

Análisis y Comentario

AVANCES EN MICROBIOLOGIA DE SUELOS: LOS PROTOZOARIOS Y SU IMPORTANCIA EN LA MINERALIZACION DEL NITROGENO¹

Ronald Vargas*

ABSTRACT

Soil microbiology advances: protozoa and their importance on nitrogen mineralization. The impact of protozoan predation of bacteria on the mineralization of N from bacterial cells in soil is documented. The discussion is focussed on soil microorganisms as both a source and a sink for N during microbial biomass turnover. This renders the turnover of N through the microbial biomass a key process in N cycling in soil. Published evidence is given that interactions between microflora and fauna such as protozoa are responsible for a significant portion of the mineralization of N in soils. In cultivated soils, protozoan "grazing" of bacteria is shown to be responsible for the improved availability to plants of organically-bound N. The mechanisms by which protozoa stimulate the mineralization of N are: i) by releasing N directly from bacterial cells and ii) by stimulating the turnover of soil organic matter through the microbial biomass. A microcosm approach is proposed to study the mineralization of N by protozoan activity in soil under controlled conditions. The effect of the spatial separation of protozoa and prey organisms upon the migration of protozoa as well as upon the turnover, dynamics and transport of specific microbial populations in soil, is also discussed. Protozoa are in essence aquatic organisms and therefore water is shown to be essential to their functioning. The action of protozoa with respect to mineralization of N has been summarized as follows: 1) by grazing bacteria, protozoan biomass is produced at the expense of bacterial biomass and excess N is excreted as ammonium; 2) by grazing bacteria, protozoa produce waste products (cell wall materials and other nutrients) which in turn may enhance microbial activity; and 3) whilst moving through the soil in search of food particles, protozoa might (re) inoculate (new) substrates by transporting bacteria that adhere to their cell surface, or by bacteria that are not digestible and therefore excreted.

INTRODUCCION

El N es un elemento indispensable para el normal crecimiento vegetal.

Sin embargo, muchos suelos no contienen cantidades suficientes de este elemento en formas disponibles, para proveer las cantidades requeridas en la producción de fibra y alimentos.

En general más de un 95% del N presente en el suelo forma parte de compuestos orgánicos no disponibles para las plantas. De ahí que el N es comúnmente aplicado al suelo en forma de fertilizantes (Newbould, 1989).

A pesar de ello, su aplicación en forma inorgánica ha acarreado serios problemas de contaminación ambiental, debido a su uso irracional. La

1/
* Recibido para publicación el 16 de octubre de 1990. Laboratorio de Microbiología de Suelos, Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. Miembro del Programa Financiero de Apoyo a Investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica.

contaminación de las aguas por el lavado de nitratos es, entre otras, una de las principales causas de contaminación ambiental.

Para aumentar o mejorar el aprovechamiento del N en la agricultura, es necesario contar con un conocimiento preciso de la dinámica de las transformaciones de este elemento en el suelo; es decir con una idea clara del ciclo interno del N en el suelo (Newbould, 1989). Las plantas, aún bajo condiciones de alta fertilización, obtienen parte del N a través de la mineralización microbiana de varias fuentes orgánicas presentes en el suelo (Schnurer y Rosswall, 1987), incluyendo la biomasa microbiana (Lethbridge y Davidson, 1983). Esta liberación de N y otros nutrientes a partir de la materia orgánica o biomasa microbiana para su utilización por las plantas, es determinada principalmente por el balance existente entre los procesos de mineralización e inmovilización.

En el suelo, la actividad microbiana es la fuerza motriz de los diferentes ciclos que en él ocurren (Van Veen *et al.*, 1989). La mayor parte del flujo energético y las transformaciones que sufren los diferentes nutrientes en la mayoría de los ecosistemas, proviene de la actividad microbiana por su efecto en los procesos de descomposición y mineralización (Wiegert y Owen, 1971). Como resultado de la lisis celular, de la formación de nueva biomasa microbiana y de la descomposición de otros componentes celulares nitrogenados, se establece en el suelo una continua transformación de este elemento (Woldendorp, 1981).

En estudios de descomposición, la acción realizada por la microflora del suelo es raramente separada de la originada por la actividad de la micro y mesofauna. Por lo tanto, el papel específico de los animales del suelo en las transformaciones de los nutrientes casi nunca es considerado con suficiente detalle (Coleman *et al.*, 1983). A pesar de esto, mucha evidencia experimental ha permitido establecer que las interacciones entre la microflora y la fauna de suelo, en particular los protozoarios, son las responsables de una significativa porción de la mineralización del N en el suelo.

Con base en estas consideraciones se pensó que era importante presentar un estudio de los antecedentes que han llevado al actual nivel de entendimiento del papel de los protozoarios del suelo en la mineralización del N inmovilizado por microbiológicamente.

PROTOZOARIOS

Los protozoarios son organismos eucarióticos unicelulares, investigados y descritos por primera vez por Anthonie Van Leeuwenhoek (1632-1723), quien desarrolló un primitivo microscopio y denominó a este grupo de microorganismos "animáculos o pequeños animales" (Van Leeuwenhoek, 1677).

Estos microorganismos son los más pequeños pero más numerosos de todos los animales. Varios miles de especies han sido descritas, a pesar de que su taxonomía todavía es controversial. Su tamaño puede oscilar desde 2 μm (nanoflagelados) hasta más de 600 μm (algunas especies de *Sarcodina*). Los protozoarios heterotróficos de vida libre se encuentran, prácticamente, en todos los ecosistemas. Corliss (1973) atribuye su amplia distribución geográfica a su tremenda capacidad de adaptación a las diferentes condiciones ambientales. Con relación a la temperatura, pH y presión osmótica del suelo, no han sido descritos límites en la literatura para la vida de los protozoarios; únicamente se delinea una amplia tolerancia de éstos. Por ejemplo, las formas activas de los protozoarios se encuentran en temperaturas que varían entre 0 y 50°C. A pesar de lo anterior, únicamente el agua ha sido demostrada como un factor indispensable para su vida. La mayoría de los protozoarios del suelo poseen la habilidad de formar quistes (estructuras de resistencia) para tolerar las condiciones de estrés hídrico (Bryant *et al.*, 1982).

Los protozoarios generalmente encontrados en los suelos cultivables incluyen flagelados, amebas desnudas y ciliados. Los flagelados heterotróficos de vida libre y las amebas desnudas son los más numerosos (Stout y Heal, 1972), con poblaciones que oscilan entre los 10^3 y 10^6 organismos/g de suelo seco (Singh, 1946, 1949; Singh y Crump, 1953; Darbyshire, 1976; Clarholm, 1981).

Los volúmenes promedio de los tres principales grupos taxonómicos de protozoarios del suelo, flagelados, amebas y ciliados, son 50 μm^3 , 400 μm^3 y 3000 μm^3 , respectivamente (Stout y Heal, 1972).

Estos valores sugieren, basados en su densidad y tamaño, que las amebas son el grupo de protozoarios más importantes dentro del suelo.

La biomasa de protozoarios es estimada en alrededor de 2 g/m² (Stout y Heal, 1972), la cual

equivale a 5-10 $\mu\text{g C/g}$ de suelo seco, aproximadamente. Este valor puede ser comparado con los valores estimados para la biomasa microbiana total en suelos cultivados, la cual varía de 300 a 500 $\mu\text{g C/g}$ de suelo seco (Schnurer *et al.*, 1986). Es importante señalar que a pesar de que los protozoarios constituyen una parte relativamente insignificativa de la biomasa microbiana total (Stout, 1973), su importancia en la economía nutricional del suelo no debe ser pasada por alto.

Su importancia está relacionada con la velocidad de producción de biomasa y no con la biomasa *per se* (Gray y Williams, 1971).

La biomasa de los protozoarios es de un grado de magnitud similar a la biomasa de lombrices de tierra de acuerdo a las estimaciones realizadas para suelos cultivados (Golebiowska y Ryskowski, 1977).

CONTEO DE PROTOZOARIOS

Los métodos usados para el conteo de protozoarios pueden dividirse en:

- 1) Método de observación directa. Es útil para las amebas con testa ("testate amoebae"); pero considerado inapropiado para ciliados, amebas desnudas o flagelados, debido a su pequeño tamaño e íntima asociación con las partículas del suelo (Foissner, 1987). La observación directa raramente proporciona evidencia de la actividad de los protozoarios debido a que la población está comúnmente enquistada (Stout y Heal, 1972);
- 2) Método de extracción. Está confinado para la mayoría de las amebas con testa (Stout y Heal, 1972) donde los restos de las testas pueden ser recogidos. Asimismo, este método puede ser usado para los ciliados capaces de migrar dentro de un campo eléctrico (Wagener *et al.*, 1986);
- 3) Enumeración indirecta con el uso de técnicas de cultivo. Es esencialmente una modificación del método de dilución empleado en microbiología. Se basa en la técnica del número más probable (NMP) y es uno de los más ampliamente usados.

Una serie de diluciones de una suspensión de suelo es incubada durante un período de aproximadamente 4 semanas, adicionando bacterias como fuente de alimento para los protozoarios. A intervalos regulares (Vargas y Hattori, 1988), se

anota la presencia o ausencia de protozoarios en la serie de diluciones. Este método fue utilizado por primera vez por Killer (1913) y Cutler (1920), y refinado posteriormente por Singh (1946), Darbyshire (1976), Darbyshire *et al.* (1974) y Clarholm (1981). El método proporciona una estimación del número total de protozoarios, tanto de formas activas como inactivas, en la suspensión de suelo. Varios prerequisites deben ser cumplidos para que este método pueda ser empleado correctamente:

- a) que los protozoarios sean fácilmente reconocibles en el medio como resultado de su multiplicación;
- b) un organismo o célula debe ser capaz de crecer y multiplicarse sin la interferencia o inhibición causada por otros organismos incluyendo otros protozoarios (Cunningham, 1915); y
- c) los protozoarios deben distribuirse al azar en la suspensión de suelo y como resultado de la dilución deben seguir una distribución de Poisson (Cochran, 1950).

A pesar de que el método del NMP es el más utilizado, el mismo posee varias desventajas:

- a) los estimados del NMP poseen una baja precisión (De Man, 1975);
- b) en cortos intervalos de tiempo, un gran número de muestras debe ser observado para detectar la presencia o ausencia de protozoarios, lo cual hace del mismo, un método que requiere de mucho tiempo y paciencia; y
- c) el método no discrimina entre formas activas e inactivas (quistes) de protozoarios.

Es por estas razones que cuando se realizan cálculos y suposiciones sobre el número y biomasa de protozoarios, es esencial considerar que los protozoarios en el suelo se encuentran, por lo general, en estados inactivos (Singh y Crump, 1953). Cutler (1920) desarrolló una modificación de este método para estimar el número de protozoarios activos: luego de eliminar los protozoarios activos por exposición del suelo a HCl al 2%, el número de éstos es calculado como la diferencia entre el número total en un suelo no tratado y el número de protozoarios inactivos (quistes) en un suelo tratado. La precisión de este método ha sido objeto de debate debido a que parte de las formas inactivas también puede ser eliminada.

Sin embargo, los números de protozoarios presentes en el suelo son necesarios para poder

realizar comparaciones con otros grupos de organismos. Los conteos proveen la información básica necesaria para poder estimar la biomasa y con ello determinar el papel de este grupo de microorganismos en el reciclaje de nutrientes. Hasta ahora no ha ocurrido avance de importancia en los métodos de conteo de protozoarios en el suelo aparte de los aquí enunciados. Los métodos usados actualmente son básicamente los mismos que los desarrollados y usados por Cutler y otros en los años veinte, y por Singh y colaboradores en la década de los cuarenta.

Mejores microscopios y otro tipo de equipo han permitido a los investigadores examinar más muestras con mayor precisión.

LOS PROTOZOARIOS Y SU NUTRICION

La principal fuente alimentaria de los protozoarios heterotróficos de vida libre son las bacterias (Fenchel, 1987). En adición, los protozoarios consumen algas, levaduras, hongos, nematodos, otros protozoarios, y posiblemente "detritus" orgánicos (Heal y Felton, 1970).

Los protozoarios ingieren sus presas o alimento por fagocitosis, forma de alimentación que consiste en encerrar la presa dentro de una vacuola, donde ocurre la digestión.

Los restos de la digestión son excretados al ambiente. Las amebas y flagelados probablemente difieren en su forma de alimentarse de bacterias adheridas o en suspensión, así como en el tamaño de las partículas que pueden ingerir (Fenchel, 1987).

Estudios detallados sobre la relación entre los protozoarios del suelo y las bacterias (Singh, 1941, 1942; Casida, 1989), han permitido establecer claramente que los protozoarios son capaces de alimentarse con una amplia variedad de bacterias, pero que también pueden mostrar cierto grado de preferencia, especialmente cuando depredan poblaciones mixtas de ciertos tipos de bacterias. *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* han sido registradas como tóxicas para los protozoarios, probablemente debido a sus altos contenidos de pigmentos (Groscof y Brent, 1964).

Fenchel (1982) estimó que los flagelados pueden ingerir (y digerir) un volumen total de partículas por hora equivalente a su propio volumen celular. Estas observaciones son congruentes con los tiempos mínimos de reproducción de los fla-

gelados que son cercanos a las 3 horas. A partir de los datos de Cutler *et al.* (1922), Stout y Heal (1972) calcularon, considerando que el tiempo de generación variaba de 1 a 3 días, que la tasa anual de producción de protozoarios era de 50 a 300 veces su biomasa. Elliott y Coleman (1977) calcularon un tiempo promedio de generación para las amebas de 2,4 días.

Inicialmente, las posiciones en relación al papel de los protozoarios como entes reguladores de las poblaciones de bacterias en el suelo eran conflictivas. Russell y Hutchinson (1909) llamaron la atención en el sentido de que los protozoarios eran agentes perjudiciales a la productividad del suelo "pues se alimentaban de la microflora benéfica del mismo".

Se observó un aumento en la formación de amonio que coincidió con un incremento en el número de bacterias inmediatamente después de la eliminación de los protozoarios a través de la esterilización parcial del suelo. Estos autores concluyeron que el tamaño de las poblaciones de bacterias disminuían cuando las condiciones eran favorables para el desarrollo de los protozoarios.

Sin embargo, Waksman (1916) no observó efecto alguno de los protozoarios en el proceso de amonificación por las bacterias. Este autor concluyó que ni las bacterias destruidas participaban en la amonificación *per se*, ni que los protozoarios, que se alimentan de las bacterias, influían benéficamente en la descomposición de la materia orgánica.

Los cultivos que contenían protozoarios mostraron un olor más agradable que aquellos que contenían bacterias únicamente; por esto parecía plausible que los protozoarios destruían los productos de la descomposición o los organismos involucrados en los procesos de putrefacción. Estas observaciones llevaron a Waksman (1916) a formular la siguiente pregunta:

¿Serán los protozoarios factores naturales y necesarios en la fertilidad del suelo?

Una interrelación íntima entre las poblaciones de amebas y bacterias en la naturaleza fue establecida por primera vez por Cutler *et al.* (1922), quienes contaron los protozoarios y las bacterias presentes, a lo largo de 365 días consecutivos. Estos autores encontraron que el número de amebas activas estaba inversamente relacionados con el de las bacterias en un 86% de los días estudiados. Estos resultados llevaron a la conclusión de que los protozoarios eran los principales

depredadores de las bacterias. Cutler (1923) encontró que *Dimastigamoeba gruberi* se multiplicó en un periodo de 15 días de 25000 a 230000 organismos/g de suelo.

Esta observación, así como resultados similares obtenidos por otros autores (Martin y Lewin, 1915), probaron de manera irrefutable que las amebas son activas en el suelo. Al final de los años veinte, no existía duda de que la principal fuente alimentaria de los protozoarios está constituida por las bacterias (Severtzova, 1928).

En 1953, Singh y Crump (1953) informaron que a pesar de que la esterilización parcial de los suelos con vapor es generalmente seguida por aumentos en las poblaciones de bacterias, también produce un marcado aumento en el tamaño de la población de protozoarios. En una revisión sobre los protozoarios del suelo, Russell y Russell (1962) propusieron que "presumiblemente debe existir una relación entre las poblaciones de protozoarios y bacterias presentes en el suelo, debido a que ciertas especies de bacterias son la principal fuente de nutrición para los protozoarios". Para estas fechas, ellos consideraron los resultados de sus anteriores investigaciones como obsoletos debido a la poca precisión de las técnicas empleadas para conteo y estimación.

EL SUELO DESDE EL PUNTO DE VISTA DE LOS PROTOZOARIOS

A pesar de las altas poblaciones de protozoarios encontradas en el suelo, se debe recordar que éstos son organismos eminentemente acuáticos. Por esta razón, su movilidad, alimentación y crecimiento en ecosistemas terrestres va a depender de su habilidad para sobreponerse a las condiciones fluctuantes en la humedad del suelo (Nikitin, 1973). Así, las especies de protozoarios más adaptadas ecológicamente son las que poseen un amplio ámbito de tolerancia a las fluctuaciones en la humedad del suelo. Sin embargo, Cutler *et al.* (1922) no encontraron relación entre el contenido de humedad del suelo y el número de amebas activas.

En el suelo, los protozoarios y sus presas (bacterias) se localizan en el agua capilar de poros entre y dentro de los agregados de partículas minerales que conforman el suelo (Bamforth y Bennett, 1985). Hattori (1988) ha distinguido entre células microbianas localizadas en la parte externa de agregados estables al agua, de aquellas

localizadas en la parte interna de los mismos, mediante un método denominado "washing-sonication" (Hattori, 1967). Como resultado de estas investigaciones se concluyó que la mayoría de las bacterias en el suelo se encontraban localizadas dentro de los agregados, mientras que los protozoarios habitaban la parte externa de éstos. Vargas y Hattori (1986) demostraron que el aumento en el número de protozoarios (utilizando el ciliado *Colpoda* spp.) fue proporcional a la densidad inicial de bacterias presente en la parte externa de los agregados, de tal forma que el efecto del depredador sobre las bacterias se restringe a la parte externa de los agregados. El tamaño crítico de las constricciones de los poros ("pore necks") que divide la parte externa de la interna de los agregados de suelo, fue estimado en 2,5 μm ; lo cual equivale a poros con un diámetro de 3 a 6 μm . Estos resultados confirmaron las observaciones sobre la actividad de los protozoarios realizadas por Darbyshire y Greaves (1967), Darbyshire (1976) y Alabouvette *et al.* (1981), quienes concluyeron que en el suelo, los poros cuyas dimensiones eran mayores de 6 μm están desprovistos de agua y, por tanto, la actividad de los protozoarios en ellos es mínima.

Postma *et al.* (1989) demostraron que por medio de la inoculación de microorganismos al suelo seco, la distribución de éstos puede ser manipulada. Las bacterias inoculadas al suelo seco tendieron a estar libres del efecto de su depredador, y alcanzaron penetrar poros más pequeños (Postma *et al.*, 1989). Estos autores asumieron que los poros menores de 3 μm no son accesibles a los protozoarios, lo cual indica que solamente parte del espacio poroso del suelo, habitable para las bacterias (poros con constricciones de poro mayores de 0,8 μm) ofrece protección al efecto del depredador. El espacio poroso habitable y protector no fue factor limitante para el crecimiento de las células bacterianas. Menos de un 0,5% de este espacio fue ocupado por las bacterias. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que localmente, el espacio disponible y no la disponibilidad de sustratos, limite el crecimiento bacteriano (Postma y Altemuller, 1989; Foster, 1988).

Pocos son los informes sobre la migración de protozoarios bajo condiciones controladas de humedad de suelo. Se ha demostrado que los protozoarios pueden migrar pocos centímetros por día si la humedad de suelo es adecuada (Biczok,

1959; Losina-Losinsky y Martinov, 1930). Por otro lado, Vargas y Hattori (1986) sugirieron que la parte externa de los agregados de suelo está dividida en compartimientos.

La ausencia de películas de agua que conecten estos compartimientos fue demostrada como limitante a la migración de los protozoarios. Esta imposibilidad migratoria facilitó la persistencia de las bacterias en la parte externa, en relación con la humedad del suelo. Debido a que no todo el espacio poroso del suelo es accesible a los protozoarios, la estructura del suelo afecta fuertemente las interacciones entre los protozoarios y sus presas.

La actividad de los protozoarios en la matriz del suelo está limitada a condiciones con suficientes contenidos de agua, tal y como se ha demostrado para ciliados (Darbyshire, 1976; Vargas y Hattori, 1986) y amebas (Bryant *et al.*, 1982).

Los protozoarios pueden, sin embargo, persistir en condiciones de estrés hídrico mediante la formación de quistes (Bryant *et al.*, 1982) y sobrevivir por décadas. Los tiempos de generación estimados para protozoarios (2 a 48 horas) indican que éstos pueden, potencialmente, reaccionar muy rápida y casi inmediatamente a condiciones favorables en el suelo (Alabouvette *et al.*, 1981). Se ha observado que la respuesta de las poblaciones de protozoarios al aumento en los contenidos de humedad del suelo está generalmente acompañada con un aumento en el número de formas activas (Elliott y Coleman, 1977; Hunt *et al.*, 1989). Mediante el uso de células bacterianas marcadas con ^{15}N y ^{14}C , Van Veen *et al.* (1985) han encontrado que la tasa de transformación de la biomasa microbiana está significativamente afectada por las fluctuaciones en la humedad del suelo.

La adición de agua a suelo seco causó una liberación temporal (4 días) de C y N. Sin embargo, no existen datos, aparte de los aportados por Kuikman (1990), sobre las interacciones entre bacterias y protozoarios, y la tasa de transformación de la biomasa bacteriana en relación al régimen hídrico del suelo.

El suelo provee una amplia variedad de factores de estrés que condicionan la vida de los protozoarios. Aparentemente, los factores que más limitan su actividad depredadora en el suelo son la estructura y la humedad del mismo. Así, la ecología de los protozoarios parece estar caracterizada por dos importantes elementos:

- a) la actividad está confinada a pequeños espacios y consecuentemente a pequeñas poblaciones, y
- b) la actividad está restringida a breves períodos cuando las condiciones de humedad son favorables (Stout, 1973).

FUNCION DE LOS PROTOZOARIOS EN EL SUELO

Debido a que la depredación de las bacterias por los protozoarios conlleva a su disminución de las primeras, se podría esperar una disminución en la actividad bacteriana y, consecuentemente, en la descomposición de la materia orgánica y mineralización de nutrimentos. Sin embargo, el caso inverso ha sido observado en muchas ocasiones.

Un efecto estimulante de la depredación por los protozoarios sobre el metabolismo bacteriano ha sido claramente demostrado para ciliados en habitats marinos (Johannes, 1965), y para flagelados en habitats de agua dulce (Barsdate *et al.*, 1974).

Hunt *et al.* (1977) han desarrollado un modelo de simulación para el estudio del efecto depredador de los protozoarios sobre las bacterias bajo condiciones de cultivo continuo. Los resultados obtenidos a partir de este modelo permiten sugerir que como consecuencia del efecto depredador, la tasa de crecimiento bacteriana aumenta, aún cuando la biomasa bacteriana disminuya. Las bacterias crecen más rápidamente como resultado de una mayor disponibilidad de fuentes energéticas (carbono), N y P en presencia del depredador. De manera, que se estableció una relación entre la depredación ejercida por los protozoarios sobre las bacterias y la mineralización de nutrimentos.

Sin embargo, el establecimiento de tales relaciones tróficas en el suelo ha resultado ser muy difícil.

En cultivos de arena, las amebas disminuyeron las poblaciones bacterianas pero aumentaron la tasa de producción de amonio y dióxido de carbono (Meiklejohn, 1930). Coleman *et al.* (1978) extendieron estas ideas a partir de observaciones en ambientes marinos y de agua dulce a condiciones de suelo.

La inoculación de bacterias a suelo esterilizado resultó en una inmovilización inicial del amonio. La inoculación de amebas (*Acanthamoeba polyphaga*) al sistema experimental, siempre

resultó en una disminución de las bacterias (Anderson *et al.*, 1978), en un aumento de la respiración (Coleman *et al.*, 1978) y en un aumento en la mineralización del N (Woods *et al.*, 1982). Griffiths (1986) demostró un aumento en la mineralización del N en presencia de un protozooario ciliado. Los resultados también indican que la mineralización del N en sistemas terrestres no es estrictamente microfloral. Los depredadores bacterianos, como las amebas, son necesarios para la mineralización de nutrientes inmovilizados microbiológicamente, tal y como fue demostrado con anterioridad para ecosistemas acuáticos por Johannes (1965). Mediante el uso de glucosa marcada con carbono radioactivo, Anderson *et al.* (1981) encontraron que la depredación microbiana por nematodos aumentó la utilización del sustrato y la mineralización del N. Estos autores sugirieron que como resultado de la actividad depredadora de la microfauna del suelo, la excreción de amonio en la solución del suelo mantuvo una alta actividad metabólica en organismos descomponedores.

Así, a pesar de su reducida población, los microorganismos mostraron una actividad total aumentada.

La información concerniente al impacto de la depredación por los protozoarios sobre las células bacterianas y las consecuentes transformaciones de los nutrientes en suelos cultivados, es muy escasa (Stout, 1980; Kuikman, 1990). Elliott *et al.* (1979) a partir de sus resultados experimentales establecieron que a nivel de la rizosfera, los protozoarios son significativamente importantes debido a su efecto estimulante en el proceso de mineralización de nutrientes inmovilizados microbiológicamente. En sus experimentos, estos autores también demostraron que como resultado de la presencia de los protozoarios, las plantas mostraron una mayor concentración de N en sus tejidos. De manera que el efecto de los protozoarios sobre la mineralización del N va a ser mayor en condiciones de suelo donde el N es limitante; esto es sin la adición de N inorgánico (Elliott, 1978). Sin embargo, sólo en el caso de la adición de N inorgánico, los protozoarios aceleraron el proceso de mineralización del N microbiológicamente inmovilizado. Clarholm (1985a) presentó resultados que demuestran el papel de las bacterias en la mineralización del N orgánico del suelo. En presencia de protozoarios una mayor cantidad de N estuvo disponible para las plantas.

Kuikman (1990) señaló que la presencia de protozoarios estimuló la mineralización del N orgánico del suelo y su posterior absorción por las plantas, en un 40 % comparado con suelos sin protozoarios. Basado en sus experimentos, Clarholm (1985b) postuló que las bacterias utilizan el N presente en la materia orgánica del suelo cuando se suministra una fuente de carbono adecuada, por ejemplo exudados radiculares. El N inmovilizado en las células microbianas es liberado para su utilización por las plantas cuando depredadores como los protozoarios consumen estos microorganismos y excretan el exceso de N consumido como amonio.

La rizosfera es una zona de intensa actividad microbiana debido a las altas poblaciones de los diferentes microorganismos que habitan en la vecindad de las raíces (Katznelson *et al.*, 1948, Rovira, 1965), como resultado de la rizodeposición de carbono en el ápice radical (Trofymow *et al.*, 1987). Katznelson (1946), Biczok (1956), Geltzer (1963) y Darbyshire y Greaves (1967, 1973) han demostrado que existe un mayor número de amebas en la rizosfera, donde se presenta un gran desarrollo bacteriano, en comparación con el suelo no-rizosférico.

Ritz y Griffiths (1987) probaron la hipótesis de Clarholm (1985b) al adicionar glucosa y nitratos al suelo. Estos autores postularon, con base en sus resultados, que como consecuencia de la adición de glucosa, se facilitó la inmovilización del nitrato en la biomasa microbiana y se redujo el lavado del suelo. La remineralización del N y su posterior absorción por las plantas fue altamente estimulada por la actividad depredadora de los protozoarios, efecto que fue claramente reflejado por el aumento en el número de amebas. En suelos no cultivados, el N mineralizado por la actividad del depredador fue rápidamente inmovilizado, tal vez, por los mismos microorganismos del suelo.

En general, el efecto de la depredación de bacterias por protozoarios en el suelo, puede ser resumido de la siguiente manera:

- 1) a través de la depredación de bacterias los protozoarios excretan el exceso de N consumido como amonio (Stout, 1973; Fenchel, 1987); el cual puede ser absorbido por las plantas;
- 2) por medio de la depredación de bacterias, los productos de desecho, tales como paredes celulares y otros nutrientes que son liberados, pueden estimular la actividad

- microbial (Hunt *et al.*, 1977), y aumentar la floculación bacteriana (Bamforth, 1973);
- 3) durante su movimiento a través de la matriz del suelo, en busca de alimento, el depredador puede (re) inocular (nuevos) sustratos con bacterias que se adhieren a su superficie celular o con bacterias que no son digeribles y por tanto regurgitadas (Finlay y Fenchel, 1989).

DISCUSION

En este trabajo se ha tratado de mostrar el papel que juegan los protozoarios del suelo en el reciclaje de nutrimentos, con especial énfasis en el proceso de mineralización del N inmovilizado microbiológicamente. Resulta evidente que el proceso de transformación del N a través de la biomasa microbiana es un fenómeno clave en el ciclo de este elemento en el suelo.

Este proceso involucra las fases de asimilación, transformación y la posterior mineralización (liberación). Se han logrado establecer experimentalmente, relaciones cuantitativas para la asimilación y transformación intracelular de nutrimentos como el N en células microbianas.

Sin embargo, los datos sobre el mecanismo de liberación del N a partir de las células microbianas, aún son escasos.

La biomasa microbiana en el suelo es tanto fuente de mineralización como de inmovilización del N. Esto hace del proceso de transformación del N a través de la biomasa microbiana, un fenómeno clave en el ciclo de éste en el suelo. El conocimiento y entendimiento de los mecanismos involucrados en la mineralización del N en el suelo, son necesarios para mejorar, y quizá controlar, el reciclaje de este elemento en suelos cultivados. La evidencia hasta ahora acumulada apunta hacia el significativo papel desempeñado por la interacción microflora (bacteria) -microfauna (protozoarios) en la mineralización del N en el suelo.

Tradicionalmente, la mineralización del N en el suelo ha sido asignada a la microflora (bacterias y hongos). A pesar de esto, hace ya mucho tiempo que los protozoarios han sido reconocidos como los principales depredadores de las bacterias, al regular el tamaño de las poblaciones de éstas últimas en el suelo. El impacto potencial de

los protozoarios en la mineralización del N ha sido recientemente reconocido (Elliott *et al.*, 1977; Kuikman, 1990). Cuando los protozoarios consumen bacterias, el exceso de N ingerido es excretado como amonio. Esta relación se basa en la similaridad existente en la relación C:N para protozoarios y bacterias. Además, se ha postulado que a través de la depredación bacteriana, los protozoarios estimulan la actividad microbiana y con ello la eventual mineralización del N presente en la materia orgánica (Clarholm, 1985a).

La importancia relativa de poblaciones específicas en el reciclaje de nutrimentos es difícil de evaluar bajo condiciones de campo, debido al sin número de interacciones que ocurren entre los microorganismos del suelo. Para estudiar la interacción específica entre las bacterias y los protozoarios, puede ser usado un sistema de complejidad limitada, como el propuesto en la Figura 1 (Kuikman, 1990). El sistema comprende el N orgánico del suelo, el N microbiano, el N inorgánico y el N vegetal (planta).

Así, un número limitado de transformaciones del N puede ser estudiado y con ello el impacto de los diferentes componentes microbiológicos del sistema; especialmente el papel de los protozoarios en la mineralización del N microbiológicamente inmovilizado.

Por otro lado, es importante señalar que el suelo es un sistema complejo que presenta una amplia gama de dificultades para la vida de sus habitantes. La estructura particular del suelo hace que la distribución de protozoarios y sus presas (bacterias) sea en conglomerados (Foster, 1988; Postma *et al.*, 1989; Vargas y Hattori, 1990). Es por esta razón que los protozoarios necesitan de agua a su alrededor para su actividad y migración.

Debido a que la disponibilidad del agua en el suelo es muy variable, el agua es el factor que regula la actividad de estos depredadores al determinar su migración y con ello la posibilidad de encontrar bacterias en la matriz del suelo (Vargas y Hattori, 1986).

Por estas y otras consideraciones, resulta evidente que el estudio de la interacción bacterias-protozoarios debe ser tratado en laboratorio empleando microcosmos de suelo cuya composición microbiana sea conocida, aún cuando existan limitaciones obvias para la extrapolación de los resultados obtenidos a condiciones naturales de campo. A pesar de esto, esta técnica abre la posibilidad de manipulación y control de factores de

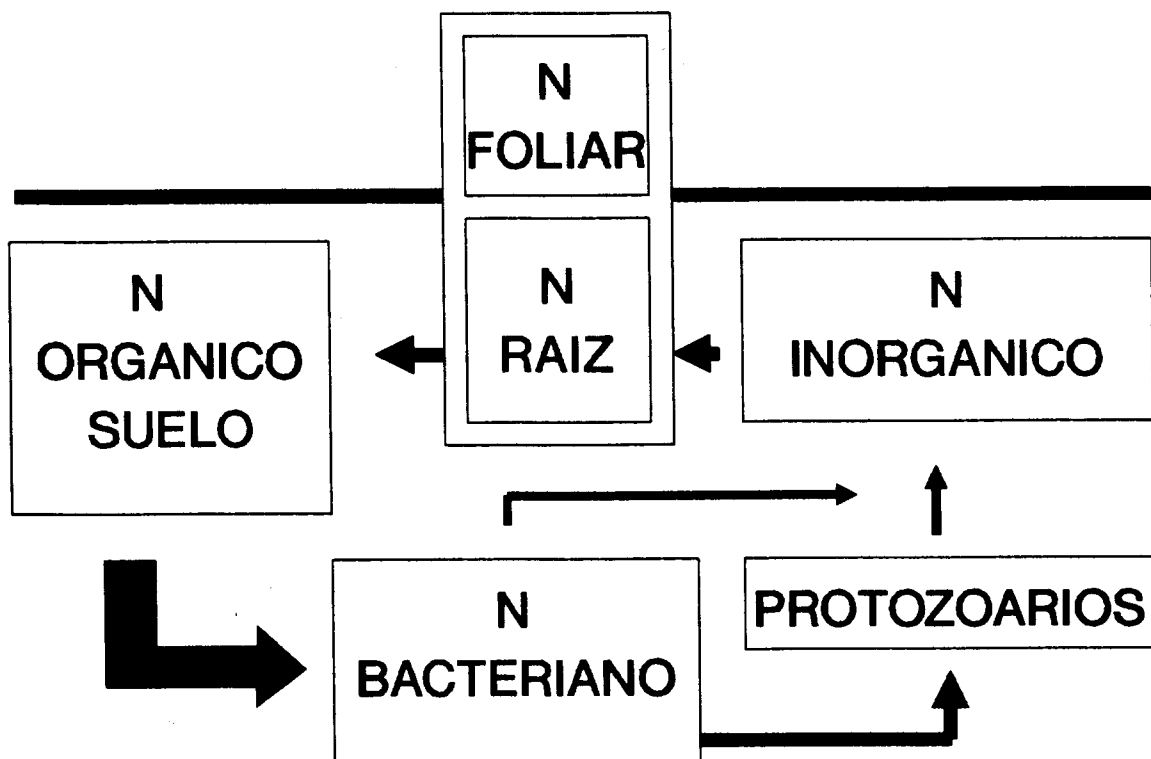


Fig. 1 Diagrama del sistema de complejidad limitada para el ciclo del N.

muy difícil regulación bajo condiciones de campo, al permitir:

- a) mantener una composición específica de los microorganismos e interrelaciones a estudiar de la comunidad microbiana del suelo, y
- b) al permitir el uso de radioisótopos como ^{15}N y ^{14}C para seguir de cerca las transformaciones específicas del N y C, y su posterior destino a componentes específicos como N o C bacteriano o materia orgánica del suelo (Jansson, 1958).

COMENTARIO FINAL

La investigación concerniente con la medición del impacto del efecto depredador de los protozoarios sobre las bacterias del suelo debe plantearse de tal forma que satisfaga condiciones mínimas de complejidad microbiológica. En forma tentativa y con miras a promover la discusión e intercambio de ideas, el autor propone como aspectos prioritarios de investigación los siguientes:

- 1) Evaluar el efecto de la adición de agua al suelo seco sobre la actividad depredadora y tasa de liberación de amonio.
- 2) Estudiar la magnitud del efecto depredador de los protozoarios sobre la disponibilidad de N (de origen orgánico y bacteriano) a las plantas.
- 3) Establecer, a través del uso de microcosmos de composición microbiana conocida, que la actividad microbiana aislada no es la responsable de la mineralización del N inmovilizado microbiológicamente, sino que las responsables del anterior proceso son las interacciones tróficas existentes a nivel de cadena alimenticia.
- 4) Desarrollar estudios utilizando suelos tropicales con miras a sincronizar la máxima liberación de N con la máxima utilización por la planta.

Para concluir, se considera conveniente llamar la atención de que sólo a través del estudio de las interacciones microbiológicas que se llevan a cabo en el suelo, es posible comprender con detalle el ciclo interno del N en el mismo. El entendimiento de éste último podría generar la tecnología

necesaria para una agricultura menos dependiente de insumos de alto valor como lo son las fuentes de N inorgánico actualmente utilizadas en la producción vegetal.

RESUMEN

En el presente artículo, se documenta el efecto depredador de los protozoarios sobre las bacterias, en la mineralización del N inmovilizado microbiológicamente.

La discusión se centra en el papel de los microorganismos del suelo como fuentes potenciales de inmovilización y mineralización de este importante elemento durante los procesos de transformación de la biomasa microbiana en el suelo. Se presentan resultados de diversas fuentes bibliográficas para demostrar que las interacciones entre la microflora (bacterias) y microfauna (protozoarios) son responsables de una significativa porción de la mineralización del N en el suelo. Para el caso de suelos cultivados, el efecto depredador de los protozoarios se demuestra como responsable de una mayor disponibilidad para las plantas del N orgánicamente inmovilizado. Los mecanismos por medio de los cuales los protozoarios estimulan la mineralización del N son:

- a) la excreción directa de N (amonio) a partir de células bacterianas, y
- b) mediante el estímulo ejercido en la degradación de la materia orgánica a través de la biomasa microbiana. Además, se presenta una alternativa de investigación, mediante la descripción de un microcosmo modelo para el estudio del proceso de mineralización del N en presencia de protozoarios, bajo condiciones controladas.

El efecto de la separación espacial de los protozoarios y sus presas, sobre la migración de los primeros, así como sobre la dinámica de las poblaciones microbianas específicas del suelo, es también discutido. Los protozoarios son esencialmente organismos acuáticos, por lo que el agua es demostrada como factor esencial para su funcionamiento. El efecto de los protozoarios con respecto a la mineralización del N se resume de la siguiente manera:

- 1) a través de la depredación bacteriana, nueva biomasa (protozoarios) es producida y el exceso de N ingerido es excretado como amonio;

- 2) mediante la depredación, los protozoarios producen productos de desecho (paredes celulares y otros nutrimentos), los cuales estimulan la actividad microbiana; y
- 3) mientras se trasladan a través de la matriz del suelo en busca de alimento, los protozoarios pueden (re) inocular (nuevos) sustratos mediante el transporte de bacterias adheridas en su superficie celular, o bacterias no digeribles que son regurgitadas.

AGRADECIMIENTO

A la Lic. Lilliana Araya Villalobos por su ayuda y constante apoyo durante la realización del presente trabajo.

LITERATURA CITADA

- ALABOUVETTE, C.; COUTEAUX, M.M.; OLD, K.M.; PUSSARD, M.; REISINGER, O.; TOUTAIN, F. 1981. Les protozoaires du sol: aspects ecologiques et methodologiques. *Ann. Biol.* 20:255-303.
- ANDERSON, R.V.; ELLIOTT, E.T.; COLEMAN, D.C.; COLE, C.V.; HUNT, H.W. 1978. Trophic interactions in soils as they affect energy and nutrient dynamics. III. Biotic interactions of bacteria, amoebae and nematodes. *Microb. Ecol.* 4:362-371.
- ANDERSON, R.V.; ELLIOTT, E.T.; COLEMAN, D.C.; COLE, C.V. 1981. Effect of the nematodes *Acrobeloides* sp. and *Mesodiplogaster* sp. on substrate utilization and nitrogen and phosphorus mineralization. *Ecology* 62:549-555.
- BAMFORTH, S.S. 1973. Population dynamics of soil and vegetation protozoa. *Amer. Zool.* 13:171-176.
- BAMFORTH, S.S.; BENNETT, L.W. 1985. Soil protozoa of two Utah cool deserts. *Pedobiologia* 28:423-426.
- BARSDATE, R.J.; PRENTKI, R.T.; FENCHEL, T. 1974. Phosphorus cycle of model ecosystems: significance for decomposer food chains and effect of bacterial grazers. *Oikos* 25:239-251.
- BICZOK, F. 1956. Contributions to the protozoa of the rhizosphere of wheat. *Acta Zool. Acad. Sci. Hung.* 2:115-147.
- BICZOK, F. 1959. Experimentelle untersuchungen uber die wanderung der protozoen in erdboden. *Acta Biol. Szeged* 5:98-108.
- BRYANT, R.J.; WOODS, L.E.; COLEMAN, D.C.; FAIRBANKS, B.D.; McCLEALAN, J.F.; COLE, C.V. 1982. Interactions of bacterial and amoebal

- populations in soil microcosms with fluctuating moisture content. *Appl. Environm. Microbiol.* 55:1857-1859.
- CASIDA, L.E. Jr. 1989. Protozoan response to the addition of bacterial predators and other bacteria to soil. *Appl. Environm. Microbiol.* 55:1857-1859.
- CLARHOLM, M. 1981. Protozoan grazing of bacteria in soil-impact and importance. *Microb. Ecol.* 7:343-350.
- CLARHOLM, M. 1985a. Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen. *Soil Biol. Biochem.* 17:181-187.
- CLARHOLM, M. 1985b. Possible roles for roots, bacteria, protozoa and fungi in supplying nitrogen to plants. *In Ecological Interactions in Soil.* Ed. by A.H. Fitter. Oxford, Blackwell Sci. Publ. p. 355-365.
- COCHRAN, W.G. 1950. Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number". *Biometrics* 6:105-116.
- COLEMAN, D.C.; ANDERSON, R.V.; COLE, C.V.; ELLIOTT, E.T.; WOODS, L.; Champion, M.K. 1978. Trophic interactions in soil as they affect energy and nutrient dynamics. IV. Flows of metabolic and biomass carbon. *Microb. Ecol.* 4:373-380.
- COLEMAN, D.C.; REID, C.P.; COLE, C.V. 1983. Biological strategies of nutrient cycling in soil systems. *Adv. Ecol. Res.* 13:1-55.
- CORLISS, J.O. 1973. Protozoan ecology: a note on its current status. *Amer. Zool.* 13:145-148.
- CUNNINGHAM, A. 1915. Studies on soil protozoa. *J. Agric. Sci.* 7:49-74.
- CUTLER, D.W. 1920. A method for estimating the number of active protozoa in the soil. *J. Agric. Sci.* 10:135-143.
- CUTLER, D.W.; LETTICE, M.A.; CRUMP, M.; SANDOM, H. 1922. A quantitative investigation of the bacterial and protozoan populations of the soil, with an account for the protozoan fauna. *Phil. Trans. R. Soc., London, B* 211:317-350.
- CUTLER, D.W. 1923. The action of protozoa on bacteria when inoculated into sterile soil. *Ann. Appl. Biol.* 10:137-141.
- DARBYSHIRE, J.F. 1976. Effect of water suction on the growth in soil of the ciliate *Colpoda steinii* and the bacterium *Azotobacter chroococcum*. *J. Soil Sci.* 27:369-376.
- DARBYSHIRE, J.F.; GREAVES, M.P. 1967. Protozoa and bacteria in the rhizosphere of *Sinapis alba* L., *Trifolium repens* L., and *Lolium perenne* L. *Can. J. Microbiol.* 13:1057-1062.
- DARBYSHIRE, J.F.; GREAVES, M.P. 1973. Bacteria and protozoa in the rhizosphere. *Pestic. Sci.* 4:349-360.
- DARBYSHIRE, J.F.; WHEATLEY, R.F.; GREAVES, M.P.; INKSON, R.H.E. 1974. A rapid method for estimating bacterial and protozoan populations in soil. *Rev. Ecol. Biol. Soil* 11:465-475.
- DE MAN, J.C. 1975. The probability of most probable numbers. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 1:67-78.
- ELLIOTT, E.T. 1978. Carbon, nitrogen, and phosphorus transformations in gnotobiotic soil microcosms. Ph.D. Thesis. Colorado, Colorado State University, U.S.A. 77 p.
- ELLIOTT, E.T.; COLEMAN, D.C. 1977. Soil protozoan dynamics in a shortgrass prairie. *Soil Biol. Biochem.* 9:113-118.
- ELLIOTT, E.T.; COLEMAN, D.C.; COLE, C.V. 1979. The influence of amoebae on the uptake of nitrogen by plants in gnotobiotic soil. *In The soil-root interface.* Ed. by J.L. Harley and R. Scott Russell. London, Academic Press. p. 225-231.
- FENCHEL, T. 1982. Ecology of heterotrophic microflagellates. II. Bioenergetics and growth. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 8:225-231.
- FENCHEL, T. 1987. Ecology of protozoa. Madison, Wis., U.S.A., Science Tech. 197 p.
- FINLAY, B.; FENCHEL, T. 1989. Everlasting picnic for protozoa. *New Scientist* 14:66-69.
- FOISSNER, W. 1987. Soil protozoa: Fundamental problems, ecological significance, adaptations in ciliates and testaceans, bioindicators and guide to the literature. *Progr. Protistology* 2:69-212.
- FOSTER, R.C. 1988. Microenvironments of soil microorganisms. *Biol. Fertil. Soils* 6:189-203.
- GELTZER, R. 1963. On the behaviour of soil amoebae in the rhizospheres of plants. *Pedobiologia* 2:249.
- GOLEBIEWSKA, J.; RYSKOWSKI, L. 1977. Energy and carbon fluxes in soil compartments of agroecosystems. *Ecol. Bull.* 25:274-283.
- GRAY, T.R.; WILLIAMS, S.T. 1971. Soil microorganisms. Edinburgh, Oliver & Boyd. 351 p.
- GRIFFITHS, B.S. 1986. Mineralization of nitrogen and phosphorus by mixed cultures of the ciliate protozoan *Colpoda steinii*, the nematode *Rhabditis* sp. and the bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol. Biochem.* 18:637-641.
- GROSCOP, J.A.; BRENT, M.M. 1964. The effects of selected strains of pigmented microorganisms on small free-living amoebae. *Can. J. Microbiol.* 10:579-584.

- HATTORI, T. 1967. Microbial distribution and its variation in soil aggregates. *Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr.* 37:302-304.
- HATTORI, T. 1988. Soil aggregates as microhabitats of microorganisms. *Bull. Inst. Agric. Res. Tohoku Univ.* 37:23-26.
- HEAL, O.W.; FELTON, M.J. 1970. Soil amoebae: their food and their reaction to microflora exudates. *In* Animal populations in relation to their food resources. Ed. by A. Watson. Oxford and Edimburg, Blackwell Sc. Publ. p. 145-162.
- HUNT, H.W.; COLE, C.V.; KLEIN, D.A.; COLEMAN, D.C. 1977. A simulation model for the effect of predation on bacteria in continuous culture. *Microb. Ecol.* 3:259-278.
- HUNT, H.W.; ELLIOTT, E.T.; WALTER, D.E. 1989. Inferring trophic transfers from pulse-dynamics in detrital food webs. *Plant Soil* 115:247-259.
- JANSSON, S.L. 1958. Tracer studies on nitrogen transformations in soil with special attention to mineralization-immobilization relationships. *Kungl. Lantbrukshögskolans Ann.* 24:101-361.
- JOHANNES, R.E. 1965. Influence of marine protozoa on nutrient regeneration. *Lymnol. Oceanogr.* 10:434-442.
- KATZNELSON, H. 1946. The rhizosphere effect of mangels on certain groups of soil microorganisms. *Soil Sci.* 62:343-354.
- KATZNELSON, H.; LOCHHEAD, A.G.; TOMONIN, M.I. 1948. Soil microorganisms and the rhizosphere. *Bot. Rev.* 14:543-587.
- KILLER, J. 1913. Die zahlung der protozoen im boden. *Zentrbl. Bakt. Parasitkde, Abt II.* 36:419.
- KUIKMAN, P. 1990. Mineralization of nitrogen by protozoan activity in soil. Ph.D. Thesis. Wageningen, Netherlands, Research Institute ITAL. 105 p.
- LETHBRIDGE, G.; DAVIDSON, M.S. 1983. Microbial biomass as a source of nitrogen for cereals. *Soil Biol. Biochem.* 15:375-376.
- LOSINA-LOSINSKY, L.; MARTINOV, P.F. 1930. A method of studying the activity and rate of diffusion of protozoa and bacteria in soil. *Soil Sci.* 29:349-362.
- MARTIN, C.H.; LEWIN, K.R. 1915. Notes on some methods for the examination of soil protozoa. *J. Agric. Sci.* 7:106.
- MEIKLEJOHN, J. 1930. The relationship between the numbers of a soil bacterium and the ammonia produced by it in peptone solution, with some reference to the effect of this process in the presence of amoebae. *Ann. Appl. Biol.* 17:614-637.
- NEWBOULD, P. 1989. The use of nitrogen fertilizers in agriculture: where do we go practically and ecologically? *Plant Soil* 115:297-311.
- NIKITIN, P. 1973. The microstructure of the elementary microbial ecosystems. *Bull. Ecol. Res. Comm.* 17:357-365.
- POSTMA, J.; ALTEMULLER, H.J. 1989. Bacteria in thin soil sections stained with fluorescent brightner calcofluor white M2R. *Soil Biol. Biochem.* (in press).
- POSTMA, J.; WALTER, S.; VAN VEEN, J.A. 1989. Influence of different initial soil moisture contents on the distribution and population dynamics of introduced *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Soil Biol. Biochem.* 21:437-442.
- RITZ, K.; GRIFFITHS, B.S. 1987. Effects of carbon and nitrate additions to soil upon leaching of nitrate, microbial predators and nitrogen uptake by plants. *Plant Soil* 102:229-237.
- ROVIRA, A.D. 1965. Interactions between plant roots and soil microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 19:241-266.
- RUSSELL, E.J.; HUTCHINSON, H.B. 1909. The effect of partial sterilization of soil on the production of plant food. *J. Agric. Sci. Camb.* 3:111.
- RUSSELL, E.W.; RUSSELL, E.J. 1962. Soil conditions and plant growth. London, Longmans Green. 364 p.
- SCHNURER, J.; CLARHOLM, M.; BOSTROM, S.; ROSSWALL, T. 1986. Effects of moisture on soil microorganisms and nematodes: a field experiment. *Microb. Ecol.* 12:217-230.
- SCHNURER, J.; ROSSWALL, T. 1987. Mineralization of nitrogen from ^{15}N labelled fungi, soil microbial biomass and roots and its uptake by barley plants. *Plant Soil* 102:71-78.
- SEVERTZOVA, L.B. 1928. The food requirement of soil amoebae with reference to their interrelation with soil bacteria and fungi. *Centralblatt Fur Bakteriologie Abbt 2.* 73:162-179.
- SINGH, B.N. 1941. Selectivity in bacterial food by soil amoebae in pure mixed culture and in sterilized soil. *Ann. Appl. Biol.* 28:52-64.
- SINGH, B.N. 1942. Selection of bacterial food by soil flagellates and amoebae. *Ann. Appl. Biol.* 29:18-22.
- SINGH, B.N. 1946. A method of estimating the numbers of soil protozoa, especially amoebae, based on their differential feeding on bacteria. *Ann. Appl. Biol.* 33:112-119.
- SINGH, B.N. 1949. The effects of artificial fertilizers and dung on the numbers of amoebae in Rothamstead soils. *J. Gen. Microbiol.* 3:204-210.

- SINGH, B.N.; CRUMP, L. 1953. The effect of partial sterilization by steam and formalin on the numbers of amoebae in field soil. *J. Gen. Microbiol.* 8:421-426.
- STOUT, J.D. 1973. The relationship between protozoan populations and biological activity in soils. *Amer. Zool.* 13:193-201.
- STOUT, J.D. 1980. The role of protozoa in nutrient cycling and energy flow. *Adv. Microb. Ecol.* 4:1-50.
- STOUT, J.D.; HEAL, O.W. 1972. Protozoa. *In* Soil Biology. Ed. by A. Burges and F. Raw. London, Academic Press. p. 149-189.
- TROFYMOW, J.A.; COLEMAN, D.C.; CAMBARDELLA, C. 1987. Rates of rhizodeposition and ammonium depletion in the rhizosphere of axenic oat roots. *Plant Soil* 97:333-344.
- VAN LEEUWENHOEK, A. 1677. *Phil. Trans. R. Soc.* 12:821.
- VAN VEEN, J.A.; LADD, J.N.; AMATO, M. 1985. Turnover of carbon and nitrogen through the microbial biomass in a sandy loam and a clay soil incubated with (^{14}C [U]) Glucose and [^{15}N] (NH_4) $_2\text{SO}_4$ under different moisture regimes. *Soil Biol. Biochem.* 17:747-756.
- VAN VEEN, J.A.; MERCK, R.; VAN DE GEYN, S.C. 1989. Plant and soil related controls of the flow of carbon from roots through the soil microbial biomass. *Plant Soil* 115:1179-1188.
- VARGAS, R.; HATTORI, T. 1986. Protozoan predation of bacterial cells in soil aggregates. *FEMS Microb. Ecol.* 38:233-242.
- VARGAS, R.; HATTORI, T. 1988. A simulation approach to the recognition of soil protozoa in the ring method. *Bull. Jpn. Soc. Microb. Ecol.* 2(2):53-55.
- VARGAS, R.; HATTORI, T. 1990. The distribution of protozoa among soil aggregates. *FEMS Microb. Ecol.* (submitted)
- WAKSMAN, S.A. 1916. Studies on soil protozoa. *Soil Sci.* 1:135-152.
- WAGENER, S.; STUMM, C.R.; VOGELS, G.D. 1986. Electromigration, a tool for studies on anaerobic ciliates. *FEMS Microb. Ecol.* 38:197-203.
- WIEGERT, R.G.; OWEN, D.F. 1971. Trophic structure, available resources and population densities in terrestrial vs. aquatic ecosystems. *J. Theoret. Biol.* 30:69-81.
- WOLDENDROP, J.W. 1981. Nutrients in the rhizosphere. *In* Colloquium International Potash Institute (16., Bern, 1981). Agriculture yield potentials in continental climates. Bern, Swiss, Int. Potash Inst. p. 99-125.
- WOODS, L.E.; COLE, C.V.; ELLIOTT, E.T.; ANDERSON, R.V.; COLEMAN, D.C. 1982. Nitrogen transformations in soil as affected by bacterial-microfaunal interactions. *Soil Biol. Biochem.* 14:93-98.