

Bioquímica de suelos derivados de cenizas volcánicas.

II. Actividad ureásica¹

Fernando Borie²
Rodrigo Fuentealba²

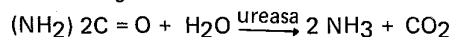
INTRODUCCION

La utilización de la urea como fertilizante nitrogenado ha experimentado, últimamente, un gran auge a nivel mundial; en Chile se ha más que duplicado su importación en los últimos tres años.

Los rendimientos obtenidos, al emplear urea, son semejantes o mayores a los proporcionados por otros fertilizantes nitrogenados, pero la urea presenta ventajas significativas en costo de transporte, almacenamiento y mano de obra (Araos y Ruiz, 1978; Rojas, 1976; Reddy y Patrick, 1978; Chavarría, 1978). Sin embargo, el uso de la urea presenta algunas desventajas, siendo las más importantes la volatilización de amoníaco, las pérdidas del fertilizante por lixiviación (Chavarría, 1978; Peyrelongue, 1977; Kiss, Dragan-Bularda y Radulescu, 1975; Covarrubias, 1978; Terman, 1979; Lloyd y Sheaffe, 1973; Tabatabai y Bremner, 1972) y la fitotoxicidad del biuret que contienen algunos preparados comerciales de este fertilizante (Tisdale y Nelson, 1975).

La hidrólisis de la urea en el suelo es controlada principalmente por la ureasa (urea amidohidrolasa, E.C. 3.5.1.5), única entre varias enzimas del suelo capaz de

afectar en forma importante el rendimiento de un fertilizante. La ureasa cataliza la reacción de hidrólisis de acuerdo a la siguiente ecuación:



El NH_3 o NH_4^+ liberado es absorbido por los coloides del suelo y/o nitrificado posteriormente.

El nivel de actividad de la enzima es de fundamental importancia en relación con los efectos adversos de la urea. A objeto de superar los inconvenientes señalados se han desarrollado diferentes modalidades en el uso de la urea, como el uso de inhibidores de la enzima, derivados de la urea, formulación de fertilizantes de liberación lenta, etc. (Mengel y Kirkby, 1978).

La complejidad, homogeneidad y propiedades de sorción del complejo orgánico mineral del suelo, unidas a la diversidad de población y número de microorganismos del suelo, hacen que la investigación de enzimas del suelo sea un problema difícil y, por lo tanto, se encuentren muchas contradicciones en la literatura. Dado el origen diverso de estas enzimas, se define actividad ureásica como la suma de la actividad de cada una de las fuentes detectables, capaces de hidrolizar urea.

El presente estudio se realizó sobre varias series de suelos derivados de cenizas volcánicas (trumaos), comparando la actividad ureásica de suelos con vegetación natural y sus homólogos cultivados con trigo.

Para cuantificar la actividad enzimática, se determinó el amoníaco producido al incubar el suelo con solu-

¹ Recepción de originales: 15 de julio de 1981.

Parte de la tesis de licenciatura presentada por el segundo autor a la Fac. de Ciencias Químicas, U. de Chile. Trabajo financiado en parte por el Proyecto A-702-801 de la U. de Chile.

²Quí. Farm. Facultad de Ciencias Químicas, U. de Chile, Casilla 233, Santiago, Chile.

ción de urea tamponada. También, se estudió la influencia del pH, materia orgánica y actividad microbiana de los suelos sobre la actividad de la enzima.

No se incluye tolueno en la determinación, ya que el error debido a la actividad microbiana se hace insignificante, con un corto período de incubación.

MATERIALES Y METODOS

Los suelos utilizados, todos derivados de cenizas volcánicas (trumaos), se recolectaron en abril de 1978 y diciembre de 1979. Se tamizaron a 2 mm y se guardaron húmedos en bolsas plásticas herméticamente cerradas. Con las muestras en estas condiciones se realizaron los ensayos físico-químicos, enzimáticos y microbiológicos.

Los valores de pH se midieron en pasta de saturación. La capacidad de retención de agua (CRA) se determinó en los suelos secados a 105°C durante 24 horas, y posterior adición de agua hasta peso constante. El contenido de materia orgánica se determinó por el método de oxidación sulfocrómica de Walkley-Black (Jackson, 1964).

Determinación de la actividad ureásica en suelo. Las determinaciones de la actividad ureásica en el suelo se efectuaron por el método del indofenol azul (Nannipieri, Johnson y Paul, 1977).

Reactivos:

1. Solución de urea al 3 por ciento p/v.
2. Cloruro de potasio 2 N.
3. Buffer Fosfato 0,1 M (pH 7,1).
4. Fenato de Sodio al 2,5 por ciento p/v. Este reactivo es estable por más de 30 días si se conserva refrigerado y debe desecharse si se produce oscurecimiento. Se lleva a temperatura ambiente antes de usar.
5. Nitroprusiato de Sodio al 1 por ciento p/v. Estable en la oscuridad. Esta solución se diluye a 0,01 por ciento y debe prepararse semanalmente.
6. Hipoclorito de Sodio 0,02 N. Se prepara por dilución de solución de hipoclorito comercial y se estandariza por iodometría. Un 20 por ciento de variación en la concentración no afecta mayormente las mediciones. Esta solución es inestable a la luz.

Los reactivos numerados del 3 al 6 se prepararon como está descrito por Fawcett y Scott (1960).

Procedimiento

Se coloca 1 g de suelo en un tubo de ensayo, se añade 2 ml de tampón fosfato y 1 ml de solución de urea al

3 por ciento y se agita cuidadosamente, por algunos segundos. Se incuba en baño de agua a 37°C, durante 30 minutos, agitando a intervalos regulares. Terminada la incubación, se colocan los tubos de hielo, se agregan 10 ml de KCl 2 N y se filtra rápidamente.

A 4 ml del filtrado, se agregan rápidamente 2 ml de fenato de sodio, 3 ml de nitroprusiato de sodio 0,01 por ciento y 3 ml de hipoclorito de sodio. Se agita vigorosamente y se deja reposar en la oscuridad, a temperatura ambiente. La coloración máxima se produce a los 30 minutos a 19°C y a los 15 minutos a 27°C.

Se lee directamente la absorbancia a 630 nm. Se prepara una curva de calibración entre 0,1 y 5 µg de NH₄⁺ y los resultados se expresan como µg de urea hidrolizada a 37°C por gramo de suelo seco durante 1 hora de incubación.

Es necesario realizar dos controles, para los efectos de corrección de la actividad enzimática; uno sin sustrato y otro sin suelo. Las muestras pueden ser diluidas por lo menos hasta seis veces sin cometer un error considerable. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Determinación de la microflora total y ureolítica en suelos.

Se determinó el número total de hongos y bacterias viables, mediante el método de dilución en placa, en los medios recomendados por el Instituto Pasteur (Pochon y Tardieux, 1975) y tal como se describiera anteriormente (Zunino y otros, 1982). Para determinar el número de microorganismos capaces de hidrolizar urea, se emplearon los medios indicados anteriormente, adicionados de urea y un indicador ácido-base, que fue seleccionado después de un estudio experimental. Como indicador se utilizó rojo fenol y se consideraron como ureolíticos los microorganismos capaces de virar al indicador dentro de los siete días siguientes a la incubación (Fuentealba, 1980).

RESULTADOS Y DISCUSION

La determinación del ión amonio en la medida de la actividad ureásica está basada en la formación de un compuesto de intenso color azul, indofenol, mediante la reacción entre los iones amonio fenato, hipoclorito y un catalizador. La intensidad del color obtenido es proporcional a la concentración del ion amonio y tiene un máximo de absorbancia a 630 nm.

La concentración de urea empleada en este trabajo cae dentro del amplio rango considerado apropiado por diferentes investigadores (Delal, 1975; Tabatabai y Bremner, 1973; Zantua, Bumenil y Bremner, 1977). Por otra parte, el corto período de incubación a que

se someten las muestras impide el agotamiento del sustrato y se puede asegurar que en ninguno de los ensayos realizados, la hidrólisis de la urea superó el 1 por ciento de la concentración inicial.

El almacenamiento de las muestras no produce grandes variaciones en la actividad uréasica, señalándose que bajo condiciones determinadas, ésta puede permanecer intacta hasta un año en algunos suelos (Zantua y Bremner, 1975). Ultimamente, Speir y Ross (1981) postulan que es preferible la observación por almacenamiento a humedad de campo, para no producir mayores variaciones de la actividad original. Por este motivo, se consideran de mayor validez los resultados obtenidos con los suelos de diciembre de 1979, aunque se mencionan las coincidencias encontradas entre ambos grupos de suelo. Los ensayos sobre la población ureolítica de los suelos se realizaron con muestra de 1978.

La estabilización y acumulación de las enzimas del suelo, debidas principalmente a los coloides orgánicos (Ladd y Butler, 1975; Skujins, 1978), permite suponer a priori alguna relación entre actividad enzimática y contenido de materia orgánica del suelo.

Particularmente, tratándose de la ureasa, este supuesto es válido. Esta relación se puede apreciar en el Cuadro 1 y la Figura 1 y se repite en las muestras de suelos tomadas en abril de 1978, lo que viene a corroborar este hecho. El tratamiento estadístico de los valores obtenidos señala coeficientes de correlación medianos y positivos, lo cual concuerda con los

trabajos realizados por Mc Garity y Myers (1967), con otros señalados por Bremner y Mulvaney (1978) y, más recientemente, con los obtenidos por Dash y otros (1981).

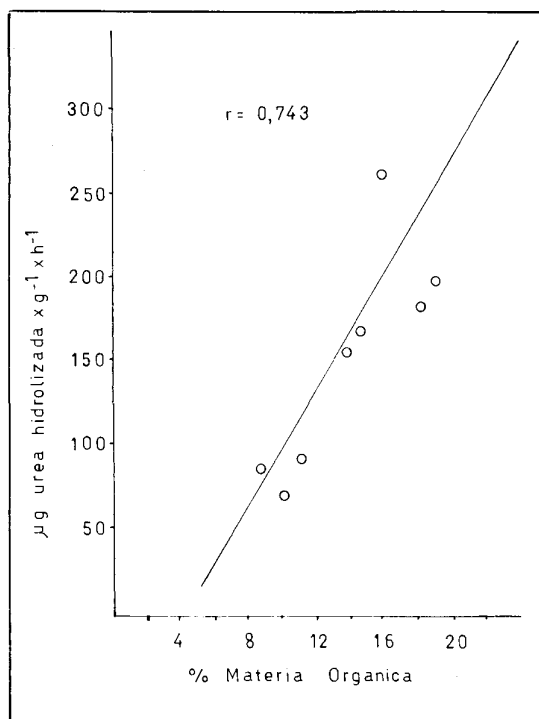


Figura 1. Relación entre actividad uréasica y contenido de materia orgánica del suelo.

CUADRO 1. ACTIVIDAD UREASICA EN SUELOS DERIVADOS DE CENIZAS VOLCANICAS

Series	Suelos sin cultivar				Suelos cultivados (trigo)			
	M.O. (%)	pH	C.R.A. (%)	A.U.	M.O. %	pH	C.R.A. ¹ (%)	A.U. ²
Arrayán	10,2	6,3	86	70	—	—	—	—
Corte Alto	18,3	5,3	103	183	27	5,1	70	—
Lican Ray	17,2	5,1	86	330	15,7	5,6	102	—
Metrenco	8,7	5,5	78	88	—	—	—	—
Lastarria	15,9	4,9	85	263	—	—	—	—
Río Bueno	13,8	4,9	97	157	13,0	4,8	75	81
Purranque	19,3	4,9	122	190	19,8	4,8	96	78
Pto. Octay	14,8	6,1	100	169	—	—	—	—
Osorno	16,8	5,6	93	340	15,4	5,2	96	183
Victoria	11,3	5,3	83	94	1,8	5,3	75	97,2
Rango				70—340				78—183

¹C.R.A.: Capacidad de retención de agua.

²A.U.: Actividad Uréasica expresada en µg de urea hidrolizada por g de suelo seco durante 1 hora a 37° C.

Una confirmación más de lo anterior es el hecho que la actividad ureásica disminuye con la profundidad del suelo. Esto se evidencia al observar el Cuadro 2, lo cual no es sorprendente, al comprobar que la materia orgánica también decrece notoriamente, aunque esto no ocurre en forma proporcional. Mc Garity y Myers (1967) señalan, al respecto, que si bien el nivel y distribución de la actividad ureásica en perfiles de suelo está relacionada con el contenido de materia orgánica, esta relación se ve modificada en algunos horizontes por otros factores, como pH, textura, etc. (Bremner y Mulvaney, 1978).

La actividad de la ureasa del suelo se modifica por cambios de pH, temperatura, humedad, fertilizantes, pesticidas, vegetación, etc. Estos aspectos han sido tratados extensamente por Kiss y otros (1975) y por Bremner y Mulvaney (1978). Aquí sólo se tratará el efecto del pH del suelo (Figura 2) y del cultivo sobre la actividad ureásica. En el gráfico se observa que la actividad ureásica y el pH varían en forma inversa, semejándose a una hipérbola, lo cual queda de manifiesto mediante un artificio matemático que la transforma en recta (Figura 3). El mismo efecto se observa entre los suelos de abril de 1978. Sin embargo, no existe acuerdo entre los investigadores en la relación existente entre pH y actividad ureásica. Mientras Mc Garity y Myers (1967) obtienen correlaciones débiles, Bremner y Mulvaney (1978) mencionan trabajos en que la relación entre ambas variables incluso llega a ser inexistente.

CUADRO 2. ACTIVIDAD UREASICA EN MUESTRAS DE SUELOS RECOLECTADAS EN ABRIL 78.
HORIZONTE B

Suelos	M.O. %	pH	C.R.A. ¹	A.U. ²
Arrayán	7,1	6,7	169	7,9
Frutillar	15,4	5,1	220	13,0
Puerto Octay	9,1	5,0	213	36,0
Lastarria	12,0	6,3	197	24,7

¹C.R.A.: Capacidad de retención de agua.

²A.U.: Actividad ureásica expresada como μg de urea hidrolizada a 37°C por g de suelo seco.

Trabajos recientes (Dash y otros, 1981; Speir y Ross, 1981), indican que no existe una relación clara entre el pH de los suelos y la actividad ureásica. La falta de concordancia entre el pH y la actividad enzimática, informada por muchos investigadores, radica en la carencia de uniformidad de los métodos utilizados; así, mientras algunos llevan a cabo la incubación de los suelos sin utilizar sistemas tamponantes, otros regulan

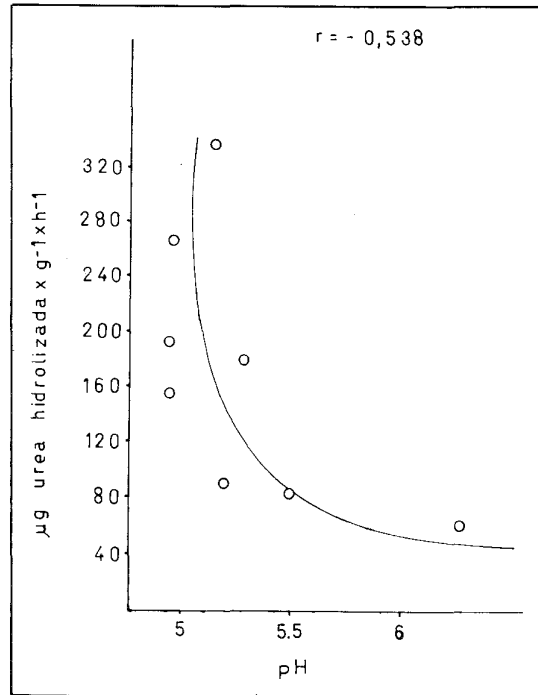


Figura 2. Relación entre actividad ureásica y pH del suelo.

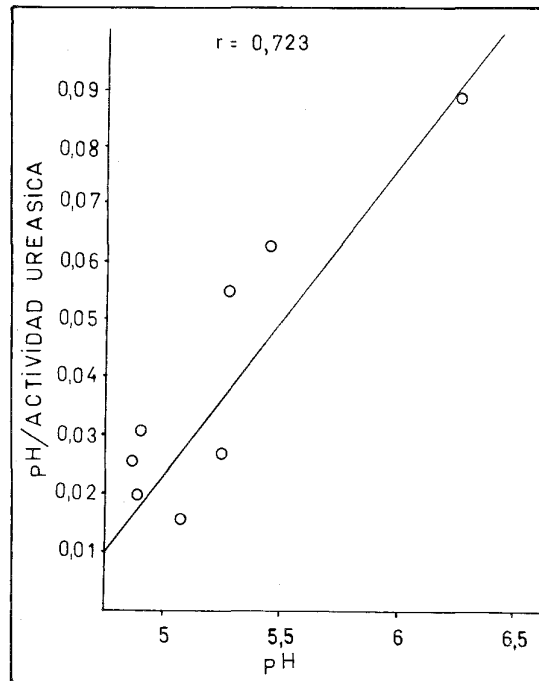


Figura 3. Relación directa entre la actividad ureásica y pH del suelo.

el pH a un rango cercano a la neutralidad, donde se encuentra el pH óptimo de la enzima (Bremner y Mulvaney, 1978).

CUADRO 3. EFECTO RIZOSFERICO SOBRE LA ACTIVIDAD UREASICA

Series	Suelos sin cultivar				Suelos cultivados			
	M.O. %	pH	C.R.A.	A.U.	M.O. %	pH	C.R.A. ¹	A.U. ²
Corte Alto	27	5,1	70	357	—	—	—	—
Licán Ray	19,1	5,1	97	362	14,8	5,7	106	102 ³
Osorno	—	—	—	—	13,7	5,2	131	296 ⁴
Río Bueno	19,1	5,1	98	278	10,5	5,3	86	90 ³
Purranque	20,8	5,1	116	276	20,4	4,8	112	111 ³
Victoria	12,6	5,4	81	93	12,3	5,4	76	96 ³
Rango				93–362				92–296

¹Capacidad de retención de agua.

²Actividad ureásica expresada en μg de urea hidrolizada por g de suelo seco durante 1 hora a 37° C.

³Cultivo de trigo.

⁴Cultivo pratense.

La actividad enzimática en los suelos es afectada en alguna forma por el tipo de vegetación que poseen. Al observar los Cuadros 1 y 3, se aprecia que en los suelos cultivados con trigo disminuye en forma notable los valores de la actividad ureásica, con respecto a los suelos con vegetación natural. El efecto del trigo sobre la actividad enzimática también lo han observado, últimamente, en estos suelos Borie y colaboradores (datos sin publicar), encontrando valores bajos de actividad fosfatásica en experiencias de invernadero. Sin embargo, se hace necesario realizar otras investigaciones como confirmación de lo anterior, ya que se ha informado que, en general, la actividad enzimática aumenta con los cultivos (Bremner y Mulvaney, 1978).

Por otra parte, al observar el Cuadro 3 es posible visualizar la existencia de un cierto efecto rizoosférico sobre la actividad enzimática en algunos suelos, efecto también observado sobre la enzima fosfatasa ácida (Borie y colaboradores, dato sin publicar). Este incremento en la actividad de la enzima no parece ser consecuencia del contenido de materia orgánica o del pH sino que, probablemente, se debe a la intensa actividad microbiana que caracteriza a la zona próxima a la raíz. Así, en un reciente artículo de revisión (Skujins, 1978) menciona que el efecto rizoosférico sobre la actividad ureásica es particularmente notorio en suelos cultivados con leguminosas, mientras que la diferencia de actividad asociada con otros cultivos es menos pronunciada. Los microorganismos son parte del microambiente inmediato a las raíces en el suelo. Mientras las bacterias se concentran en la proximidad de las raíces, los hongos en cualquier suelo que contenga material húmico, forman una cerrada malla de hifas a través del suelo. Este hecho lleva, sin lugar a dudas, a una acumulación de enzimas mayor en la ri-

zosfera que en zonas más alejadas (Epstein, 1972) y, de hecho, así lo informa Skujins (1978).

Entre los suelos de abril de 1978 se observan correlaciones, mediana con el recuento microbiano y ligeramente mayor con la microflora ureolítica, siendo superiores entre los suelos no cultivados. Sin embargo, pese a que la relación es débil, se observa que los suelos que poseen alta actividad ureásica corresponden a aquéllos con valores de recuento elevado y con alto porcentaje de microorganismos ureolíticos (Cuadro 4). Los niveles de microorganismos ureolíticos, principalmente hongos, son los que habitualmente es posible encontrar en la generalidad de los suelos (Alexander, 1977).

Mc Garity y Myers (1967) mencionan haber obtenido correlaciones débiles con recuentos microbianos ureolíticos, mientras que Paulson y Kurtz (1969) señalan altas correlaciones entre microorganismos ureolíticos y actividad ureásica. Las diferencias encontradas podrían deberse a propiedades específicas del suelo, como humedad, características de los coloides orgánicos e inorgánicos y contenido en nutrientes. Ya que los microorganismos del suelo viven en la película de agua que recubre las partículas del suelo y las raíces, es evidente que la actividad microbiana es afectada en gran magnitud por el estado de humedad del suelo. Según Mc Garity y Myers (1967), la actividad ureásica de los suelos no correlaciona necesariamente con la actividad ureolítica de los microorganismos, en el momento de determinar la actividad enzimática. Sin embargo, factores que influyan en la población ureolítica y la producción de ureasa de esta fuente, así como factores que afecten la actividad y preservación de la enzima, pueden en forma conjunta determinar la actividad ureásica del suelo.

CUADRO 4. MICROFLORA UREOLITICA EN MUESTRAS DE SUELOS RECOLECTAS EN ABRIL DE 1978

Suelos	Bacterias %	Hongos %
Arrayán	14,9	54,0
Arrayán (c)	28,5	33,0
Corte Alto	23,0	25,0
Corte Alto (c)	37,5	25,0
Frutillar	—	40,0
Lastarria	24,0	33,1
Malihue	25,0	50,0
Malihue (c)	18,0	15,0
Metrenco	—	48,0
Metrenco (c)	25,0	36,0
Osorno	15,0	50,0
Osorno (c)	25,0	50,0
San Pablo	—	50,0
San Pablo (c)	15,0	42,0
Puerto Octay	—	50,0
Puerto Varas	—	50,0
Puerto Varas (c)	—	75,0
Victoria	14,0	34,0
Victoria (c)	—	12,5

(c): Cultivado

Esta falta de correlación estrecha entre biomasa y actividad enzimática en estos suelos es comprensible, partiendo del hecho que la actividad que se mide es prácticamente la acumulada en el tiempo y estabilizada por los coloides del suelo (Ladd, 1978).

Tanto Lloyd y Sheaffe (1973) como Paulson y Kurtz (1969) señalan que la adición conjunta de urea y glucosa al suelo promueve la producción de ureasa. Este efecto se produce debido a que la adición de glucosa, fuente de carbono fácilmente asimilable por los microorganismos, determina un marcado aumento poblacional microbiano. Sin embargo, en los suelos trumaos, pese a tener un alto contenido de carbono orgánico, éste está fuertemente humificado, lo que se traduce en un déficit de carbono, fuente energética para formación de protoplasma microbiano.

Es evidente que los resultados encontrados aquí solamente indican la actividad enzimática que ocurre, en los andosoles estudiados, a pH 7,1 y con el tampón seleccionado y no pueden tomarse como una indicación de que ocurra lo mismo sin tampón y/o en las condiciones propias del campo, siendo por lo tanto, de un valor práctico potencial. Sin embargo, pensamos que la medición de esta actividad, complementada con otros estudios, podría servir como herramienta para conocer el destino que tiene la urea en un suelo dado. Si se encuentran las condiciones de la reacción que permitan obtener buenas correlaciones entre actividad ureásica y pérdidas por volatilización de NH_3 , se podrían buscar los medios prácticos para minimizar las pérdidas del fertilizante, ya sea buscando la profundidad de aplicación o utilizando inhibidores de la enzima, tal como se ha hecho en otros países (Anderson, 1962), o bien con la utilización de ureas sustituidas o urea recubierta.

CONCLUSIONES

La actividad ureásica en los andosoles varía en forma directamente proporcional con el contenido de materia orgánica del suelo y en forma inversa, aunque no muy clara, con el pH.

No se visualiza una relación directa entre actividad ureásica y recuento microbiano y, sólo ligeramente, con la microflora ureolítica. En algunos suelos se observa mayor actividad enzimática en la rizosfera, probablemente debido a la mayor cantidad de microorganismos que posee habitualmente esa zona.

El tipo de cultivo afecta la actividad enzimática, observándose una disminución en los suelos cultivados con trigo, efecto que se hace necesario profundizar más adelante.

Creemos que la determinación de la actividad ureásica deberá ser complementada con estudios relacionados con pérdidas de fertilizante por volatilización, en busca de conclusiones válidas para encontrar las condiciones de aplicación de la urea en los suelos.

RESUMEN

El objeto de este trabajo consistió en determinar la actividad ureásica de suelos derivados de cenizas volcánicas. Para ello, se incuban los suelos tratados con solución de urea tamponada y se determina el amonio

producido mediante la técnica colorimétrica del azul de indofenol.

Por otra parte se estudió la relación existente entre

actividad ureásica y contenido de materia orgánica, pH y microflora total y ureolítica en una serie de andosoles. Los resultados demuestran que la actividad ureásica varía en forma directamente proporcional con la materia orgánica, indicando una estabilización de la enzima por los coloides orgánicos. No se observó

una relación clara con el pH de los suelos ni tampoco con la microflora ureolítica. Esto último demuestra que la principal contribución a la actividad enzimática proviene de enzimas acumuladas y estabilizadas en el suelo. Los experimentos demostraron un importante efecto del trigo sobre la actividad de la enzima.

SUMMARY

Biochemistry of soils derived from volcanic ashes.

II. Urease activity

In this work urease activity in several volcanic ash derived soils is determined. Ammonium released, after incubation of soil samples with buffered urea solution, was estimated by using the indophenol blue colorimetric method.

The effect of soil pH, organic matter content, microbial population and ureolytic microflora on urease activity was studied. No clear relationship was observed

between urease activity and soil pH or ureolytic microorganisms. The results show that urease activity is positively correlated with organic matter content. This suggests that enzymatic activity in these andosols is supported basically by enzymes which are accumulated and stabilized by interactions with soil active surfaces, specially organic ones. The experiment showed an important effect of wheat on the enzymatic activity.

LITERATURA CITADA

- ALEXANDER, M. 1977. Soil microbiology: John Wiley & Sons.
- ANDERSON, J.R. 1962. Proc. Ann. Congr. S. Afr. Sugar Technol. Ass. 36: 97-105.
- ARAOS, J.F. Y R. RUIZ. 1978. Comparación entre urea y salitre aplicados al trigo en la macolla. Agricultura Técnica (Chile) 38: 45-48.
- BREMNER, J.M. AND R.L. MULVANEY. 1978. Urease activity in soil. En: Soils Enzymes. R.G. Burns (Ed.) Academic Press, New York. p. 149-196.
- COVARRUBIAS L., H. 1978. Transformaciones de la urea en el suelo y volatilización de amoníaco. Tesis Ing. Agr., U. Católica de Chile.
- CHAVARRIA, J. 1978. La urea, otra alternativa en la fertilización nitrogenada. Informativo N° 6. Estación Experimental Quilamapu, Chillán, Chile.
- DALAL, R.C. 1975. Urease activity in some Trinidad Soils. Soil Biol. Biochem. 7: 5-8.
- DASH, M.C.; P.C. MISKRA; R.K. MOHANTY AND N. BHATT. 1981. Effects of specific conductance and temperature on urease activity in some Indian Soils. Soil Biol. Biochem. 13: 73-74.
- DE LA MAZA M., B. 1977. Efecto de la dosis de urea sobre volatilización de amoníaco resultante de aplicaciones superficiales de urea y fosfato diamónico. Tesis Ing. Agr., U. Católica de Chile.
- EPSTEIN, E. 1972. Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. John Wiley & Sons. New York.
- FAWCETT, J.K. AND J.E. SCOTT. 1960. A rapid and precise method for the determination of urea. J. Clin. Path. 13: 156-159.
- FUENTEALBA, R. 1980. Actividad ureásica en suelos derivados de cenizas volcánicas y su relación con las propiedades de ellos. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. U. de Chile. 30 p.
- JACKSON, M.L. 1964. Análisis químico de suelos. Ed. Omega Barcelona.
- KISS S., M. DRAGAN-BULARDA AND D. RADULESCU. 1975. Biological significance of enzymes accumulated in soil. Adv. Agron. 27: 25-87.
- LADD, J.N. AND J. BUTLER. 1975. En: Soil Biochemistry, A.D. Mc Laren (Ed.) Dekker, New York. 4: 143-194.
- LADD, J.N. 1978. Origin and range of enzymes in soil. En: Soil Enzymes; Burns, R.G. (Ed.) Academic Press. London.
- LLOYD, A.B. AND J. SHEAFFE. 1973. Urease activity in soils. Pl. Soil 39: 71-80.
- Mc GARTY, J.W. AND M. G. MYERS. 1967. A survey of urease activity in soils of Northern New South Wales. Pl. Soil. 27: 217-238.
- MENGEL, K. AND E.A. KIRKBY. 1978. Principles of plant nutrition. International Potash Institute Berne, Switzerland.

- land. p. 295–328.
- NANNIPIERI, P., R.L. JOHNSON AND E. A. PAUL. 1977. Criteria for measurement of microbial growth and activity in soil. *Soil Biol. Biochem.* 10: 223–229.
- PAULSON, K.N. AND L.T. KURTZ. 1969. Locus of urease activity in soil. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 33: 897–901.
- PEYRELONGUE, A. 1977. Fertilización de trigo en la zona sur. *Boletín Divulgativo Nº 7, Est. Experimental Carillanca. Temuco, Chile.*
- POCHON, J. ET P. TARDIEUX. 1975. *Techniques d'analyse en microbiologie du sol.* Editon de la Tourelle. Paris.
- REDDY, K. R. AND W. H. PATRICK Jr. 1978. Utilization of labelled urea and ammonium sulfate by lowland rice. *Agron. J.* 70: 465–467.
- ROJAS, C. 1976. Evaluación de fertilizantes nitrogenados en arroz. *Agricultura Técnica (Chile)* 36: 145–150.
- SILVA H., A. 1977. Efectos de la humedad del suelo sobre la volatilización de amoníaco resultante de aplicaciones superficiales de urea. Tesis Ing. Agr. U. Católica de Chile.
- SKUJINS, J. 1978. History of abiotic soil enzymes research. En: *Soil Enzymes.* Burns, R.G. (Ed.) Academic Press London.
- SPEIR, T.W. AND ROSS, D.J. 1981. A comparison of the effects of air-drying and acetone dehydration on soil enzyme activities. *Soil Biol. Biochem.* 13: 225–229.
- TABATABAI, M.A. AND J.M. BREMNER. 1972. Assay of urease activity in soils. *Soil Biol. Biochem* 4: 479–487.
- TERMAN, G.L. 1979. Volatilization losses of nitrogen as ammonia. *Adv. Agron.* 31: 189–223.
- TISDALE, S.L. AND W.L. NELSON. 1975. *Soil fertility and fertilizers.* Third Ed. Macmillan, New York.
- ZANTUA, M.I. AND J. M. BREMNER. 1975a. Comparison of methods of assaying urease activity in soil. *Soil Biol. Biochem.* 7: 292–295.
- ZANTUA, M.I. AND J.M. BREMNER. 1975b. Preservation of soil samples for assay of urease activity. *Soil Biol. Biochem.* 7: 297–299.
- ZANTUA, M.I., BUMENIL, L.C. AND BREMNER, J.M. 1977. Relationships between soil urease and other soil properties. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 41: 350–352.
- ZUNINO, H.; BORIE, F.; AGUILERA, M.; PEIRANO, P.; CAIOZZI, M. Y MARTIN, J.P. 1982. *Bioquímica de suelos derivados de cenizas volcánicas. I. Ecología microbiana y su relación con las propiedades físico químicas de ellos.* *Agricultura Técnica (Chile)* 42(1): 67–72.