	Do	0.68±0.02	0.69±0.01	0.71±0.02	0.70±0.01	0.71±0.02	0.71±0.01
V	Rp	0.61±0.02	0.64±0.01	0.69±0.02	0.68±0.02		
	Rf	0.65±0.02	0.66±0.02	0.69±0.02	0.69±0.03		
	Do	0.70±0.01	0.72±0.01	0.73±0.02	0.71±0.02	0.74±0.02	0.72±0.02



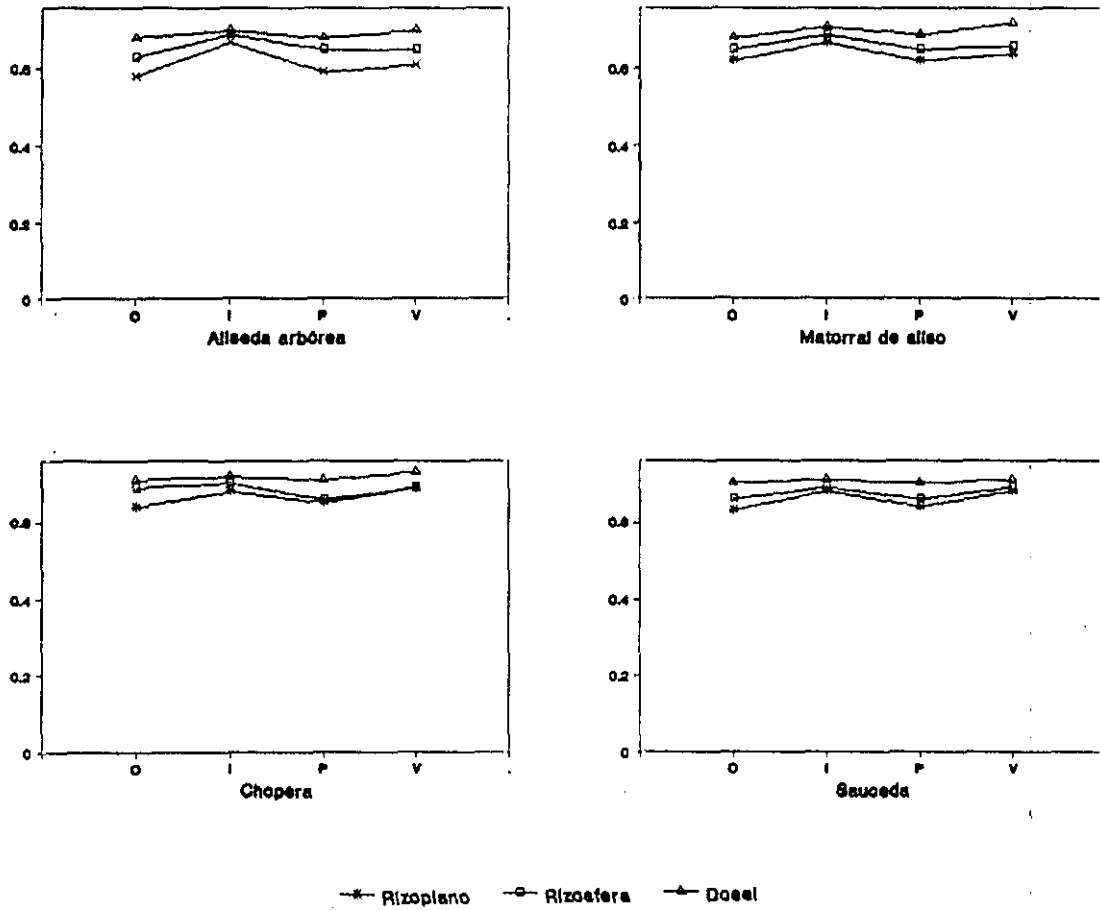
Aliseda arbórea
 Matorral de aliso
 Chopera
 Saucedada
 Ladera
 Pastizal

Z 1 Aliseda arbórea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera
 Z 4 Saucedada
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo

Rp Rizoplano
 Rf Rizosfera
 Do Dosel

O Otoño
 I Invierno
 P Primavera
 V Verano

Fig. 3.29 Variaciones estacionales y entre zonas del T50 de la microflora amonificante



O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Fig. 3.30 Variaciones entre el rizoplano, rizosfera y dosel del T50 de la microflora amonificante

es 20.7 ($p < 0.01$), para la rizosfera, 9.1 ($p < 0.01$) y para el dosel, 2.4 ($p < 0.05$).

Los cuadros de comparación entre medias (tabla 3.XLV) confirman que, tanto en el rizoplano como en la rizosfera de los alisos, aparece la comunidad amonificante más activa, mientras que en las zonas 5 y 6 los microorganismos productores de amonio se encuentran en un estado fisiológico de actividad menor y estas variaciones son significativas ($p < 0.01$). Los T50 de las zonas con chopos y sauces no difieren significativamente entre sí. Sin embargo los T50 del dosel y de las zonas sin árboles no varían significativamente, excepto cuando se comparan los datos del dosel de la aliseda de porte arbóreo con los T50 de las zonas 5 y 6 y de la zona con chopos. En estos casos las diferencias son significativas al 99 y al 95%, respectivamente.

Las variaciones estacionales se representan en la figura 3.29. El otoño y la primavera son las estaciones en las que la microflora productora de amonio alcanza una actividad biológica superior, que disminuye en las dos estaciones de condiciones climáticas más extremas.

El análisis de la varianza de los T50 de las cuatro zonas arboladas indica que las variaciones estacionales son significativas al 99% con $F=9.8$. Las diferencias también son significativas ($p < 0.01$ y $p < 0.05$) en los ANOVA de los T50 del rizoplano y de la rizosfera con las zonas sin árboles, con resultados de la F 7.4 y 3.9 respectivamente. En el ANOVA del dosel y de las zonas sin vegetación arbórea no se aprecian variaciones significativas.

Las comparaciones entre las medias de los T50 en los cuatro conjuntos de datos señalan que en invierno la actividad amonificante es menor. En ningún caso se advierten variaciones significativas entre las medias de los T50 de

verano e invierno. El hecho se repite en las dos estaciones con actividad mayor, otoño y primavera, aunque en el otoño se registran los T50 más bajos, menos cuando se consideran los resultados del pastizal, ladera y rizosfera de las cuatro zonas arboladas.

Las variaciones entre el rizoplano, rizosfera y dosel se representan en la figura 3.30. La actividad máxima corresponde al rizoplano y en el dosel aparece la microflora amonificante menos activa. El análisis de la varianza de los T50 muestra que las variaciones son significativas ($F=37.9$ y $p<0.01$). La tabla de comparación entre medias manifiesta variaciones entre las tres zonas ($p<0.01$).

Al igual que en el estudio de la actividad biológica de la microflora proteolítica las interacciones no señalan variaciones significativas.

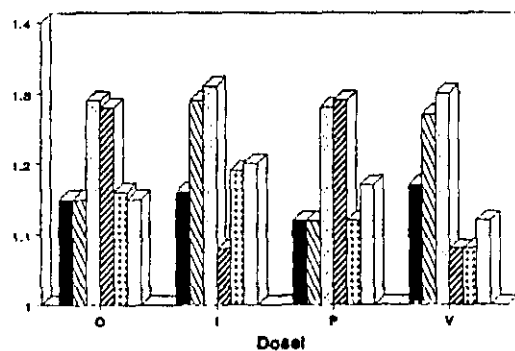
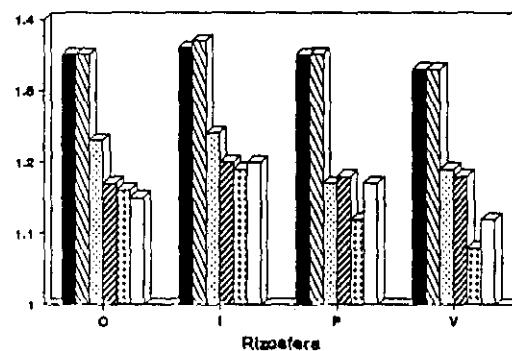
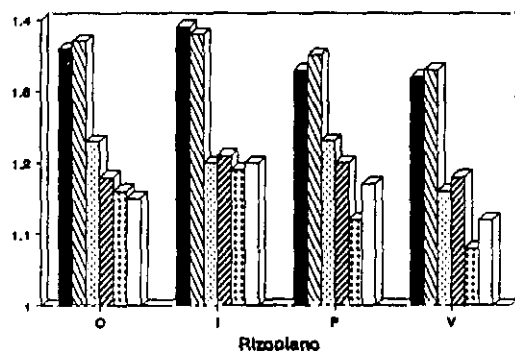
3.3.8. Actividad biológica de la microflora nitrificante nitrosa

La tabla 3.XXXVIII muestra los datos de la actividad nitrificante nitrosa. Los resultados oscilan entre 1.08 en la ladera durante el verano y en el dosel de la sauceda durante el invierno y verano y 1.39 en el rizoplano de los alisos más desarrollados en invierno.

La figura 3.31 presenta las diferencias entre las seis zonas. Los T50 menores aparecen en las zonas control sin árboles, mientras que en las zonas con alisos la actividad biológica disminuye y en la chopera y sauceda los resultados son intermedios.

Tabla 3.XXXVIII Resultados medios del T50 de la microflora nitrificante nitrosa

	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 5	Z 6
O	Rp	1.36±0.04	1.37±0.02	1.23±0.03	1.18±0.02	
	Rf	1.35±0.01	1.35±0.01	1.23±0.03	1.17±0.03	
	Do	1.15±0.01	1.15±0.03	1.29±0.01	1.28±0.03	1.16±0.02
I	Rp	1.39±0.02	1.38±0.02	1.20±0.03	1.21±0.02	
	Rf	1.36±0.01	1.37±0.02	1.24±0.02	1.20±0.01	
	Do	1.16±0.01	1.29±0.01	1.31±0.01	1.08±0.01	1.19±0.02
P	Rp	1.33±0.01	1.35±0.02	1.23±0.01	1.20±0.02	
	Rf	1.35±0.02	1.35±0.01	1.17±0.03	1.18±0.01	
	Do	1.12±0.04	1.12±0.03	1.28±0.01	1.29±0.01	1.12±0.03
V	Rp	1.32±0.01	1.33±0.01	1.16±0.02	1.18±0.02	
	Rf	1.33±0.01	1.33±0.02	1.19±0.03	1.18±0.03	
	Do	1.17±0.03	1.27±0.02	1.30±0.01	1.08±0.03	1.08±0.03



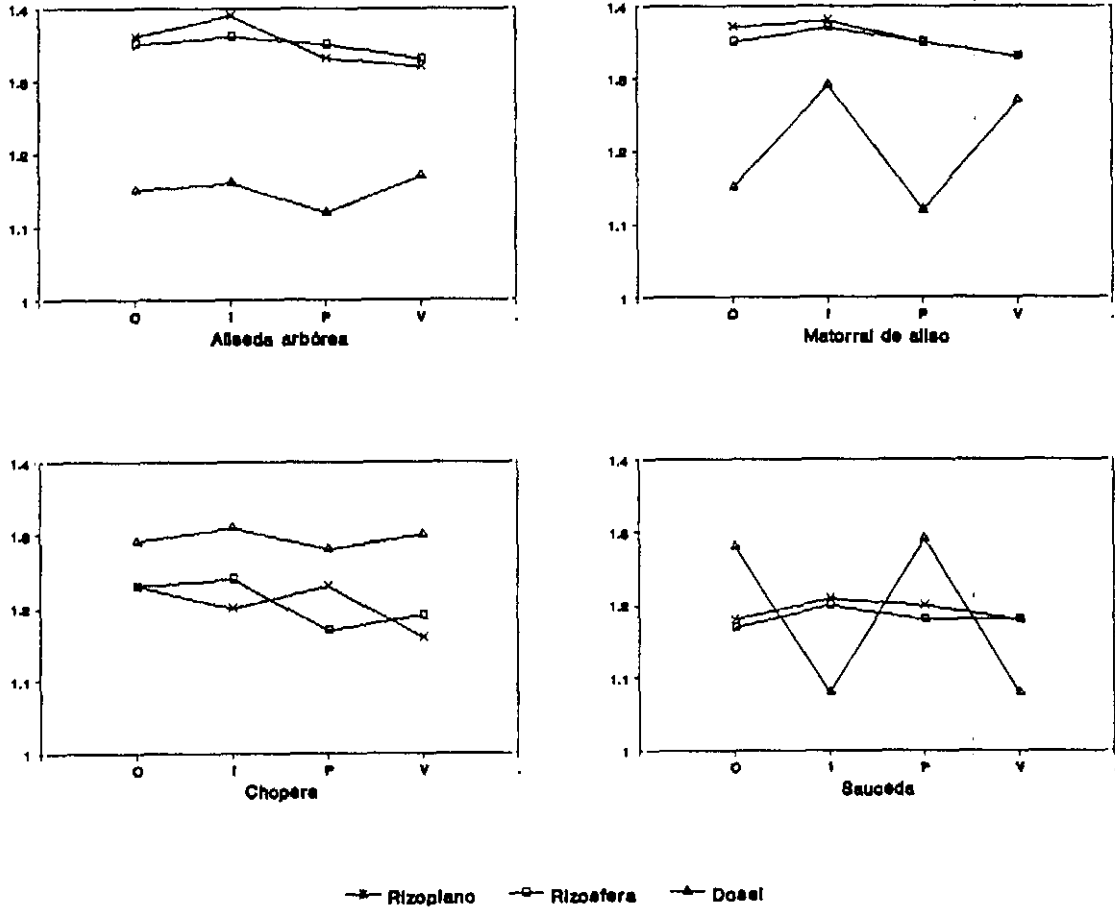
■ Alameda arbórea ▨ Matorral de aliso ▤ Chopera
 ▩ Saucedada ▧ Ladera □ Pastizal

Z 1 Alameda arbórea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera
 Z 4 Saucedada
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo

Rp Rizoplano
 Rf Rizosfera
 Do Dosel

O Otoño
 I Invierno
 P Primavera
 V Verano

Fig. 3.31 Variaciones estacionales y entre zonas del T50 de la microflora nitrificante nitrosa



O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Fig. 3.32 Variaciones entre el rizoaplano, rizofera y dosel del T50 de la densidad de microflora nitrificante nitrosa

El análisis de la varianza de los T50 de las cuatro primeras zonas manifiesta que las diferencias son significativas ($p < 0.01$, tabla 3.XL). Los cuadros de comparación entre medias (tabla 3.XLVI) reflejan que las variaciones no se deben al azar ($p < 0.01$) y que en el rizoplano y en la rizosfera de ambas alisedas se registran actividades menores que en las zonas no arboladas. Sin embargo no se aprecian diferencias significativas entre el dosel de los alisos y los resultados de ambas zonas sin vegetación leñosa.

Las variaciones estacionales aparecen en la figura 3.31. En los análisis de la varianza se observan variaciones significativas ($p < 0.01$), salvo cuando se consideran los valores de las zonas 5 y 6 y del dosel de las cuatro zonas con árboles. La tabla 3.XLVI manifiesta que en el verano la actividad biológica nitrificante nitrosa es mayor y no difiere significativamente de los resultados de la primavera, excepto cuando se considera el conjunto de datos de las zonas 5 y 6 y de la rizosfera de las cuatro zonas primeras ($p < 0.05$). Entre la primavera y el otoño no se advierten diferencias, ni entre esta última estación y el invierno, donde aparecen los datos más elevados de los T50.

La figura 3.32 representa la actividad biológica en el rizoplano, rizosfera y dosel. En las gráficas se observa que el rizoplano es la región con datos más altos del T50 entre los alisos. Por el contrario en los chopos y en los sauces la microflora nitrificante nitrosa se activa.

El análisis de la varianza muestra que las diferencias entre el rizoplano, la rizosfera y el dosel no se deben al azar ($F = 41.6$ y $p < 0.01$). El cuadro de comparación entre medias (tabla 3.XLVI) indica que la actividad de los microorganismos nitrificantes nitrosos es superior en el dosel y disminuye

cerca del sistema radical, pero no se aprecian variaciones significativas entre el rizoplano y la rizosfera.

El ANOVA de los T50 de las zonas con alisos y de las zonas control con vegetación leñosa expresa que hay variaciones significativas ($p < 0.01$) en las interacciones estación-zona, zona-sistema radical y estación-zona-sistema radical. Sin embargo los ANOVA de las zonas sin árboles con el rizoplano y rizosfera no manifiestan variaciones en la interacción estación-zona.

3.3.9. Actividad biológica de la microflora nitrificante nítrica

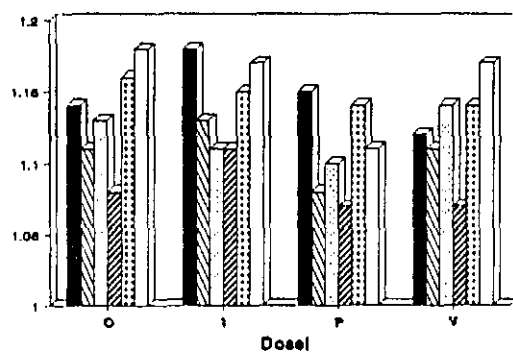
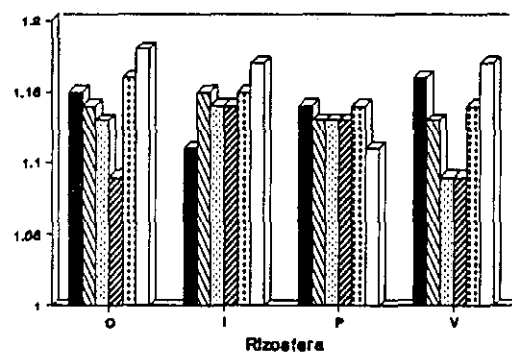
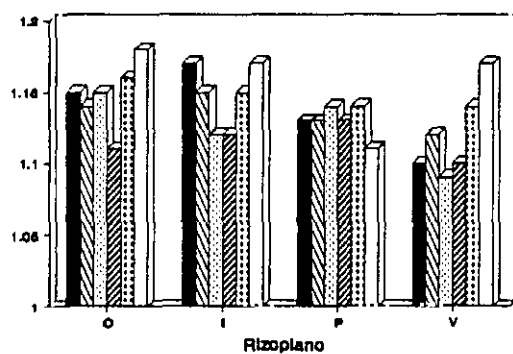
Los resultados del T50 del grupo nitrificante nítrico se exponen en la tabla 3.XXXIX. El dato más elevado, 1.18, aparece en el pastizal en otoño y en el dosel de los árboles de aliso en invierno, el límite inferior, 1.07, corresponde a los chopos en las fracciones de suelo del dosel en primavera y en verano.

Las variaciones entre las zonas se expresan en la figura 3.33. Los T50 menores se observan entre los sauces y la actividad biológica menor se encuentra en el pastizal.

Los análisis de la varianza de los T50 reflejan que hay variaciones significativas ($p < 0.01$) entre las zonas. La tabla de comparación entre medias (tabla 3.XLVII) manifiesta que las diferencias más acusadas se registran entre las zonas sin árboles y las fracciones del dosel de las cuatro zonas restantes, mientras que las variaciones son menos acusadas a nivel del rizoplano y de la rizosfera. En estos dos casos la actividad biológica mayor aparece en la sauceda que difiere de las zonas control libres de vegetación leñosa ($p < 0.01$). Las zonas con alisos varían de forma significativa entre sí,

Tabla 3.XXXIX Resultados medios del T50 de la microflora nitrificante nitrica

		Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 5	Z 6
O	Rp	1.15±0.02	1.14±0.01	1.15±0.01	1.11±0.02		
	Rf	1.15±0.01	1.14±0.01	1.13±0.01	1.09±0.02		
	Do	1.14±0.01	1.11±0.01	1.13±0.01	1.08±0.03	1.16±0.01	1.18±0.01
I	Rp	1.17±0.01	1.15±0.01	1.12±0.02	1.12±0.01		
	Rf	1.11±0.02	1.15±0.02	1.14±0.02	1.14±0.02		
	Do	1.18±0.01	1.13±0.03	1.11±0.02	1.11±0.02	1.15±0.01	1.17±0.01
P	Rp	1.13±0.01	1.13±0.02	1.14±0.01	1.13±0.01		
	Rf	1.14±0.02	1.13±0.02	1.13±0.01	1.13±0.02		
	Do	1.15±0.02	1.08±0.03	1.10±0.01	1.07±0.01	1.14±0.01	1.11±0.01
V	Rp	1.10±0.02	1.12±0.02	1.09±0.01	1.10±0.02		
	Rf	1.16±0.02	1.13±0.01	1.09±0.01	1.09±0.02		
	Do	1.12±0.02	1.11±0.02	1.14±0.02	1.07±0.03	1.14±0.01	1.07±0.02



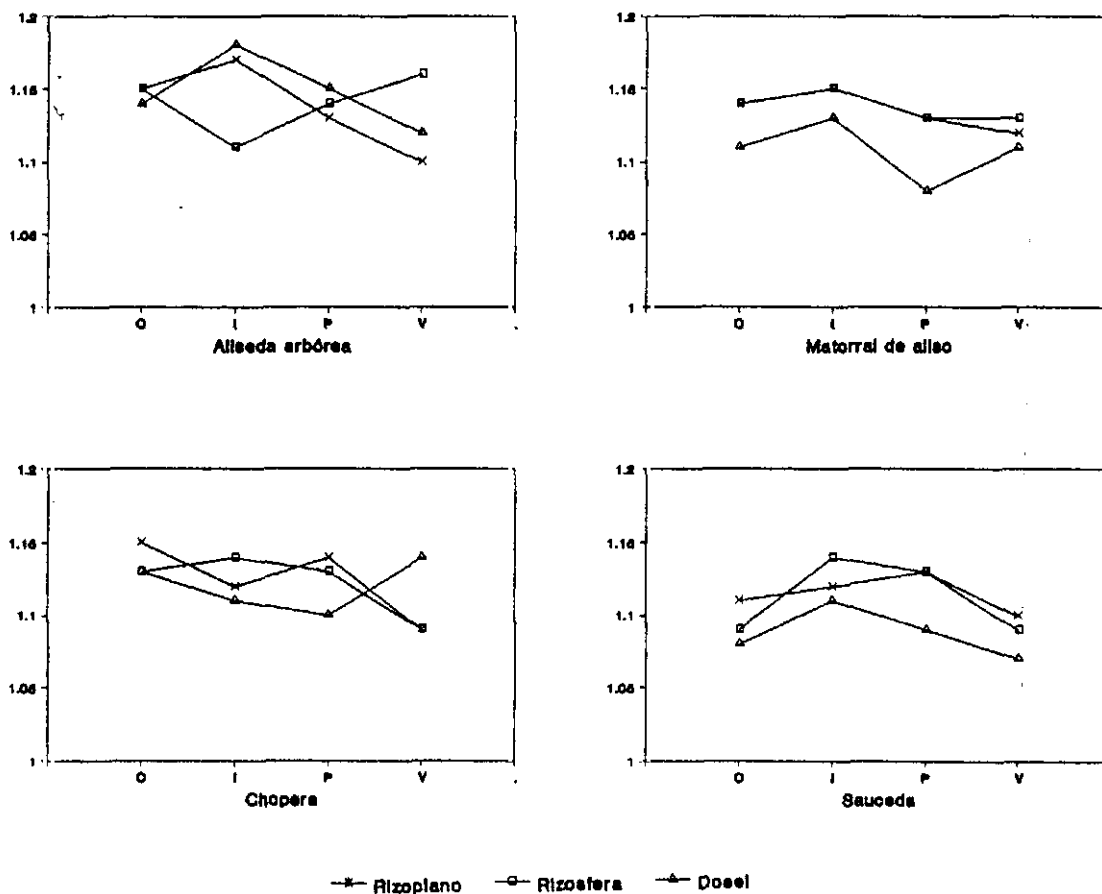
Z 1 Aliseda arborea
 Z 2 Matorral de aliso
 Z 3 Chopera
 Z 4 Saucedá
 Z 5 Ladera
 Z 6 Pastizal húmedo

Rp Rizoplano
 Rf Rizosfera
 Do Dosele

■ Aliseda arborea ▨ Matorral de aliso ▤ Chopera
 ▩ Saucedá ▧ Ladera ▥ Pastizal

O Otoño
 I Invierno
 P Primavera
 V Verano

Fig. 3.33 Variaciones estacionales y entre zonas del T50 de la microflora nitrificante nitrica



O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Fig. 3.34 Variaciones entre el rizoplano, rizosfera y dosel del T50 de la densidad de microflora nitrificante nítrica

cuando se consideran las fracciones de suelo del dosel.

La figura 3.33 representa la actividad de la microflora nitrificante nitríca durante el año. Las variaciones estacionales son escasas. Los ANOVA de los T50 de las cuatro zonas arboladas y del conjunto de datos del rizoplano y de los controles sin árboles reflejan diferencias significativas ($F=3.5$, $p<0.05$ y $F=4.5$, $p<0.01$ respectivamente).

La prueba LSD (tabla 3.XLVII) manifiesta que el verano es la estación de actividad biológica mayor y difiere significativamente del invierno cuando la actividad de los organismos nitrificantes nitrícos es menor.

Las variaciones en el tercer factor, la proximidad al sistema radical, se observan en la figura 3.34, y el ANOVA indica que no son significativas.

Las interacciones de los tres factores considerados tampoco presentan diferencias significativas.

Tablas 3.XL a 3.XLIII. Significación de los ANOVA (F) de los T50

Tabla 3.XL ANOVA de los datos del T50 del rizoplaneo, rizosfera y dosel. Se indica la F y la significación

FUENTES DE VARIACION							
	1	2	3	4	5	6	7
Proteolíticos	5.6 (**)	7.4 (**)	4.0 (**)	0.2 (NS)	0.07 (NS)	0.09 (NS)	0.08 (NS)
Amonificantes	9.8 (**)	8.3 (**)	37.9 (**)	0.5 (NS)	0.4 (NS)	0.9 (NS)	0.2 (NS)
Nitrificantes nitrosos	3.8 (*)	59.1 (**)	41.6 (**)	3.7 (**)	41.7 (**)	0.8 (NS)	5.1 (**)
Nitrificantes nítricos	3.5 (*)	6.9 (**)	2.6 (NS)	0.6 (NS)	1.4 (NS)	1.0 (NS)	0.9 (NS)

Fuentes de variación:

- 1 Estación
- 2 Zona
- 3 Sistema radical
- 4 Interacción Estación - Zona
- 5 Interacción Zona - Sistema radical
- 6 Interacción Estación - Sistema radical
- 7 Interacción Estación - Zona - Sistema radical

Significación:

- ** $p < 0.01$
 * $p < 0.05$
 NS no significativo

Tabla 3. XLI ANOVA de los datos del T50 del rizoplano y de las zonas sin árboles. Se indica la F y la significación

FUENTES DE VARIACION			
	1	2	3
Proteolíticos	3.1 (*)	8.4 (**)	0.2 (NS)
Amonificantes	7.4 (**)	20.7 (**)	0.4 (NS)
Nitrificantes nitrosos	8.3 (**)	68.7 (**)	0.9 (NS)
Nitrificantes nitrícos	4.5 (**)	3.5 (**)	1.5 (NS)

Fuentes de variación:

- 1 Estación
- 2 Zona
- 3 Interacción Estación - Zona

Significación: ** p<0.01
* p<0.05
NS no significativo

Tabla 3. XLII ANOVA de los datos del T50 de la rizosfera y de las zonas sin árboles. Se indica la F y la significación

	FUENTES DE VARIACION		
	1	2	3
Proteolíticos	3.4 (*)	6.2 (**)	0.1 (NS)
Amonificantes	3.9 (*)	9.1 (**)	0.3 (NS)
Nitrificantes nitrosos	5.7 (**)	60.6 (**)	0.6 (NS)
Nitrificantes nitrícos	0.9 (NS)	3.6 (**)	1.5 (NS)

Fuentes de variación:

- 1 Estación
- 2 Zona
- 3 Interacción Estación - Zona

Significación: ** p<0.01
* p<0.05
NS no significativo

Tabla 3. XLIII ANOVA de los datos del T50 del dosel y de las zonas sin árboles. Se indica la F y la significación

FUENTES DE VARIACION			
	1	2	3
Proteolíticos	3.0 (*)	3.7 (**)	0.1 (NS)
Amonificantes	2.6 (NS)	2.4 (*)	0.1 (NS)
Nitrificantes nitrosos	1.3 (**)	6.3 (**)	2.5 (**)
Nitrificantes nitrícos	2.3 (NS)	8.0 (**)	0.7 (NS)

Fuentes de variación:

- 1 Estación
- 2 Zona
- 3 Interacción Estación - Zona

Significación: ** $p < 0.01$
 * $p < 0.05$
 NS no significativo

Tablas 3.XLIV a 3.XLVII. Significación de las diferencias de los T50 entre las estaciones del año, las zonas de muestreo y las zonas respecto al sistema radical.

En cada tabla se presentan cuatro apartados:

- a) Significación de los datos de las observaciones del rizoplano, de la rizosfera y del dosel.
- b) Significación de los datos de las observaciones de las zonas sin árboles y del rizoplano de las zonas arboladas.
- c) Significación de los datos de las observaciones de las zonas sin árboles y de la rizosfera de las zonas arboladas.
- d) Significación de los datos de las observaciones de las zonas sin árboles y del dosel de las zonas arboladas.

En todas las tablas los resultados medios de las observaciones se disponen en orden creciente de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo.

Significación: ** p<0.01
* p<0.01
NS no significativo

Tabla 3.XLIV Significación de las diferencias entre los resultados medios del T50 de microflora proteolítica

a)

Z 2	*										
Z 3	**	NS									
Z 4	**	*	NS								
	Z 1	Z 2	Z 3								

O	NS		
P	*	NS	
I	*	*	NS
	V	O	P

Rf	NS	
Do	**	NS
	Rp	Rf

b)

Z 2	NS							
Z 3	NS	NS						
Z 4	NS	NS	NS					
Z 5	**	**	*	*				
Z 6	**	**	*	*	NS			
	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 5	Z 6		

O	NS		
P	NS	NS	
I	*	*	NS
	V	O	P

c)

Z 2	NS						
Z 4	*	NS					
Z 3	*	NS	NS				
Z 5	**	**	NS	NS			
Z 6	**	**	NS	NS	NS		
	Z 1	Z 2	Z 4	Z 3	Z 5	Z 6	

O	NS		
P	NS	NS	
I	**	*	NS
	V	O	P

d)

Z 2	NS					
Z 3	*	NS				
Z 4	*	NS	NS			
Z 5	**	*	NS	NS		
Z 6	**	*	NS	NS	NS	
	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 5	Z 6

O	NS		
P	NS	NS	
I	*	NS	NS
	V	O	P

Z 1 Aliseda arbórea Z 2 Matorral de aliso Z 3 Chopera
 Z 4 Saucedá Z 5 Ladera Z 6 Pastizal húmedo

O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Rp Rizoplano; Rf Rizosfera; Do Dosel

Tabla 3.XLV Significación de las diferencias entre los resultados medios del T50 de microflora amonificante

a)

Z 2	NS			P	NS			Rf	**	
Z 4	*	NS		V	**	**		Do	**	**
Z 3	**	**	NS	I	**	**	NS	Do	**	**
	Z 1	Z 2	Z 4		O	P	V		Rp	Rf

b)

Z 2	NS			P	NS		
Z 4	**	NS		V	**	*	
Z 3	**	*	NS	I	**	**	NS
Z 8	**	**	**	**			
Z 6	**	**	**	**	NS		
	Z 1	Z 2	Z 4	Z 3	Z 6		
				O	P	V	

c)

Z 2	NS			O	NS		
Z 4	NS	NS		V	NS	NS	
Z 3	*	NS	NS	I	**	**	NS
Z 8	**	**	**	*			
Z 6	**	**	**	**	NS		
	Z 1	Z 2	Z 4	Z 3	Z 6		
				P	O	V	

d)

Z 2	NS			P	NS		
Z 4	NS	NS		I	*	NS	
Z 3	*	NS	NS	V	*	NS	NS
Z 6	*	NS	NS	NS			
Z 6	**	NS	NS	NS	NS		
	Z 1	Z 2	Z 4	Z 3	Z 6		
				O	P	I	

Z 1 Aliseda arborea Z 2 Matorral de aliso Z 3 Chopera
 Z 4 Sauceda Z 5 Ladera Z 6 Pastizal húmedo

O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Rp Rizoplano; Rf Rizosfera; Do Dosel

Tabla 3.XLVII Significación de las diferencias entre los resultados medios del T50 de microflora nitrificante nitrica

a)

Z 3	NS																		
Z 2	**	NS																	
Z 1	**	NS	NS																
	Z 4	Z 3	Z 2																

P	NS																		
O	NS	NS																	
I	**	NS	NS																
	V	P	O																

Rf	NS																		
Rp	NS	NS																	
	Do	Rf																	

b)

Z 3	NS																		
Z 2	NS	NS																	
Z 1	NS	NS	NS																
Z 6	*	NS	NS	NS															
Z 6	**	*	NS	NS	NS														
	Z 4	Z 3	Z 2	Z 1	Z 6														

P	NS																		
I	**	NS																	
O	**	NS	NS																
	V	P	I																

c)

Z 3	NS																		
Z 2	*	NS																	
Z 1	*	NS	NS																
Z 6	**	*	NS	NS															
Z 6	**	**	NS	NS	NS														
	Z 4	Z 3	Z 2	Z 1	Z 6														

P	NS																		
O	NS	NS																	
I	NS	NS	NS																
	V	P	O																

d)

Z 2	*																		
Z 3	**	NS																	
Z 1	**	**	*																
Z 6	**	**	*	NS															
Z 6	**	**	**	NS	NS														
	Z 4	Z 2	Z 3	Z 1	Z 6														

P	NS																		
O	NS	NS																	
I	NS	NS	NS																
	P	V	O																

Z 1 Aliseda arbórea Z 2 Matorral de aliso Z 3 Chopera
 Z 4 Sauceda Z 5 Ladera Z 6 Pastizal húmedo

O Otoño; I Invierno; P Primavera; V Verano

Rp Rizoplano; Rf Rizosfera; Do Dosel

3.4. Análisis de la covarianza

Los resultados de los análisis de la covarianza de las variables consideradas se expresan en la tabla 3.XLVIII. Se exponen los índices de correlación y su significación. En primer lugar se refleja el índice que corresponde a los valores sin ajustar (r_1) y en segundo lugar el índice corregido por la varianza residual que se debe a las fuentes de variación (estaciones, sistema radical y presencia de árboles) (r_2).

Destaca que la mayoría de las variables contrastadas, una vez eliminada la variación debida a los tres factores objeto de estudio, no covarían. Sin embargo la concentración de carbono orgánico y el NMP de microorganismos proteolíticos se correlacionan negativamente al 95%, y los T50 de los microorganismos amonificantes y la concentración de nitrógeno-amonio muestran una covarianza positiva ($p < 0.05$). El cociente C/N covaría de forma positiva ($p < 0.01$) con los niveles de carbono orgánico y los T50 de la microflora proteolítica se correlacionan en sentido negativo con la tasa de C/N ($p < 0.01$) y positivamente con el contenido de nitrógeno total de las muestras ($p < 0.05$), aunque en los tres casos se observa que el efecto de las fuentes de variación altera y enmascara las covariaciones hasta el punto de que no se manifiestan si no se corrige la varianza residual. Los T50 de la microflora amonificante también covarían positivamente con la relación C/N sin que las fuentes de variación modifiquen la correlación.

Tabla 3.XLVIII Grado de significación de los índices de correlación de los análisis de la covarianza

Variable independiente	Variable dependiente	r_1	r_2
pH	T50 P	0.05 (NS)	0.05 (NS)
pH	T50 A	0.15 (NS)	-0.03 (NS)
pH	T50 No	-0.37 (**)	-0.002 (NS)
C orgánico	NMP Mt	0.26 (**)	-0.17 (NS)
C orgánico	NMP P	0.34 (**)	-0.22 (*)
C orgánico	NMP A	0.28 (**)	-0.04 (NS)
C orgánico	T50 P	-0.18 (*)	-0.14 (NS)
C orgánico	T50 A	-0.16 (NS)	0.12 (NS)
C orgánico	C/N	0.15 (NS)	0.80 (**)
Nt	C/N	-0.55 (**)	-0.17 (NS)
Nt	NMP Mt	0.39 (**)	-0.04 (NS)
Nt	NMP P	0.45 (**)	-0.09 (NS)
Nt	NMP A	0.27 (**)	0.04 (NS)
Nt	T50 P	-0.12 (NS)	0.18 (*)
Nt	T50 A	-0.25 (**)	-0.04 (NS)
C/N	NMP Mt	-0.22 (**)	-0.08 (NS)
C/N	NMP P	-0.21 (**)	-0.14 (NS)
C/N	NMP A	-0.04 (NS)	-0.05 (NS)
C/N	NMP No	0.23 (**)	-0.002 (NS)
C/N	NMP Ni	0.22 (**)	-0.04 (NS)
C/N	T50 P	-0.07 (NS)	-0.30 (**)
C/N	T50 A	0.17 (*)	0.18 (*)
C/N	T50 No	-0.18 (*)	-0.09 (NS)
C/N	T50 Ni	-0.06 (NS)	-0.02 (NS)
N-Amonio	T50 No	0.32 (**)	-0.02 (NS)
N-Amonio	Nt	0.44 (**)	-0.12 (NS)
N-Nitrato	Nt	-0.55 (**)	-0.17 (NS)
Humedad	T50 No	0.17 (*)	0.03 (NS)
Humedad	T50 Ni	0.22 (**)	-0.04 (NS)
NMP P	T50 P	-0.18 (*)	-0.03 (NS)
NMP A	T50 A	-0.31 (**)	-0.12 (NS)
NMP No	T50 No	-0.13 (NS)	-0.06 (NS)
NMP Ni	T50 Ni	-0.27 (**)	-0.008 (NS)
T50 A	N-Amonio	-0.38 (**)	0.22 (*)
T50 No	T50 Ni	0.13 (NS)	-0.02 (NS)

Nt = Nitrógeno total.

C/N = Relación carbono-nitrógeno

Mt = Microflora total.

P = Microflora Proteolítica

A = Microflora Amonificante

No = Microflora Nitrificante Nitrosa

Ni = Microflora Nitrificante Nítrica

r_1 = índice de correlación de los valores sin ajustar por la varianza residual

r_2 = índice de correlación de los valores ajustados por la varianza residual debida a las fuentes de variación

Significación: ** $p < 0.01$

* $p < 0.05$

NS no significativo

DISCUSSION

Para evaluar el efecto del aparato radical de *A. glutinosa* sobre las transformaciones, mediadas por los microorganismos telúricos, de los compuestos orgánicos nitrogenados en nitrógeno mineral se eligió para el muestreo una aliseda integrada por árboles en diferentes estados de desarrollo y donde crecían próximos sauces y chopos, a fin de comparar el papel de las raíces. El trabajo se centró en la densidad y la actividad biológica de las comunidades de microorganismos que regulan la transformación de las formas nitrogenadas en el medio edáfico y, por tanto, la disponibilidad del nitrógeno mineral en el suelo y la productividad del mismo. Por ello no se consideran los aspectos taxonómicos de la comunidad microbiana sino que se estima la biomasa microbiana viable que realiza cada proceso biológico y su funcionalidad.

Son numerosos los métodos que se han usado en la investigación de la comunidad microbiana implicada en el ciclo del nitrógeno pero no existe una técnica que permita determinar con exactitud el número de microorganismos y la capacidad metabólica de cada grupo fisiológico "in situ".

El método del NMP revisado por Cochran (1950), Alexander (1965), Melchiori-Santolini (1972) y Colwell (1979) entre otros, es útil y conserva su vigencia, aunque subestima el número de microorganismos por la adaptación necesaria de la microflora al medio de cultivo antes de manifestar su crecimiento. Sin embargo, al cultivar en tubos la comunidad microbiana, se manifiestan interacciones de sinergia y antagonismo (Bungay y Bungay, 1968) que reflejan en parte los procesos que tienen lugar en el medio natural. La técnica del NMP es clásica en los estudios microbiológicos edáficos en

los que se pretende conocer la densidad de la población microbiana encargada de desarrollar una actividad que da nombre a alguna de las etapas de los ciclos biogeoquímicos (Remacle y De Leval, 1975; Velasco y Lozano, 1979; Rao y Veukateswarlu, 1985; Turner y Franz, 1985; Hashimoto y Hattori, 1987 y Gökçeoglu, 1988). Por ello, en este trabajo, se usa el NMP como medida de la densidad de los microorganismos de los grupos fisiológicos del nitrógeno. En el caso de la comunidad nitrificante se ha aumentado el tiempo de incubación de las muestras debido al crecimiento lento y a la densidad escasa de la microflora nitrificante, solución que proponen Matulewich et al. (1975) y Hashimoto y Hattori (1987) ante el mismo problema. El NMP se relaciona con la capacidad fisiológica de un grupo de microorganismos, pues considera la aparición de un producto en el medio de cultivo o la desaparición del sustrato. Muchos autores relacionan el NMP con el potencial biológico de microorganismos (Turner y Franz, 1985). Sin embargo se puede afirmar que la densidad microbiana no es por sí sola un indicativo de la actividad, pues no considera las diferencias entre células latentes y activas. Por esta razón se estudia la actividad microbiana siguiendo la liberación de un producto o el consumo de un sustrato "in vitro" a tiempos discretos (Pochon y Tardieux, 1962; Parkinson et al., 1971; Lozano y Velasco, 1981 y Velasco et al., 1986).

Para comprobar los resultados de la capacidad funcional de los microorganismos por esta técnica indirecta se emplea la pendiente de las gráficas que representan el crecimiento de la población microbiana. En este caso la pendiente es un parámetro que no recoge la variación que se debe al periodo de latencia y al estado fisiológico de la población de microorganismos que sin embargo se manifiestan en el valor de la ordenada en el origen. Por ello utilizamos un parámetro

que complementa la pendiente con el valor de la ordenada en el origen y que además no depende del NMP de microorganismos de la muestra. Se utilizó el tiempo transcurrido en alcanzar el 50% del crecimiento máximo que se representa como T50 (Gutiérrez Mañero, 1987).

Por tanto la actividad biológica aquí expresada es consecuencia del método de Pochon y Tardieux (1962) y se refiere a la velocidad de crecimiento que manifiesta la microflora edáfica en el tubo de ensayo cuando se suministra en condiciones óptimas un sustrato específico de cada grupo funcional de microorganismos. Por ello esta técnica refleja la dinámica de las comunidades microbianas y nos indica su estado fisiológico, pues el T50 considera el periodo de latencia de los microorganismos para adaptarse al medio de cultivo. Este periodo será mayor cuando las poblaciones edáficas se encuentren esporuladas y menor cuando sean activas, aunque el sustrato del medio de cultivo no coincide con el sustrato natural.

Los análisis de las variables físico-químicas se refieren a los factores relacionados íntimamente con la circulación del nitrógeno en el suelo. Algunos, como el nitrógeno-nitrato y el nitrógeno-amonio, tienen un carácter muy específico que contribuye a comprender el estado de la mineralización en distintos suelos (Vitousek et al., 1982). La información que se desprende de conocer las concentraciones de ambos iones se debe matizar pues dependen no solo de los microorganismos que los emplean como fuentes de energía y de la microflora que los elabora como resultado de su metabolismo, sino también de otros procesos biológicos y físico-químicos como la captación del nitrógeno mineral por las raíces, la volatilización del amonio, el lixiviado de los nitratos y la interacción con las partículas coloidales del

suelo (Vitousek et al., 1982). Por ello los niveles de nitrógeno-amonio y nitrógeno-nitrato no pueden, por sí solos, indicar la actividad biológica de los grupos funcionales que utilizan estos iones, pero conjuntamente con otros datos manifiestan la dinámica del nitrógeno mineral y nos aproximan a entender el estado de la comunidad microbiana que interviene en las transformaciones del nitrógeno.

La determinación de los iones con electrodos específicos es un método rápido y sencillo que permite evaluar un número elevado de muestras en un breve espacio de tiempo, eliminando los problemas que se derivan de almacenar las muestras intervalos largos de tiempo, que pueden modificar los valores de nitrógeno-nitrato y de nitrógeno-amonio en las fracciones de suelo (Breitenbeck y Bremner, 1987).

También se estudian variables más generales como el carbono orgánico y el nitrógeno total que reflejan la cantidad y la naturaleza de la materia orgánica que sirve de sustrato a los microorganismos mineralizadores. Los recursos orgánicos edáficos alteran las propiedades del suelo, condicionan la estructura de la comunidad microbiana mineralizadora y reflejan el metabolismo de la citada microflora. Así un aumento de la materia orgánica fácilmente degradable y con un contenido elevado en nitrógeno conduce a un crecimiento de la capacidad mineralizadora del suelo (Danière et al., 1986).

La humedad es una variable físico-química que define en parte las condiciones en que se realiza la mineralización de los compuestos orgánicos, pues determina, junto con la granulometría, la cantidad de oxígeno disponible para la comunidad microbiana que mineraliza los compuestos orgánicos (Allison, 1973 y Knight y Skujins, 1981) y es de especial

interés en el caso de los microorganismos nitrificantes, que son aerobios estrictos. Se incluye también el pH que es un factor que influye en las condiciones en las que se desarrolla la microflora nitrificante autótrofa (Katyal et al., 1988) y que afecta a las poblaciones de microorganismos proteolíticos y amonificantes que se desarrollan más o menos dentro del intervalo de tolerancia para este factor. Los resultados de las variables físico-químicas y de la densidad y actividad de los grupos fisiológicos de microorganismos estudiados indican que la vegetación arbórea, principalmente cuando está formada por plantas diazotróficas, a través de la interacción planta-suelo, desempeña un papel fundamental en la dinámica del nitrógeno (De Datta, 1987) y de la comunidad microbiana en el medio edáfico (Sundin et al., 1990).

El análisis de ordenación que considera el conjunto de variables analizadas (tanto físico-químicas como bióticas) contrasta el efecto de la vegetación, pues las observaciones realizadas en las zonas pobladas con alisos, chopos y sauces se disponen en espacios diferentes de las muestras recogidas en las dos zonas libres de arbolado. Estas variaciones se justificarían porque las plantas determinan microclimas (Campbell et al., 1971), promueven microhabitats (Reinhold et al., 1989), inducen cambios en la estructura del suelo (Monroe y Kladuko, 1987), regulan las pérdidas de nutrientes en el ecosistema (Vitousek et al., 1982) y, en particular, suponen un aporte importante de materia orgánica en el medio telúrico (Aranda et al., 1991). La deposición de las hojas y de otros restos vegetales (Franklin y Waring, 1980, Struwe y Kjoller, 1986), el aporte derivado de las raíces muertas (Joslin y Henderson, 1987) y la liberación de sustratos orgánicos por los sistemas radicales vivos (Kloss et al., 1989) son las vías principales de entrada de sustratos orgánicos al suelo.

Por esta razón los niveles de carbono orgánico de las muestras analizadas son superiores en las zonas pobladas con alisos, chopos y sauces. Las diferencias también se refieren al tipo de vegetación y la aliseda registra la riqueza mayor de materia orgánica. Resultados similares se encuentran en el contenido de nitrógeno total y de nitrógeno amonio. Aunque debemos tener presente, como indican Sharma y Ambasht (1987), que en la descomposición de las hojas desciende el contenido absoluto de nitrógeno total pero aumenta su concentración lo que refleja una mineralización intensa de los compuestos carbonados y una inmovilización del nitrógeno por la microflora heterótrofa.

Por tanto los alisos requieren una mención especial pues suponen una fuente de energía y de nutrientes, sobre todo nitrógeno, muy importante para el ecosistema. Las hojas senescentes de los alisos poseen niveles de nitrógeno similares a las hojas activas, sin embargo esto no sucede con los chopos (Domenach y Kurdali, 1989). Los compuestos nitrogenados del lecho de hojarasca de la aliseda se mineralizan rápidamente (Domenach et al., 1989), lo que significa que la materia orgánica que aportan las hojas de aliso está constituida por compuestos que se degradan fácilmente e influyen en el desarrollo de la microflora telúrica.

Como consecuencia de la entrada mayor de materia orgánica rica en nitrógeno cerca de los alisos se crean unas condiciones favorables para el incremento de la biomasa microbiana tal y como confirman los análisis microbiológicos realizados, que muestran valores superiores de la densidad de la microflora total y del número más probable y de la actividad de los microorganismos proteolíticos y

amonificantes en la interfase suelo-raíz y en el dosel de los alisos.

El análisis de ordenación manifiesta la influencia del sistema radical de las plantas. El eje principal que absorbe mayor varianza en ambos análisis de componentes principales delimita campos de observaciones distintos para las muestras rizosféricas y del dosel. La rizosfera y el suelo no rizosférico difieren en numerosas características (Sarkar et al., 1979 y Smith, 1987), pero la diferencia más importante reside en la liberación de sustratos orgánicos por las raíces (Janzen y Bruinsma, 1989). En este sentido destaca que los resultados de los análisis físico-químicos indican que carbono orgánico, nitrógeno total y nitrógeno-amonio son las variables con factores de carga mayores en el eje que diferencia las muestras de la rizosfera de los chopos y de los sauces y principalmente en la interfase suelo-raíz de los alisos. El pH desciende en la rizosfera de los alisos, de los chopos y de los sauces, y, aunque las variaciones en la concentración de protones son pequeñas, su significación biológica puede ser relevante.

Además el efecto rizosfera se manifiesta en la comunidad microbiana (Sundin et al., 1990; Alström, 1987 y Bowen y Foster, 1978) y los datos obtenidos así lo confirman. La influencia de la zona rizosférica sobre los microorganismos edáficos adquiere importancia especial en el caso de una planta diazotrófica como el aliso, porque la composición de los exudados radicales influye en la comunidad bacteriana de la interfase raíz-suelo (Lawley et al., 1983) y en especial los niveles de nitrógeno que aportan los exudados pueden modificar la densidad de los microorganismos (Christie et al., 1978).

El análisis de componentes principales de las variables microbiológicas diferencia las observaciones del dosel de las localizadas en el rizoplano y en la rizosfera, tanto en los alisos como en los chopos y en los sauces, e incluso ordena en un campo los datos rizosféricos y del rizoplano de los alisos y en otro los valores del rizoplano y de la rizosfera de los sauces y de los chopos, estableciendo una clara distinción entre el efecto rizosfera de una planta diazotrófica y el impacto del sistema radical de plantas no fijadoras de nitrógeno.

Las microfloras proteolítica y amonificante presentan densidades y actividades superiores en el rizoplano y rizosfera de los sauces, chopos y alisos y por el contrario los microorganismos nitrificantes nitrosos y nítricos son menos abundantes y manifiestan una actividad menor. Los resultados son más acusados en el rizoplano y en la rizosfera de los alisos. El descenso en la densidad y actividad de la microflora nitrificante implicaría un efecto inhibitorio de las raíces de los sauces, chopos y en especial de los alisos sobre los microorganismos nitrificantes, dato contrastado por otros autores en ámbitos rizosféricos distintos (Jordan et al., 1979 y Montagnini y Buschbacher, 1989). Hay que considerar que el rizoplano y la rizosfera constituyen un hábitat muy variable donde los microorganismos compiten por el espacio (Purchase, 1974) y por los nutrientes que aportan las raíces y donde se produce un número elevado de productos con actividad antibiótica (Katelijen et al., 1989). Por tanto se puede esperar que la entrada de compuestos orgánicos en la rizosfera, muchos fácilmente asimilables, promueva el desarrollo de la microflora heterótrofa (microorganismos mineralizadores) (Bennett y Lynch, 1981) que inmoviliza el nitrógeno en detrimento de microorganismos autótrofos como los nitrificantes.

Las variaciones comentadas anteriormente ponen de manifiesto el efecto de la vegetación sobre la comunidad microbiana que mineraliza los compuestos orgánicos nitrogenados, y en particular del sistema radicular. Dicho efecto enmascara las diferencias que promueve la variación estacional, que se aprecian con mayor claridad cuando las variables analizadas se estudian independientemente una de otra.

Las diferencias en los valores del pH entre las seis zonas muestreadas son pequeñas aunque significativas ($p < 0.01$) y ponen de relieve que, en el suelo de la aliseda, tanto en la zona donde crecen los ejemplares más desarrollados como entre los alisos de porte inferior, la concentración de protones es más elevada. Estos datos coinciden con los valores registrados por otros autores (Crocker y Major, 1955; Crocker y Dickson, 1957; Ugoni, 1968; Franklin et al., 1968; Bormann y Debell, 1981; Pérez Hernández et al., 1989 y Bermúdez de Castro y Gutiérrez Mañero, 1987) que observan que las plantas diazotróficas inducen una acidificación del medio edáfico. El descenso del pH en la rizosfera de los alisos, chopos y sauces hace suponer que las variaciones se deben en primer lugar a la influencia del sistema radical que elevaría la concentración de protones sobre todo bajo los alisos y en menor medida en la zona rizosférica de los chopos y de los sauces. La justificación de tales variaciones es el resultado conjunto de diversos factores que inciden en la interacción planta-suelo.

Las plantas, al introducir materia orgánica en el medio edáfico, modifican su composición y aportan sustratos que serán mineralizados en un proceso complejo que implica el consumo de protones con el consiguiente incremento del pH

(Ulrich, 1980). Por otra parte la descomposición de los sustratos orgánicos incrementa los niveles de nitrógeno disponible para el crecimiento de la vegetación, lo que se manifiesta en un descenso de los compuestos polifenólicos en la hojarasca y por tanto en una entrada menor de protones al medio edáfico (Gosz, 1981). Al mismo tiempo la materia orgánica de origen vegetal aporta ácidos orgánicos e inorgánicos (Bormann y Debell, 1981) y puede, mediante la disociación de los grupos fenólicos y carboxilos frecuentes en los restos vegetales (Schwintzer, 1984), liberar protones al suelo. Los dos procesos citados en primer lugar explican los resultados mayores del pH en el dosel de los sauces, chopos y alisos respecto a las dos zonas libres de arbolado, mientras que el tercer mecanismo supone que el incremento del pH no sea muy acusado, aunque las variaciones entre las zonas con árboles y las zonas sin ellos son significativas como encuentran también Schmitz et al. (1990) bajo otros árboles diazotróficos.

En el sistema suelo-planta las raíces desempeñan un papel importante en el intercambio de nutrientes que puede alterar el equilibrio electrostático del medio edáfico. Se debe considerar que las raíces captan el nitrógeno que requiere la planta de los sustratos nitrogenados inorgánicos del suelo (Gillespie y Chaney, 1989). Según la fuente de nitrógeno, el pH del suelo cercano a las raíces puede variar en un sentido o en otro, porque si el sistema radical absorbe amonio libera protones y si capta nitrato libera hidróxilos para mantener la electroneutralidad celular (Swart y Van Diest, 1987). Estos procesos justifican los valores menores del pH bajo los alisos respecto a los chopos y sauces pues las plantas fijadoras de nitrógeno manifiestan escasa necesidad de nitrógeno mineral, mientras que los chopos y sauces al captar nitrato enriquecen el suelo con iones

hidróxilo. Por esta razón en la rizosfera de los chopos y de los sauces la concentración de protones desciende respecto a las zonas sin vegetación leñosa.

En leguminosas se ha observado que el sistema radical absorbe mayor proporción de cationes que de aniones por lo que el pH del sustrato disminuye debido a que la planta libera más protones que iones hidróxilo (Kirkby, 1981). Resultados similares obtienen Smith y Pooley (1989), Ingestad (1980), Stewart y Bond (1961) y McConell y Bond (1957). Franklin et al. (1968) observan concentraciones menores de Ca^{2+} y Mg^{2+} y un descenso del pH bajo *Alnus rubra* Bong. Estos hechos podrían justificar la variación más intensa del pH bajo los alisos, pues al absorber las plantas diazotróficas cantidades significativas de cationes y liberar protones, aquellos no pueden actuar como amortiguadores del pH en el suelo y por tanto cualquier cambio en la concentración de protones se manifiesta de forma más intensa. Los microorganismos telúricos alteran también el pH del medio como consecuencia de su actividad metabólica. Alström y Burns (1989) registran en cultivos de rizobacterias productoras de HCN un descenso del pH entre 0.5 y 3 unidades a las 48 horas de incubación. Las variaciones estacionales se explicarían por esta vía porque los microorganismos proteolíticos y amonificantes muestran su actividad más elevada en otoño y verano cuando el pH es más elevado, probablemente como resultado del consumo de protones en el proceso mineralizador.

Por tanto las zonas con arbolado, mediante el aporte de sustratos orgánicos que mineralizan los microorganismos edáficos, promueven un incremento del pH debido al consumo de protones implícito con el proceso mineralizador. Este hecho se manifiesta en las muestras recogidas entre los chopos y

los sauces, pero no así en la aliseda, porque su aparato radical acidifica el suelo (Miller, 1982). Las raíces absorben cationes divalentes, principalmente Ca^{2+} y Mg^{2+} , y con el fin de mantener la electroneutralidad interna liberan protones pero no iones hidróxilo, que se utilizan en la síntesis de aniones de ácidos orgánicos manteniendo el equilibrio eléctrico y el pH interno pero no así el pH externo.

Las diferencias significativas ($p < 0.01$) en el contenido de carbono orgánico indican que en las zonas con arbolado los niveles de compuestos orgánicos son más elevados que en las zonas sin árboles. Los materiales orgánicos de origen vegetal derivan de fragmentos de troncos (Franklin y Waring, 1980), del lecho de hojarasca (Hunt et al., 1988), del lavado de la parte aérea por el agua de lluvia (Bollen y Lu, 1968), de las raíces muertas (Joslin y Henderson, 1987) y de la liberación de productos por las raíces vivas (Janzen y Bruinsma, 1989 y Newman, 1985). Los porcentajes mayores de carbono orgánico en la aliseda y en las zonas con chopos y sauces respecto a los controles sin vegetación leñosa se podrían explicar por un aporte mayor por las vías citadas, en particular por la liberación de compuestos orgánicos de origen radical y a través del lecho de hojarasca. La capacidad fijadora de los alisos potencia la producción primaria y la entrada de sustratos orgánicos, hecho importante porque motiva que en las prácticas de silvicultura moderna se asocien otras especies con los alisos (Silvester, 1977 y Rojas et al., 1978).

Las variaciones entre rizosfera y dosel, aunque no son muy elevadas, reflejan que las raíces suponen una entrada importante de sustratos carbonados para la actividad microbiana telúrica, como también observan otros autores

(Janzen y Bruinsma, 1989 y Barber y Lynch, 1977). Keith et al. (1986) indican que el carbono que las plantas fijan mediante la fotosíntesis se libera en la rizosfera en proporción elevada, que en ocasiones supera el 20% (Martin y Kemp, 1986).

Las variaciones en la deposición de los restos vegetales, como la hojarasca, y su correspondiente descomposición por la microflora telúrica implica que existan diferencias a lo largo del año en los niveles de carbono orgánico. La tasa de descomposición de las hojas caídas de los chopos (Aranda et al., 1991) indica una mineralización rápida, hecho que también se produce en las hojas de aliso (Domenach et al., 1989). Sharma y Ambasht (1987) observan que en *A. nepalensis* D. Don hay una pérdida de masa del 30% en el lecho de hojarasca en los tres primeros meses lo que representa un enriquecimiento del medio telúrico en carbono fácilmente utilizable. Este hecho se corresponde con los datos más elevados de carbono orgánico que se registran en el invierno tras el desprendimiento de las hojas en el otoño. Sharma y Ambasht (1987) reflejan también que la pérdida de masa del lecho de hojarasca disminuye en las épocas de humedad menor por lo que en el verano desciende la entrada de carbono orgánico en el suelo a partir de las hojas depositadas en el mismo. Por otra parte las temperaturas más elevadas en el verano y en la primavera favorecen la oxidación de la materia orgánica, más intensa y rápida (Rodríguez-Barrueco et al., 1984), y por tanto compensan en parte el efecto que promueve el descenso de humedad en la estación más calurosa que presenta los valores inferiores de carbono orgánico.

Los resultados obtenidos reflejan la importancia de los alisos, chopos y sauces como fuente de compuestos orgánicos.

La entrada de materia orgánica supone también un aporte de nitrógeno al medio telúrico por lo que la cantidad de nitrógeno total en el suelo es mayor en las zonas arboladas y en especial en las zonas con alisos, gracias a su actividad diazotrófica.

El aporte de nitrógeno por parte de las plantas que se estudian, al igual que la entrada de materia orgánica, se realiza a través de numerosas vías, entre las que destacan el lavado de la parte aérea o el lecho de hojarasca, como ya se ha indicado. En este sentido conviene resaltar que las hojas senescentes de los alisos contienen niveles de nitrógeno similares a los de las hojas activas, hecho que no sucede en las plantas no diazotróficas, que pueden perder de uno a dos tercios de su contenido de nitrógeno antes de caer al suelo (Domenach y Kurdali, 1989).

Estos datos justifican el papel conservador del contenido de nitrógeno de la cubierta vegetal y se corresponden con los datos apuntados por otros autores que observan un aumento de las pérdidas de nitrógeno-nitrato en aquellos sitios que han sufrido alguna alteración en el desarrollo de la vegetación bien por el uso de herbicidas (Vitousek et al., 1982) o por la tala de árboles (Wiklander, 1981). El contenido más elevado de nitrógeno total que se registra en las zonas pobladas con árboles coincide con las concentraciones mayores de nitrógeno-amonio y de nitrógeno-nitrato que aparecen en estas zonas, sobre todo de nitrógeno-amonio en la aliseda, aunque el análisis de la covarianza de estas variables refleja que los datos de nitrógeno-amonio y de nitrógeno-nitrato, una vez eliminada la variación que se debe a los tres factores estudiados (zona, sistema radical y estación), no se correlacionan con la concentración de nitrógeno-total. Los niveles de nitrato en

la aliseda son menores que los que se observan entre los chopos y entre los sauces, y, puesto que la granulometría no difiere, podemos atribuir las diferencias en la concentración de nitrógeno-nitrato a la localización de los alisos junto al cauce del río Sorbe. En esta zona, por el nivel freático del río, es muy importante el lavado horizontal y vertical del nitrógeno-nitrato, forma aniónica de movilidad más elevada que el nitrógeno-amonio (Hart y Firestone, 1989) que se fija a las arcillas y no es translocado por el agua. Las diferencias en el contenido de nitrógeno-total y de nitrógeno-amonio de las seis zonas tampoco se pueden justificar por las variaciones en la textura, porque solo destaca la proporción mayor de arcillas en las zonas con matorral de aliso y en la ladera. Por otra parte las variaciones geomorfológicas entre las dos zonas sin arbolado no se manifiestan en el contenido de nitrógeno-nitrato y de nitrógeno-amonio, por lo que los resultados del aporte de nitrógeno mineral en ambas, del lavado superficial en la zona de mayor pendiente y del lavado por el nivel freático del río en el pastizal son similares.

El incremento del nitrógeno-total en la rizosfera de los alisos, chopos y sauces respecto al dosel de las mismas plantas responde al aporte de compuestos nitrogenados a través del sistema radical por las raíces muertas (McClaugherty et al., 1984 y Joslin y Henderson, 1987) y por la liberación de productos nitrogenados por las raíces vivas, que Janzen y Bruinsma (1989) cifran en torno al 25 - 32% del nitrógeno asimilado por la parte aérea de la planta y que en proporción elevada se liberan como aminoácidos en los exudados radicales (Hale et al., 1975). En las plantas actinorrizas, además, se debe considerar la necrosis de los nódulos donde reside la actividad diazotrófica (Leaf et al., 1959), pues sus exudados presentan concentraciones elevadas

de compuestos nitrogenados (Remacle y De Leval, 1975). Por ello en la rizosfera de los alisos se observan niveles de nitrógeno total mayores que en la rizosfera de los chopos y de los sauces.

Las diferencias en el contenido de nitrógeno total entre los suelos con ambas poblaciones de alisos confirman que su estado de desarrollo afecta a la intensidad del aporte de compuestos nitrogenados al medio edáfico, hecho que también observan Sharma et al. (1985) en poblaciones de *A. nepalensis* D. Don, pues con la edad de los bosques aumenta el nitrógeno total y el carbono orgánico del suelo en proximidad a los alisos.

Tras la caída de las hojas, los niveles de nitrógeno total descienden en invierno debido a un grado mayor de humedad que provocaría el lixiviado de las formas solubles de nitrógeno mineral, sobre todo cuando en la estación precedente la actividad de las microfloras nitrificantes nitrosa y nítrica es máxima, lo que determina un incremento del nitrógeno mineral más fácilmente lavable. Este efecto se manifiesta también en primavera, época del año en que se obtienen los valores más bajos del nitrógeno total, y cuando la absorción de nitrógeno por las raíces aumenta como consecuencia del incremento de actividad de los alisos, chopos y sauces. Por esta razón en primavera desciende la concentración de nitrógeno-nitrato, aunque el contenido menor se registra en invierno, cuando el lavado de las formas móviles de nitrógeno es más intenso. En las zonas 1 y 2, pobladas con alisos, otro factor a considerar es la actividad nula del endófito de *A. glutinosa* en invierno (Gardner, 1965) por lo que en esta época y en esta misma aliseda Bermúdez de Castro y Schmitz (1981) no registraron actividad reductora de acetileno y por tanto el aporte de materia orgánica

nitrogenada de origen radical es menos significativo.

El contenido mayor de nitrógeno total en la rizosfera se corresponde de forma dispar con los niveles de nitrógeno-nitrato y de nitrógeno-amonio, principales formas de nitrógeno inorgánico en el suelo. El amonio aparece en concentración mayor cerca de las raíces, hecho que se justifica por el flujo elevado de compuestos orgánicos nitrogenados por parte de las raíces que, a través de la mineralización biológica, suponen un aporte significativo de nitrógeno-amonio. Por el contrario, en la rizosfera desciende la concentración de nitrógeno-nitrato, forma de nitrógeno inorgánico susceptible al lixiviado por su fácil movilidad tal y como indican Vitousek et al. (1982) quienes registran las pérdidas más elevadas de nitrato en la zona radical de los árboles de un bosque de *A. rubra*. Además se debe tener en cuenta el papel de la vegetación nitrófila (*Urtica* sp., *Rubus* sp.) que absorbe el nitrógeno-nitrato edáfico y que está presente en muchas alisedas (Bermúdez de Castro, 1977). Por otro lado el nitrógeno-nitrato constituye el sustrato de la actividad desnitrificante que los microorganismos realizan en la rizosfera donde se reúnen unas condiciones adecuadas para su desarrollo (Mikkelsen, 1987).

La relación carbono/nitrógeno influye en la actividad de los microorganismos edáficos (Rosswall, 1981) y por esta razón las variaciones significativas que se encuentran entre las muestras estudiadas son interesantes. Antes de analizar los resultados obtenidos, conviene resaltar que la relación C/N por sí sola no permite determinar ni el tamaño ni la actividad de las poblaciones de los microorganismos edáficos, aunque nos orienta sobre la composición cualitativa del sustrato que sirve de soporte a la comunidad microbiana. Los resultados más elevados de las zonas sin arbolado no

significa que, en estos puntos, se encuentren niveles mayores de sustratos orgánicos, sino que la concentración de nitrógeno total disminuye respecto a las zonas con alisos, chopos y sauces. El aporte de nitrógeno mayor en las zonas arboladas, sobre todo en la aliseda más desarrollada, favorece la productividad primaria, aumenta la biomasa y se traduce en una relación C/N elevada, que además indica que el nitrógeno bajo los alisos se asimila fácilmente. Sin embargo entre el nitrógeno total y el cociente C/N no se observa ninguna correlación, aunque ambas variables presentan diferencias significativas que se deben a las tres fuentes de variación estudiadas (zona, estación y proximidad al sistema radical).

La evolución estacional del cociente C/N y las diferencias entre la zona rizosférica y el dosel se pueden atribuir a las variaciones registradas en la concentración de carbono orgánico en cada zona. En este sentido, el análisis de la covarianza de los resultados de la relación carbono/nitrógeno ajustados por los valores de carbono orgánico indica que ambas variables evolucionan de forma semejante y que están correlacionadas. Por ello, las variaciones significativas se pueden atribuir a las diferencias en la concentración de carbono orgánico. El análisis de la covarianza de estas dos variables indica también que las fuentes de variación inciden sobre ambas variables hasta el extremo de enmascarar la correlación existente. Entre la relación C/N y la densidad y la actividad de los microorganismos de los grupos fisiológicos que se estudian solo se observa correlación significativa con los T50 de las microfloras proteolítica y amonificante. De ello se deduce que el efecto de esta variable sobre los microorganismos proteolíticos, amonificantes y nitrificantes está modulado en parte por la interacción con otras variables

y con los factores ambientales.

La densidad microbiana de los diferentes grupos de microorganismos por gramo de suelo es comparable con la encontrada en otros suelos de ambientes templados (O'Brien, 1978; Bermúdez de Castro y Gutiérrez Mañero, 1987 y Schmitz et al., 1990).

El NMP de microorganismos totales, proteolíticos y amonificantes son las variables que presentan factores de carga más elevados en el análisis de componentes principales. Por ello las variaciones en la densidad de tales grupos fisiológicos de microorganismos nos permiten caracterizar las distintas observaciones y evaluar el efecto del sistema radical de las diferentes plantas aquí estudiadas y de los cambios estacionales. Estos resultados no implican que los factores de variación que se analizan solo afecten a las citadas comunidades de microorganismos.

Las variaciones significativas ($p < 0.01$) en los análisis de la varianza del NMP de microflora total ponen de manifiesto el efecto importante de las plantas sobre la microflora telúrica. Tanto en la aliseda, como entre los sauces y los chopos, el NMP de microorganismos supera al que aparece en las dos zonas sin vegetación arbórea. Por consiguiente el papel regulador de la vegetación en este caso se traduce en un incremento de la comunidad microbiana. Las razones que pueden justificar este hecho son numerosas, pero, como Pough (1974) indica, los nutrientes de las hojas caídas y las excretas de las plantas son condiciones suficientes para el desarrollo de la microflora edáfica pese a la influencia de los factores físico-químicos, y en especial se puede destacar el aporte de materia orgánica que representa el arbolado para la región edáfica, dato que está de acuerdo

con los resultados registrados y expuestos anteriormente que demuestran que en las zonas con chopos y sauces, y en especial bajo los alisos, aparecen valores más elevados de carbono orgánico y de nitrógeno total.

La densidad de la microflora total muestra coeficientes de correlación positivos con los niveles de carbono orgánico y de nitrógeno total. Pero los análisis de la covarianza de cada una de ambas variables físico-químicas respecto a los datos del NMP de microflora total nos indican que, al eliminar el efecto debido a las tres fuentes de variabilidad (aparato radical, estación y zona), los coeficientes de correlación que se calculan a partir de la variación residual reflejan valores no significativos. Por ello la correlación observada en principio es consecuencia del efecto de las fuentes de variabilidad que inciden de forma significativa en las concentraciones de carbono orgánico y de nitrógeno total (hecho que se refleja en los análisis de la varianza de las dos variables físico-químicas). Estos resultados reflejan que el aporte de potenciales sustratos orgánicos nitrogenados por parte de los alisos, chopos y sauces es importante y justifica en parte las diferencias en el tamaño de la comunidad de la microflora total. Sin embargo, deben existir otros factores que incidan en las variaciones de la densidad de microflora total y que alteren su asociación con los niveles de materia orgánica nitrogenada. En este sentido hay que considerar que los alisos, chopos y sauces aportan también nutrientes distintos de la materia orgánica y esenciales para el desarrollo de los microorganismos telúricos, situación que no sucede en las zonas sin árboles que registran las densidades inferiores de la microflora total.

Los datos también manifiestan el efecto de las condiciones ambientales. Aunque la microflora de los suelos mediterráneos se adapta al déficit temporal de agua (Schaefer, 1973) y en un suelo ribereño las variaciones de humedad no son muy acusadas, en otoño y primavera aumenta la densidad de microorganismos. En el otoño la elevación del NMP coincide con el incremento de humedad en el suelo tras la estación seca, mientras que en invierno aumenta el contenido de agua e incide en una porosidad menor y una compactación mayor de los suelos con el consiguiente descenso de la superficie de las partículas del suelo, lo que refleja unas condiciones adversas para el desarrollo de la microflora aerobia. Además las lluvias más abundantes en invierno provocan la pérdida de sustratos para la comunidad microbiana. En primavera las condiciones no son tan adversas pues tiene lugar un incremento de la temperatura que supone una activación térmica de la microflora edáfica que se manifiesta en una densidad más elevada de la microflora total. Las condiciones ambientales influyen en la densidad y actividad de la microflora edáfica y, por tanto, alteran la comunidad de microorganismos telúricos.

Los datos del NMP de microflora total no permiten establecer diferencias entre el rizoplano y la rizosfera en las cuatro zonas con vegetación arbórea. Por consiguiente rizoplano y rizosfera constituyen una zona homogénea para el desarrollo de la comunidad de microorganismos totales, que presenta una densidad superior a la del dosel de los alisos, chopos y sauces. Los valores más elevados del rizoplano y de la rizosfera se explicarían con las condiciones óptimas de la zona radical, porque las raíces son una fuente importante de sustratos (superior al lecho de hojarasca en ocasiones, McClaugherty et al., 1982), y muchos de ellos son compuestos orgánicos nitrogenados de fácil utilización como los

aminoácidos (Hale et al., 1975). El crecimiento de la densidad bacteriana en el rizoplano y rizosfera depende en gran medida de la naturaleza de la materia orgánica ya que las características metabólicas de las bacterias manifiestan una eficacia superior con sustratos orgánicos de peso molecular bajo (Nakas y Klein, 1980), lo que también afecta al tiempo de generación de las bacterias, que disminuye cerca del sistema radical (Bowen y Foster, 1978). Además los productos liberados por las raíces pueden tener un efecto quimiotáctico (Krotzky et al., 1983) que favorezca el desarrollo de poblaciones determinadas de microorganismos (Barak et al., 1983) en detrimento de otras poblaciones de la comunidad edáfica, hecho muy importante pues recordemos que, en este sentido, Neal et al. (1968) indican que el número mayor de microorganismos en la interfase raíz-suelo puede disminuir la susceptibilidad de las raíces a la invasión por hongos patógenos y por tanto las bacterias rizosféricas pueden desempeñar un papel fundamental en el control de ciertas plagas (Elad y Baker, 1985).

Destacan el rizoplano y la rizosfera de los alisos arbustivos porque presentan el mayor incremento de microflora total respecto a los valores del dosel y de las zonas libres de arbolado; en el rizoplano y en la rizosfera de los alisos más desarrollados, el aumento del NMP de la comunidad microbiana es menor porque la densidad de microorganismos totales en el dosel de estos árboles es la más elevada de de todas las zonas no rizosféricas. En la interfase raíz-suelo de los chopos y de los sauces también se observan valores más elevados del NMP respecto al dosel de ambas plantas y a las zonas sin arbolado, aunque el incremento es menor que en la aliseda. Entre los chopos y los sauces las pruebas estadísticas (anova y LSD) no manifiestan variaciones significativas de la densidad de los microorganismos totales

en la zona rizosférica por lo que el efecto del sistema radical de ambas plantas será similar. Por el contrario el aumento de la microflora total en la zona rizosférica de los alisos sugiere que el simbiote *Frankia* influye de forma muy acusada en el desarrollo de la comunidad microbiana.

La presencia de los alisos, chopos, sauces y en particular de su sistema radicular desempeña un papel especial en la dinámica del ciclo del nitrógeno por la interacción de estas plantas con los microorganismos mineralizadores de los compuestos nitrogenados y así lo confirman los resultados del análisis de ordenación efectuado, pues manifiestan un efecto significativo de las plantas citadas sobre las poblaciones de microorganismos proteolíticos y amonificantes. La densidad y los T50 de las microfloras proteolítica y amonificante caracterizan el eje que representa la tendencia de variación mayor en el análisis de componentes principales. Por tanto las variaciones en las comunidades de microorganismos proteolíticos y amonificantes adquieren un gran protagonismo que permite diferenciar las muestras de la interfase raíz-suelo de las localizadas en el dosel y en los controles sin arbolado.

Las diferencias entre el rizoplano, la rizosfera y el dosel, en las cuatro zonas con arbolado muestran que rizoplano y rizosfera son zonas óptimas para las comunidades microbianas mineralizadoras, probablemente porque el aporte de nutrientes promueve el desarrollo de tales microorganismos. Destaca la riqueza de amonio de la zona rizosférica y los niveles superiores de carbono orgánico y de nitrógeno total que también se encuentran a pie de planta en la interfase raíz-suelo. Por ello resalta la fuente de nutrientes que representan los alisos, chopos y sauces a través de su sistema radical que proporciona compuestos

orgánicos poco frecuentes en el suelo no rizosférico (Smith y Pooley, 1989) y, aunque, de composición química diversa, abundan los compuestos fácilmente metabolizables (Turner y Newman, 1984), sobre todo en la interfase raíz-suelo de los alisos, hecho que reflejan los análisis de la varianza y las pruebas del LSD que indican que los microorganismos proteolíticos y amonificantes varían en densidad y actividad, más elevados siempre en el rizoplano y en la rizosfera de los alisos, descienden en la zona de influencia de la raíz de los chopos y sauces, que no difieren entre sí, y son mínimas en el pastizal y ladera. Las variaciones no significativas en el rizoplano y la rizosfera de los chopos y de los sauces manifiestan que, bajo ambos, los microorganismos proteolíticos y amonificantes encuentran condiciones similares para su desarrollo e igual ocurre en las dos zonas sin arbolado.

El efecto favorable de la vegetación arbórea sobre proteólisis y amonificación se extiende al dosel de los chopos y sauces y adquiere un relieve aún mayor en la aliseda. Aquí se obtienen los valores más elevados de densidad y menores de los T50 y las concentraciones superiores de amonio, lo que supone una mineralización mayor de los sustratos orgánicos y confirma que los microorganismos productores de amonio se encuentran en un estado fisiológico que refleja una actividad intensa. En el entorno de otras actinorrizas se han observado resultados similares (Bermúdez de Castro y Gutiérrez Mañero, 1987 y Llinares, comunicación personal).

Los sustratos orgánicos fuera de la rizosfera están menos localizados, pues la fuente principal de compuestos orgánicos es el lecho de hojarasca y por tanto el NMP y la actividad de la microflora proteolítica en el dosel es menor

que en la rizosfera. Otro factor importante es la naturaleza del lecho de hojarasca, ya que las hojas senescentes de los alisos presentan concentraciones superiores de compuestos nitrogenados (Sharma y Ambasht, 1987 y Domenach y Kurdali, 1989). Esto justifica que ambas actividades, proteolítica y amonificante, sean más intensas en el dosel de los alisos que en las demás zonas no rizosféricas. El dosel de los sauces y chopos refleja, al igual que su rizosfera, unas condiciones semejantes para el crecimiento de ambos grupos de microorganismos. En las zonas sin arbolado no se registra la entrada de sustratos derivados de los exudados radicales de los alisos, chopos y sauces y el aporte de nutrientes de sus hojas es mínimo según confirman los niveles inferiores de carbono orgánico y de nitrógeno total que reflejan unas condiciones menos idóneas para el desarrollo de los microorganismos proteolíticos y amonificantes.

Los resultados más elevados de la densidad e inferiores de los T50 de la comunidad amonificante en relación a la microflora proteolítica, principalmente en la aliseda, se atribuyen a que los productos que resultan de la actividad metabólica de los microorganismos proteolíticos son susceptibles de ser metabolizados por numerosos microorganismos y, por tanto, un aumento de la proteólisis induce un incremento mayor de la amonificación. También destaca el hecho antes citado de que la diazotrofia de los alisos manifiesta a través de las raíces y del lecho de hojarasca un aporte de compuestos nitrogenados sustrato de la microflora amonificante sin que los microorganismos proteolíticos los degraden previamente. Por ello en las zonas control (chopera, saucedá, ladera y pastizal) las diferencias entre las comunidades proteolítica y amonificante son menores, aunque en la rizosfera de los sauces y de los chopos

las variaciones aumentan respecto al dosel de las mismas plantas, debido a la liberación de exudados radicales que proporcionan sustratos a la actividad amonificante por una vía alternativa a la iniciada en la proteolisis.

Los resultados de los análisis de la covarianza de la densidad y actividad de las microfloras proteolítica y amonificante con las concentraciones de carbono orgánico y de nitrógeno total indican que la correlación positiva que se aprecia entre el NMP de ambos grupos fisiológicos de microorganismos y las dos variables físico-químicas, desaparece cuando se desestima el efecto de las tres fuentes de variación que se estudian (zona, sistema radical y estación) e incluso se observa que el NMP de microorganismos proteolíticos y el nivel de materia orgánica se correlacionan negativamente, mientras que el contenido de nitrógeno total y la actividad proteolítica muestran una correlación positiva. El papel de las fuentes de variabilidad es primordial en la correlación de los niveles de amonio y de la actividad amonificante, porque el análisis de la covarianza indica que ambas variables covarían de forma significativa al 99%, a causa de las diferencias que inducen los citados factores de variación. Si se consideran los datos de nitrógeno-amonio ajustados con los valores de la actividad microbiana, el grado de significación es del 95%. La explicación de estos resultados no resta importancia al papel de los sustratos carbonados, pues el aporte de materia orgánica cerca de los alisos, chopos y sauces refleja una situación favorable para el desarrollo de la biomasa microbiana y las microfloras proteolítica y amonificante, pero se puede alterar por otros factores que modifiquen la disponibilidad de los nutrientes de origen vegetal o que incidan directamente sobre las comunidades de microorganismos que mineralizan los compuestos orgánicos nitrogenados. En este sentido se debe mencionar que

las raíces y el lecho de hojarasca de los alisos, chopos y sauces pueden liberar sustancias, en especial compuestos polifenólicos (Schwintzer, 1984; D'Arcy Lameta, 1986 y Greenway y Whatley, 1990), que forman agregados con las proteínas y aminoácidos y dificultan su disponibilidad como sustratos de las comunidades proteolítica y amonificante (Howard y Howard, 1990). El efecto de los exudados radicales puede ser más intenso como D'Arcy Lameta y Jay (1987) registran en las raíces de la soja que libera cumestrol, inhibidor del desarrollo rizosférico de Pseudomonas sp., taxon muy abundante en la interfase raíz-suelo. Además debemos considerar que la densidad y actividad de los microorganismos proteolíticos y amonificantes se encuentran bajo el influjo de las múltiples microzonas que se tienden a crear en la interfase raíz-suelo por la absorción de nutrientes y la competencia por nitrógeno entre plantas y microorganismos (situación extendible al lecho de hojarasca) y por el mayor número de microhabitats aerobios y anaerobios que determinan la estructura del suelo, humedad y respiración radical, lo que propicia la diversificación de las comunidades proteolítica y amonificante. Estas circunstancias justificarían que las variaciones en los niveles de carbono orgánico y de nitrógeno total no se correspondan con las diferencias de los microorganismos mineralizadores.

Por otra parte hay que resaltar que las diferencias más importantes entre los niveles de materia orgánica y la densidad y actividad de los microorganismos radica en el cambio estacional que determina que no se aprecie una correlación positiva entre la materia orgánica y los microorganismos mineralizadores. Las diferencias entre las estaciones reflejan la importancia de las condiciones ambientales sobre ambas comunidades de microorganismos y matiza el papel de la concentración de sustratos orgánicos

nitrogenados.

En invierno, tras la caída de la hoja, se observan los valores más elevados de materia orgánica, pero la densidad y la actividad de los microorganismos son menores. La humedad más elevada que se registra en esta época promueve una disminución de la porosidad, lo que supone una superficie menor de los agregados donde se localizan los microorganismos. Esto se traduce en una disponibilidad inferior de los sustratos orgánicos nitrogenados para la microflora mineralizadora (Schaefer, 1973). Las variaciones en la temperatura también son importantes como registran Foster et al. (1989), quienes detectan un descenso de la mineralización de los compuestos orgánicos nitrogenados cuando disminuye la temperatura de los sustratos orgánicos. O'Brien (1972) indica que la proteólisis aumenta del orden de tres veces cuando la temperatura se eleva de 20°C a 37°C y Stanford et al. (1975) observan que por debajo de 35°C disminuye la actividad mineralizadora. En verano, estación con menor grado de humedad y temperaturas más elevadas se registra la máxima actividad de la microflora proteolítica, aunque no difiere significativamente de las que aparecen en otoño y primavera, estaciones que presentan las comunidades amonificantes más activas, lo que indica que estos grupos fisiológicos debido a su heterogeneidad se muestran activos en un intervalo amplio de humedad y temperatura (Miller y Johnson, 1964). La interacción de ambas variables promueve la actividad de los microorganismos amonificantes como indican Seneviratne (1985) y Sparling y Ross (1988).

Un factor abiótico importante es el pH, que en todas las fracciones de suelo supera el intervalo óptimo que Sahrawat (1982) señala para la mineralización. Por ello en la rizosfera de las plantas, sobre todo en la aliseda, donde el

pH desciende y la concentración de protones se aproxima al nivel idóneo, se observan los resultados más elevados del NMP y menores de los T50 de las microfloras proteolítica y amonificante. Esta circunstancia no se aprecia en los cambios estacionales del pH y de los T50 (variables que no covarían), luego la variación estacional tiene mayor incidencia que la concentración de protones sobre el estado fisiológico de las microfloras proteolítica y amonificante.

De estos datos se desprende que las concentraciones mayores de materia orgánica y de nitrógeno total que se registran bajo los chopos y los sauces, y en particular entre los alisos, así como a nivel del sistema radical, influyen en la comunidad microbiana que descompone los compuestos orgánicos nitrogenados. Además hay que considerar que la naturaleza de la materia orgánica y la riqueza en nitrógeno condiciona su disponibilidad como sustrato de la actividad metabólica de los microorganismos y que junto con otros factores, en especial las condiciones ambientales (Tiedje et al., 1984), determina que no exista ninguna correlación entre la densidad y la actividad biológica como indican Schmidt (1973) y Alef y Kleiner (1986).

Los microorganismos nitrificantes manifiestan pautas de comportamiento diferentes de los grupos fisiológicos anteriores. El análisis de ordenación refleja que las comunidades de microorganismos nitrificantes caracterizan en parte la principal tendencia de variación entre las zonas estudiadas y, por tanto, contribuyen a diferenciarlas mediante las variaciones significativas que muestran en su desarrollo. La microflora nitrificante nitrosa, que supone la etapa limitante de la producción de nitrógeno-nitrato a partir de nitrógeno-amonio, presenta las comunidades menos numerosas y los T50 más elevados en las cuatro zonas con

vegetación arbórea, en particular a nivel del sistema radical de los árboles. Los datos del NMP son inferiores a los que encuentran Pérez Hernández et al. (1989) cerca de *A. glutinosa*, aunque fuera del ámbito radical, e indican un desarrollo menor de los microorganismos nitrificantes nitrosos en el área de influencia de las raíces de los alisos. Los microorganismos que oxidan el nitrito hasta nitrato también aparecen con menor densidad en el rizoplano y en la rizosfera de los alisos, chopos y sauces, pero no ocurre así con los resultados del T50. Estos valores reflejan que las raíces de los sauces y de los chopos con la misma intensidad y, en mayor medida, el sistema radical de los alisos, ejercen un efecto inhibitorio importante sobre la densidad y la actividad de las comunidades de microorganismos de los grupos fisiológicos citados. Sin embargo la influencia del aparato radical no modifica la actividad de la microflora nitrificante nitrítica, pues no hay diferencias significativas entre las muestra del rizoplano, de la rizosfera y del dosel.

En las seis zonas analizadas los niveles de amonio se mantienen entre las 10 y 800 ppm que Verstraete (1981) y Jones y Hedlin (1970) señalan como concentraciones limitantes para los microorganismos nitrificantes nitrosos. Los resultados del análisis de la covarianza constituyen un dato interesante pues muestran que la concentración de amonio y los T50 de la comunidad nitrificante nitrosa covarían positivamente al 99%, pero la correlación se debe a las modificaciones que inducen las tres fuentes de variación sobre ambas variables. De este hecho se deduce que los niveles de amonio encontrados tanto en las zonas no arboladas como en las zonas con alisos, chopos y sauces no alteran significativamente el desarrollo de los microorganismos nitrificantes nitrosos.

Dentro de los límites de nitrógeno-amonio antes indicados las concentraciones más elevadas de amonio se encuentran en la aliseda cerca de las raíces, que son las zonas con mayor proporción de carbono orgánico y niveles inferiores de nitrógeno-nitrato. Keeney (1980) interpreta las diferencias en el contenido de las dos formas de nitrógeno mineral en las mismas zonas como una prueba de que la nitrificación está disminuida, hecho que coincide con los resultados obtenidos del NMP y del T50 de la microflora nitrificante.

El pH es otra variable físico-química que afecta profundamente a este grupo fisiológico de microorganismos. Las raíces desempeñan un efecto acidificador sobre la zona del suelo en que crecen y es más intenso en la rizosfera de la aliseda de porte arbóreo, como demuestran los resultados obtenidos y comentados anteriormente, pero en ningún caso la concentración de protones determina un pH inferior a 5 que inhibe la nitrificación autótrofa (Katyal et al., 1988). En las seis zonas los valores del pH coinciden con el intervalo que Katyal et al. (1988) indican adecuado para la nitrificación, aunque superan el óptimo que Sahrawat (1982) señala. Del análisis de la covarianza entre los valores de los T50 de la microflora nitrificante nitrosa y del pH se desprende que las variaciones en la concentración de protones no alteran el desarrollo de los microorganismos. Por tanto el pH no representa un factor limitante para el crecimiento de la microflora que oxida el amonio en ninguna de las zonas que se estudian y cualquier variación que pudiera inducir se ve modificada por efecto de las tres fuentes de variación.

El hecho de que la densidad menor y los T50 más elevados de los microorganismos nitrificantes aparezcan en las zonas con mayor riqueza de materia orgánica nitrogenada se puede

justificar por diferentes vías. Las raíces de los alisos y, en proporción menor, de los sauces y de los chopos aportan compuestos orgánicos nitrogenados al medio edáfico que favorecen el desarrollo de la comunidad descomponedora heterótrofa (Pastor et al., 1984) y el nitrógeno-amonio en presencia de una fuente de carbono estimula la actividad de los microorganismos heterótrofos que inmovilizan el nitrógeno (Robertson, 1982), en clara competencia con la población nitrificante que Jones y Richards (1977) describen como competidores poco eficaces por el nitrógeno inorgánico. Por esta razón, los datos más elevados de la densidad e inferiores de los T50 de los microorganismos proteolíticos y amonificantes y los NMP menores de la microflora nitrificante que se registran en proximidad al sistema radical de los alisos, sauces y chopos, se pueden interpretar como resultado de la competición entre estas comunidades de microorganismos. La vegetación también compite con los microorganismos por los nutrientes. Las raíces de los chopos y sauces, y en menor medida de los alisos, asimilan el nitrógeno-mineral en detrimento de la población nitrificante (Hatch et al., 1990).

Purchase (1974) indica que la competencia entre los microorganismos heterótrofos y los nitrificantes autótrofos no se limita al sustrato de la actividad sino que se puede extender a otros factores como el oxígeno y el espacio. En este sentido conviene resaltar que Pastor et al. (1984) encuentran escasa actividad nitrificante en suelos con niveles de amonio elevados e indican que las raíces compiten con los microorganismos nitrificantes por otros nutrientes distintos al nitrógeno inorgánico, en especial por el fosfato disponible en el medio edáfico. Los datos expuestos por estos autores coinciden con los resultados obtenidos y contribuirían a justificar la actividad menor de la microflora nitrificante nitrosa en el rizoplaneo y en la

rizosfera de los alisos, chopos y sauces donde, los microorganismos manifiestan un periodo de latencia que se explicaría por la baja disponibilidad de nutrientes a causa de la competencia con las raíces.

Por último, debemos tener en cuenta el efecto directo de los exudados radicales sobre la población nitrificante. Klein et al. (1988) y Gökçeoglu (1988) indican que los ácidos orgánicos de origen radical inhiben la nitrificación y favorecen la amonificación. Jordan et al. (1979) inciden en el papel inhibitor de las raíces pues encuentran pocos microorganismos nitrificantes debido a la alta concentración de taninos que producen las raíces. Los T50 elevados de la microflora nitrificante nitrifica en la rizosfera de los alisos se explicarían porque el nitrito, sustrato de los microorganismos, reacciona con los compuestos fenólicos liberados por el sistema radical y se forma nitrógeno orgánico (Azhar et al., 1986b) que se mantiene en el ecosistema, no se pierde por lixiviado ni por desnitrificación y supone un mecanismo de inmovilización del nitrógeno (Montagnini y Buschbacher, 1989). Esta reacción se facilita con el aumento de la materia orgánica y con el descenso del pH (Smith y Chalk, 1980), hecho que se observa en la rizosfera de los alisos. Por ello en la aliseda se favorece la conservación del nitrógeno al impedir que se forme el nitrógeno-nitrato. Estas consideraciones junto con el nivel freático del río que promueve el lavado intenso del suelo y disminuye el sustrato de la actividad nitrificante nitrifica justifican el crecimiento inferior de la comunidad de microorganismos nitrificantes en el rizoplano y en la rizosfera de los alisos y también explican que no se aprecien variaciones significativas entre los datos de los árboles y de los matorrales de aliso.

La liberación de productos orgánicos que inhiben la nitrificación no se restringe al aparato radical de las plantas sino que también se observa en el lecho de hojarasca. Pohlman y McColl (1988) identifican varios ácidos orgánicos en extractos de hojarasca que suprimen la actividad nitrificante y Frazer et al. (1990) explican por esta vía el descenso de la nitrificación en un bosque de coníferas de California. Un mecanismo semejante puede justificar las variaciones de las comunidades de microorganismos nitrificantes en el dosel de los chopos, de los sauces y de los alisos. Por ello bajo estos últimos se debe registrar el aporte mayor de productos que inhiban la nitrificación.

En las zonas control no hay liberación de exudados procedentes de las raíces de los árboles, disminuye el lecho de hojarasca y la densidad de microorganismos heterótrofos que mineralizan los compuestos orgánicos nitrogenados es inferior, condiciones que favorecen el desarrollo de las comunidades de microorganismos nitrificantes frente al ambiente de las zonas pobladas con los alisos, chopos y sauces tal y como manifiestan los resultados del NMP y del T50. Sin embargo estos datos no se corresponden con los niveles inferiores de nitrógeno-nitrato de las dos zonas sin árboles, lo que indica que el ión nitrato se elimina por una desnitrificación activa o por lixiviado.

La microflora nitrificante manifiesta el efecto de las condiciones climáticas como indican los valores máximo y mínimo de densidad y actividad de los microorganismos en las dos estaciones, verano e invierno, de condiciones extremas. La humedad provoca el descenso de la presión parcial de oxígeno y por ello afecta a los microorganismos que transforman el amonio en nitrato que son aerobios y se localizan sobre la superficie de las partículas del suelo.

Por tanto la humedad elevada, característica de la estación invernal, inhibe la actividad nitrificante (Tate, 1985 y Alexander, 1980). La humedad y los T50 de la microflora nitrificante no covarían de forma significativa cuando se elimina la variación que inducen los árboles y el cambio de estaciones. Por ello este factor por sí solo no justifica las fluctuaciones de los T50 de los microorganismos nitrificantes. Los datos del verano se explican por el menor grado de humedad y por la temperatura más alta, pues la microflora nitrificante alcanza su actividad máxima entre 20 y 30°C (Niemiera y Wright, 1987) lo que también justifica los resultados elevados de la primavera y del otoño. El descenso de la temperatura durante el invierno promueve la disminución de la actividad de los microorganismos nitrificantes como también registran Niemiera y Wright (1987).

CONCLUSIONES

1. *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. modifica las condiciones físico-químicas del suelo sobre el que se desarrolla. Esto se manifiesta por:

El descenso significativo del pH en el suelo bajo los alisos.

El incremento significativo de las concentraciones de carbono orgánico, de nitrógeno total y de nitrógeno-amonio.

2. *A. glutinosa* interfiere en la densidad y actividad de los microorganismos del ciclo del nitrógeno que mineralizan los compuestos orgánicos nitrogenados y que, posteriormente, transforman el nitrógeno-amonio en nitrógeno-nitrato. Favorece el crecimiento de la microflora total que presenta densidades significativamente mayores en la aliseda. Induce, con una significación del 99%, densidad y actividad biológica mayores en las comunidades proteolítica y amonificante e inhibe también significativamente el desarrollo de los microorganismos nitrificantes.

3. Las raíces de *A. glutinosa* manifiestan un efecto rizosfera importante pues promueven concentraciones de protones, carbono orgánico, nitrógeno total y nitrógeno amonio significativamente mayores que los sistemas radicales de los sauces y chopos que crecen en la misma zona.

4. En el rizoplano y en la rizosfera de los alisos se establecen las condiciones óptimas para el crecimiento de la microflora total, de los microorganismos proteolíticos y

amonificantes, que presentan densidades más elevadas y actividades biológicas mayores, en ambos casos por causas ajenas al azar, que las comunidades de los mismos grupos funcionales que se desarrollan próximas al sistema radical de los chopos y sauces.

5. El rizoplaneo y la rizosfera de los alisos presentan características diferentes que se reflejan en densidades significativamente mayores de los microorganismos proteolíticos y amonificantes y en una actividad biológica más elevada ($p < 0.01$) de la comunidad amonificante en el rizoplaneo. Por el contrario los microorganismos nitrificantes, nitrosos y nítricos, crecen por igual en el rizoplaneo y en la rizosfera de los alisos, por lo que deben encontrar condiciones similares para su desarrollo en ambas zonas.

6. Las comunidades proteolítica y amonificante son las más sensibles al efecto rizosfera de los alisos, pues aparecen como los grupos fisiológicos de microorganismos con factores de carga más elevados que caracterizan la ordenación de las muestras en el análisis de componentes principales.

7. Chopos y sauces presentan características físico-químicas, densidades y actividades biológicas de los grupos de microorganismos considerados semejantes alrededor de su sistema radical. Por ello el efecto de ambas plantas no fijadoras de nitrógeno debe ser similar.

8. Las densidades significativamente superiores de las microfloras proteolítica y amonificante en el rizoplano respecto a la rizosfera de los chopos y sauces indican que los microorganismos mineralizadores encuentran en la superficie radicular condiciones más idóneas. No sucede así con la microflora nitrificante que presenta densidades y actividades biológicas parecidas en el rizoplano y rizosfera de chopos y sauces.

9. La diferencia de edad de los alisos incide en:

Un aporte significativamente superior de materia orgánica nitrogenada al medio edáfico bajo los alisos de porte arbóreo.

Un aumento significativo de la densidad de los microorganismos proteolíticos y amonificantes entre los alisos más desarrollados.

10. Las variaciones estacionales modifican las variables físico-químicas: las concentraciones de nitrógeno total y de nitrógeno-amonio son más elevadas en otoño, mientras que en invierno se registra la concentración mayor de carbono orgánico y el pH más ácido.

11. Las variaciones estacionales también inciden en la comunidad microbiana mineralizadora de los compuestos orgánicos nitrogenados, aunque el efecto de los árboles y de su sistema radical, principalmente de los alisos, enmascara las diferencias de origen estacional. A pesar de ello, la temperatura más elevada y la humedad menor del verano hacen

de esta época la estación idónea para la microflora nitrificante. La microflora total y la comunidad amonificante se desarrollan mejor en el otoño, cuando las condiciones ambientales son menos extremas.

12. El efecto de los árboles (chopos, sauces y en particular alisos), de su aparato radical y de las variaciones estacionales sobre los grupos de microorganismos que transforman la materia orgánica nitrogenada en nitrógeno-amonio y posteriormente éste en nitrógeno-nitrato, se realiza en parte a través de las diferentes condiciones físico-químicas que promueven, pero, como reflejan los análisis de la covarianza las tres fuentes de variación, también ejercen un efecto directo sobre las comunidades de microorganismos.

13. Las raíces de los chopos, sauces, pero sobre todo de los alisos favorecen la movilización de los compuestos orgánicos nitrogenados y, por tanto, su aprovechamiento y promueven la conservación de las formas nitrogenadas no orgánicas en beneficio de la productividad del ecosistema.

BIBLIOGRAFIA

- ABDEL WAHAB, A. M. 1975. Nitrogen fixation by bacillus strains isolated from the rhizosphere of Ammophila arenaria. Plant and Soil. 42, 703-708.
- ADAMS, M. A. y ATTIWILL, P. M. 1982. Nitrogen mineralization and nitrate reduction in forests. Soil Biol. Biochem. 14, 197-202.
- ALEF, K. y KLEINER, D. 1986. Arginine ammonification, a simple method to estimate microbial activity potentials in soils. Soil Biol. Biochem. 18, 233-235.
- ALEXANDER, M. 1965. Most-probable-number method for microbial populations. En: Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. C. A. Black (ed.). American Society of Agronomy. Madison. Wisconsin. 1467 - 1472.
- ALEXANDER, M. 1980. Introducción a la Microbiología del Suelo. AGT Ed. S.A. México. 491 pp.
- ALSTRÖM, S. 1987. Influence of root-zone inhabiting bacteria on growth of plants and soil-borne fungal pathogens. Tesis Doctoral. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.
- ALSTRÖM, S. y BURNS, R. G. 1989. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. Biol. Fertil. Soils. 7, 232-238.
- ALLISON, F. E. 1973. Soil Organic Matter and its Role in Crop Production. Elsevier, Amsterdam. 637 pp.
- ANDERSON, J. R. 1978. Some methods for assessing pesticide effects on non-target soil micro-organisms and their activities. En: Pesticide Microbiology. I. R. Hill y S. J. L. Wright (eds.). Academic Press. London. 247-312.
- ANDERSON, J. P. E. y DOMSCH, K. H. 1980. Quantities of plant nutrient in the microbial biomass of selected soils. Soil Science. 130, 211-216.
- ARANDA, Y., SERRANO, J. M. y BERMUDEZ DE CASTRO, F. 1991. Degradación de la hojarasca de Populus nigra L. Rev. Ecol. Biol. Sol. (en prensa).
- ARIMA, Y. y YOSHIDA, T. 1982. Nitrogen fixation and denitrification in the roots of flooded crops. Soil Sci. Plant. Nutr. 24, 483-489.
- ARNASON, J. T., WAT, C. K., PARTINGTON, S., LAM, J., SWAIN, T. y TOWERS, G. H. N. 1981. Mosquito larvicides from polyacetylenes occurring naturally in the Asteraceae. Biochem. System. Ecol. 9, 63-67.

- ASANUMA, S., TANAKA, H. y YATAZAWA, M. 1979. Rhizoplane micro-organisms of rice seedlings as examined by scanning electron microscopy. Soil Science and Plant Nutrition. 25, 539-551.
- AZAD, H. R., DAVIS, J. R., SCHNATHORST, W. C. y KODO, C. I. 1985. Relationship between rhizoplane bacteria and Verticillium wilt resistance in potato. Arch. Microbiol. 140, 347-351.
- AZCON, C., AZCON, R. y BAREA, J. M. 1979. Endomycorrhizal fungi and Rhizobium as biological fertilizer for Medicago sativa in normal cultivation. Nature London. 279, 325-327.
- AZHAR, E. S., VAN CLEEMPUT, O. y VERSTRAETE, W. 1986a. Nitrification mediated nitrogen immobilization in soils. Plant and Soil. 94, 401-409.
- AZHAR, E. S., VERHE, R., PROOT, M., SANDRA, P. y VERSTRAETE, W. 1986b. Binding of nitrite nitrogen on polyphenols during nitrification. Plant and Soil. 94, 369-382.
- BAILEY, L. D. y BEAUCHAMP, E. G. 1973. Effect of moisture, added NO_3^- -N, and macerated roots on NO_3^- transformations and redox potential in surface and subsurface soils. Can. J. Soil Sci. 53, 219-230.
- BARAK, R., NUR, I. y OKON, Y. 1983. Detection of chemotaxis in Azospirillum brasilense. Journal of Applied Bacteriology. 53, 399-403.
- BARBER, D. A. 1968. Microorganisms and the inorganic nutrition of higher plants. Ann. Rev. Plant. Physiol. 19, 71-76.
- BARBER, D. A. y MARTIN, J. K. 1976. The release of organic substances by cereal roots into the soil. New Phytologist. 76, 69-80.
- BARBER, D. A. y LYNCH, J. M. 1977. Microbial growth in the rhizosphere. Soil Biol. Biochem. 9, 305-308.
- BAREA, J. M. y AZCON, A. 1983. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. Advances in Agronomy. 36, 1-54.
- BAZIN, M. J., MARKHAM, P., SCOTT, E. M. y LYNCH, J. M. 1990. Population dynamics and rhizosphere interactions. En: The Rhizosphere. J. M. Lynch (ed.). John Wiley sons. Chichester. 99-127.
- BECK, S. M. y GILMOUR, C. M. 1983. Role of wheat root exudates in associative nitrogen fixation. Soil Biol. Biochem. 15, 33-38.

- BECKING, J. H. 1974. The family Frankiaceae. En: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. R. E. Buchanan y N. E. Gibbons (eds.). The Williams and Wilkins Co. Baltimore. 701-706.
- BENNETT, R. A. y LYNCH, J. M. 1981. Bacterial growth and development in the rhizosphere of gnotobiotic cereal plants. Journal of General Microbiology. 125, 95-102.
- BERG, B. y STAAF, H. 1980. Decomposition rate and chemical changes of scots pine needle litter II. The influence of chemical composition. Ecol. Bull. (Stockholm). 32, 373-390.
- BERG, B. y STAAF, H. 1981. Leaching, accumulation and release of nitrogen in decomposing forest litter. Ecol. Bull. (Stockholm). 33, 163-178.
- BERMUDEZ DE CASTRO, F. 1977. Angiospermas no-leguminosas fijadoras de nitrógeno de la Península Ibérica. Bol. Est. Cent. Ecol. 2, 3-17.
- BERMUDEZ DE CASTRO, F. 1981. Diazotrofia como técnica en agronomía y silvicultura. En: Productividad Vegetal. C. Vicente (ed.). Ed. Univ. Complutense. Madrid. 191-225.
- BERMUDEZ DE CASTRO, F., ARANDA, Y. y SCHMITZ, M. F. 1990. Acetylene-reducing activity and nitrogen inputs in a bluff of Elaeagnus angustifolia L. Orsis. 5, 85-89.
- BERMUDEZ DE CASTRO, F., BURGUETE, I. y SCHMITZ, M. F. 1984. Variaciones en la densidad de los microorganismos nitrificantes en alisedas. Studia Oecologica. 5, 109-116.
- BERMUDEZ DE CASTRO, F. y GUTIERREZ MANERO, F. J. 1987. Introducción de Myrica gale L. en un pastizal. Respuesta de los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno. Studia Oecologica. 6, 149-156.
- BERMUDEZ DE CASTRO, F. y RODRIGUEZ-BARRUECO, C. 1976. Estudio sobre las sustancias con actividad citokinina de los nódulos radiculares fijadores de nitrógeno de Alnus glutinosa (L.) Gaernt. Anuario II. Centro de Edafología y Biología aplicada CSIC. Salamanca. 105-114.
- BERMUDEZ DE CASTRO, F. y SCHMITZ, M. F. 1981. Variaciones diaria y estacional de la actividad nitrogenásica en Alnus glutinosa. Acta Salmanticensia. Ciencias. 44, 147-148.
- BERMUDEZ DE CASTRO, F. y SCHMITZ, M. F. 1991. Alnus glutinosa y Myrica gale: ¿Plantas pioneras en suelos ribereños?. En: Aspectos Generales de la Fijación de Nitrógeno Atmosférico. M. Megias (ed.). (En prensa).
- BERNHARD-REVERSAT, F. 1977. Observation sur la mineralization in situ de l'azote du sol en savane

- sahelienne (Senegal). Cah. Orston ser Biol. 12, 301-306.
- BHUIYA, M. R. H. y CORNFIELD, A. H. 1972. Effects of addition of 1000 ppm Cu, Ni, Pb and Zn on carbon dioxide release during incubation of soil alone and after treatment with straw. Environ. Pollut. 3, 173-177.
- BLACKBURN, T. H. 1983. The microbial nitrogen cycle. En: Microbial Geochemistry. W. E. Krumbein (ed.). Blackwell Sci. Pub. Oxford. 63-89.
- BLANCHETTE, R. A. y SHAW, C. G. 1978. Associations among bacteria, yeasts and basidiomycetes during wood decay. Phytopathology. 68, 631-637.
- BOCOCK, K. L. 1964. Changes in the amount of dry matter, nitrogen, carbon and energy in decomposing woodland leaf litter in relation to the activities of the soil fauna. J. Ecol. 52, 273-284.
- BOLTON, H. y ELLIOT, L. F. 1989. Toxin production by a rhizobacterial Pseudomonas sp. that inhibits wheat root growth. Plant and Soil. 114, 269-278.
- BOLTON, H. Jr., ELLIOT, L. F., GURUSIDDAIAH, S. y FREDRICKSON, J. K. 1989. Characterization of a toxin produced by a rhizobacterial Pseudomonas sp. that inhibits wheat growth. Plant and Soil. 114, 279-287.
- BOLLEN, W. B. y LU, K. C. 1968. Nitrogen transformations in soils beneath red alder and conifers. En: Biology of Alder. J. M. Trappe, J. F. Franklin, R. F. Tarrant y G. M. Hansen (eds.). U. S. Dep. Agric. For. Serv. Portland, Oregon. 141-148.
- BOND, G. 1951. The fixation of nitrogen associated with the root nodules of Myrica gale L. with special reference to its pH relation and ecological significance. Ann. Bot. 15, 447-449.
- BORMANN, B. T. y DEBELL, D. S. 1981. Nitrogen content and other soil properties related to age of red alder stands. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, 428-432.
- BOUWER, E. J. y McCARTY, P. L. 1983. Transformations of 1- and 2- carbon halogenated aliphatic organic compounds under methanogenic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 45, 1286-1294.
- BOWEN, G. D. 1969. Nutrient status effects on loss of amides and amino acids from pine roots. Plant and soil. 30, 139-142.
- BOWEN, G. D. 1979. Integrated and experimental approaches to the study of growth of organisms around roots. En: Soil-borne Plant Pathogens. B. Schippers y W. Gams (eds.).

Academic Press. London. 207-227.

BOWEN, G. D. 1981. The root-microorganisms ecosystem. En: Biological and chemical interactions in the rhizosphere. P. Brinck (ed.). Swedish Natural Science Research Council Stockholm. 3-42.

BOWEN, G. D. y FOSTER, R. C. 1978. Dynamics of microbial colonization of plant roots. En: Proc. Symp. on Soil Microbiology and Plant Nutrition. W. J. Broughton y C. K. John (eds.). Univ. Malaysia Press. 98-101.

BOWEN, G. D. y THEODEROU, C. 1979. Interactions between bacteria and ectomycorrhizal fungi. Soil Biology and Biochemistry . 11, 119-126.

BRAR, S. S. 1972. Influence of root on denitrification. Plant and Soil. 36, 713-715.

BREITENBECK, G. A. y BREMNER, J. M. 1987. Effects of storing soils at various temperatures on their capacity for denitrification. Soil Biol. Biochem. 19, 377-380.

BREMNER, J. M. y BLACKMER, A. M. 1981. Terrestrial nitrification as a source of atmospheric source of atmospheric nitrous oxide. En: Denitrification, Nitrification and Atmospheric Nitrous Oxide. C. C. Delwiche (ed.). J. Wiley and Sons New York. 151-170.

BRODA, E. 1975. The history of inorganic nitrogen in the biosphere. J. Mol. Evol. 7, 87-100.

BROWN, M. E. 1972. Plant growth substances produced by microorganisms of soil and rhizosphere. J. appl. Bact. 35, 443-451.

BUCHANAN, R. E. y GIBBONS, N. E. (1974). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. R. E. Buchanan y N. E. Gibbons (eds.). The Williams and Wilkins Co. Baltimore.

BUNGAY, H. R. y BUNGAY, M. L. 1968. Microbial interactions in continous culture. Adv. Appl. Microbiol. 10, 269-290.

BURNS, R. G. 1983. Extracellular enzyme-substrate interactions in soil. En: Microbes in their natural enviroments. J. H. Salter, R. Whittenbury y J. W. T. Wimpenny (eds.). Symp. Soc. Gen. Microbio., 34, Cambridge University Press, Cambridge. 249-298.

BURR, T. J. y CAESAR, A. 1984. Beneficial plant bacteria. Critical Rev. Plant. Sci. 2, 1-20.

CAMPBELL, R. 1985. Microbiology of Roots. En: Plant Microbiology. R. Cambell (eds.). Edward Arnold Ltd. London. 106-152.

- CAMPBELL, C. A., BIEDERBECK, V.O. Y WARDER, F. G. 1971. Influence of simulated fall and spring conditions on the soil system: II. Effect on soil nitrogen. Soil Science Society of America Proceedings. 35, 480-483.
- CAMPBELL, G., LAMBERT, J. D., ARNASON, T. y TOWERS, G. H. N. 1982. Alleopathic properties of -terthienyl and phenylheptatriyne, naturally occurring compounds from species of Asteraceae. J. Chem. Eco. 8, 961-972.
- CATALAN, J. C. 1965. Estudio químico-sedimentológico de algunos afluentes del Tajo. C. S. I. C. Madrid. 137 pp.
- CATANZARO, J. B., BEAUCHAMP, E. G. y DRURY, C. F. 1987. Denitrification vs dissimilatory nitrate reduction in soil with alfalfa, straw, glucose and sulfide treatments. Soil Biol. Biochem. 19, 583-587.
- CHAN, E. C. S., KATZNELSON, H. y ROVATT, J. W. 1963. The influence of soil and root extractson the associative growth of selected soil bacreria. Con. J. Microbiol. 9, 187-197.
- CHEN, Y. P. y YOCH, D. C. 1988. Nickel-requiring oxidoreductases couple electron flow from formate and H₂ to nitrogenase in Methylosinus trichosporium OB3C. En: Nitrogen fixation: Hundred Years After. H. Bothe, F. J. de Bruijin y W. E. Newton (eds.). G. Fischer. Stuttgart. 281pp.
- CHESIRE, M. V., SPARLING, G. P. y MUNDIE, C. M. 1983. Effect of periodate treatment of soilan carbohydrate constituents and soil aggregation. J. Soil Sci. 34, 105-112.
- CHILD, J. J. 1981. Biological nitrogen fixation. En: Soil Biochemistry. E. A. Paul y J. N. Ladd (ed.). Marcel Dekker, Inc., New York. 297-322.
- CHOU DHURY, M. S. y CORNFIELD, A. H. 1978. Nitrogen and carbon mineralization during incubation of two Bangladesh soils in relation to temperature. Plant and Soil. 49, 317-321.
- CHRISTIE, P., NEWMAN, E. I. y CAMPBELL, R. 1978. The influence of neighbouring grassland plants on each others endomycorrhizas and root-surface microorganisms. Soil Biol. Biochem. 10, 521-527.
- CHU, L. C. 1979. Use of Azolla in Rice Production in China. En: Nitrogen and Rice. W. G. Rockwood y C. Mendoza (eds.). International Rice Research Institute, Laguna, Philippines. 375-394.
- CLARK, F. E. 1967. Bacteria in soil. En: Soil Biology. A.

Burges y F. Raw (eds.) Academic Press. New York. 15-49.

COATS, R. N., LEONARD, R. L. y GOLDMAN, C. R. 1976. Nitrogen uptake and release in a forested watershed Lake Tahoe basin, California. Ecology. 57, 995-1004.

COCHRAN, W. G. 1950. Estimation of bacterial densities by means of the "Most Probable Number". Biometrics. 2, 105-116.

COCHRAN, V. L., ELLIOT, L. F. y PAPENDICK, R. I. 1980. Carbon and nitrogen movement from surface applied wheat (Triticum aestivum) straw. Soil Sci. Soc. Am. J. 44, 978-982.

COLBOURN, P. y DOWDELL, R. J. 1984. Denitrification in field soils. Plant and Soil. 76, 213-226.

COLWELL, R. R. 1979. Enumeration of specific populations by the most probable number (MPN) method. En: Native Aquatic Bacteria: Enumeration, Activity and Ecology. J. W. Costerton y R. R. Colwell (eds.). American Society for Testing and Materials, Philadelphia.

COWLING, E. B. y MERRILL, W. 1966. Nitrogen in wood and its role in wood deterioration. Can. J. Bot. 44, 1539-1554.

CRASWELL, E. T. 1978. Some factors affecting denitrification and nitrogen immobilization in a clay soil. Soil Biol. Biochem. 10, 241-245.

CRAWFORD, R. M. M. 1978. Metabolic indicators in the prediction of soil anaerobiosis. En: Nielsen, d. r., McDonald, j. g. (eds.). Nitrogen in the environment. Volumen 1. Nitrogen behaviour in field soils. Academic Press, New York, 427-447.

CROCKER, R. L. y DICKINSON, B. A. 1957. Soil development on the recessional moraines of the Herbert and Mendenhall Glaciers, South-eastern Alaska. J. Ecol. 45, 169-185.

CROCKER, R. L. y MAJOR, J. 1955. Soil development in relation to vegetation and surface age at Glacier Bay, Alaska. J. Ecol. 43, 427-448.

CURL, E. A. 1982 The rizosphere: relation to pathogen behavior and root disease. Plant disease. 66, 624-630.

CURRIE, J. A. 1984. Gass diffusion through soil crumbs: The effects of compaction and wetting. J. Soil Sci. 35, 1-10.

DALAL, R. C. 1979. Mineralization of carbon and phosphorus from Carbon-14 and Phosphorus-32 labeled plant material

- added to soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 43, 913-916.
- DANIERE, S., CAPELLANO, A. y MOIROUD, A. 1986. Dynamique de l'azote dans un peuplement naturel d'Alnus incana (L.) Moench. Oecol. Plant. 7, 165-175.
- D'ARCY LAMETA, A. 1986. Study of soybean and lentil root exudates II. Identification of some polyphenolic compounds, relation with plantlet physiology. Plant and soil. 92, 113-123.
- D'ARCY LAMETA, A. y JAY, M. 1987. Study of soybean and lentil root exudates. Plant and Soil. 101, 267-272.
- DAVEY, A. 1983. Effects of abiotic factors on nitrogen fixation by blue-green algae in Antarctica. Polar Biology. 2, 95-100.
- DAY, P. R. 1965. Particle fractionation and particle-size analysis. Methods of Soil Analysis. American Society of Agronomy Part 1. 545-567.
- DE DATTA, S. K. 1987. Nitrogen transformation processes in relation to improved cultural practices for lowland rice. Plant and Soil. 100, 47-69.
- DELPHIN, J. E. 1986. Evaluation du pouvoir minéralisateur de sols agricoles en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques. Agronomie. 6, 453-458.
- DÖBEREINER, J. 1976. Nitrogen fixation in grass-bacteria association a summarized review of recent progress. VIII Relar. CIAT. Cali. Colombia. 25-34.
- DOMENACH, A. M. y KURDALI, F. 1989. Influence des réserves azotées sur la formation des feuilles d'Alnus glutinosa et ses conséquences dans l'estimation de la fixation d'azote. Can. J. Bot. 67, 865-871.
- DOMENACH, A. M., KURDALI, F. y BARDIN, R. 1989. estimation of symbiotic dinitrogen fixation in alder forest by the method based on natural ^{15}N abundance. Plant and Soil. 118, 51-59.
- DOMMERGUES, Y. R., BELSER, L. W. y SCHMIDT, E. L. 1978. Limiting factors for microbial growth and activity in soil. Adv. Microbiol. Ecol. 2, 49-104.
- DROZD, J. y POSTGATE, J. R. 1970. Effects of oxygen on acetylene reduction, cytochrome content and respiratory activity of Azotobacter chroococcum. Journal of General Microbiology. 63, 63-73.
- DUCHAUFOR, P. 1976. Dynamics of organic matter in soils of temperate regions: its action on pedogenesis. Geoderma. 15, 31-40.

- DULLAART, J. 1970. The auxin content of root nodules and roots of Alnus glutinosa (L.) Vill. J. Exp. Bot. 21, 975-984.
- EDMONDS, R. L. 1980. Litter decomposition and nutrient release in Douglas-fir, red alder, western hemlock, and Pacific silver fir ecosystems in western Washington. Can. J. For. Res. 10, 327-337.
- ELAD, Y. y BAKER, R. 1985. The role of competition for iron and carbon in supression of chlamyospore germination of Fudsrrium spp by Pseudomonas spp. Phytopath. 75, 1053-1059.
- ELLIOT, L. F., GILMOUR, C. M., COCHRAN, V. L., COLEY, C. y BENNET, D. 1979. Influence of tillage and residues on wheat root microflora and root colonization by nitrogen-fixing bacteria. En: The Soil-Root Interface. J. G. Harley y R. S. Russell (eds.). Academic Press New York. 243-258.
- EPSTEIN, E. 1972. A blind spot in biology. Science. 176, 235-238.
- EVANS, L. S., LEWIN, K. F. y VELLA, F. A. 1980. Effect of nutrient medium pH on symbiotic nitrogen fixation by Rhizobium leguminosarum y Pisum sativum. Plant and Soil. 56, 71-80.
- FARNWORTH, R. B., ROMNEY, E. M. y WALLACE, A. 1978. Nitrogen fixation by microfloral higher plant associations in arid to semiarid environments. En: Nitrogen in Desert Ecosystems. N. E. West y J. J. Skujins (eds.). Dowden, Hutchinson and Ross, Inc., Strondsburg. Pennsylvania. 307 pp.
- FILLERY, I. R. P. 1983. Biological denitrification. En: Gaseous Loss of Nitrogen from Plant-Soil Systems. J. R. Freney y J. R. Simpson (eds.). M. Nijhoff y W. Junk. The Hague. 33-64.
- FIRESTONE, M. K. 1982. Biological Denitrification. En: Nitrogen in Agricultural Soils. F. J. Stevenson (ed.). American Society of Agronomy, Madison, Wis. 289-326.
- FISHER, R. A. y YATES, F. 1963. Statistical tables for Biological, Agricultural and Medical Research. Oliver y Boyd (eds.). Edimburgh. 138 pp.
- FOCHT, D. D. 1979. Microbial kinetics of nitrogen losses in flooded soils. En: Nitrogen and Rice. N. C. Brady (ed.). The International Rice Research Institute. Los Baños. Philippines. 119-134.

FOCHT, D. D. y VERSTRAETE, W. 1977. Biochemical ecology of nitrification and denitrification. Ann. Rev. Microbiol. Ecol. 1, 135-214.

FORTEZA DEL REY. 1981. Caracterización agroclimática de la provincia de Guadalajara. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. 145 pp.

FOSTER, N. W., HAZLETT, P. W., NICOLSON, J. A. y MORRISON, I. K. 1989. Ion leaching from a sugar maple forest in response to acidic deposition and nitrification. Water, Air, and Soil Pollution. 48, 251-261.

FOSTER, R. C y ROVIRA, A. D. 1978. The ultrastructure of the rizosphere of Trifolium subterraneum L. En: Microbial Ecology. M. W. Loutit y J. A. R. Miles (eds.). Springer-Verlag. Berlin. 278-290.

FRANCIS, A. J. 1982. Effects of acidic precipitation and acidity on soil microbial processes. Water Air Pollut. 18, 375-394.

FRANKLIN, J. F., DRYNESS, C. T., MOORE, D. G. y TARRANT, R.F. 1968. Chemical soil properties under coastal Oregon stands of alder and conifers. En: Biology of Alder. J. M. Trappe, J. F. Franklin, R. F. Tarrant y G. M. Hansen (eds.). Pacific N. W. For. y Range Exp. Sta., U. S. D. A., Portland, Oregon. 157-178.

FRANKLIN, J. F. y WARING, R. H. 1980. Distinctive features of the northwestern coniferous forest: development, structure, and function. En: Forests: Fresh Perspectives from Ecosystem Analysis. R. H. Waring (ed.). Oregon St. Univ. Press. Corvallis. 59-85.

FRAZER, D. W., MCCOLL, J. G. y POWERS, R.F. 1990. Soil nitrogen mineralization in a clearcutting chronosequence in a Northern California Conifer Forest. Soil Sci. Soc. Am. J. 54, 1145-1152.

FREDRICKSON, J. K. y ELLIOT, L. F. 1985. Colonization of winter wheat seedling growth by toxin-producing rhizobacteria. Plant and soil. 83, 399-409.

FREDRICKSON, J. K., ELLIOTT, L. F. y ENGIBUS, J. C. 1987. Crop residues as substrate for host specific inhibitory pseudomonads. Soil Biol. Biochem. 19, 127-134.

FRENEY, J. R., SIMPSON, J. R. y DENMEAD, O. T. 1981. Ammonia volatilization. Ecol. Bull. (Stockholm). 33, 291-302.

FRESQUEZ, P. R. y LINDEMANN, W. E. 1982. Soil and rhizosphere microorganisms in amended coal mine spoils. Soil Sci. Soc. Am. J. 46, 751-755.

- FUENTE, V. 1985. Vegetación orófila del occidente de la provincia de Guadalajara (España). Lazaroa. 8, 123-219.
- GALLON, J. R. 1980. Nitrogen fixation by photoautotrophs. En: Nitrogen fixation. W. D. P. Stewart y J. R. Gallon (eds.). 197-238.
- GARCIA, J. L. 1977. Analyse de différents groupes composant la microflore dénitrifiante de sols de rizière du Sénégal. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 128, 433-446.
- GARCIA, A. 1981. Experimentos en Microbiología del Suelo. Compañía Editorial Continental S.A. México. 75 pp.
- GARDNER, I. C. 1965. Observations on the fine structure of the endophyte of the root nodules of Alnus glutinosa (L.) Gaertn. Arch. für Mikrobiol. 41, 365-383.
- GARRET, S. D. 1963. Soil fungi and Soil fertility. Pergamon Press. Oxford. 75-86.
- GEORGE, U. S. y ANTOINE, A. D. 1982. Denitrification potential of a salt marsh soil: Effect of temperature, pH, and substrate concentration. Soil Biol. Biochem. 14, 117-125.
- GERHARDSON, B., ALSTRÖM, S. y RAMERT, B. 1985. Plant reactions to inoculation of roots with fungi and bacteria. Phytopath. Z. 114, 108-117.
- GHILAROV, M. S. 1968. Soil stratum of terrestrial biocenosis. Pedobiol. 8, 82-96.
- GILLER, K. E., WANI, S. P., DAY, J. M. y DART, P. J. 1988. Short-term measurement of nitrogen fixed in the rhizospheres of sorghum (Sorghum bicolor) and millet (Pennisetum americanum). Biol. Fertil. Soils. 7, 11-15.
- GILLESPIE, A. R. y CHANEY, W. R. 1989. Process modeling of nitrogen effects on carbon assimilation and allocation - a review. Tree Physiology. 5, 99-112.
- GOERING, J. J. y CLINE, J. D. 1970. A note on denitrification in seawater. Limnol. Oceanogr. 15, 306-308.
- GÖKÇEOĞLU, M. 1988. Nitrogen mineralization in volcanic soil under grassland, shrub and forest vegetation in the Aegean region of Turkey. Oecologia. 77, 242-249.
- GOMMERS, F. J., BAKKER, J. y SMITS, L. 1980. Effects of singlet oxygen generated by the nematicidal compound α -terthienyl from tagetes on the nematode. Aphelenchus avenae. Nematologica. 26, 369-375.

- GONZALEZ-BERNALDEZ, F., MOREY, M. y VELASCO, F. 1969. Efectos de la encina sobre el pasto. Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. (Biol.). 67, 265-284.
- GONZALEZ VAZQUEZ, C. y GUTIERREZ RUEDA, C. 1983. Incidencia del fuego en la población bacteriana del suelo. En: Microbiología 83. A. Rodríguez Torres (ed.). Sociedad Española de Microbiología. Madrid. 909-910.
- GOSZ, J. R. 1981. Nitrogen cycling in coniferous ecosystems. Ecol. Bull. (Stockholm). 33, 405-426.
- GOTTSCHAL, J. C. 1986. Occurrence and Functioning of Anaerobic Bacteria in Oxidized Environments. En: Microbial Communities in Soil. V. Jensen, A. Kjoller, L. H. Sorensen (eds.). Elsevier Applied Science Publishers LTD. London. 263-273.
- GRAHAM, J. H., LEONARD, R. T. y MENGE, J. A. 1981. Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. Plant Physiology. 68, 548-552.
- GRANHALL, U. 1981. Biological nitrogen fixation in relation to environmental factors and functioning of natural ecosystems. Ecol. Bull. (Stockholm). 33, 131-145.
- GREENWAY, W. y WHATLEY, F. R. 1990. Analysis of phenolics of bud exudate of Populus angustifolia by GC-MS. Phytochemistry. 29, 2551-2554.
- GRIFFIN, D. M. 1972. Ecology of Soil Fungi. Chapman and Hall. London. 193 pp.
- GUTIERREZ MANERO, F. J. 1987. Estudios sobre la influencia de Myrica gale en la microflora edáfica del ciclo del nitrógeno. Tesis Doctoral. Univ. Comp. Madrid. 339 pp.
- GUTIERREZ MANERO, F. J. y BERMUDEZ DE CASTRO, F. 1983. Modificaciones de la microflora edáfica del ciclo del nitrógeno bajo Myrica gale L. An. Edafol. Agrobiol. 42, 1233-1244.
- HADAS, A., FEIGENBAUM, S., FEIGIN, A. y PORTNOY, R. 1986. Nitrogen mineralization in profiles of differently managed soil types. Soil Sci. Soc. Am. J. 50, 314-319.
- HADAS, A., FEIGIN, A., FEIFENBAUM, S. y PORTNOY, R. 1989. Nitrogen mineralization in the field at various soil depths. Journal of Soil Science. 40, 131-137.
- HAIDER, K. 1986. Changes in substrate composition during the incubation of plant residues in soil. En: Microbial Communities in Soil. V. Jensen, A. Kjoller y L. H. Sorensen (eds.). Elsevier Applied Science Publishers Ltd. London. 133-147.

- HALE, M. G., FOY, C.L. y SHAY, F. J. 1975. Factors affecting root exudation. Advances in Agronomy. 23, 89-109.
- HALE, M. G. y MOORE, L. D. 1979. Factors affecting root exudation II: 1970-1978. Adv. Agron. 31, 93-124.
- HARDY, R. W. y HOLSTEN, R. D. 1972. Global nitrogen cycling: pools, evolution, transformations, transfers, quantitation, and research needs. En: The Aquatic Environment: Microbial Transformation and Water Management Implications. L. J. Guarraia y R. K. Ballentine (eds). U. S. Government Printing Office. Washington D. C. 87-132.
- HARMAN, H. H. 1967. Modern factor analysis. Univ. Chicago Press. Chicago. 133 pp.
- HARRIS, R. F., CHESTERS, G. y ALLEN, O. N. 1966. Dynamics of soil aggregation. Advan. Agron. 18, 107-169.
- HART, S. C. y FIRESTONE, M. K. 1989. Evaluation of three in situ soil nitrogen availability assays. Can. J. Res. 19, 185-191.
- HASHIMOTO, T. y HATTORI, T. 1987. Length of incubation for the estimation of the most probable number of nitrifying bacteria in soil. Soil. Sci. Plant Nutr. 33, 507-509.
- HATCH, D. J., JARVIS, S. C. y PHILIPPS, L. 1990. Field measurement of nitrogen mineralization using soil core incubation and acetylene inhibition of nitrification. Plant and Soil. 124, 97-107.
- HOSSAIN, M. y ALEXANDER, M. 1984. Enhancing soybean rhizosphere colonization by Rhizobium japonicum. Appl. Environ. Microbiol. 48, 468-472.
- HOWARD, P. J. A. y HOWARD, D. M. 1990. Ammonification as an indicator of microbial activity in soils: effects on aqueous tree leaf extracts. Soil Biol. Biochem. 22, 281-282.
- HSIEH, Y. P. 1988. Dynamics of carbon, nitrogen, and phosphorus cycling in a sawgrass tidal marsh with special reference to the aboveground primary production. J. Environ. Qual. 17, 676-681.
- HUBER, D. H. y WATSON, R. D. 1974. Nitrogen form and plant disease. Annu. Rev. Phytopathol. 12, 139-165.
- HUNT, H. W., INGHAM, E. R., COLEMAN, D. C. y REID, C. P. P. 1988. Nitrogen limitation of production and decomposition in prairie, mountain meadow, and pine forest. Ecology. 69, 1009-1016.

- HUTCHINSON, G. E. 1944. Limnological studies in Connecticut: critical examination of the supposed relationship between phytoplankton periodicity and chemical changes in lake water. Ecology. 25, 3-26.
- HUTCHINSON, G. E. 1950. Survey of contemporary knowledge of biogeochemistry. III. The biogeochemistry of vertebrate excretio. Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. 96, 554 pp.
- INGESTAD, T. 1980. Growth, nutrition and nitrogen fixation in gry alder at varied rate nitrogen input. Physiol. Plant. 50, 363-364.
- INGRAHAM, J. L. 1981. Microbiology and genetic of denitrifiers. En: Denitrification, Nitrification and Atmospheric Nitrous Oxide. C. C. Delwiche (ed.). John Wiley and Sons. New York. 45-84.
- IVARSON, K.C. 1977. Changes in decomposition rate, microbial population and carbohydrate content of an acid peat bog after liming and reclamation. Can. J. Soil Sci. 57, 129-137.
- JAGNOW, G. y SÖCHTIG, H. 1983. Nitrogen losses from the soil to the atmosphere and to ground water-possible ways of limiting them - a survey. Plant. Res. Develop. 17, 68-88.
- JANZEN, H. H. y BRUINSMA, Y. 1989. Methodology for the quantification of root and rhizosphere nitrogen dynamics by exposure of shoots to ¹⁵N-labelled ammonia. Soil Biol. Biochem. 21, 189-196.
- JENKINSON, D. S. 1990. An introduction to the global nitrogen cycle. Soil use and mangement. 6, 56-60.
- JENKINSON, D. S. y AYANABA, A. 1977. Decomposition of carbon-14 labelled plant material under tropical conditions. Soil Sci. Soc. Amer. J. 41, 912-915.
- JENNY, H. 1980. The Soil Resource. Springer-Verlag, New York. 377 pp.
- JETER, R. M. y INGRAHAM, J. L. 1979. Procaryotes. En: The Denitrifying Prokaryotes. M. P. Starr (ed.). Springer-Verlag, Berlin. 108-112.
- JONES, R. W. y HEDLIN, R. A. 1970. Ammonium, nitrite and nitrate accumulation in three Manitoba soils as influenced by added ammonium sulphate and urea. Can. J. Soil Sci. 50, 331-338.
- JONES, J. M. y RICHARDS, B. N. 1977. Effect of reforestation on turnover of ¹⁵N-labelled nitrate and ammonium in relation to changes in soil microflora. Soil Biol. Biochem. 9, 383-392.

- JONES, M. B. y WOODMANSEE, R. G. 1979. Biogeochemical cycling in annual grassland ecosystems. Bot. Rev. 45, 111-144.
- JORDAN, C. F., TODD, R. L. y ESCALANATE, G. 1979. Nitrogen conservation in a tropical rainforest. Oecologia. 39, 123-129.
- JOSLIN, J. D. y HENDERSON, G. S. 1987. Organic matter and nutrients associated with fine root turnover in a white oak stand. Forest Science. 33, 330-346.
- KAPULNIK, Y., OKON, Y. y HENIS, Y. 1985. Changes in root morphology of wheat caused by Azospirillum inoculation. Can. J. Microbiol. 31, 881-887.
- KATELIJEN, H. L., VAN RIJSBERGEN, R., LEYNS, F. R., LAMBERT, B. J., TENNING, P., SWINGS, J. y JOOS, H. J.-P. 1989. Dominant rhizosphere bacteria as a source for Antifungal Agents. Pestic. Sci. 27, 141-154.
- KATYAL, J. C., CARTER, M. F. y VLEK, P. L. G. 1988. Nitrification activity in submerged soils and its relation to denitrification loss. Biol. Fertil. Soils. 7, 16-22.
- KEENEY, D. R. 1980. Prediction of soil nitrogen availability in forest ecosystems: a literature review. Forest Sci. 26, 159-171.
- KEITH, H. OADES, J. M. y MARTIN, J. K. 1986. Input of carbon to soil from wheat plants. Soil Biol. Biochem. 18, 445-449.
- KELLY, D. P. 1978. Bioenergetics of chemolithotrophic bacteria. En: Companion to Microbiology. A. T. Bull y P. M. Meadow (eds.). Longman. London. 363-386.
- KENDRICK, W. B. 1962. Soil fungi of a copper swamp. Can. J. Microbiol. 8, 639-647.
- KEPERT, D. G., ROBSON, A. D. y POSNER, A. M. 1979. The effect of organic root products on the availability of phosphorus to plants. En: The Soil-Root Interface. J. L. Harley y R. Scott Russell (eds.). Academic Press. London. 115-124.
- KHANDELWAL, K. C. y GAUR, A. C. 1970. Influence of humate on the growth of moong (Phaseolus aureus). Sci. and Cult. 36, 110-111.
- KIMOU, A. y DREVON, J. J. 1989. Hydrogen metabolism and nitrogen fixation of soybean (Glycine max. L.) inoculated with different strains of Rhizobium spp. Biol. Fertil. Soils. 7, 259-262.

- KIRKBY, E. A. 1981. Plant grow in relation to nitrogen supply. Ecol. Bull. (Stockholm). 33, 249-267.
- KJELDAHL, J. 1883. A new method for the determination of nitrogen organic matter. Z. Anal. Chem. 22, 366.
- KLEIN, D. A., FREDERICK, B. A., BIONDINI, M. y TRLICA, J. 1988. Rhizosphere microorganisms effects on soluble amino acids, sugars and organic acids in the root aone of Agropyron cristatum, A. smithii and Boutelona gracilis. Plant and Soil. 110, 19-25.
- KLEMEDTSON, L., BERG, P., CLARHOLM, M., SCHNÜRER, J. y ROSSWALL, T. 1987a. Microbial nitrogen transformation in the root environment of barley. Soil Biol. Biochem. 19, 551-556.
- KLEMEDTSON, L., SVENSSON, B. H. y ROSSWALL, T. 1987b. Dinitrogen and nitrous oxide production by dinitrification and nitrification in soil with and without roots. Plant and Soil. 99, 303-307.
- KLOSS, M., IWANNEK, K.H., FENDRIK, I. y NIEMANN, E. G. 1989. Organic acids in the root exudates of Diplachne fusca (Linn.) Beauv. Environ. Exp. Bot. 24, 179-188.
- KNIGHT, W. G. y SKUJINS, J. 1981. ATP concentration and soil respiration at reduced water potentials in arid soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, 657-660.
- KNOWLES, R. 1978. Free-living bacteria. En: Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the tropics. J. Döbereiner, R. H. Burris, A. Hollaender, A. Franco, A. A. Neyra y D. B. Scott (eds.). Plenum Press. New York. 25-40.
- KOSSLAK, R. M., BOHLOOL, B. B., DOWDLE, S. y SADOWSKI, M. J. 1983. Competition of Rhizobium japonicum strains in early stages soybean nodulation. Appl. Environ. Microbiol. 46, 870-873.
- KROTZKY, A., BERGGOLD, R., JAEGER, D., DART, P. J. y WERNER, D. 1983. Enhancement of aerobic nitrogenase activity (acetylene reduction assay) by phenol in soils and the rhizosphere of cereals. Zeit. Pflanzenern. Boden. 146, 634-642.
- KROTZKY, A., BERGGOLD, R. y WERNER, D. 1986. Analysis of factors limiting associative N₂-Fixation (C₂H₂ reduction) with two cultivars of Sorghum mutans. Soil Biol. Biochem. 18, 201-207.
- LADD, J. N. y JACKSON, R. B. 1982. Biochemistry of Ammonification. En: Nitrogen in Agricultural Soils. F. J.

- Stevenson (ed.). American Society of Agronomy, Madison, Wis. 173-228.
- LAWLEY, R. A., CAMPBELL, R. y NEWMAN, E. I. 1983. Composition of the bacterial flora of the rhizosphere of three grassland plants grown separately and in mixtures. Soil Biol. Biochem. 15, 605-607.
- LEAF, G., GARDNER, I. C. y BOND, G. 1959. Observations on the composition and metabolism of the nitrogen-fixing root nodules of Myrica. Biochem. J. 72, 662-667.
- LEPPARD, G. G. 1974. Rhizoplane fibrils in wheat. Demonstration and derivation. Science. 185, 1066-1068.
- LEVI, M. P., MERRILL, W. y COWLING, E. B. 1968. Role of nitrogen in wood deterioration VI. Mycelial fractions and model nitrogen compounds as substrates for growth and Polyporus versicolor and other wood-destroying and wood-inhabiting fungi. Phytopathology. 58, 626-634.
- LIEVENS, K. H., VAN RIJSBERGEN, R., LEYNS, F. R., LAMBERT, B. J., TENNING, P., SWINGS, J. y JOOS, H. J. P. 1989. Dominant rhizosphere bacteria a source for antifungal agents. Pestic. Sci. 27, 141-154.
- LIMMER, A. W. y STEELE, K. W. 1982. Denitrification potentials: measurement of seasonal variation using a short-term anaerobic incubation technique. Soil Biol. Biochem. 14, 179-184.
- LIN, L. P. y SADOFF, H. L. 1969. Chemical composition of Azotobacter vinelandii cysts. J. Bacteriol. 100, 480-486.
- LINE, M. A. y LOUITIT, M. W. 1971. Non-symbiotic nitrogen-fixing organisms from some New Zealand tussock-grassland soils. J. Gen. Microbiol. 66, 309-318.
- LOZANO, J. M. y VELASCO, F. 1972. Alteraciones sinecológicas de la población microbiana en un antiguo bosque de Quercus toza Bosch. repoblado con Pinus pinaster Sol. An. Edafol. Agrobiol. 31, 615-624.
- LOZANO, J. M. y VELASCO, F. 1981. Evolución del humus y de la microflora telúrica por la implantación de Eucalyptus camaldulensis Dehn. en bosques autóctonos de Extremadura. An. Edafol. Agrobiol. 40, 711-718.
- LUND, V. y GOKOSOYR, J. 1980. Effects of water fluctuations on microbial mass and activity in soil. Microbial Ecol. 6, 115-123.
- LYNCH, J. M. 1984. Interactions between biological processes cultivation and soil structure. Plant and Soil. 76, 307-318.

- MAGDOFF, F. R. y BOULDIN, D. R. 1970. Nitrogen fixation in submerged soil-sand-energy material media and the aerobic-anaerobic interface. Plant and Soil. 33, 49-61.
- MAHENDRAPPA, M. K., SMITH, R. L. y CHRISTIANSEN, A. T. 1976. Nitrifying organisms affected by climatic region in western United States. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 30, 60-63.
- MALHI, S. S. y MCGILL, W. B. 1982. Nitrification in three Alberta soils Effect of temperature. Soil Biol. Biochem. 14, 393-399.
- MAPA DE SUELOS DE LA PROVINCIA DE GUADALAJARA. 1970. Escala 1:250.000. C.S.I.C.
- MARTIN, J. K. 1977. Factors influencing the loss of organic carbon from wheat roots. Soil Biol. Biochem. 9, 1-6.
- MARTIN, J. P., FILIP, Z. y HAIDER, K. 1976. Effect of montmorillonite and humate on growth and metabolic activity of some actinomycetes. Soil Biol. Biochem. 8, 409-413.
- MARTIN, J. K. y KEMP, J. R. 1986. The measurement of C transfers within the rhizosphere of wheat grown in field plots. Soil Biol. Biochem. 18, 103-108.
- MATULEWICH, V. A., STORM, P. F. y FINSTEIN, M. 1975. Length of incubation for enumerating nitrifying bacteria present in various environments. Appl. Microbiol. 29, 265-268.
- McCLAUGHERTY, C. A., ABER, J. D. y MELILLO, J. M., 1982. The role of fine roots in the organic matter and nitrogen budgets of two forested ecosystems. Ecology, 63, 1481-1490.
- McCLAUGHERTY, C. A., ABER, J.D. y MELILLO, J.M., 1984. Decomposition dynamics of the roots in forested ecosystems. Oikos, 42, 378-386.
- McCONNELL, J. T. y BOND, G. 1957. A comparison of the effect of combined nitrogen on nodulation in non-legumes and legumes. Plant and Soil. 8, 378-388.
- McCRADY, M. H. 1918. Tables for rapid interpretation of fermentation tube results. Can. J. Pub. Health. 9, 20
- McLACHLAN, K. D. 1976. Comparative phosphorus responses in plants to a range of available phosphorus situations. Aust. J. Agri. Res., 27, 323-326.
- McKENNEY, D. J., SHUTTLEWORTH, K. F. y FINDLAY, W. I. 1980. Temperature dependence of nitrous oxide production from Brodeston clay. Can. J. Soil Sci. 60, 665-674.

- MELCHIORI-SANTOLINI, V. 1972. Enumeration of microbial concentration of dilution series (MPN). En: Techniques for the Assesment of Microbial Production and Decomposition in Fresh Waters. Y. I. Sorokin y H. Kadota (eds.). IBP Handbook No 23. Blackwell Sci. Pub., Oxford. 64-70.
- MIKKELSEN, D. S. 1987. Nitrogen budgets in flooded soils used for rice production. Plant and soil. 100, 71-97.
- MILHAM, P. J., AWAD, A. S., PAULL, R. E. y BULL. J. E. 1970. Analysis of plants, soils, and waters for nitrate by using an ion-selective electrode. Analyst. 95, 751-757.
- MILLER, H. G. 1982. Nutrient cycling in alder. International Energy Agency. Planing Group. B. JAB-21. 54 pp.
- MILLER, R. D. y JOHNSON, D. D. 1964. The effect of soil moisture tension on carbon dioxide evolution, nitrification and nitrogen mineralization. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 28, 644-647.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA. 1977a. Mapa de Clases Agrícolas. Jadraque (Guadalajara). Escala 1:50.000. 40 pp.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA. 1977b. Mapa de Cultivos y Aprovechamiento. Jadraque (Guadalajara). Escala 1:50.000. 34 pp.
- MOLINA, J. A. E. y ROVIRA, A. D. 1963. The influence of plant roots on autotrophic nitrifying bacteria. Con. J. Microbiol. 10, 249-257.
- MONROE, C. D. y KLADUCO, E. J. 1987. Aggregate stability of a silt loam soil as affected by roots of corn, soybeans and wheat. Commun. in soil Sci. Plant anal. 18, 1077-1087.
- MONTAGNINI, F. y BUSCHBACHER, R. 1988. Nitrification rates in two undisturbed tropical rain forest and three slash-and-burn sites of the Venezuelan Amazon. Biotropica 21, 9-14.
- MOORHEAD, K. K., GRAETZ, D. A. y REDDY, K. R. 1988. Mineralization of carbon and nitrogen from freeze- and oven-dried plant material added to soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 52, 1343-1346.
- MOSIER, A. R., GUENZI, W. D. y SCHWEIZER, E. E. 1986. Modelling nitrous oxide evolution from irrigated crops in northeastern Colorado. Soil Sci. Soc. Am. J. 50, 344-348.
- MÜLLER, A., SCHMITZ, M. F. y BERMUDEZ DE CASTRO, F. 1989. Estudios previos sobre la contribución de líquenes epifíticos a la producción de robledales. Options

Méditerranéennes 3, 203-205.

MURRELL, J. 1988. The rapid switch-off of nitrogenase in obligate methane-oxidizing bacteria. En: Nitrogen Fixation: Hundred Years After. H. Bothe, F. J. de Bruijin y W. E. Newton (eds.). G. Fischer. Stuttgart. 281 pp.

NAGARAJAH, S., POSNER, A. M. y QUIRK, J. P. 1970. Competitive adsorption of phosphate with polygalacturonate and organic anions on kaolinite and oxidase surfaces. Nature. 228, 83-87.

NAKAS, J. P. y KLEIN, D. A. 1980. Mineralization capacity of bacteria and fungi from the rhizosphere-rhizoplane of a semiarid grassland. Appl. Environ. Microbiol. 39, 113-117.

NEAL, J. L., TRAPPE, J. M., LU, K. C. y BOLLEN, W. B. 1968. Some ectotrophic mycorrhizae of Alnus rubra. En: Biology of alder. J. M. Trappe, J. F. Franklin, R. F. Tarrant y G. M. Hansen (eds.). Pacific Northwest Forest and Range Exp. Sta., Portland, Oregon. 179-184.

NEWELL, K. 1984. Interaction between two decomposer basidiomycetes and a collembolan under Sitka spruce: distribution, abundance and selective grazing. Soil Biol. Biochem. 16, 227-233.

NEWMAN, E. I. 1985. The rhizosphere in carbon sources and microbial populations. En: Ecological interactions in soil. A. H. Fitter, D. Atkins, D. J. Read, y M. B. Usher, (eds.). Blackwell Scientific Publications, London. 107-121.

NEYRA, C. A., DÖBEREINER, J., LALANDE, R. y KNOWLES, R. 1977. Denitrification by N₂-fixing Spirillum lipoferum. Can. J. Microbiol. 23, 300-305.

NIEMIERA, A. X. y WRIGHT, R. D. 1987. Influence of temperature on nitrification in a pine bark medium. Hortscience. 22, 615-616.

NIOH, I. 1979. Nitrogen fixation and nitrogen-fixing bacterium from the roots of Eragrostis ferruginea. J. Gen. Appl. Microbiol. 25, 261-271.

NÖMMIK, H. 1956. Investigations on denitrification in soil. Acta Agric. Scand. VI 2, 195-228.

NOMMIK, H. y VAHTRAS, K. 1982. Retention and Fixation of Ammonium in soils. En: Nitrogen in Agricultural Soils. F. J. Stevenson (eds.). American Society of Agronomy, Madison, Wis. 123-171.

OADES, J. M. 1984. Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. Plant and Soil. 76, 319-337.

- O'BRIEN, R. T. 1972. Proteolytic activity of soil microorganisms. US/IBP. Desert Biome Res. Memo. 72-92. Utah State Univ. Lugann. 8 pp.
- O'BRIEN, R. T. 1978. Proteolysis and ammonification in desert soils. En: Nitrogen in Desert Ecosystems. N. E. West y J. J. Skujins (eds.). Dowden, Hutchinson y Ross Inc. Stroudsburg. Pennsylvania. 307 pp.
- OLSON, R.K. y REINERS, W. A. 1983. Nitrification in subalpine balsam for soils: test for inhibitory factors. Soil Biol. Biochem. 15, 413-418.
- PARKINSON, D., GRAY, T. R. G. y WILLIAMS, S. T. 1971. Methods for Studying the Ecology of Soil Microorganisms. Blackwell Sci. Publications. 319 pp.
- PASTOR, J., ABER, J. D. McCLAUGHERTY, C. A. y MELILLO, J. M. 1984. Aboveground production and N and P cycling along a nitrogen mineralization gradient on Blackhawk Island, Wisconsin. Ecology. 65, 256-268.
- PAYNE, W. J. 1973. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. Bacteriol. Reviews. 37, 409-452.
- PEREZ HERNANDEZ, M. C., MÜLLER, A. y BERMUDEZ DE CASTRO, F. 1989. Regulación de microorganismos del ciclo del nitrógeno por Alnus glutinosa. Studia Oecologica. 6, 245-263.
- PETERSON, E. A. 1961. Observations on the influence of plant illumination on the fungal flora of roots. Can. J. Microbiol. 7, 1-6.
- POCHON, J. y TARDIEUX, P. 1962. Techniques d'analyse en Microbiologie du Sol. Editions de la Tourelle. St. Mandè. 108 pp.
- POHLMAN, A. A. y McCOLL, J. G. 1988. Soluble organics from forest litter and their role in metal dissolution. Soil Sci. Soc. Am. J. 52, 265-271.
- POUGH, G. J. F. 1974. Terrestrial fungi. En: Biology of plant litter decomposition. C. H. Dickinson y G. J. F. Pough (eds.). Academic Press. Nueva York. 2, 303-336.
- POWELL, C. Ll. 1982. Mycorrhizae. En: Experimental Microbial Ecology. R. G. Burns y J. M. Slater (eds.). Blackwell Scientific Publications Oxford London. 447-471.
- POWER, J. F. y LEGG, J. O. 1984. Nitrogen-15 recovery for five years after application of ammonium nitrate to crested wheat grass. Soil Sci Soc. Am. J. 48, 322-326.
- PRAKASAM, T. B. S. y LOEHR, R. C. 1972. Microbial nitrification and denitrification in concentrated wastes.

Water Res. 6, 859-869.

PRENZEL, J. 1979. Mass flow transport forward the roots systems of two forest ecosystems in relation to the uptake by the above ground tree parts. En: The soil-Root Interface. J. L. Harley y R. Scott Russell (eds.). Academic Press, London, 431 pp.

PURCHASE, B. S. 1974. Evaluation of the claim that grass root exudates inhibit nitrification. Plant and Soil. 41, 527-539.

RAO, J. L. N., REDDY, B. B. y RAO, R. 1984. Rhizosphere soil nitrogenase ($C_2 H_2$ reduction) as influenced by plant density in intermediate deep water rice. Plant and Soil. 78, 433-435.

RAO, A. V. y VENKATESWARLU, B. 1985. Most probable numbers of Azospirillum associated with the roots of inoculated pearl millet. Plant and Soil. 88, 153-158.

REICHMAN, G. A., GRUNES, D. L. y VIETS, F. G. 1966. Effect of soil moisture on ammonification and nitrification in two northern plains soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 30, 363-365.

REID, J. B. y GOSS, M. J. 1980. Changes in the aggregate stability of a sandy loam affected by growing roots of perennial ryegrass (Lolium perenne). J. Sci. Food Agric. 31, 325-328.

REID, J. B. y GOSS, M. J. 1982. Interactions between soil drying due to plant water use and decreases in aggregate stability caused by maize roots. J. Soil Sci. 33, 47-53.

REID, J. B., GOSS, M. J. y ROBERTSON, P. D. 1982. Relationships between the decreased in soil stability affected by the growth of maize roots and changes in organically bound iron and aluminium. J. Soil Sci. 33, 397-410.

REINHOLD, D. B., HUREK, T. y FENDRIK, I. 1989. Plant-bacteria interactions with special emphasis on the kallar grass association. En: Nitrogen fixation with non-legumes. F. A. Skinner (ed.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 199-207.

REMACLE, J. y DE LEVAL, J. 1975. L'application des indices de richesse et d'activité pour la caractérisation microbiologique des sols. Rev. Ecol. Biol. Sol. 12, 193-199.

RICE, E. L. 1979. Allelopathy-an update. The Botanical Review 45, 15-109.

- RICE, E. L. y PANCHOLY, S. K. 1972. Inhibition of nitrification by climax vegetation. An. J. Bot. 59, 1033-1040.
- RINAUDO, G., BLANDREAU, J. y DOMMERGUES, Y. 1971. Algal and bacterial non-symbiotic nitrogen fixation in paddy soils. Plant and Soil Spec. Vol. 471-479.
- RISSER, P. G. y PARTON, W. J. 1982. Ecosystem Analysis of the tallgrass prairie: Nitrogen cycle. Ecology. 63, 1342-1351.
- RITCHIE, G. A. F. y NICHOLAS, D. J. D. 1974. The partial characterization of purified nitrite reductase and hydroxylamine oxidase from Nitrosomonas europaea. Biochem. J. 138, 471-480.
- ROBERTS, J. A. y TUCKER, G. A. 1985. Ethylene and plant development. Proc. of 39th Univ. of Nottingham Easter School in Agric. Science. March 26-30.
- ROBERTSON, G. P. 1982. Factor regulating nitrification in primary and secondary succession. Ecology. 63, 1561-1573.
- ROBERTSON, G. P. y VITOUSEK, P. M. 1981. Nitrification potentials in primary and secondary succession. Ecology. 62, 376-386.
- RODRIGUEZ-BARRUECO, C., MIGUEL, C. y PALMI, L. M. 1979. Cytokinins in root-Nodules of the nitrogen-fixing non-legume Myrica gale L. Z. Pflanzenphysiol. 95, 275-278.
- RODRIGUEZ-BARRUECO, C., MIGUEL, C. y SUBRAMANIAM, P. 1984. Seasonal fluctuations of the mineral concentration of alder (Alnus glutinosa (L.) Gaertn.) from the field. Plant and Soil. 78, 201-208.
- ROJAS, H., MACIA, F. y LASTRA, J. A. 1978. Monografía del Alnus jorullensis. H. B. K. Colombia Forestal. 1, 5-22.
- ROSENBLUM, E. G. y WILSON, P. W. 1949. Fixation of isotopic nitrogen by Clostridium. J. Bacteriol. 57, 413-414.
- ROSSWALL, T. 1976. The internal Nitrogen Cycle between Microorganisms, Vegetation and Soil. En: Nitrogen, Phosphorus, and Sulphur Global Cycles. B. H. Svensson y R. Soderlund (eds.). SCOPE Report 7, Ecol. Bull. 22, 157-167.
- ROSSWALL, T. 1981. The Biogeochemical Nitrogen cycle. En: Some perspectives of the major biogeochemical cycles. G. E. Likens (ed.). John Wiley and sons. Chichester. 25-49.
- ROSSWALL, T. y PANSTIAN, K. 1984. Cycling of nitrogen in modern agricultural systems. Plant and Soil. 76, 3-21.

ROVIRA, A. D. 1965. Plant root exudates and their influence upon soil micro-organisms. En: Ecology of soil-borne Plant Pathogens-Prelude to Biological Control. K. F. Baker y W. C. Snyder (eds.). John Murray, London. 170-186.

ROVIRA, A. D., FOSTER, R. C. y MARTIN, J. K. 1979. Note on terminology: Origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere. En: The Soil-Root Interface. J. L. Harley y R. Scott Russell (eds.). Academic Press. London. 1-4.

ROVIRA, A. D. y McDOUGALL, B. 1967. Microbiological and biochemical aspects of the rhizosphere. En: Soil Biochemistry. A. D. McLaren y G. G. Petersen (eds.). Marcel Dekker. New York. Vol. 1, 417-463.

ROVIRA, A. D. y RIDGE, E. H. 1978. Exudation of ^{14}C -labelled compounds from wheat roots: influence of nutrients, micro-organisms and added organic compounds. New Phytologist 72, 1081-1087.

SAHRAWAT, K. L. 1982. Nitrification in some tropical soils. Plant and Soil. 65, 281-286.

SAIN, P. y BROADBENT, F. E. 1977. Descomposition of rice straw in soils as affected by some mangement factors. J. Environ. Qual. 6, 96-100.

SARKAR, A. N., JENKINS, D. A. y WYNJONES, R. G. 1979. Modifications to mechanical and mineralogical composition of soil within the rizosphere. En: The Soil Root Interface. J. L. Harley y R. Scott Russell (eds.). Academic press Inc. (London). 125-136.

SASSER, C. L. y BINKLEY, D. 1989. Nitrogen mineralization in high-elevation forest of the Appalachians. II. Patterns whit stand development in fir waves. Biogeochemistry 7, 147-156.

SCHAEFER, R. 1973. Microbial activity under seasonal conditions of drought in mediterranean climates. En: Mediterranean Type Ecosystem. F. di Castri (ed.). H. A. Mooney. Springer-Verlag. New York. 191-198.

SCHMIDT, E. L. 1973. The traditional plate count technique among modern methods. Ecol. Bull. 17, 453-454.

- SCHMITZ, M. F. 1990. Análisis de la variación de microorganismos edáficos y de la fijación de nitrógeno en la sucesión de un pasto mediterráneo. Tesis Doctoral. Univ. Complutense. Madrid. 308 pp.
- SCHMITZ, M. F., ARANDA, Y., ESTEBAN, M. L. y BERMUDEZ DE CASTRO, F. 1990. Nodulación de Elaeagnus angustifolia L. en el bosque de Valdemoro (Madrid). Ecología (en prensa).
- SCHWINTZER, C. R. 1979. Nitrogen fixation by Myrica gale root nodules in a Massachusetts wetland. Oecologia. 43, 283-294.
- SCHWINTZER, C. R. 1984. Production, decomposition, and nitrogen dynamics of Myrica gale litter. Plant and Soil. 78, 245-258.
- SEIFERT, J. 1972. The influence of moisture on the degree of nitrification in soil. II. Acta Universitatis Carolinae Biologica. 467-470.
- SELBY, K. 1968. Mechanism of biodegradation of cellulose. En: Biodeterioration of Materials. A. H. Walters, J. S. Elphick (eds.). Elsevier, Amsterdam. 62-78.
- SENEVIRATNE, R. 1985. Effect of mild drying on the mineralization of soil nitrogen. Plant and Soil. 84, 175-179.
- SEVILLANO, F. y RODRIGUEZ-BARRUECO, C. 1987. Sistemas simbióticos fijadores de nitrógeno de interés aplicado en agricultura. En: Avances en la Biología de la Fijación Simbiótica del Nitrógeno Atmosférico. M. Megias y F. Ruiz (eds.). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Sevilla. 9-29.
- SHARMA, E. y AMBASHT, R. H. 1987. Litterfall, decomposition and nutrient release in an age sequence of Alnus nepalensis plantation stands in the Eastern Himalaya. Journal of Ecology, 75. 997-1010.
- SHARMA, E., AMBASHT, R. S. y SINGH, M. P. 1985. Chemical soil properties under five age series of Alnus nepalensis plantations in the Eastern Himalayas. Plant and Soil. 84, 105-113.
- SHELTON, D. R. y TIEDJE, J. M. 1984. Insolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. Appl. Environ. Microbiol. 48, 840-848.
- SHIELDS, J. A., PAUL, E. A., LOWE, W. E. y PARKINSON, D. 1971. Turnover of microbial tissue in soil under field conditions. Soil Biol. Biochem. 5, 753-764.

- SILVER, W. S., BENDANA, F. E. y POWELL, R. D. 1966. Root nodule symbiosis. II. The relation of auxin-root geotropism in root and root nodules of non-legumes. Physiol. Plant. 19, 207-218.
- SILVESTER, W. B. 1976. Ecological and economic significance of the non-legumes symbioses. En: Proc. 1st Int. Symp. Nitrogen Fixation, vol. 2. W. Newton y C. J. Nyman (eds.). Washington Sta. Univ. Press. Washington. 489-505.
- SILVESTER, W. B. 1977. Dinitrogen fixation by plants associations excluding legumes. En: A Treatise on Dinitrogen Fixation. IV. R. W. F. Hardy y A. H. Gibson (eds.). John Wiley and Sons. New York. 141-190.
- SILVESTER, W. B., SILVESTER, J. K. y TORREY, J. G. 1988. Adaptation of nitrogenase to varying oxygen tension and the role of the vesicle in root nodules of Alnus incana ssp. rugosa. Can. J. Bot. 66, 1772-1779.
- SIMON-SYLVESTRE, G. y CALVET, R. 1987. Nitrification dans un système experimental modélisé. Agronomic 7, 303-312.
- SIVASITHAMPARAM, K. PARKER, C. A. y EDWARDS, C. S. 1979. Rhizosphere micro-organisms of seminal and nodal roots of wheat grown in pots. Soil Biol. Biochem. 11, 155-160.
- SMITH, W. H. 1987. The atmosphere and the rhizosphere: Linkages with potential significance for forest tree health. National Council. Paper Indus. Air Stream Improve. Tech. Bull. 527, 30-94.
- SMITH, C. J. y CHALK, P. N. 1980. Fixation and loss of nitrogen during transformation of nitrite in soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 44, 288-291.
- SMITH, J. L., McCNEAL, B. L., CHENG, H.H. y CAMPBELL, G. S. 1986. Calculation of microbial maintenance rates and net nitrogen mineralization in soil at steady-state. Soil Sci. Soc. Am. J. 50, 322-338.
- SMITH, C. J. y PATRICK, W. W. H. Jr. 1983. Nitrous oxide emission as affected by alternate anaerobic and aerobic conditions from soil suspensions enriched with ammonium sulfate. Soil Biol. Biochem. 15, 693-697.
- SMITH, W. H. y POOLEY, A. S. 1989. Red spruce rhizosphere dynamics: spatial distribution of aluminum and zinc in the near-root soil zone. Forest Science. 35, 1114-1124.
- SMITH, M. S. y TIEDJE, J. M. 1979. The effect of roots on soil denitrification. Soil Sci. Soc. Am. J. 43, 951-955.

- SNEH, B., AGAMI, O. y BAKER, R. 1985. Biological control of Fusarium wilt in carnation with Serratia liquefaciens and Hafnia alvei isolated from rhizosphere of carnation. Phytopath. Z. 113, 271-276.
- SÖDERSTROM, B. E. 1977. Vital stainin of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. Soil Biol. Biochem. 9, 59-63.
- SÖDERLUND, R. y ROSSWALL, T. 1982. The Nitrogen Cycle. The Hand - book of Environmental Chemistry. O. Hutzinger (ed.) Springer - Verlag, New York. 61-81.
- SÖDERLUND, R. y SEVENSSON, B.H. 1976. Nitrogen, Phosporus, and Sulfur - Global Cycles. Ecol. Bull. 22, 23-73.
- SOKAL, R. R. y ROHLF, F. J. 1979. Biometria. H. Blume (ed.). 832 pp.
- SORENSEN, L. H. 1974. Rate of decomposition of organic matter in soil as influenced by repeated air-drying-rewetting and repeated additions of organic matter. Soil Biol. Biochem. 6, 287-292.
- SPARLING, G. P., CHESHIRE, M.V. y MUNDIE, C.H. 1982. Effect of barley plants on the decomposition of ¹⁴C-labelled soil organic matter. J. Soil Sci. 33, 89-90.
- SPARLING, G. P. y ROSS, D. J. 1988. Microbial contributions to the increased nitrogen mineralization after air-drying of soils. Plant and soil. 105, 163-167.
- STANFORD, G. y EPSTEIN, E. 1974. Nitrogen mineralization water relations in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 38, 103-107.
- STANFORD, G., FRERE, M. H. y VANDERPOL, R. A. 1975. Effect of fluctuating temperatures on soil nitrogen mineralization. Soil Sci. 119, 222-226.
- STARR, J. L. y PARLANGE, J. Y. 1975. Nonlinear denitrification kinetics with continuous flow in soil columns. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 39, 875-880.
- STEEL, R. G. D. y TORRIE, J. H. 1980. Principles and procedures of statistics a biometrical approach. C. Napier y J. W. Maisel (eds.). McGraw-Hill Book Company. Singapore.
- STEVENSON, F. J. 1965. Origin and distribution of nitrogen in soil. Agronomy. 10, 1-42.

- STEVENSON, F. J. 1982. Origin and Distribution of Nitrogen in soils. En: Nitrogen in Agricultural Soils. F. J. Stevenson (ed.). American Society of Agronomy, Madison, Wis., 1-42.
- STEVENSON, F. J. 1986. The nitrogen cycle in soil: Global and ecological aspects. En: Cycles of Soil. Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients. F. J. Stevenson (ed.). J. Wiley Sons. New York. 106-154.
- STEWART, W. D. P. y BOND, G. 1961. The effect of ammonium nitrogen on fixation of elemental nitrogen in Alnus and Myrica. Plant and Soil. 14, 347-359.
- STROJAN, C. L. 1978. Forest leaf litter decomposition vithe vicinity of a zinc smelter. Oecologia 32, 203-212.
- STROO, H. F. y JENCKS, E. M. 1982. Enzyme activity and respiration in mine soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 46, 548-553.
- STRUWE, S. y KJOLLER, A. 1986. Changes in population structure during decomposition. En: Microbial Communities in soil. V. Jensen, A. Kjoller y L.H. Sorensen (eds.) Elsevier Applied Science Publishers Ltd. London. 149-162.
- SUNDIN, P., VALEUR, A., OLSSON, S. y ODHAM, G. 1990. Interactions between bacteria-feeding nematodes and bacteria in the rape rhizosphere: effects on root exudation and distribution of bacteria. FEMS Microbiology Ecology. 73, 13-22.
- SUSLOW, T. V., KLOPPER, J. W., SCHROTH, M. N. y BURR, T. J. 1979. Beneficial bacteria enhance plant growth. California Agriculturae 33, 15-17.
- SWANSON, B. T., WILKINS, H. F. y KENNEDY, B. W. 1979. Factors affecting ethylene production by some plant pathogenic bacteria. Plant and soil 51, 19-26.
- SWART, P. H. y VAN DIEST, A. 1987. The rock-phosphate solubilizing capacity of Pueraria javanica as affected by soil pH, superphosphate priming effect and symbiotic N₂ fixation. Plant and Soil. 100, 135-147.
- SWIFT, M. J. 1978. Growth of Stereum hirsutum during the long-term decomposition of oak branch-wood. Soil Biol. Biochem. 10, 335-337.
- SWIFT, M. J. y HEAL, O. W. 1986. Theoretical considerations of microbial succession and growth strategies: intellectual exercises on practical necessity ?. En: Microbial communities in soil. V. Jensen, A. Kjoller y L. H. Sorensen (eds.). Elsevier Applied Science Publishers Ltd. England. 115-131.

- TANG, C. S., WAT, C. K. y TOWERS, G. H. N. 1987. Thiophenes and benzofurans in the undisturbed rhizosphere of Tagetes patula L. Plant and soil 98, 93-97.
- TARRANT, R. F. y TRAPPE, J. M. 1971. The role of Alnus in improving the forest environment. Plant and Soil Special Vol. 335-348.
- TATE, R. L. 1985. Microorganisms, ecosystem disturbance and soil formation processes. En: Soil Reclamation Processes, Microbial Analyses and Applications. R. L. Tate III y A. K. Donnalid (ed.). 1-3.
- TIEDJE, J. M., SEXTONE, A. J., MYROLD, D. D. y ROBINSON, J. A. 1982. Denitrification: Ecological niches, competition and survival. Antonie van Leeuwenhoke. J. Ser. Microbiol. 48, 569-583.
- TIEDJE, J. M., SEXSTONE, A. J., PARKIN, T. B. y REVSBECH, N. P. 1984. Anaerobic processes in soil. Plant and Soil. 70, 197-212.
- TIESSEN, H., STEWART, J. W. B. y HUNT, H. W. 1984. Concepts of soil organic matter transformations in relation to organo-mineral particle size fractions. Plant and Soil. 76, 287-295.
- TISDALL, J. M. y OADES, J. M. 1982. Organic matter and water-stable aggregation in soil. J. Soil Sci. 33 141-163.
- TOLBA, M. K. y WHITE, G. F. 1979. Appendix 1. En: Global life support system. Microbiological nitrous-oxide production. Implications for the global nitrogen cycle. T. Rosswall (ed.). Scope Unep International Nitrogen Unit Royal Swedish Academy of Sciences. 267-278.
- TREDICI, M. R., MARGHERI, M. C., GIOVANNETTI, L., de PHILIPPIS, R. y VINCENZINI, L. 1989. Heterotrophic metabolism and diazotropic growth of Nostoc sp. from Cycas circinalis. En: NITROGEN fixation with non-legumes. F.A. Skinner, R. M. Boddey, I. Fendrik (eds.) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 63-70.
- TURNER, D. P. y FRANZ, E. H. 1985. The influence of western hemlock and western redcedar on microbial numbers, nitrogen mineralization, and nitrification. Plant and Soil. 88, 259-267.
- TURNER, S. M. y NEWMAN, E. I. 1984. Growth of Bacteria on roots of grasses: Influence of mineral nutrient supply and interactions between species. Journal of General Microbiology 130, 505-512.
- TYLER, G. 1981. Heavy metals in soil biology and biochemistry. Soil Biochemistry 5, 371-413.

- UGOLONI,, F. C. 1968. Soil development and alder invasion in a recently deglaciated area of Glacier Bay, Alaska. En: *Biology of Alder*. J. M. Trappe. J. F. Franklin, R. F. Tarrant y G. M. Hansen (eds.). Pub. Pacific N. W. For. and Range Exp. Sta., U.S.D.A., Portland, Oregon.
- ULRICH, B. 1980. Production and consumption of hydrogen ions in the ecosphere. En: *Effects of Acid Precipitation on Terrestrial Ecosystems*. Hutchinson and Havas (eds.). Plenum Press, New York.
- VAN EGERAAT, A. W. S. M. 1979. Root exudates and microbial growth in the interface. En: *The Soil-Root Interface*. J. L. Harley y R. Scot Russell (eds.). Academic Press. London.
- VAN GENT-RUYTERS, J. L. W., DE VRIES, W. y STOUTHAMER, A. H. 1975. Influence of nitrate on fermentation pattern, molar growth yields, and synthesis of cytochrome b in *Propionobacterium pentosaceum*. *J. Gen. Microbiol.* 88, 36-48.
- VELASCO, F. y LOZANO, J. M. 1979. Cambios sinecológicos de la microflora telúrica asociados a las repoblaciones forestales con especies exóticas. *An. Edafol. Agrobiol.* 38, 871-879.
- VELASCO, F., LOZANO, J. M. y BELLO, A. 1986. Alteraciones fisicoquímicas, bioquímicas y biológicas en áreas quemadas de *Pinus pinaster*. *Bol. Est. Cent. Ecol.* 29, 29-38.
- VERSTRAETE, W. 1981. Nitrification. *Ecol. Bull. (Stockholm)*. 33, 303-314.
- VITOUSEK, P. M., GOSZ, J. R., GRIER, C. C., MELILLO, J. M. y REINERS, W. A. 1982. A comparative analysis potential nitrification an nitrate mobility in forests ecosystems. *Ecol. Monographs*. 52, 155-157.
- VLASSAK, K. 1970. Total soil nitrogen and nitrogen mineralization. *Plant and Soil*. 32, 27-32.
- VLASSAK, K. 1975. Effects of some pesticides on biological nitrogen fixation and mineralization of nitrogen in Soil. *Int. Symp. on Interaction of Herbicides, Microorganisms and Plants*. Wroclaw. 1973. 87-98.
- WALKLEY, A. y BLACK, I. A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37, 29-38.
- WAT, C. K., JOHNS, T. y TOWERS, G. H. N. 1980. Phototoxic effects and antibiotic activities of plants of the *Asteraceae* used in folck medicine. *J. Ethnopharmacol.* 2,

279-283.

WEISZ, P. R. y SINCLAIR, T. R. 1987. Regulation of Soybean Nitrogen Fixation in Response to Rhizosphere Oxygen. Plant Physiol. 84, 900-905.

WERNER, D., KROTZKY, A., BERGGOLD, B., THIERFELDER, H. y PREISS, M. 1982. Enhancement of specific nitrogenase activity in Azospirillum brasilense, Klebsiella pneumoniae, inhibition in Rhizobium japonicum under air by phenol. Arch. Microbiol. 132, 51-56.

WETSELAAR, R., PASSIOURA, J. B. y SINGH, B. R. 1972. Consequences of banding nitrogen fertilizers in soils. Plant Soil 36, 159-175.

WHEATLANDS, A. B., BARRET, M. J. y BRUCE, A. M. 1959. Some observations on denitrification in rivers and estuaries. Journal Proceedings of the Institute of Sewage Purification. 149-159.

WHITTAKER, R. H. 1970. Communities and Ecosystems. McMillan. New York. 162 pp.

WIGGINS, E. A. y CURL, E. A. 1979. Interactions of Collembola and microflora of cotton rhizosphere. Phytopathology 69, 244-249.

WIGHT, J. R. y BLACK, A. L. 1979. Range fertilization: plant response and water use. J. Range Management. 32, 343-349.

WIKLANDER, G. 1981. Rapporteur's comment on clearcutting. En: Nitrogen cycling in terrestrial ecosystems: processes, ecosystem strategies, and management implications. F. E. Clark y T. H. Rosswall (eds.). Ecological Bulletin 33, Swedish Natural Science Research Council, Stockholm, Sweden. 642-647.

WILDUNG, R. E., GARLAND, T. R. y BUSCHBOM, R. L. 1975. The interdependent effects of soil temperature and water contents on soil respiration rate and plant root decomposition in arid grassland soils. Soil Biol. Biochem. 7, 373-378.

WILSON, J. M. y GRIFFIN, D. M. 1975. Water potential and the respiration of microorganisms in the soil. Soil Biol. Biochem. 7, 199-204.

WOLDENDORP, J. W. 1962. Quantitative influence of the rhizosphere on denitrification. Plant and Soil. 17, 267-270.

WOLK, C. P., THOMAS, J. C. y SHAFFER, P. W. 1976. Pathway of nitrogen metabolism after fixation of ¹⁵N-labelled nitrogen gas by the cyanobacterium Anabaena cylindrica. J.

Biol. Chemistry. 251, 5027-5034.

WOLLUM, A. G. y DAVEY, C. B. 1975. Nitrogenaccumulation, transformation and transport in forest soils. En: Forest Soil and Forest Land Management. B. Bernier y C. H. Winget (eds.). Les Presses De L'Universite Laval, Quebec, 67-106.

WONG, P. P. y BURRIS, R. H. 1972. Nature of oxygen inhibition of nitrogenase from Azotobacter vinelandii. Proc. Acad. Sci. U.S.A. 69, 672-675.

WOOD, T. M. y McCRAE, S. I. 1978. The cellulases of Trichoderma koningii. Biochem. J., 171, 61-72.

WOODMANSEE, R. G., DODD, J. L., BOWMAN, R. R., CLARK, F. E. y DICKINSON, C. E. 1978. Nitrogen budget of shortgrass prairie ecosystem. Oecologia (Berl.) 34, 363-376.

WORTHINGTON, E. B. 1975. The evolution of IBP. Cambridge Univ. Press. Cambridge 268 pp.

WRIGHT, S. J. L. y THOMPSON, R. J. 1985. Bacillus volatiles antagonize cyanobacteria. FEMS Microbiology letters 30, 236-267.

YAMAMOTO, E., WAT, C. K., McRAE, W. D., TOWERS, G. H. N. y CHEN, C. F. 1979. Photoinactivation of human erythrocyte enzymes by α -terthienyl and phenylheptatryne, naturally occurring compounds in Asteraceae. FEBS Letters, 107, 134-136.

YORDY, D. M. y RUOFF, K. L. 1981. Dissimilatory nitrate reduction to ammonia. En: Denitrification, Nitrification and Atmospheric Nitrous Oxide. C. C. Delwiche (ed.). John Wiley and Sons. New York. 171-190.

ZABLOTOWICZ, R. M., ESKEW, D. L. y FOCHT, D. D. 1978. Denitrification in Rhizobium. Can. J. Microbiol. 24, 757-760.

APENDICE

7.1. Medios de cultivo y reactivos

7.1.1. Extracto de tierra

Se preparó con tierra de jardín de Montepríncipe (Madrid) de pH 7.1 que se recogió entre 10 y 15 cm de profundidad.

La tierra se mezcló con agua destilada en proporción 1:1 (p/v) y cada litro se enriqueció con 1 ml de la solución de oligoelementos indicada en 7.3. La solución resultante se introdujo en autoclave donde permaneció una hora a 130°C. Luego se filtró por papel el líquido caliente con el objeto de eliminar las partículas en suspensión más voluminosas. Posteriormente se centrifugó el filtrado a 43000 rpm durante 15 min en una centrífuga SORVAL SS-34 Superspeed Refrigerated con un rotor SORVAL SS-34. El sobrenadante se esterilizó en autoclave durante 30 min a 115°C.

7.1.2. Solución salina de Winogradsky

K_2HPO_4	5.0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.5 g
NaCl.....	2.5 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.05 g
$Fe_2(SO_4)_3$	0.05 g
Agua destilada.....	1000.0 ml

Se añadió 1 ml de la solución de oligoelementos indicada en 7.3 y se esterilizó en autoclave durante 20 min a 110°C. Se ajustó el pH entre 7.0 y 7.5 con una solución de OHNa al 10% (p/v).

7.1.3. Solución de oligoelementos

Se empleó la fórmula de Gutiérrez Mañero y Bermúdez de Castro (1983):

Na ₂ (MoO ₄).2H ₂ O.....	0.05 g
K ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O.....	0.05 g
FeCl ₃ .6H ₂ O.....	0.05 g
Cd(NO ₃) ₂ .4H ₂ O.....	0.04 g
CoSO ₄ .7H ₂ O.....	0.05 g
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0.05 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0.05 g
Agua destilada.....	1000.00 g

7.1.4. Medio para microflora total

El medio de cultivo es el extracto de tierra descrito en el apartado 7.1.

Se pusieron 5 ml del medio en tubos de ensayo de 22 mm de diámetro que se taparon con algodón y se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 110°C.

Se consideraron tubos positivos aquellos que tras la incubación presentaban velo.

7.1.5. Medio para microorganismos proteolíticos

Se empleó el medio Difco para proteolíticos modificado como sigue:

Solución salina.....	5 ml
Extracto de carne.....	33 g
Peptona.....	5 g
Gelatina.....	120 g
Solución de oligoelementos.....	1 ml
Agua destilada.....	1000 ml

Se ajustó el pH a 7.2 y se distribuyeron 2 ml del medio en tubos de 10x100 mm que se taparon con algodón y se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 110°C.

Se consideraron positivos aquellos tubos en los que tras la incubación el medio permanecía líquido después de refrigerarlos a 2 - 4°C durante una hora.

7.1.6. Medio para microorganismos amonificantes

Solución salina.....	50	ml
Asparragina.....	0.2	g
Solución de oligoelementos.....	1	ml
Agua destilada.....	950	ml

Se pusieron 10 ml del medio en tubos de 16x160 mm que se taparon con algodón y se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 110°C.

Después de la incubación se retiró con una pipeta estéril 1 ml de cada tubo que se pasó a otro tubo al que se añadieron dos gotas del reactivo de Nessler (ver 7.1.9). Se consideraron positivos los tubos en que el color amarillo viró a anaranjado.

7.1.7 Medio para microorganismos nitrificantes nitrosos

Solución salina.....	50	ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	g
CaCO ₃	1	g
Agua destilada.....	950	ml

Se pusieron 5 ml del medio en tubos de 16x160 mm que se taparon con algodón y se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 110°C.

Después de la incubación se retiraron con una pipeta estéril 0.2 ml de cada tubo que se pasaron a otro tubo donde se añadieron 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado y 10 gotas de difenilamina sulfúrica (ver 7.1.10) y se consideraron positivos los que presentaron coloración azul.

7.1.8. Medio para microorganismos nitrificantes nítricos

Solución salina.....	50	ml
NaNO ₂	1	g
CaCO ₃	1	g
Agua destilada.....	950	ml

Se pusieron 5 ml del medio en tubos de 16x160 mm que se taparon con algodón y se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 110°C.

Se opera igual que en el caso de los microorganismos nitrificantes nitrosos pero antes de añadir el ácido sulfúrico y la difenilamina sulfúrica se incorporan 50 mg de urea a cada tubo para eliminar los nitritos.

7.1.9. Reactivo de Nessler

Solución A:

HgI ₂	50	g
KI.....	36.5	g
Agua destilada.....	1000	ml

Solución B:

OHK.....	150	g
Agua destilada.....	1000	ml

En el momento de usarlo se mezclan volúmenes iguales de las soluciones A y B.

7.1.10. Reactivo de la difenilamina sulfúrica

NH(C ₆ H ₅) ₂	10	g
H ₂ SO ₄	1000	ml
Agua destilada.....	200	ml