

2 FEB. 1913

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

MUSEO Y FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

EL ÁZOE EN LA VEGETACIÓN

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR EN QUÍMICA

POR

SEGUNDO J. TIEGHI

Handwritten: TESIS
1913



BUENOS AIRES

IMPRESA DE CONI HERMANOS

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Biblioteca
50 y 115 1° subsuelo
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar
Tel 0221 422-6977/79 int. 129



DEX-56315

ORACION.....

cha.....

Inv. B..... Inv.....

56315



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
MUSEO Y FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

EL ÁZOE EN LA VEGETACIÓN

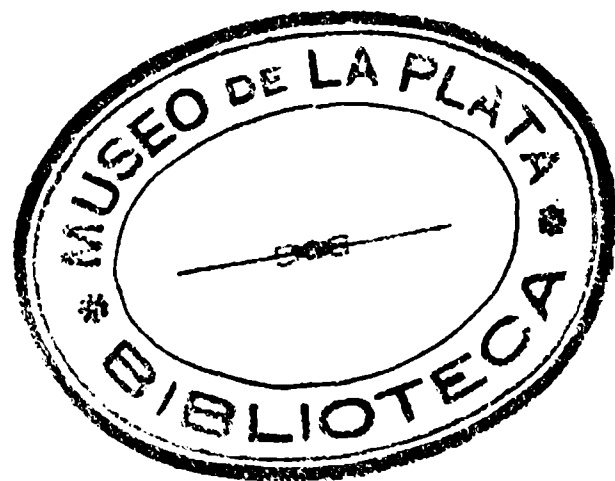
TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR EN QUÍMICA



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

POR

SEGUNDO J. TIEGHI



BUENOS AIRES
IMPRESA DE CONI HERMANOS
684, PERÚ, 684

1911

MUSEO Y FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

CONSEJO ACADÉMICO

- Presidente* doctor Samuel A. Lafone Quevedo, M. A. (Cantab.).
Consejero titular ingeniero Nicolás Besio Moreno.
— doctor Juan Carlos Delfino.
— doctor Enrique Herrero Ducloux.
— doctor Roberto Lehmann-Nitsche.
— doctor Santiago Roth.
— señor Guillermo Salom.
Consejero suplente señor Carlos Bruch.
— doctor Enrique J. Poussart.
Secretario señor Félix F. Outes.

ACADÉMICOS HONORARIOS Y CORRESPONDIENTES NACIONALES

ESCUELAS DE CIENCIAS NATURALES

ACADÉMICO HONORARIO

Doctor Ángel Gallardo (Buenos Aires), 1907.

ACADÉMICOS CORRESPONDIENTES

Doctor Juan B. Ambrosetti (Buenos Aires), 1907.

Doctor Miguel Lillo (Tucumán), 1907.

Doctor Francisco Latzina (Buenos Aires), 1907.

Ingeniero Francisco Seguí (Buenos Aires), 1907.

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

ACADÉMICO HONORARIO

Doctor Juan J. J. Kyle (Buenos Aires), 1907.

(043.2)
TESIS
00001

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Biblioteca
50 y 115 1° subsuelo
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar
Tel 0221 422-6977/79 int. 129

MUSEO Y FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

ACADÉMICOS HONORARIOS Y CORRESPONDIENTES EXTRANJEROS

ESCUELAS DE CIENCIAS NATURALES

ACADÉMICOS HONORARIOS

Doctor Santiago Ramón y Cajal (España), 1907.
Doctor Théodore Jules Ernest Hamy (Francia), 1907 †.
Doctor Enrique Hillyer Giglioli (Italia), 1909 †.
Doctor Albert Gaudry (Francia), 1907 †.
Doctor Ernest Haeckel (Alemania), 1907.
Profesor William H. Holmes (Estados Unidos), 1907.
Doctor Otto Nordenskjöld (Suecia), 1907.
S. A. S. Alberto I de Monaco, 1910.
Doctor Juan Ranke (Alemania), 1910.
Profesor Eduard Suess (Austria-Hungría), 1907.
Frederic Ward Putnam (Estados Unidos), 1909.
Doctor Eugen Bülow Warming (Dinamarca), 1907.

ACADÉMICOS CORRESPONDIENTES

Doctor Paul Vidal de la Blache (Francia) 1907.
Doctor Hermann von Ihering (Brasil), 1907.
Doctor Yoshikiyo Koganei (Japón), 1907.
Doctor Estanislao Maunier (Francia), 1910.
Doctor Rodolfo Martin (Niza), 1910.
Doctor Richard Lydekker (Inglaterra), 1907.
Doctor Abraham Lissauer (Alemania), 1907 †.
Doctor Henry Fairfield Osborn (Estados Unidos), 1907.
Doctor Albert Auguste de Lapparent (Francia), 1907 †.
Doctor Giuseppe Sergi (Italia), 1907.
Doctor Gustav Steinmann (Alemania), 1907.
Profesor J. Wardlaw Redway (E. Unidos), 1907.

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

ACADÉMICO HONORARIO

Profesor Wilhem Ostwald (Alemania), 1907.

ACADÉMICOS CORRESPONDIENTES

Profesor Armand Gauthier (Francia) 1907.
Profesor José Rodríguez Carracido (España), 1908.
Profesor Harvéy W. Wiley (Estados Unidos) 1907.

MUSEO Y FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

PERSONAL DIRECTIVO Y CIENTÍFICO

DOCTOR SAMUEL A. LAFONE QUEVEDO, M. A. (Cantab.)

Director

DOCTOR ENRIQUE HERRERO DUCLOUX

Vicedirector

SEÑOR FÉLIX F. OUTES

Secretario, bibliotecario y director de publicaciones

DOCTOR P. ABEL SÁNCHEZ DÍAZ

Prosecretario

ESCUELAS DE CIENCIAS NATURALES

DOCTOR SANTIAGO ROTH

Jefe de sección y profesor de Geología
Paleontología y Geografía física

DOCTOR GUALTERIO SCHILLER

Jefe de sección y profesor de Mineralogía

DOCTOR CARLOS SPEGAZZINI

Jefe de sección y profesor de Botánica

DOCTOR EMILIO P. MEINECKE

Profesor suplente de Botánica

SEÑOR AUGUSTO SCALA

Profesor adjunto de Botánica

SEÑOR CARLOS BRUCH

Jefe de sección y profesor de Zoología

DOCTOR MIGUEL FERNÁNDEZ

Profesor adjunto de Zoología y de Anatomía
comparada

SEÑOR HORACIO ARDITI

Profesor suplente de Zoología

DOCTOR SAMUEL A. LAFONE QUEVEDO

Profesor de Lingüística

DOCTOR ROBERTO LEHMANN-NITSCHÉ

Jefe de sección y profesor de Antropología

SEÑOR FÉLIX F. OUTES

Profesor suplente de Antropología

SEÑOR FÉLIX F. OUTES

Profesor adjunto de Etnografía

SEÑOR VALENTÍN BERRONDO

Profesor de Geografía política y económica

INGENIERO N. BESIO MORENO

Profesor de Cartografía

DOCTOR LUIS MARÍA TORRES

Profesor adjunto de Arqueología

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

DOCTOR ENRIQUE HERRERO DUCLOUX

Director y profesor de Química analítica

DOCTOR FEDERICO LANDOLPH

Profesor de Química orgánica

DOCTOR ENRIQUE J. POUSSART

Profesor de Química general

SEÑOR GUILLERMO SALOM

Profesor de Farmacología y Farmacia práctica

SEÑOR EDELMIRO CALVO

Profesor adjunto de Química orgánica farmacéutica

INGENIERO ALEJANDRO BOTTO

Profesor adjunto de Química analítica
cualitativa general

DOCTOR ALEJANDRO OYUELA

Profesor de terapéutica

DOCTOR JUAN C. DELFINO

Profesor de higiene

DOCTOR GUILLERMO F. SCHAEFER

Profesor de Química analítica especial

DOCTOR PEDRO T. VIGNAU

Profesor adjunto de Química analítica

SEÑOR LEOPOLDO HERRERO DUCLOUX

Profesor suplente de Química analítica cuantitativa

DOCTOR P. ABEL SÁNCHEZ DÍAZ

Profesor suplente de Química general

DOCTOR ATILIO BADO

Profesor suplente de Química analítica especial

DOCTOR SEGUNDO J. TIEGHI

Profesor suplente de Química orgánica

ESCUELA ANEXA DE DIBUJO

SEÑOR E. COUTARET

Profesor de Dibujo geométrico y de perspectiva

SEÑOR E. BOUCHONVILLE

Profesor de Dibujo cartográfico y de relieve

SEÑOR M. ROSSO

Profesor de Dibujo natural

SEÑOR M. MALHARRO

Profesor de Dibujo de arte y pintura

SEÑOR R. BERGHMANS

Profesor de Caligrafía

DOCTOR ROBERTO LEHMANN-NITSCHÉ

Profesor de Anatomía artística

MUSEO Y FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

MATERIAS DE CORRELACIÓN

PROFESORES TITULARES

DOCTOR EMILIO BOSE

Físico-Químico y Física General

INGENIERO TEOBALDO RICALDONI

Complementos de Física

INGENIERO MIGUEL OLMOS

Complementos de Aritmética y Álgebra

INGENIERO AGUSTÍN DELGADO

Complementos de Geometría

INGENIERO VIRGILIO RAFFINETTI

Complementos de Trigonometría y Cosmografía

INGENIERO JOSÉ A. MEDINA

Cálculo

DOCTOR FERNANDO SÍVORI

Microbiología

DOCTOR JUAN C. DELFINO

Química y Física Biológica

Señores académicos,

Señores profesores :

Al someter á vuestra elevada consideración la prueba final que los reglamentos del instituto exigen, séame ante todo permitido rendir mi sincero homenaje de respeto y agradecimiento hacia todos mis profesores, quienes en una ú otra forma han contribuido á formar mi ilustración científica. Despedirse de las aulas para iniciarse en los arduos problemas de la profesión, constituye un momento solemne, en que bien puede detenerse la afanosa marcha para contemplar, siquiera sea un instante, el camino velozmente recorrido. Y al hacerlo, vienen á mi memoria espontáneos mil recuerdos de sabias lecciones y útiles consejos, que si necesarios me fueron para escalar la difícil cuesta, he de conservarlos siempre como mi mejor bagaje para la investigación de la verdad.

El tema escogido para este trabajo, pertenece á una categoría de estudios intermedios entre la biología y la química. Es por eso que las numerosas produc-

ciones en que constantemente se trata la cuestión del ázoe, aparecen encaradas en alguna de las dos formas. Bien se comprende que esa división ha de redundar al fin en la mayor intensidad que aquellas adquieran, pero ello no encuadra en las tendencias modernas, que aun manteniéndose alejadas del enciclopedismo que caracterizó á otras edades se encamina á suprimir, ó mejor aun, á llenar, los intervalos bruscos que entre sí dejaban algunas de las ramas del saber humano. Y es así que entre la biología y la química, aparece la bioquímica, lazo de unión que permite estudiar los fenómenos vitales, en cuanto ellos emanen ó resulten de fenómenos químicos.

Es de esta nueva rama de quien depende la solución de problemas como el mencionado, pues que siguiendo la evolución del ázoe á través de sus diversos estados de compuestos minerales y orgánicos, simples reacciones químicas las unas, regidas por las mismas leyes que determinan las combinaciones artificiales de laboratorio, producidas las otras en condiciones que escapan á los métodos de análisis y síntesis á nuestro alcance, ha de llevarnos en definitiva al conocimiento de la forma más práctica para su aprovechamiento.

Aparte de la ligera síntesis con que he tratado de plantear el estado actual del « Problema del ázoe », señalando los factores que con él se relacionan, al considerar sus posibles soluciones, he procurado llegar á

la demostración de una de las formas en que se produce su restitución. Los resultados obtenidos, concordando con las conclusiones á las que por diversas vías han llegado algunos experimentadores, me permiten afirmar que aquélla se produce en forma distinta á la indicada últimamente por Jamieson en la teoría que lleva su nombre.

Bien sé que investigaciones de esta naturaleza requieren por parte de quien las encara una preparación y criterio científico superior á mis modestas fuerzas; espero sin embargo que habéis de juzgarme con benevolencia, reconociendo la buena voluntad y sincero empeño que me han guiado en su prosecución.

EL ÁZOE EN LA VEGETACIÓN

I

EL ÁZOE

Aparte de algunos compuestos azoados tales como el ácido nítrico y amoníaco utilizados desde épocas remotas (1), el conocimiento del ázoe, comienza en el siglo XVI en que el estudio del aire revela en él la presencia de dos elementos, uno sumamente activo en cuya caracterización, empéñanse los químicos, mientras que el otro, resultante de su separación, es más ó menos descuidado bajo la denominación de gas mefítico ó aire corrompido.

Es recién en el año 1772 que Rutheford lo identifica como cuerpo simple y pocos años después Lavoisier al determinar con sus clásicas experiencias la composición del aire atmosférico, precisa claramente

(1) El ácido nítrico era conocido por Gerber, alquimista del siglo VIII quien lo obtenía destilando el nitro en presencia del sulfato de cobre ó del alumbre, métodos que con ligeras modificaciones siguieron después R. Lulio, B. Valentín, Glauber y otros. El mismo Gerber obtuvo el amoníaco á partir de la orina en presencia del cloruro de sodio, preparación que parece era conocida por los egipcios. (GUARESCHI, *Enciclop. chim.*)

su naturaleza, dándole el nombre de ázoe, nombre que si era propio en la mencionada época dado el grado de adelanto de los conocimientos, resulta hoy el más antitético en vista de las importantes funciones que él desempeña en el mecanismo de la vida.

Las investigaciones y determinaciones citadas, sólo referíanse al ázoe atmosférico. Más adelante fué posible observar la frecuencia con que él se encuentra en la naturaleza bajo forma de compuestos los más variados.

Hállase en efecto en combinaciones minerales tales como son los nitratos sódico, potásico, cálcico, etc., como compuestos amoniacales en la colombita, ittrio-titanita, ortita, euxenita, fergusonita, gadolinita, etc., así como al estado libre en surgentes minerales. Al mismo estado mineral puede referirse el ázoe libre que acompaña al grisou, el que por estar siempre mezclado con argón, debe ser considerado como de origen atmosférico (1).

En los organismos, tanto animales como vegetales, la presencia del ázoe es constante. En éstos márcase siempre una preponderancia de compuestos ternarios, siendo en cambio en aquéllos superior la cantidad de substancias cuaternarias, pero tanto en unos como en otros, la intervención de este elemento histogénico es imprescindible para su desarrollo y conservación.

(1) SCHOLOESING, *C. R.*, t. CXXIII.

En consecuencia, sustancias orgánicas azoadas hállanse siempre en mayor ó menor cantidad, donde quiera que se produzcan fenómenos vitales, ya formando combinaciones simples, ó lo que es más frecuente formando moléculas sumamente complejas, cuya estructura escapa á los medios de investigación sean electrolíticos, crioscópicos, ebulioscópicos ó aquellos basados en los poderes rotatorios, en las reglas de las fases y en los métodos gráficos que con éstas se relacionan; compuestos lábiles é inestables en lo que probablemente estriba su estrecha relación con los fenómenos vitales, en lo que se diferencian de aquellos más estables y definidos, obtenidos en nuestros laboratorios, que precisamente por estas características, cuando llegan á formarse en el organismo, éste los elimina al exterior, pues que habiendo desaparecido su extrema movilidad, resultan ya impropios á los intercambios de la vida.

Á esta categoría de compuestos pertenecen especialmente los albuminoides, cuyo conocimiento se debe en gran parte al gran taumaturgo de la química orgánica, Emilio Fischer, quien después de sus admirables estudios sobre los hidratos de carbono, encaminase con paso seguro sobre esta nueva vía, en la que los resultados obtenidos permiten cifrar las más halagüeñas esperanzas.

Los albuminoides bajo la influencia de los procesos vitales, dan origen á la formación de compuestos á su

vez complejos (alcaloides) pero de constitución definida, que el organismo almacena ó elimina según su particular organización, ó degradándose dan origen á substancias azoadas de estructura sencilla. Unas y otras constituyen en consecuencia fuentes de ázoe, que mineralizado por los agentes naturales del suelo, vuelven á ser puestos en las condiciones necesarias para iniciar nuevamente su evolución á través de los organismos.

Si impropia es la denominación de «Privativo de vida» con que se sigue denominando á este elemento, no puede decirse menos de la inercia que se le atribuye. Si bien él no se combina con otros elementos á la temperatura y presión normal por los procedimientos de laboratorio, estas combinaciones realízanse constantemente en la naturaleza bajo la acción de variadas influencias. Veremos más adelante cómo algunos microorganismos no sólo enriquecen el suelo, sino que también permiten á individuos de organización más complicada, satisfacer sus necesidades de ázoe, utilizado para ello, no solamente aquel que en condiciones más ó menos favorables de combinación tienen á su alcance, sino que también el procedente de la atmósfera.

Y si la acción de los microorganismos es substituída por una de las formas de energía, sea ella eléctrica ó calorífica, ó por la acción catalítica de la esponja de platino aun á la temperatura normal, así como por los

óxidos y carburos metálicos calentados, ó los núcleos alifáticos saturados ó no, como por los radicales aromáticos y etero ó isocíclicos, el número de derivados á que él puede dar origen, demuestra que lejos de ser un cuerpo inerte, el ázoe debe ser considerado como un elemento eminentemente móvil y dotado de un gran poder de combinación.

II

EL ÁZOE EN LOS ORGANISMOS VEGETALES

El ázoe puede hallarse en los organismos vegetales al estado de combinaciones orgánicas y minerales. Éstas, representadas casi exclusivamente por los nitratos, mientras que aquéllas por los albuminoides, compuestos amidados y alcaloides.

A. — NITRATOS

La mayor parte de los vegetales los contienen en sus tejidos en cantidades que varían con las distintas especies y con el período de la vegetación en que se les estudia (1). Estas cantidades de ázoe mineral almacenado por la planta constituye una reserva que él mismo utilizará más tarde para la formación de compuestos orgánicos azoados. Así, las mayores can-

(1) *Ann. phys. et chim.*, 6ª serie, t. VIII. Berthelot y André estudiando diversos vegetales, han podido determinar la presencia de nitratos en proporción que oscila de 15-20 á 150 miligramos por ciento.

tidades de nitratos encuéntrase durante el invierno y especialmente en las raíces y partes inferiores del tallo, para disminuir durante la primavera, cuando las funciones de la planta alcanzan todo su desarrollo.

B. — ALBUMINOIDES

Presentes invariablemente en todos los tejidos de los organismos, constituyen el *substratum* químico de los fenómenos vitales.

Su formación es de origen vegetal. Éstos realizan la complicada síntesis de la molécula albuminoidea que, utilizada en su propia nutrición ó en la nutrición animal, será luego restituída al suelo y á la atmósfera en forma de productos regresivos.

Ellos utilizan como punto de partida los elementos simples minerales : CO_2 , H_2O , NH_3 , $\text{NO}_3\text{x}'$, $\text{PO}_4\text{x}'_3$, $\text{SO}_4\text{x}'_2$, que toman del suelo por sus raíces ó de la atmósfera bajo la influencia de los rayos solares.

En su composición interviene el carbono, el oxígeno, el hidrógeno, el ázoe y el azufre pudiendo contener además algunos, fósforo, hierro, magnesio, calcio, etc., combinados en modo tal que se hace sumamente difícil su separación.

Para los primeros elementos, la composición centesimal es más ó menos constante :

Carbono	57.08
Hidrógeno.	7.10
Oxígeno..	21.99
Ázoe.	15.95
Azufre.	1.09

y corresponde al fósforo y al hierro 0,4 —0,8 y 0,33 —0,59 respectivamente (1).

En cuanto á su composición molecular, es hasta hoy desconocida á causa de las dificultades que presenta su separación, siendo por lo general productos no cristalizables ni susceptibles de ser transformados en vapor, así como tampoco capaces de dar verdaderas soluciones necesarias para efectuar determinaciones crioscópicas ó ebullioscópicas.

Los ensayos practicados permiten, sin embargo, creer que su peso molecular, es sumamente elevado. Hoffmeister teniendo en cuenta la relación centesimal del azufre, ha llegado á establecer para la molécula proteica, la composición molecular siguiente :

C 450 H 720 N 116 S 6 O 140

lo que le daría el peso : 10,176.

Según las determinaciones de Hausman, hállese el ázoe distribuído en los diversos albuminoides en las proporciones siguientes :

(1) FREMY, *Encyclop. de chim.*, t. IX.

Albuminoide	Ázoe amídico por ciento	Ázoe diamínico por ciento	Ázoe monoamínico por ciento
Caseína .	13.37	11.71	75.90
Albúmina de huevo cris- talizada .	18.53	21.33	67.8
Suero albúmina .	8.90	24.95	68.8
Protoalbúmina de la fi- brina .	7.14	25.42	68.17
Globulina	4.62	29.39	67.8
Oxihemoglobina cristali- zada .	6.18	23.51	53.25
Albuminoides de las se- millas de las coníferas .	10.30	32.8	59.9

La elevada composición molecular de los albuminoides, explica el gran número de derivados á que pueden dar origen sometidos á los procesos de análisis y de degradación; estos procesos tienen lugar en todos los organismos, como consecuencia del desgaste vital, dando al fin substancias de composición cada vez más simple.

Los albuminoides, se encuentran en los organismos bajo tres formas :

1° Al estado de solución (líquidos, ó jugos animales ó vegetales);

2° En estado más ó menos sólido, formando el protoplasma viviente ó con mayor consistencia, la trama misma de los tejidos;

3° Al estado sólido y aun cristalizado como material de reserva en los embriones de las plantas y más raramente, en el de los animales.

C. — COMPUESTOS AMIDADOS

Esta clase de combinaciones constituye entre las substancias azoadas, lo que la glucosa entre los hidratos de carbono. Así como el almidón formado en los organismos vegetales, ha de ser transformado por la acción de las diastasas, en azúcares dializables, con el fin de permitir su circulación á través de las membranas celulares, los albuminoides cuyas soluciones coloidales les impiden circular á través de los tejidos, se transforman en compuestos cristalizables de fácil difusión. Este cambio se comprueba especialmente durante la germinación. Al entrar el vegetal en su primer período de desarrollo, tanto los hidratos de carbono (almidón) como los albuminoides (albúminas, legumina, gluten, etc.) transfórmanse en substancias dializables: dextrina, maltosa, glucosa, los primeros, y asparraguina, leusina, tyrosina, ácido glutámico, glutamina, etc., los segundos.

Estos compuestos amidados, estados pues de transición de los albuminoides, destinados á facilitar la nutrición del vegetal en su primera edad, son susceptibles mediante un proceso de síntesis, de regenerar estos últimos, lo que se produce con variable intensidad, según sean más ó menos favorables las condiciones ofrecidas por la planta.

Emerling admite como causas que dificultan la

síntesis de los albuminoides, á partir de los compuestos amidados :

1° La falta de compuestos ternarios;

2° La falta de alguna substancia (azufre, fósforo) ó de alguna condición física indispensable para la formación del albuminoide;

3° La insuficiente actividad fisiológica de los compuestos ternarios (hidratos de carbono) presentes.

Según que estas condiciones se realicen ó no, variarán las cantidades de amidas acumuladas en las partes nuevas del vegetal.

Bajo el punto de vista de la composición y reconstrucción de la molécula albuminoidea, estos compuestos amidados tienen la mayor importancia. Ellos presentan una composición bien definida y por los caracteres que le son propios, ha sido posible determinar su estructura molecular, lo que á su vez ha permitido llegar á su reconstrucción sintética á partir de los elementos.

En efecto, conocidos los productos de degradación, Fischer ha podido, siguiendo un proceso inverso á partir de ellos, obtener compuestos de estructura cada vez más compleja, muy análogas á las peptonas primero y después, continuando la síntesis, á los albuminoides mismos (1).

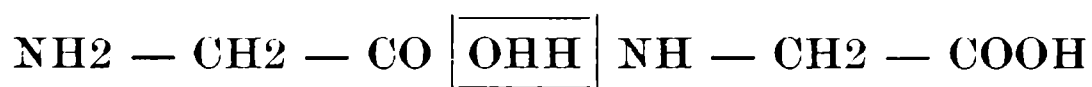
(1) E. FISCHER, *Untersuchungen uber Aminosäurem, polypétide und proteine*. Berlin, 1906.

El procedimiento seguido para llegar á estos resultados, consiste en someter dos moléculas de amino-ácidos ó de los ácidos amidados resultantes de la combinación de aquéllos, á reacciones químicas tales que permitan unir el grupo carboxilo de una de ellas con el grupo amidógeno de la otra, con eliminación de una molécula de agua.

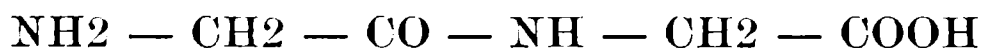
Tomando como ejemplo la glicocola, cuya estructura molecular se representa por la fórmula :



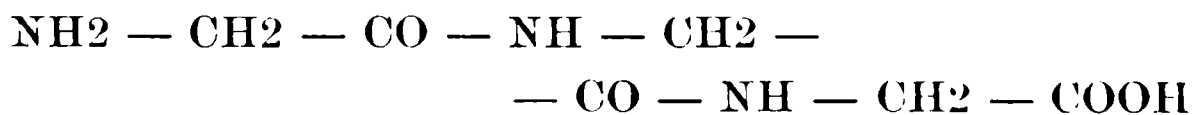
tendríamos :



es decir, que el compuesto resultante, la glicil-glicina, sería :



Éste, á su vez, sometido á la acción de otra molécula de glicocola, daría lugar á la formación de la di-glicil-glicina :

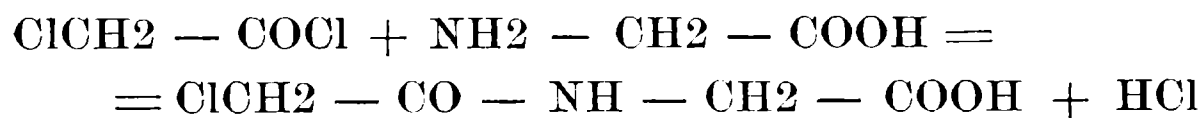


Como se ve, siendo variable el número de moléculas de amino-ácidos que es posible combinar, la estructura del compuesto resultante, podrá llegar á

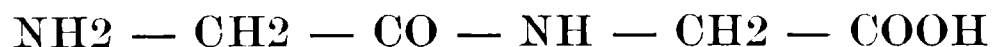
ser sumamente compleja. Fischer denomina estos compuestos con el nombre de polipéptidos, que corresponde al de polisacáridos, empleado para los hidratos de carbono. Según el número de moléculas que intervengan en su formación, el cuerpo resultante se denominará bipéptido, tripéptido, etc.

Entre los métodos seguidos para su obtención, dos son los más importantes. El primero que consiste en combinar el amido-ácido con un ácido graso halogenado, con lo cual se consigue reemplazar el halógeno por el grupo amidógeno.

Así, si se trata la glicocola por el cloruro acético monoclorado en solución alcalina, se tiene la cloroacétil-glicina :

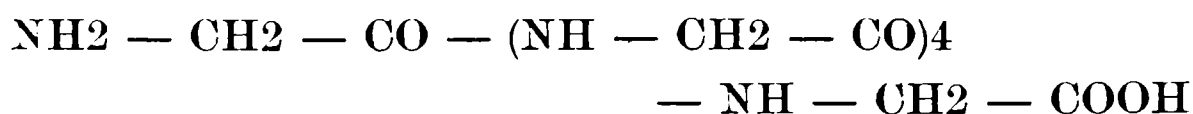


y tratando por el agua amoniacal, el átomo de cloro es reemplazado por el grupo amidógeno formándose el dipéptido : glicil-glicina :

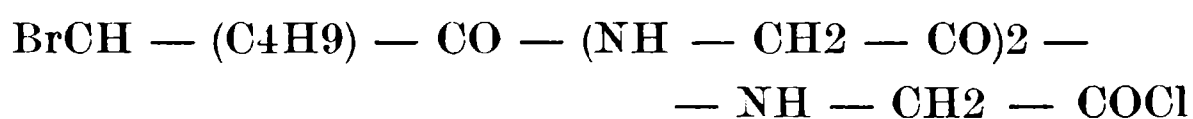


El segundo método consiste en tratar una molécula de un amido-ácido por el derivado iso-amidado, combinado con el bromo.

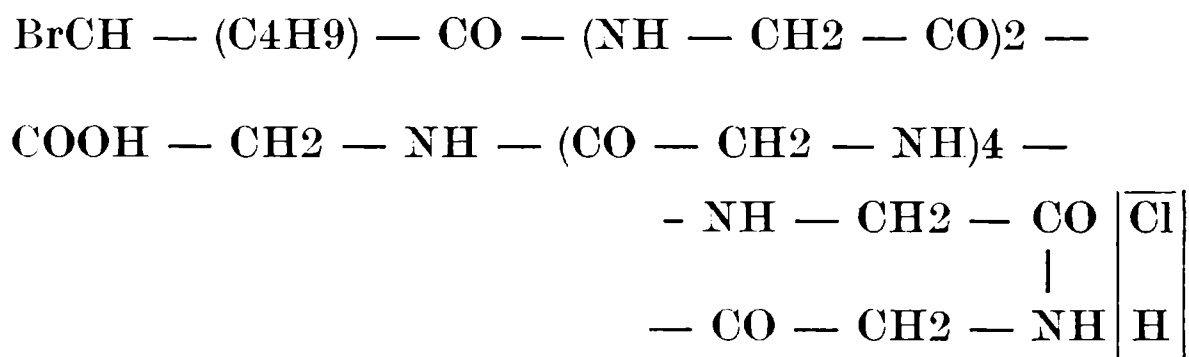
El ácido pontaglicil-glicílico, hexapéptido resultante de la combinación de seis moléculas de glicocola :



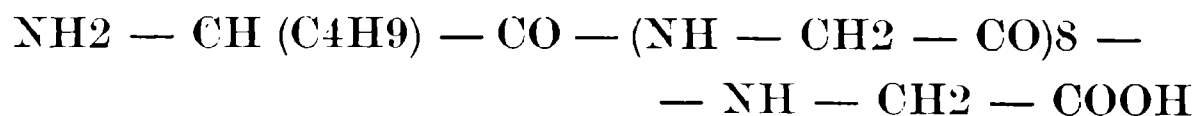
en presencia del ácido bromo-iso-caproil-diglicil-glicínico, cuyo grupo carboxílico ha sido previamente transformado en grupo cloruro-ácido :



da lugar á la siguiente reacción :



y tratando por el amoníaco diluído para substituir el átomo de bromo por el grupo NH_2 , se tiene :



un decapéptido, el ácido leucil-octo-glicil-glicílico.

Estos productos, de los cuales ha sido ya posible obtener un buen número, presentan varios caracteres de semejanza con las proteínas naturales. Sus soluciones alcalinas dan por agitación una espuma abundante y forman con los ácidos minerales sales poco solubles. Presentan además como carácter de

semejanza con los albuminoides, al mismo tiempo que diferencial con los compuestos amidados de que derivan, la particularidad de dar algunas de las reacciones de coloración típica de los primeros, tal como es la reacción de biuret; y si bien, son insensibles á otro reactivo como el de Millon, Adamkiewiecs, etc., debe tenerse presente que la propiedad de dar reacciones coloreadas, en general sólo es propia de aquellas proteínas capaces de dar entre sus productos de degradación triptofane (1).

D. — ALCALOIDES

El tercer grupo de los compuestos orgánicos azoados, comprende los alcaloides.

Si la teoría emitida por Haeckel (2) y Schlagdenhauf, respecto al papel que estos cuerpos desempeñan en la nutrición vegetal ha debido ser desechada á raíz de las experiencias de Feldhause, Miller y Kulz, que demuestran la inutilidad de los alcaloides para el desarrollo de la planta, no puede decirse lo mismo de aquélla emitida por Clautrian (3), según la que se considera á los alcaloides vegetales como productos

(1) *Ztschr. physiol. chem.*, t. XLVII. STEENSMA, *extract. en jour.phis. et chim.*, XXIII.

(2) *C. R.*, t. CX, p. 89.

(3) *Sociedad real de ciencias médicas*. Bélgica, t. IX.

regresivos, inútiles bajo el punto de vista nutritivo.

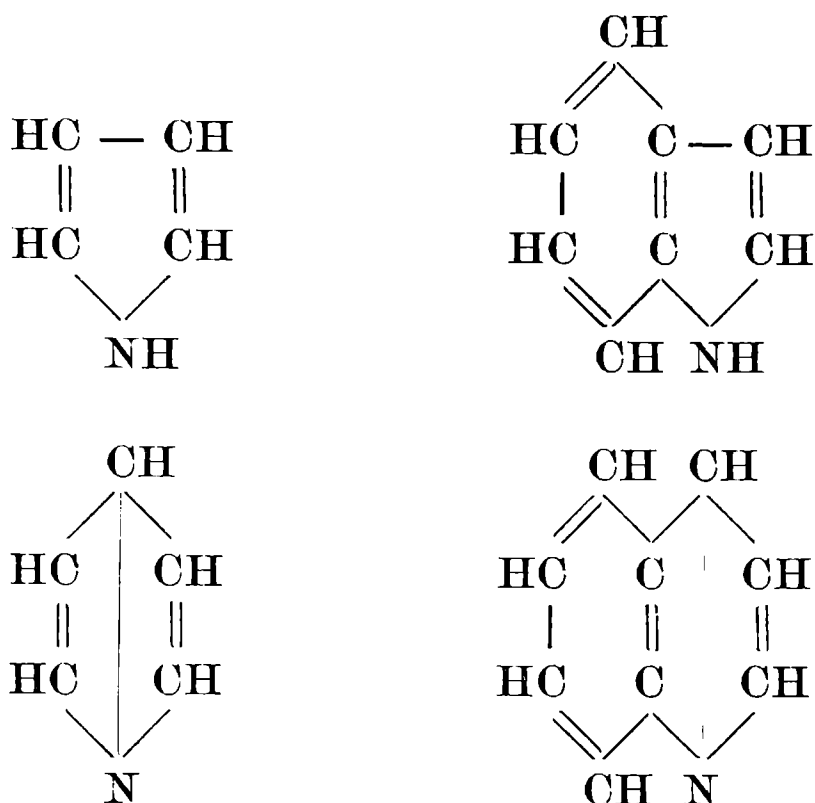
En consecuencia, ellos pueden compararse á las sustancias del mismo orden que el organismo animal elabora y que, gracias á su particular organización elimina al exterior como sustancias inútiles y aun nocivas, tales como la urea, indol, escatol, creatina, ácido úrico, etc.

Si el vegetal por la forma especial de su estructura no elimina al exterior sus alcaloides, tampoco los almacena en puntos donde la actividad es mayor. Los depósitos de estas sustancias, fórmanse por lo general en sus partes periféricas como son la corteza del tallo, de la raíz, en las hojas ó en los tegumentos que envuelven al embrión, es decir, en los puntos más accesibles á los enemigos naturales de la planta, lo que induce á creer que ellos desempeñan en cierto modo, un papel de protección para la semilla ó para el individuo adulto.

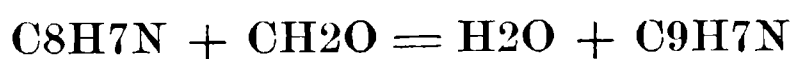
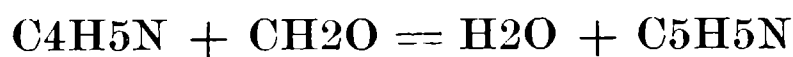
En cuanto al origen de los alcaloides, concordando con la hipótesis de Clautrian, deben admitirse como productos de la desagregación de los compuestos proteicos. Ellos contienen siempre entre otros, los núcleos pirrólico é indólico los que, así como el grupo isoindólico de la clorófila, pueden servir de punto de partida para la formación de los alcaloides.

Es verdad que los núcleos citados difieren de los grupos pirídico y quinoleico que se encuentran en la mayoría de los alcaloides, lo que *a priori* niega la po-

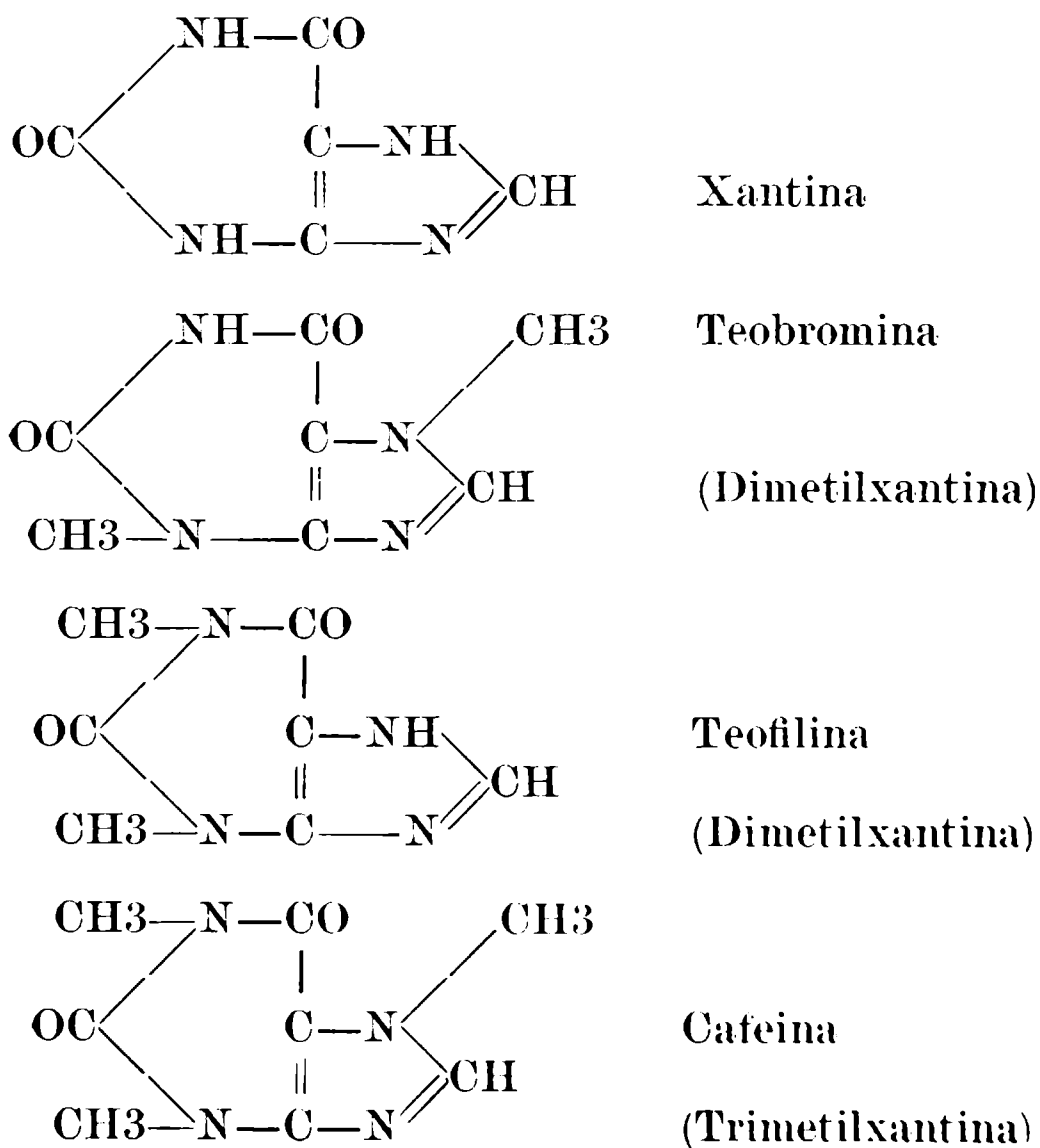
sibilidad de aquella derivación; pero si se considera la estructura molecular del pirrol y del indol con respecto á la de la piridina y quinoleína :



se ve una estrecha relación, sobre todo en lo que respecta á la composición de los dos primeros núcleos contenidos en la molécula de quinolina. De esta semejanza de estructura molecular, derivada de la igual forma de las ligaduras que constituyen el ciclo, puede deducirse que baste la acción del primer producto orgánico resultante de la asimilación del anhídrido carbónico, para transformar respectivamente el pirrol en piridina y el indol en quinolina :



Admitida así la formación de los alcaloides á ciclos pirídicos y quinoleicos, por análogos procesos se explica el origen de aquellos constituídos por otros núcleos, como es el de la iso-quinolina, la piperidina, la pirrolidina, etc., á partir de sus respectivos grupos proteicos : isoindol, ácido amido-valeriánico, tetrametilendiamina, etc., del mismo modo que aquéllos á base de la purina ó xantina, tales como la teobromina, teofilina, cafeína, han de derivarse de los núcleos proteidos vegetales, que por hidrólisis, dan la xantina. Ésta, bajo la acción del metanol (Eschweiler), produce los derivados metilados :

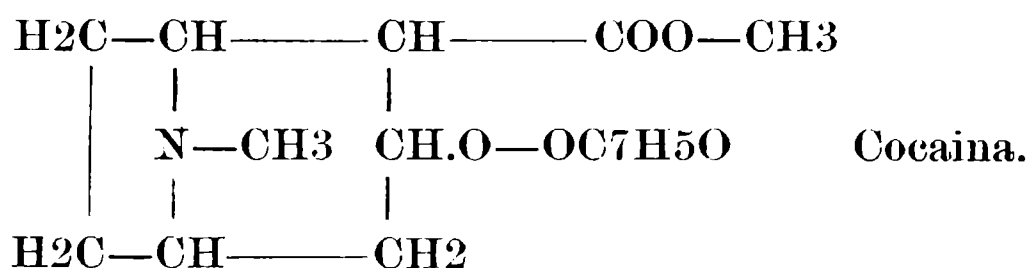
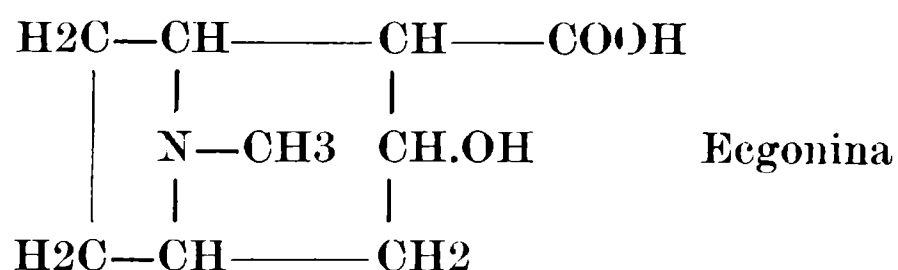


De lo anterior se desprende, que si los alcaloides no son derivados directos de los albuminoides, éstos pueden en sus procesos de degradación dar lugar á la formación de sustancias azoadas más ó menos simples, las cuales por un proceso sintético ulterior serían capaces de originarlos.

Es evidente que en las síntesis artificiales, que permiten hoy obtener un buen número de alcaloides, no es posible aplicar estrictamente el proceso seguido por la planta, desde que ésta empieza por formar los albuminoides, cosa que por hoy es imposible hacer en los laboratorios. Para llegar á estos cuerpos han debido seguirse dos procedimientos: el primero que consiste en partir de los compuestos más simples, siendo por consiguiente una síntesis completa, ha sido aplicado por primera vez por Landenburg en la preparación de la conina y después por Johns, Scholtz, Wyllstatter, Gadamer, Pictet en la obtención de la trigonelina, arecolina, piperina, atropina, y nicotina.

El otro procedimiento que guarda mayor relación con el proceso natural, constituye una síntesis parcial basada en el aprovechamiento de los mismos productos á que da origen la descomposición del alcaloide. En las hojas de coca, por ejemplo, existe junto á la cocaína la ecgonina producida por el desdoblamiento de aquélla, así como de otros alcaloides no utilizables de la misma planta. Este compuesto, por

la aplicación de una molécula de ácido benzoico y un radical metílico se transforma en cocaína :



En las síntesis de estos alcaloides, como en la generalidad de los compuestos orgánicos, nótase la diversa actividad óptica del producto artificial con respecto al natural. Mientras que aquéllos son ópticamente inactivos, éstos desvían más ó menos la luz polarizada á la derecha ó á la izquierda, lo que se explica atribuyendo á ambos productos en su origen una forma racémica, forma en la que el producto artificial se conserva, resultando así inactivo, mientras que el natural á medida que se forma y bajo la acción de encimas contenidas en la planta, es transformado en una de las dos variedades, del mismo modo que el ácido láctico ordinario racémico, es transformado por la acción encimótica del *penicillium glaucum* en ácido láctico derecho, más resistente que el izquierdo á la acción de dicho agente.

III

EMPOBRECIMIENTO DE LAS TIERRAS EN SUBSTANCIAS AZOADAS

Hemos visto que la constitución de los seres vivos, exige como complemento indispensable á su existencia la presencia del ázoe combinado con otros elementos simples para formar la molécula albuminoidea.

Y si bien es éste uno de los elementos más difundidos en la naturaleza, ya sea en estado libre ó formando parte de combinaciones minerales ú orgánicas, el hecho de que su asimilación exija una forma única de compuesto (nitratos), excluye la posibilidad de que ella se efectúe, aun en el caso de que el vegetal se encuentre en presencia de substancias más ó menos nitrogenadas, siempre que ellas no sean previamente transformadas en aquel compuesto.

Para que la nutrición azoada se produzca en condiciones convenientes, es pues necesario que el ázoe se halle en estado de poder ser asimilado, y á eso

tienden diversos factores naturales que, en condiciones normales, vendrían á establecer un equilibrio entre el ázoe cedido por el suelo al vegetal y el ázoe devuelto por éste al suelo.

Pero ésto no sucede así. Debido al progreso de las industrias agrícolas, la aplicación de cultivos intensos y continuados, representa uno de los factores de empobrecimiento del suelo, que no puede ser naturalmente subsanado con la misma rapidez con que él se produce.

Tratándose aun de terrenos ricos en substancias húmíferas, el proceso de mineralización que en ellos se realiza por acción de los microbios del suelo es sumamente lento, lo que con justicia ha hecho decir á Sabatier que « el ázoe orgánico es un capital del cual la vegetación no puede utilizar nada más que las reservas ».

Por otra parte, es toda una serie de industrias de importancia siempre mayor las que utilizan el ázoe, tomándolo precisamente en el estado de combinación más útil para la vegetación, y si bien él ha de ser devuelto, en el eterno evolucionar de la materia, en grado tal que pueda ser nuevamente asimilado, ello no impide que esta substracción temporaria, redunde en perjuicio inmediato para la bondad del suelo, bajo el punto de vista de su poder nutritivo.

Finalmente, á las causas mencionadas de empobrecimiento del suelo en lo que con el ázoe nítrico se

relaciona, debe agregarse las pérdidas experimentadas por la gran solubilidad de los nitratos.

Las aguas pluviales, al lixiviar el suelo disuelven entre otras sales, grandes proporciones de nitratos que son así llevados por las corrientes naturales al mar, substrayéndose en consecuencia á la agricultura. Las enormes cantidades de ázoe así perdido, pueden evaluarse con el cálculo de Boussingauld para las aguas del Sena, que arrojan diariamente al mar 33.000 kilogramos de nitratos (Laulanié).

De lo anterior se desprende, que el equilibrio resultante de la oposición de funciones químicas entre animales y plantas, deja de ser tal desde el momento que la intervención de factores naturales ó artificiales, tienden á romperlo, quedando por esta razón sujeto á las variaciones que éstos pueden experimentar.

Es así que la aplicación de sustancias azoadas en las diferentes industrias, no sólo representa un factor importante por las cantidades de ázoe empleado, sino que también bajo el punto de vista de su constante variación, íntimamente ligado al progreso de las mismas.

Bastaría, como ejemplo, recordar los progresos alcanzados por las industrias de los colores artificiales, que han suplantado á los naturales, de las sustancias aromáticas, de los abonos azoados, de las sustancias explosivas, etc., para admitir la importancia de este

factor en la inversión del ázoe. Y en cuanto á su variación, seguir el desarrollo progresivo de una cualquiera de esas industrias, al par que permite comprobar los triunfos alcanzados por las diversas civilizaciones, relacionados con su grado de cultura, conduce también á apreciar en su verdadera magnitud el problema planteado á la ciencia moderna: el problema del ázoe.

Así, en la fabricación de explosivos, ya la provisión de nitratos constituía una seria preocupación para los estados europeos, en el siglo XVI, al punto de originar un gravamen especial « el impuesto en sal nitro », que se justificaba de acuerdo con las ideas de la época, por ser el sal nitro y respectivamente la pólvora « aquella substancia que mantiene el Estado y sostiene el trono » (1). La superioridad de las armas de fuego generalizando su uso, incitaba á buscar nuevas fuentes capaces de suministrar abundantemente el precioso elemento, y á ello debieron su origen las nitreras que con el nombre de *salpêtrières* en Francia, *salpeterwande* en Prusia, *salpeterpyramiden* en Suiza, tuvieron entonces su época floreciente, para decaer luego á medida que el desarrollo marítimo hizo que tomara impulso creciente la importación del nitro de Oriente. Ésta empezó á su vez

(1) Frase atribuída á Enrique IV de Francia. (GUARESCUI, *loc. cit.*)

á decaer hacia 1830, para ser pocos años después totalmente suplantada por los enormes yacimientos chilenos.

El otro de los factores citados como causante de pérdidas de ázoe, á pesar de fundarse en una propiedad inherente á los nitratos, su solubilidad, ha podido ser, sin embargo, indirectamente modificado en el sentido de hacerlo menos sensible.

Siendo estas sales perfectamente solubles en el agua y cayendo ésta en proporciones más ó menos constantes para las diversas regiones, parecería que las cantidades disueltas y por consiguiente arrastradas, debieran mantenerse también en un límite de escasa variación. Sin embargo, esta uniformidad sólo es relativa, desde que variando las condiciones del suelo, se facilitará ó no la formación de corrientes de agua y por consiguiente, la localización en determinadas zonas de las sales disueltas. Y el progreso marcado por las ciencias agronómicas, ha debido en todas las épocas contribuir á la modificación de dichas condiciones, desde aquellas más remotas, en las que, el desconocimiento de los metales ó su aplicación, no impedía á los pueblos primitivos el uso de arados de madera é instrumentos similares para roturar las tierras de cultivo, hasta nuestros días en que sólo por la aplicación práctica de principios científicos bien determinados, pueden algunos países hacer frente con sus cultivos intensos á las graves situa-

ciones económicas derivadas de la carestía del suelo y de su agotamiento progresivo.

La necesidad de someter el suelo á una labor compleja y profunda con el fin de mejorar la tierra (1), facilitando el desarrollo de los vegetales, impide, ó por lo menos dificulta la formación de corrientes de agua superficiales, la que por el contrario, penetrando en el suelo mismo en que cae, no solamente lo beneficia desde que localiza en él las sales disueltas, sino que también por regularizar su distribución dentro de la profundidad que se ha dado á los labores.

Resulta de ahí, que á medida que las zonas cultivadas aumentan de extensión, menores serán las pérdidas de nitratos ocasionadas por el arrastre de las aguas, lo que unido á una distribución racional mediante el regadío de aquellas excedentes, tradúcese al fin en una real economía de dichas sales.

(1) J. Tull en Inglaterra ha pretendido substituir los abonos azoados por el trabajo mecánico del suelo, opinión confirmada por las experiencias de S. Smiths (Granja Loisedon). GIL, *Agric. general*. Últimamente Pouget y Gerard, fundados en serias experiencias afirman que los buenos efectos de los labores de la tierra, se explican por la aereación á que dan lugar, lo cual facilita la nitrificación al par que dificulta la desnitrificación. *C. R.*, t. CXLVIII, p. 183.

IV

RESTITUCIÓN DEL ÁZOE AL SUELO

A. — DEL ÁZOE EN CIRCULACIÓN EN LOS SERES VIVOS

Siendo constante en los seres vivos la presencia del ázoe, ellos deben ser considerados como los primeros factores tendientes á mantener el suelo en las condiciones propicias á la subsistencia de los nuevos organismos. No solamente las substancias que ellos elaboran ó segregan, sino también sus propios organismos, bajo la acción de diversos agentes naturales y en condiciones convenientes de temperatura y aereación, son sometidos á procesos de descomposición cuyo resultado, en definitiva, es la mineralización de los elementos que constituyen la molécula orgánica.

En lo que se refiere á los compuestos proteicos, su mineralización verifícase en tres etapas principales, por la acción directa de los microbios del suelo. Orígnase primero una fermentación anaeróbica que da

lugar á la formación de productos amoniacaes al mismo tiempo que á los compuestos hidrogenados respectivos del azufre y del fósforo. Después, la intervención de agentes aerobios nitrificantes, quemando aquéllos compuestos, los transforman en nitritos, nitratos, sulfatos y fosfatos.

Es, como se ve, particularmente importante el rol que desempeñan los microorganismos del suelo en las transformaciones sucesivas de combinaciones orgánicas en compuestos minerales. Nitrificando el ázoe orgánico, ponen á este elemento en condiciones de ser asimilado por la planta, la que se encargará después de elaborar con él aquellos compuestos necesarios á su propia nutrición y capaces también de concurrir á la nutrición animal. Ellos preparan, pues, los elementos necesarios á la vida. Después, cuando terminado el ciclo vital de los organismos, éstos se restituyen al suelo, serán los mismos microbios los encargados de concluir la obra de la muerte, desdoblado los compuestos orgánicos que formaban sus tejidos en los elementos simples y asimilables por la planta.

Fué considerando este ciclo que representa la evolución del ázoe á través de los organismos animales y vegetales, que se admitió como el exponente de la cantidad de vida posible.

Tal apreciación es errónea, desde el momento que al ázoe en circulación en los seres vivos susceptible

de ser transformado en nitratos, debe agregarse el procedente de la atmósfera, que como para el oxígeno, es fuente inagotable no solamente por su magnitud, sino también porque á ella se restituyen constantemente las cantidades excedentes á las necesidades de la vida.

B. — APROVECHAMIENTO DEL ÁZOE ATMOSFÉRICO

1. ACCIÓN DE LAS DESCARGAS ELÉCTRICAS NATURALES

Las descargas eléctricas producidas en la atmósfera, dan origen á la formación de compuestos oxigenados del ázoe, que arrastrados por las aguas pluviales serán después distribuídos en el suelo.

Las experiencias de Boussingauld en Alsacia, demuestran que el ázoe ganado por el suelo en esta forma, oscila alrededor de tres á cuatro kilogramos por hectárea. Si á ésto se agrega el ázoe amoniacal, producido por la descomposición de substancias orgánicas y arrastrado en la misma forma por las lluvias, que el mismo autor ha calculado en dos á tres kilogramos, se tiene un total de ázoe adquirido que varía alrededor de cinco á siete kilogramos por hectárea.

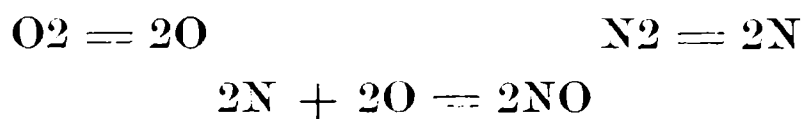
Es evidente, que aun teniendo en cuenta los aumentos que estas cantidades pueden sufrir en las regiones en que los fenómenos meteóricos son más

intensos y frecuentes (1), las cifras alcanzadas no bastarían por sí solas á compensar las pérdidas de ázoe que experimenta el suelo por los cultivos que en él se producen.

2. ACCIÓN DE LAS DESCARGAS ELÉCTRICAS ARTIFICIALES

El fenómeno de la combinación del ázoe bajo la influencia de las descargas eléctricas, ha surgido un procedimiento artificial para el aprovechamiento del contenido en el enorme depósito que representa la atmósfera.

Á la elevada temperatura del arco eléctrico, las moléculas de ázoe y de oxígeno se desdoblán en sus átomos respectivos, los que combinándose dan origen á la formación de bióxido de ázoe :



Pero esta reacción es reversible y ella se detiene cuando el tenor de bióxido ha alcanzado cierto límite. Éste es tanto mayor, cuanto más elevada es la temperatura ; de ahí que haya conveniencia en mantener esta condición, con lo cual se aumenta la producción de bióxido al mismo tiempo que se hace más

(1) DEHERAIN, *Chim. agric.*, p. 457.

rápida la reacción. Además, con el objeto de evitar la retrogradación del compuesto formado por efecto del calor, es necesario enfriarlo rápidamente, cosa que se consigue con doble ventaja haciendo circular los gases calientes procedentes de los hornos, por las soluciones de los mismos nitratos obtenidos en la fábrica, las que son así llevadas al grado de concentración necesario para hacerlas cristalizar.

El bióxido de ázoe, al pasar por las soluciones de nitratos y en presencia del oxígeno del aire, se transforma en peróxido, que obligado á circular en torres de coke, en contacto del agua, se transforma en parte en ácido nítrico, y en parte en bióxido que es nuevamente absorbido.

Las soluciones de ácido nítrico en presencia de la cal, dan el nitrato cálcico apto para ser empleado como abono.

Este procedimiento ha sido llevado á la práctica en gran escala en Notedden (Noruega) desde 1905, donde se produce diariamente una cantidad de nitratos correspondiente á mil quinientos kilogramos de ácido nítrico (1).

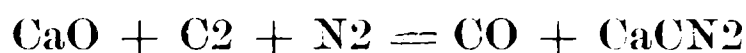
(1) La aplicación práctica de este procedimiento se debe á Birkeland (Cristiania) quien obtuvo por medio de una corriente alternativa de 5000 voltios y bajo la acción de fuertes magnetos, un arco voltaico de dos metros de diámetro, El rendimiento teórico de 950 kilogramos de ácido nítrico por HP anual, ha alcanzado en la práctica á 550-600 kilogramos. (MOLINARI, *Chim. gener. et aplic. all'industria*, vol. I.)

La implantación de otras grandes fábricas similares, dada la economía de la energía eléctrica derivada del aprovechamiento de las caídas de agua, permite á los productos así obtenidos, competir ventajosamente con los nitratos de Chile.

3. PROCEDIMIENTOS QUÍMICOS

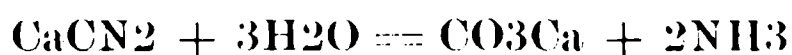
Otra forma de aprovechar el ázoe atmosférico, consiste en la fijación de este elemento por medio del carburo de calcio en presencia de una temperatura elevada.

El procedimiento consiste en tratar el carburo ó el óxido de calcio, en presencia del carbono y del ázoe á la temperatura de mil á mil cien grados centígrados :



El producto formado, cuya riqueza en ázoe es de 20 á 22 por ciento ó de 12 á 14 por ciento, según proceda del carburo ó del óxido de calcio, constituye un abono de primer orden.

En presencia de los microorganismos del suelo y de la humedad, se transforma en carbonato de calcio y amoníaco :



éste, fijado directamente al estado de sal amoniacal, es oxidado en seguida por la acción de los agentes nitrificadores.

Algunas experiencias hechas con esta substancia, demuestran no solamente su poder fertilizante, sino también que éste no es inferior al de los nitratos (1) ó al del sulfato de amonio (2).

Sin embargo, esta opinión no es compartida por todos los agrónomos, en razón de los insucesos producidos en algunas experiencias, llevándolos á dudar que éste pueda substituir á los bonos azoados empleados hasta hoy.

Por otra parte, el precio elevado á consecuencia de la gran cantidad de energía que exige su preparación, parecía hasta hace poco constituir un obstáculo insuperable para su empleo en la agricultura.

Un trabajo relativamente reciente de Pozzoli (3) relacionado con las reacciones químicas que se producen en la cianamida cálcica bajo la influencia de los agentes del suelo, confirma las esperanzas cifradas por los agricultores en este abono.

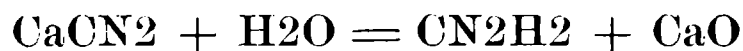
En efecto, aparte de algunos productos improprios para la vegetación á que puede dar origen las impurezas que contenga (carburo de calcio, sulfuro de

(1) PEROTTI, *Staz. sper. agron. italiana*, p. 687. 1904.

(2) MINOZI e GUINER, *Staz. sper. agron. italiana*, p. 1132. 1904.

(3) POZZOLI, *IV Congreso inter. di chim aplic.*, Roma.

calcio, etc., que originan acetileno, ácido sulfhídrico, etc.), la descomposición de la calciocianamida da lugar á la formación de óxido de calcio y cianamida.



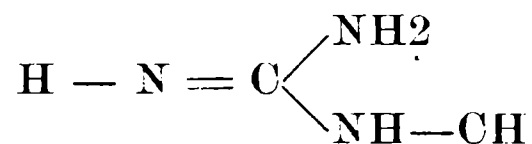
Ésta, transfórmase á su vez en urea :



que bajo la acción de los fermentos, se desdobra en anhídrido carbónico y amoníaco :

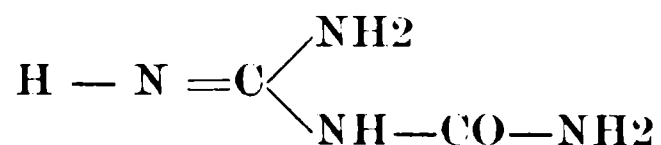


Pero la misma cianamida cálcica á temperaturas superiores á la normal, se polimeriza para dar lugar á la formación de la diacianamida ó cianguanidina :



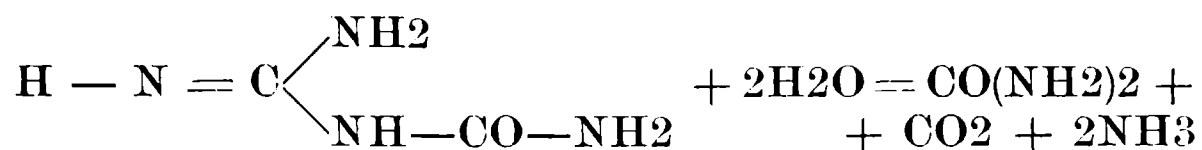
producto que siempre acompaña á la calciocianamida comercial.

La cianguanidina, aun siendo mucho más estable que la cianamida, da por hidrólisis la guanilurea :

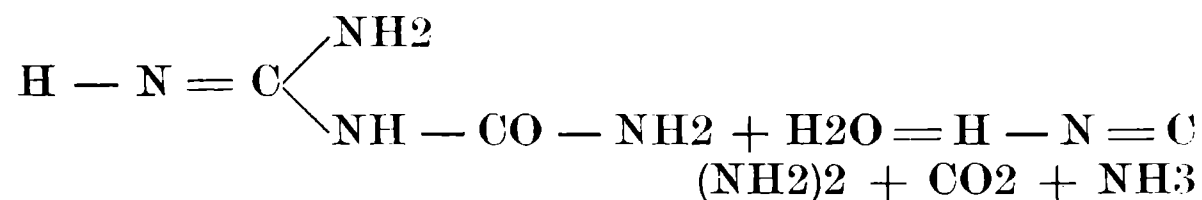


producto no asimilable por la planta pero susceptible

de transformarse mediante nueva hidrólisis en urea, anhídrido carbónico y amoníaco :

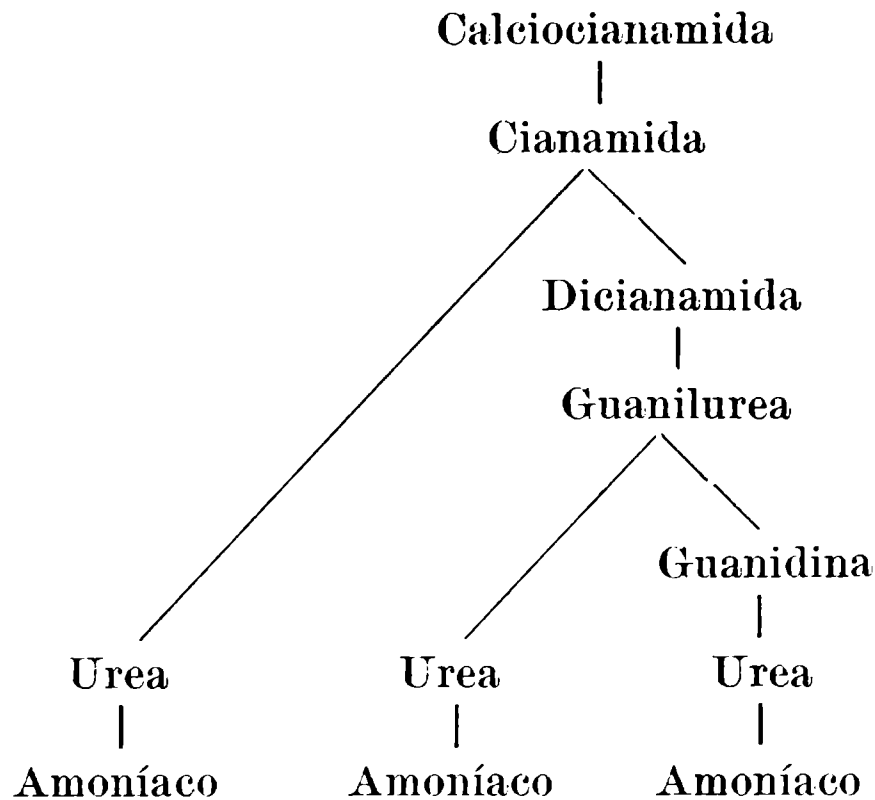


Además, los mismos agentes que originan la formación de la guanilurea, por acción ulterior pueden descomponerla de modo á dar lugar á la formación de la guanidina, anhídrido carbónico y amoníaco :



y á su vez la guanidina en medio ácido ó alcalino se desdobra en urea y amoníaco.

En definitiva, pues, por distintas vías el ázoe de la calciocianamida, será transformado en compuestos amoniacaes de fácil nitrificación por los agentes del suelo.



En cuanto al segundo inconveniente apuntado debido al costo elevado de la calciocianamida, él tiende á disminuir á medida que los métodos de obtención se modifican y perfeccionan. En 1905 ha empezado á funcionar en Italia un establecimiento hidroeléctrico « Societá italiana per la fabbricazione dei Prodotti Azotati » con una potencialidad productora de 40.000 quintales por año, cantidad que la misma fábrica se propone llevar á 120.000. El costo relativamente bajo en ese país de la corriente eléctrica, ha disminuído el de los productos, al punto de resultar estos hoy más económicos que los demás abonos azoados y aun que el mismo nitrato de Chile (1).

(1) MOLINARI, *loc. cit.*

4. FIJACIÓN DEL ÁZOE ATMOSFÉRICO POR LOS AGENTES BIOLÓGICOS

Si se consideran las cantidades de ázoe cedidas por el suelo á la vegetación, se verá que las que les son restituídas por la acción de las descargas eléctricas, no pueden bastar por sí solas á mantener el equilibrio. Hemos dicho antes que igual cosa sucede en lo que respecta al ciclo evolutivo de este elemento á través de ambos reinos y si á pesar de ello el suelo puede en los casos generales, mantener su riqueza en substancias azoadas, aun mediando circunstancias desfavorables, como sucede en terrenos provistos de abundante vegetación, cuya situación elevada facilita la pérdida de substancias solubles por el arrastre de las aguas, lógico es pensar que á este resultado deben contribuir además de los citados, otros factores que también por su parte tienden á mantener el suelo en su riqueza constante de ázoe.

Un gran número de experiencias practicadas en los últimos treinta años, han logrado descubrir estos factores, algunos de los cuales eran ya presentidos desde épocas muy anteriores por numerosas observaciones prácticas (1).

(1) Es de vieja práctica transportar algunas carradas de tierra tomada en terrenos sembrados de leguminosas á aquellos que se piensan destinar á cultivos de la misma especie. (VANDERGHEN, *Bol. minas y fomento*. Perú).

Estos factores pueden ser clasificados en:

1° Agentes microbianos;

a) Microbios fijadores del ázoe del suelo;

b) Microbios fijadores del ázoe de las nudosidades radicales de las leguminosas.

2° Simbiosis de algas y bacterios.

Á estos agentes agrego por separado los órganos fijadores de ázoe descritos por Jamieson por cuanto que, fundado su estudio en algunas experiencias, estas distan de ser concluyentes por la forma en que se han realizado, así como las conclusiones á que arriba el autor, no creo exclusivas al fenómeno que él se propone demostrar.

a) *Microbios del suelo fijadores de ázoe.* — La primera demostración de la fijación del ázoe atmosférico por acción microbiana, data del año 1885 y se debe á Berthelot.

Sometiendo tierras estériles y arables á la acción del aire durante un tiempo variable y dosando en ellas el ázoe contenido antes y después de la experiencia, comprobó un aumento notable que se hacía nulo en las mismas tierras si ellas eran sometidas de antemano á una temperatura de 120 grados C., y á la acción de una corriente de vapor de agua sobrecalentado.

Tres ensayos efectuados bajo campana, con tres tierras de riqueza distinta, han dado lugar á una fijación de ázoe que procede evidentemente del ázoe ga-

seoso contenido en atmósfera limitada. Una de las tierras cuyo tenor inicial por kilogramo es de 0^{gr}974, ha adquirido en dos meses 8,6 por ciento de ázoe; la segunda tierra, que contenía al principio 1^{gr}655 de ázoe, combinado, ha ganado 2,2 por ciento en el mismo tiempo; la tercera cuyo tenor inicial era de 1^{gr}744, ha ganado 4,3 por ciento. Las experiencias hechas al aire libre, bajo abrigo, han dado respectivamente ganancias de 7,3; 5, 8 y 6 por ciento; finalmente al aire libre y sin abrigo, las ganancias han sido, 8, 9,1, 1,7 por ciento.

Estas mismas tierras, mezcladas con infusión procedente del contenido de tubérculos radicales de leguminosas, no fijan el ázoe en cantidad mayor que en las condiciones normales. Los bacterios encerrados en estos tubérculos, no parecen susceptibles de comunicar al suelo la propiedad fijadora. Sin embargo, se trata evidentemente de un fenómeno de intervención microbiana, pues que él no se manifiesta cuando las tierras han sido previamente esterilizadas por una permanencia de media hora á 120 grados.

El mismo Berthelot (1) expone una de las tierras precedentemente estudiadas á la acción del aire, bajo un cobertizo lateralmente abierto y adiciona un poco de carbonato de cal. Al cabo de seis meses, la dosis de amoníaco libre y las sales amoniacaes solubles en

(1) *Ann. chim. et phis.*, serie 6^a, t. XVI, p. 484.

agua no habían aumentado de una manera sensible lo mismo que la proporción de amoníaco susceptible de ser extraída por acción de los ácidos diluídos.

El mismo resultado se ha observado en una experiencia análoga por la forma y que ha durado 18 meses.

Esto demuestra que la absorción del ázoe amoniacal por el suelo es un fenómeno extremadamente restringido y que contrariamente al concepto antiguo, la ganancia de ázoe por esta vía es insignificante.

Berthelot, observando desde sus primeras experiencias que la fijación de ázoe por la tierra no cubierta de vegetación, sólo se efectúa cuando se cumplen las condiciones requeridas por la vitalidad de los microorganismos que la pueblan, concluye que dicha fijación verificase por su intermedio, sin especificar una especie determinada y haciéndola por lo contrario extensiva á las algas, mucedineas, infusorios, etc., que normalmente se encuentran en el suelo.

Más adelante Winogradsky, Schloesingh, Laurent y otros, determinan la diferente acción que corresponde á cada uno de estos organismos.

Dejando de lado un gran número de especies halladas con posterioridad á los estudios de Winogradsky y Beijerinck, capaces de fijar pequeñas cantidades de ázoe, deben ser considerados como agentes específicos de esa función los microbios del tipo *Clostridium* y del tipo *Azotobácter* descubiertos respectivamente por los dos autores mencionados.

Para conseguir su aislamiento, ellos han partido del principio que, si en un suelo dado existen microorganismos capaces de fijar el ázoe libre, es evidente que éstos han de poder desarrollarse en un medio privado de este elemento, inversamente á los otros microorganismos del suelo, que careciendo de esta propiedad, no podrán hacerlo.

Sembrando una dilución de tierra en un medio provisto de hidratos de carbono, necesario para producir la energía imprescindible al funcionamiento vital de los bacterios, Winogradsky logró aislar un agente anaerobio: *Clostridium Pasteurianum*, que se cultiva perfectamente en el vacío sobre papas, dando aun mejor desarrollo en agar-agar y nulo en gelatina.

Beijerink, por un procedimiento análogo, obtuvo cultivos puros de dos microbios aerobios capaces de fijar el ázoe atmosférico. El *azotobacter chroococum* y el *azotobacter agilis*.

Estos últimos se desarrollan mejor en medios provistos de pequeñas cantidades de ázoe, pero son destruídas por otras especies si el medio es rico en dichas substancias.

Según Winogradsky (1), el *Clostridium Pasteurianum* puede utilizar para su nutrición la glucosa, sacarosa levulosa, dextrina y otros hidratos de carbono. La combustión de estos compuestos, provee el or-

(1) *C. R.*, t. CXVI, p. 1385 y t. 118, p. 353.

ganismo del calor necesario para la asimilación del ázoe del aire, siendo en consecuencia proporcional, dentro de ciertos límites la cantidad de ázoe fijado con la cantidad de azúcar quemado. El autor ha podido constatar que á la combustión de un gramo de azúcar, corresponde una ganancia de 1,6 miligramos de ázoe, quedando en el medio como residuo de dicha combustión, ácido acético, butírico, láctico, alcoholes superiores, etc.

En estado joven este organismo se presenta bajo forma de bastoncillos cilíndricos, rectos, de uno á dos milímetros de grueso, con una longitud doble ó triple. En este estado se multiplica rápidamente para hacerse después estacionario adoptando entonces la verdadera forma de *Clostridium*, es decir, muy voluminoso hacia el centro donde llega á duplicar su diámetro, adelgazándose en los extremos. En este estado, se colorea bien por el yodo y presenta en uno de sus extremos ciertas granulaciones que se transforman progresivamente en un esporo. Éste, llegado á su edad adulta, ocupa el centro y queda rodeado por una cápsula gelatinosa que mide 1,5 á 1,7 milímetros por 1,3 á 1,5.

El *Clostridium P.* es un anaerobio verdadero que puede vivir normalmente y durante un número indefinido de generaciones en un medio aereado, siempre que se halle protegido de la acción del oxígeno, por la asociación con especies aerobias.

Esta acción es generalmente ejercida por el *Penicillium glaucum* ó el *Aspergillus nigra*, pero no siendo específica de estos hongos, puede ser desempeñada por toda otra especie.

En cuanto al azotobácter, Beijerinck ha comprobado que también requiere para su nutrición carbonada la presencia de estos compuestos, siéndole especialmente favorable la manita, glucosa, levulosa, maltosa, galactosa y además los productos de degradación de los mismos: butiratos, lactatos, succinatos, acetatos, etc.

Para su nutrición mineral, ambas especies requieren la presencia de cal y ácido fosfórico (Gerlach y Bogel).

Las culturas del azotobácter son relativamente fáciles de obtener. Empléase como medio nutritivo:

Agua destilada.	100	c. c.
Manita.	2	gr.
Fostato potásico..	0.02	gr.
Agar-agar . .	2	gr.

En el que se siembra dilución de tierra de jardín.

Después de 24 horas á 30 grados centígrados el azotobácter se muestra bajo forma de pequeñas colonias semejanado engrudo de almidón.

Los caracteres diferenciales de la especie han sido precisados por Von Freundenreich.

Son gruesos *Croccus* de 3 á 5 milímetros de diáme-

tro pudiendo tomar una forma alargada (3 á 6 milímetros por 2 á 3 milímetros) y que encierran de 3 á 4 corpúsculos refringentes ya señalados por Beijerinck.

Esta apariencia cocciforme se halla sobre todo en las culturas jóvenes, donde, por otra parte, se observa un pequeño número de individuos que se transportan por la acción de una pestaña vibrátil. En las viejas membranas, se hallan los micrococos de dimensiones variables, comunmente agrupados en sarcinas y poseyendo paredes mucilaginosas; estas formas adultas son pardas ó negras.

La fijación del ázoe por el azotobácter, se hace en la proporción de 6 á 8 miligramos por cada gramo de manita quemada.

Tanto el tipo clostrídico como el azotobácter son igualmente abundantes en los suelos, aun en aquellos de composición más variada habiendo sido hallados en diversas latitudes y hasta una profundidad de 0,80 centímetros.

Han sido también hallados por Benecke, Keutner y Keding en las aguas de los mares orientales, en el mar del norte, océano Indico, etc. Parecen ser sin embargo más abundantes (Fischer) en los terrenos ricos en cal, siendo proporcional entonces su distribución con la basicidad del suelo (Christensen).

Á pesar de estar bien comprobada hoy la acción de estos microorganismos sobre el ázoe libre, no ha sido

posible obtener de ellos una aplicación práctica (1) en beneficio de la agricultura.

La relación entre el ázoe fijado y los hidratos de carbono quemados, representa un serio obstáculo para el aumento de estos bacterios en el suelo, cuyo funcionamiento útil exige para serlo, fuertes cantidades de abonos carbonados. La fijación del ázoe correspondiente á un quintal de sal nitro exigiría catorce toneladas de azúcar, para la nutrición de los bacterios.

Por otra parte, la agregación de hidratos de carbono al suelo no podría hacerse sin modificar fundamentalmente la flora bacteriana del mismo, lo cual podría conducir á pérdidas de mayor consideración que las cantidades de ázoe absorbidas.

Pero si la aplicación práctica por medio de inoculaciones directas al suelo no satisface económicamente, no puede negarse la acción eficaz de estos bacterios en relación con su distribución natural y con los variados factores que los acompañan, favoreciendo y complementando dicha acción.

Así, para determinadas condiciones es evidente que ha de producirse en el suelo un verdadero estado de equilibrio para la flora microbiana dependiente de las propiedades físicas, composición química y sobre todo

(1) El empleo de la alinita preparada por Stoklasa cultivando en gran escala el *bacillus megaterium*, no ha respondido á lo que se esperaba. (DEHERAIN, *loc. cit.*)

de la riqueza en substancias azoadas é hidratos de carbono.

Si la adición directa de microbios fijadores, por los múltiples inconvenientes que ofrece no permite cifrar mayores esperanzas para la agricultura, la modificación de las condiciones citadas con el propósito de favorecer la multiplicación de las especies más útiles, valiéndose para ello de medios sencillos y al alcance de los agricultores, permitirá utilizar en las mejores condiciones las propiedades de estos agentes fertilizantes del suelo.

Fijación del ázoe por la alinita. — Con este nombre, el agrónomo Carón de Ellembach, entregó en 1897 al comercio un abono biológico constituido por un cultivo puro de una bacteriácea que él mismo denominó: *Bacillus Ellembachensis* a., que tenía — según él — la propiedad de fijar el ázoe del aire en beneficio de los cereales.

Numerosos autores ensayaron la identificación de dicho bacterio, llegando Stoklasa á identificarlo con el *Bacillus Megaterium*.

Por su parte, el mismo Stoklasa y luego Laska y Vuchaset (1) comprueban que el *B. Megaterium* es capaz de fijar ázoe.

Aun siendo un bacterio aerobio y desnitrificante, posee en alto grado la propiedad de solubilizar enér-

(1) LUTZ, *Microorganismos fijadores del ázoe*, p. 58.

gicamente el ázoe de las materias orgánicas. Esta acción se manifiesta con gran energía en presencia de las materias orgánicas de la turba, llevándolas rápidamente al estado asimilable, con lo que tiende á facilitar la alimentación de las plantas y por consiguiente á aumentar las cosechas.

Los resultados obtenidos por numerosos experimentadores, no concuerdan desgraciadamente con los citados.

Según Frank el bacterio de la alinita destruye los nitratos pero no fija el ázoe. Wagner, cultivando cebada y avena en suelos deprovistos de ázoe y en presencia de fuertes dosis de alinita, ha podido constatar todos los caracteres que el mismo ha descrito bajo el nombre de hambre de ázoe.

Stutzer y Hortler y Lank concluyen que el bacilo de Carón se comporta como un agente de la putrefacción en el sentido que descompone los albuminoides, transformándolos en peptonas, aminas, amoníaco, y aun ázoe libre, pero que es incapaz de originar nitritos ó nitratos. Los mismos resultados obtiene Krüger, Schneidewind, Dherain (1).

Grandeau (2) ha podido notar algunas ventajas con el empleo de la alinita usándola en la forma siguiente: impregnando los granos de trigo, cebada y

(1) *Ann. agron.*, t. XXIV, p. 154.

(2) *Ann. agron.*, t. XXIV, p. 171, y t. XXVI, p. 496.

avena en cultivos de alinita y sembrándolos en tierras muy ricas en materias orgánicas, han dado plantas más vigorosas que las de las mismas semillas no sometidas al tratamiento. Pero el mismo autor no ha comprobado ventaja ninguna operando en un buen suelo, de una riqueza media en substancias orgánicas.

Estos resultados más ó menos infructuosos justifican el juicio de Gerlach á propósito del abono que nos ocupa, pronunciado en el Congreso de naturalistas en Berlín en el año 1898 « la alinita no ha respondido á las esperanzas que había hecho concebir ».

Se puede también preguntar, dice Deherain (1) si es por la introducción de nuevas dosis de fermentos que se podrá alcanzar á aumentar el stock considerable de ázoe que encierran ya nuestras tierras cultivadas. Parecería que los fermentos estuvieran repartidos en todas partes, pero no pululan sino donde encuentran las condiciones de alimentación y de humedad favorables. Es sobre todo favoreciendo estas condiciones, más bien que agregando otros fermentos, que puede esperarse mejorar la fertilidad.

b) Microbios de las nudosidades de las leguminosas.— En 1687, había observado Malpighi los tubérculos ó nudosidades comunes á las raíces de las leguminosas, las que fueron por mucho tiempo consideradas como concrecencias normales ó patológicas de los tejidos

(1) DEHERAIN, *loc. cit.*

radiculares de estas plantas. Hellriegel y Wilfarth demostraron el origen, constitución y papel fisiológico que ellas desempeñan en lo que concierne á la nutrición azoada.

La absorción del ázoe por las plantas había sido presentida con mucha anterioridad. En 1771 Priestley afirmaba que algunas plantas tenían la particularidad de ejercer dicha función y poco tiempo después Ingenhouse hacía la extensiva á todas (1).

Estas afirmaciones, combatidas primero por Saussure, fueron parcialmente confirmadas en 1834 por Boussingault, quien fundándose en numerosas experiencias, llegó á la conclusión que los vegetales pueden absorber de la atmósfera, carbono, oxígeno, hidrógeno y que algunos del tipo de las leguminosas absorben además ázoe.

Más tarde, sin embargo, el mismo Boussingault, á raíz de nuevas experiencias, Ville, Lanes y Gilbert (2), Grandeaux, concluyen que ningún vegetal

(1) *Recherches chimiques sur la végétation.*

(2) Lannes, Gilbert y Pugh llegan á las siguientes conclusiones. (*Philosophical transaction*, 1861). «El rendimiento en ázoe de las plantas de cultura, recogidas en una superficie y en un tiempo determinados, no pueden explicarse de un modo satisfactorio si sólo se considera el ázoe combinado suministrado periódicamente y en cantidades conocidas y esto sobre todo sucede en el caso de las leguminosas.

Los resultados de las numerosas experiencias realizadas para saber si las plantas asimilan el ázoe libre, son muy contradictorias. En sus experiencias personales, los autores han reconocido que las

puede fijar el ázoe libre, atribuyendo las afirmaciones contrarias anteriores, á deficiencias en la experimentación (1).

En 1881 Hellriegel y Wilfarth vuelven sobre el asunto, afirmando categóricamente que las leguminosas tienen la propiedad de fijar el ázoe atmosférico.

Sus conclusiones, pueden resumirse así :

1^a Las leguminosas difieren por su modo de nutrición relativa al ázoe, fundamentalmente de las gramináceas ;

2^a Las gramináceas no pueden satisfacer su necesidad de ázoe, sino mediante las combinaciones asimilables contenidas en el suelo, guardando en consecuencia relación su desarrollo con la cantidad de dicho elemento que se le suministra ;

3^a Además del ázoe del suelo, las leguminosas tie-

condiciones de vegetación en dispositivos especiales, concuerdan el desarrollo regular de los cereales, pero que no sucede lo mismo con las leguminosas.

En las condiciones experimentales realizadas, no es posible que una pérdida de ázoe se haya producido á consecuencia del desprendimiento de ázoe libre en la descomposición de la materia orgánica ó de las substancias azoadas que constituyen las plantas en vegetación.

En las pruebas realizadas sobre las gramináceas y variando las condiciones de las mismas, nunca se ha comprobado la asimilación de ázoe libre.

En los ensayos sobre leguminosas, los resultados fueron más satisfactorios, pero tampoco han indicado dicha asimilación.

Los datos recogidos con otras plantas, concuerdan todos al punto de vista de la no fijación del ázoe.

(1) GRANDEAUX, *Cours d'agriculture*.

nen á su servicio una segunda fuente de donde ellas pueden tomar de la manera más abundante todo aquel que su alimentación exige ó completar lo que le falta, cuando la primera fuente es insuficiente ;

4^a Esta segunda fuente, es el ázoe libre de la atmósfera ;

5^a Las leguminosas no poseen por si mismas la facultad de asimilar el ázoe libre, siendo para ello necesario la acción vital de ciertos microorganismos del suelo ;

6^a Para que el ázoe libre pueda servir á las leguminosas para su nutrición, no basta la presencia de microorganismos del suelo ; es necesario que algunos de ellos entren en relaciones simbióticas con las plantas ;

7^a Los tubérculos radicados no deben ser considerados como simples receptáculos de sustancias albuminoideas. Ellos guardan una relación de causa á efecto, con la asimilación del ázoe libre.

Precisando fenómenos observados (1) los mismos autores dicen que inoculando el suelo con una dilución de tierra, no puede atribuirse la ganancia en ázoe constatada en las leguminosas á la proporción de nitratos contenidos en la tierra adicionada, por lo que debe admitirse que todo el efecto de esta dilu-

(1) HELLRIEGEL et WILLFARD, *Recherches sur la alimentation des graminacées et des legumineuses.*

ción debe ser atribuído á los microorganismos que ella encierra. En apoyo de esta opinión dan las razones siguientes: *a)* Una mínima cantidad de dilución de tierra es suficiente para producir un efecto completo; *b)* La dilución, mantenida la ebullición durante media hora, pierde totalmente la propiedad fertilizante; *c)* La dilución de tierra de diversas procedencias, actúa diversamente sobre gran número de leguminosas.

Por otra parte, la relación entre el desarrollo de los tubérculos y la dilución de tierra, puede ser puesta fácilmente en evidencia por medio de la siguiente experiencia:

Se toma en una cultura de arvejas un pie que tenga raíces muy divergentes, y se cultiva de modo que la raíz esté distribuída en dos vasos situados uno al lado del otro. En ambos se ha puesto una tierra esterilizada, pero á uno de ellos se adiciona una dilución de tierra fértil. Sin ninguna excepción aparecerán numerosos tubérculos en la raíz del vaso que tenga la dilución mientras que no aparecerán en el segundo.

El descubrimiento de Hellriegel y Willfard, tan importante bajo el punto de vista de sus aplicaciones posibles, motivó una serie de nuevas experiencias tendientes á comprobarlo.

Destácanse entre ellos por su importancia, las realizadas por Schloesing (h.) y Laurent, quienes siguien-

do un procedimiento indirecto fueron los primeros en confirmarlo.

Cultivaron arvejas en un suelo sin ázoe, previamente esterilizado y en presencia de una atmósfera limitada. Con objeto de producir el desarrollo de nudosidades, agregaron al suelo una dilución de tierra en la que se habían cultivado leguminosas. Las cantidades de ázoe de la semilla y de la atmósfera, eran determinadas de antemano.

Es una especie de alargadera de vidrio cilíndrico, introdujeron gres calcinada embebida en una solución nutritiva mineral exenta de ázoe. La alargadera es esterilizada con su arena y se toman todas las precauciones para evitar el acceso del aire. Se siembra en este medio tres semillas de alberjas que se riegan con un poco de agua pura en la que se han macerado algunas nudosidades frescas de raíz de alberja y habas de tierra fértil, colocándose la alargadera al sol en una ventana.

Por dos tubuladuras laterales se ponen en comunicación la alargadera con un dispositivo comprendiendo una trompa de mercurio y un tubo de bohemia lleno de torneaduras de cobre, colocado sobre una parrilla de gas.

Se puede así tomar, por medio de la trompa, pequeñas muestras de la atmósfera de la alargadera y analizarlas sin ninguna pérdida de ázoe. Cuando el análisis demuestra la necesidad, se introduce en el aparato

anhidrido carbónico ó bien se absorbe oxígeno, calentando la columna de cobre y haciendo circular el gas, siempre mediante la bomba.

Cuando los granos han sido sembrados, se hace el vacío perfecto en todo el sistema, luego se introduce nuevamente oxígeno (20 á 25 %) anhidrido carbónico (6 á 9 %), ázoe (60 á 70 %) siendo este último medido exactamente con un volumenómetro.

Los análisis posteriores al desarrollo de las plantas, demostraron que la atmósfera había perdido una cierta cantidad de ázoe, cantidad que fué hallada como aumento en la planta y en el suelo. Un cultivo hecho en las mismas condiciones, pero sin agregar la dilución de tierra, no ocasiona ninguna disminución del ázoe atmosférico y en consecuencia, ninguna ganancia ni en la planta ni en el suelo (1).

Breal (2) por su parte, inoculando la raíz de una leguminosa (Lupino) hecha germinar en el agua, con aguja previamente introducida en un tubérculo de alfalfa, obtuvo plantas perfectamente desarrolladas y provistas de tubérculos, semejantes á las producidas por aquellas semillas testigos hechas germinar en un suelo conveniente. Comprobó además que aquellas plantas que se habían desarrollado en un medio aséptico sin ser inoculadas, no dieron origen á la forma-

(1) *C. R.*, t. III, p. 750.

(2) DEHERAIN, *loc. cit.*

ción de tubérculos, creciendo débiles con hojas pequeñas y pálidas.

Beijerink y Prasmousky han hecho las mismas inoculaciones con bacterios de las nudosidades obtenidas por medio de cultivos artificiales, llegando á los mismos resultados (1).

Origen y estructura de las nudosidades. — Los tubérculos radicales son excrecencias carnosas de aspecto bastante variable. Sin embargo, su forma que puede variar mucho en especies vegetales próximas, es bastante constante en los representantes de una misma especie.

Son simples, esféricos (*Phaseolus*), oboides (trébol), elípticos ó más ó menos cónicos ó irregulares en otras especies, en alguna de las cuales puede hasta tomar un aspecto ramificado ó coraloide que Trehirsch atribuye á un tabicamiento del meristema generador que se produce una vez terminada la evolución del tubérculo primitivo.

El color de los tubérculos es el mismo que el de las raíces. Blanquecino en su origen, se oscurece á medida que las capas exteriores se suberifican. El suber persiste algún tiempo después de la destrucción de los tubérculos. Villemin cita tubérculos de colores variados entre los que se encontrarían algunos de color rojoladrillo y de aspecto farináceo. Su presencia

(1) *Ann. sc. agron.*, I, p. 121.

parece ser general en todas las leguminosas, en condiciones normales de desarrollo.

En cuanto á su origen, parece ser debido á la atracción que los pelos radiculares, ricos en hidratos de carbono, ejercen sobre los bacterios normalmente contenidos en el suelo, que se propagan en seguida á las células de la corteza, para formar allí pequeños tubérculos. Á medida que el tamaño de la nudosidad es mayor, aumenta también su riqueza en ázoe al mismo tiempo que los bacterios van haciéndose más ó menos polimorfos.

La presencia de potasa y ácido fosfórico contribuye á la formación del mayor número de tubérculos, mientras que la cal favorece su mayor desarrollo. Las sales de amonio (1) así como los nitratos alcalinos (2) dificultan en cambio su formación.

La temperatura óptima para esta clase de bacterios es entre 10 y 40 grados C. Un excelente medio nutritivo es el caldo de leguminosas adicionado con sacarosa y cloruro de sodio. El medio sólido se obtiene por la agregación de 1,3 por ciento de agar-agar.

c) Simbiosis de algas y bacterios. — Esta vía de entrada al suelo de ázoe atmosférico, fué por mucho tiempo atribuída á la acción exclusiva de los hongos

(1) LAURENT, *C. R.*, t. CXXXIII, p. 1241.

(2) MARCHAL, *C. R.*, t. CXXXIII, p. 1032.

(*P. glaucum*, *A. Niger*) ó de las algas. Esta opinión pareció confirmarse por una experiencia de Schloesing (h.) y Laurent análoga á la ya citada hecha con las leguminosas.

Los mencionados autores (1) constatan que ciertas algas (*Conferva*, *Oscilaria*, *Nitzchia*) pueden determinar en el suelo donde ellas crecen, ganancias de ázoe, debiendo en consecuencia considerarse como fijadoras de este elemento.

En otras experiencias, los mismos autores (2) utilizan una tierra natural provista en la mejor forma posible de los diversos microorganismos comunes á ellas. Cultivan en ella topinambú, avena y arvejas como testigos; colocan además en las mismas condiciones tres suelos de cultura completamente semejantes.

En una primera serie de ensayos, la superficie de todos los suelos se cubre en grado variable de plantas verdes inferiores, pero para dos de los testigos el desarrollo ha sido muy débil. Ahora, en todas las experiencias, salvo estas dos, se ha notado una absorción de ázoe gaseoso; en una de ellas, sin plantas superiores, el suelo se ha cubierto de una cantidad de algas y se ha podido notar que la totalidad del ázoe fijado se encuentra en estos vegetales.

En una segunda serie de ensayos, se ha llegado á

(1) *C. R.*, t. CXCH, p. 776.

(2) *C. R.*, t. CXV, p. 732.

evitar la producción de estas plantas inferiores, recubriendo los suelos sembrados y contaminados con una capa de arena cuarzosa calcinada. Desde este momento no se ha notado fijación.

Por tercera vez (1) vuelven los autores actuando no ya, sobre terrenos pobres sino que sobre una buena tierra natural, en la que introducen una dosis crecida de nitrato de potasio.

Esfuézanse esta vez en obtener cultivos de algas menos complejas que en las experiencias precedentes y más puros.

En las dos primeras, se ha hecho uso de la tierra provista de nitratos y sembrada con algunos centímetros cúbicos de dilución de cinco á seis buenas tierras de jardín.

En estas tierras se ha echado principalmente una mezcla de *Nostoc punctiforme* y *Nostoc minutum*. Hállanse además algunas amas incoloras formadas por restos de *Nostoc* invadido por bacterios y también algunas colonias de *Cylindrospermum majus*. Después de cinco meses se ha comprobado una adquisición de ázoe.

Experimentando sobre arena cuarzosa calcinada, privada de nitratos y adicionada de una traza de dilución de tierra, pudieron comprobar en una mezcla, el desarrollo casi exclusivo de *N. punctiforme*, con

(1) *Ann. inst. Pasteur*, t. VI, p. 65.

algunas amas de células muertas acompañadas de bacterideas, mientras que en otras además del *N. punctiforme* halláronse colonias de *Pharmidium papiraceum* y en menor cantidad de *N. minutum*. En ambos casos, hubo ganancia de ázoe.

El hecho de que los cultivos en varios casos no fueran puros, ha dejado subsistente la duda de que la ganancia comprobada, no fuera debida á la exclusiva acción de estos organismos, sino al resultado de la simbiosis de algas y bacterios.

Por otra parte, una tierra sembrada por los mismos autores con una cultura casi pura de *Microcoleus vaginatus* acompañado de algas oscilarias no ha fijado ázoe.

Gautier y Drouin (1) han constatado que algas puras no pueden desarrollarse en medios privados de ázoe, y que por el contrario ésto se produce cuando aquellas están en presencia de bacterios.

Kossowitsch (2) ha logrado cultivos puros de *Chorella vulgaris* y con él ha verificado también, que las algas no se desarrollan en la ausencia de nitratos aun estando en presencia de abundantes cantidades de hidratos de carbono. En ningún caso hay fijación de ázoe, lo que demostraría que son los microbios asociados á las algas quienes dan aquel resultado.

(1) *C. R.*, t. CXIII.

(2) *Bot. Zeit.*, t. III.

Beijerinck atribuye, sin embargo, á ciertas cianofíceas la propiedad de fijar directamente el ázoe libre, siempre que en el suelo no haya substancias que lo contengan; en este caso, aparecen otras especies (clorofíceas), las cuales subsisten hasta la conclusión de este elemento, para dar recién lugar al desarrollo de las primeras.

Frank atribuye la fijación del ázoe libre á algas microscópicas, distribuídas en gran número en las capas superiores del suelo á quien se lo ceden después de su muerte. En sus experiencias, estas algas estaban representadas por dos oxilarias: *Chlorococcus humicole* y *Pleurococcus* acompañados de algunas protonemas de mucíneas. Al cabo de ciento cuarenta días, pudo notar que un peso de tierra de 9950 gramos ganaba de 25,27 á 36,0 por ciento de ázoe, según la calidad del suelo. Operando sobre suelos esterilizados por la lixiviación con agua hirviendo, se observa que ni la porosidad del suelo, ni su aereación tienen á la temperatura ordinaria, la propiedad de producir por sí mismas, la fijación del ázoe elemental.

De todo lo anterior se desprende el estado dudoso en que se encuentra la asimilación del ázoe libre por las algas, siendo sin embargo todas las probabilidades en favor de una concurrencia simbiótica entre estos organismos y los bacterios. Los primeros capaces de fijar por la clorófila el carbono necesario á la elabora-

ción de los carbohidratos que han de proveer á los segundos de la energía indispensable á la fijación y organización del ázoe.

d) Fijación del ázoe por los vegetales en general.
— La acción de los bacterios de las leguminosas, que parece hoy perfectamente comprobada, ha sido sin embargo objetada por Bonema, quien atribuye el fenómeno de la oxidación del ázoe libre al hierro del suelo precipitado al estado de hidrato férrico por las secreciones alcalinas de los bacterios y en segundo lugar por Jamieson que niega la fijación del ázoe por dichos bacterios, haciendo, por otra parte, común á todas las plantas la propiedad de absorber dicho elemento. Esta función la ejercerían los vegetales mediante órganos especiales que él denomina « fijadores del ázoe ».

La primera objeción, no puede ser admitida porque la escasa afinidad inicial del ázoe, no podría dar origen á fenómenos tan intensos como los que en realidad se comprueban, aparte de que estas reacciones químicas, exigen para producirse una cantidad de energía superior á la que el suelo puede normalmente suministrar.

En cuanto á la segunda, sin ser perfectamente concluyentes las experiencias en que se basa el autor adquiere relativo interés en razón de las comprobaciones hechas recientemente por los agrónomos húngaros Zemplen y Roth, quienes, fundados en nuevas

y numerosas experiencias, llegan á las mismas conclusiones que Jamieson.

Teoría de Jamieson. — Para llegar á la afirmación de que los bacterios de las leguminosas no desempeñan ningún rol en la fijación del ázoe, negando aun su existencia, cita Jamieson una serie de autores cuyas opiniones efectivamente concuerdan con su teoría, aunque no así con otras numerosas experiencias algunas de las cuales dejo citadas en párrafos anteriores.

Así, niega la presencia de bacterios en los tubérculos de las raíces de las luminosas, fundado en las primeras experiencias de Vuillemin, en las que este autor cree haber comprobado no ser dichas nudosidades otra cosa que hongos superpuestos al epiblema de la raíz. Este hongo, aislado por él y estudiado en cuanto á su composición general y modo de desarrollo se refiere, resulta perfectamente semejante á los hongos en general y lo denomina *Clodochytrium tubercolorum*.

Conviene recordar que hoy el mismo Vuillemin admite la presencia de bacterios en las nudosidades y del *Clodochytrium* como un organismo superpuesto á aquélla (1).

Cita también Jamieson la opinión de Frank según la cual las manchas consideradas como bacterios, no

(1) HENRY, *Ann. agron.*, t. 1.

son sino restos de células procedentes de la desorganización de los tejidos de la raíz y los tubérculos formados por micorhisas debidas á la simbiosis de ciertos órganos con el vegetal.

La primera parte de esta afirmación, es inconsistente como lo demuestran los cultivos obtenidos á partir de estos bacterios de los tubérculos, que no podrían producirse con simples restos de células. La segunda parte es parcialmente confirmada por las últimas experiencias de Vuillemin citadas, según las cuales puede admitirse la presencia de hongos superpuestos á los tubérculos, sin que ello excluya su formación microbiana.

Pero el mismo Frank refiriéndose á la fijación del ázoe concluye :

1° Que las algas fijan ázoe;

2° Que la colza y la avena parecen enriquecerse en ázoe aunque muy débilmente;

3° Que las leguminosas enriquecen en ázoe el suelo en mayor grado, por un procedimiento inexplicable.

Es decir, una conclusión afirmativa sobre un punto que aun no ha podido dilucidarse claramente, como es la fijación del ázoe por las algas; otra dudosa y la tercera que sin negar el fenómeno, niega la causa conocida que lo produce sin indicar empero una más plausible, constituyen los fundamentos en que Jamieson se funda para oponerse á las importantes con-

clusiones de Hellriegel, Willfard, Schloesing (h.), Laurent, Breal y otros.

Negada la intervención de los bacterios en la fijación del ázoe, Jamieson, fundado en sus experiencias, afirma que: las plantas en general absorben directamente el ázoe del aire y lo transforman en albúmina. La cantidad absorbida y fijada, varía con el número, la naturaleza de los órganos especiales que le permiten ejercer esta función y con las condiciones de vegetación que la favorecen. Dichos órganos están constituidos por las vellocidades de las hojas, cuyas verdaderas funciones habrían pasado desapercibidas hasta hoy, así como por escamas pequeñas ó adelgazamientos del tejido epidérmico más ó menos frecuentes en las partes nuevas de las plantas.

Estos órganos, llegados á su completo desarrollo empezarían á producir albúmina hasta llenarse en cuyo momento, ella será distribuída á los tejidos adyacentes quedando vacíos y entonces, cumplida su misión, desaparecen.

Comprueba la formación de albúmina mediante una serie de reacciones microquímicas en las que utiliza como reactivos la solución de iodo, el sulfato cúprico alcalino y el nitrato mercúrico.

Experiencias de Zemplen y Roth (1). — Zemplen y

(1) *Adotoc. az. ordei. fak. Nitrogen. Felret.* Trad. *Ann. scien. agron.* 1909.

Roth amplían los trabajos de Jamieson realizándolos sobre mayor número de vegetales, pero llevándolos á cabo en la misma forma. Es decir, que por lo menos en lo que se refiere á las leguminosas, no se ha excluído la acción de los bacterios.

Ellos no coinciden en absoluto con el autor de la teoría, á cuyo respecto afirman « que las dos teorías no se excluyen absolutamente, siendo posible y aun probable que las plantas pueden fijar el ázoe elemental á la vez de la atmósfera y del suelo ».

En cuanto á los órganos fijadores, creen que las plantas estudiadas, poseen órganos análogos á los hallados por Jamieson, que sirven probablemente á diversos usos, pero que parecen destinados en primer lugar á la elaboración del ázoe tomado directamente del aire.

Como complemento del estudio anatómico y microquímico investigan la ganancia en ázoe experimentada por la planta.

No puede dudarse de que las reacciones obtenidas por el empleo de los reactivos indicados, revelan la presencia de sustancias proteicas en los llamados órganos fijadores, sin que ello importe admitir, que tales sustancias han sido elaboradas ahí á expensas del ázoe libre.

Tratándose de tejidos nuevos, es decir, formados por células en plena evolución, lógico es suponer en ellos la presencia de abundantes sustancias albumi-

noideas, las que en presencia de los reactivos, originan las coloraciones típicas, que pueden ser fácilmente observadas gracias al escaso espesor de las membranas de las células jóvenes.

Si es difícil admitir que en dichos órganos se formen los albuminoides á partir del ázoe atmosférico, por lo que ello se opone á los resultados obtenidos en serias y numerosas experiencias, tales como son las de Schloesing (h.) y Laurent, no habría en cambio contradicción entre lo comprobado por Zemplen y Roth y la posibilidad de que la reacción positiva obtenida por ellos, fuera debida al resultado de una síntesis parcial producida á partir de los compuestos amidados.

Estos cuerpos azoados, caracterizados por su fácil difusión á través de las membranas celulares, han podido llegar precisamente á las partes extremas y nuevas del vegetal, en las cuales la actividad vital de las nuevas células exige abundante cantidad de albuminoides como principal alimento histogénico.

En resumen, las albúminas halladas en las partes nuevas del vegetal no serían formadas á expensas del ázoe libre, sino que por la recombinación de los compuestos amidados los cuales no reaccionando en presencia de los reactivos empleados, sólo se revelan cuando, combinándose, reconstruyen la molécula de aquellos compuestos.

Si con respecto á la interpretación de las reacciones observadas, es posible una seria disención, igual cosa sucede en lo relativo á la forma en que se han practicado las experiencias que informan esta nueva teoría.

Experimentando sobre plantas cultivadas en contacto con la atmósfera y con el suelo, cuya composición puede ser sumamente variada, las ganancias halladas pueden imputarse, á lo menos en parte, al amoníaco ó á los compuestos oxigenados de la atmósfera ó del suelo y á las condiciones particulares de luz, aereación, edad, etc. (1).

Últimamente, Kovesi ha demostrado, cultivando una serie de vegetales en una atmósfera privada de ázoe y con arena esterilizada y lavada, que los pelos de las plantas mismas descritas por Zemplen y Roth en tales condiciones, dan del mismo modo que cuando lo hacen al aire libre las reacciones propias de los albuminoides (2).

EXPERIENCIAS DEL AUTOR

En una serie de experiencias practicadas en el transcurso del corriente año, he podido comprobar la inconsistencia de algunas de las afirmaciones en que

(1) HENRY, *Les sols forestiers*.

(2) *C. R.*, t. CXLIX, p. 56.

Jamieson funda su teoría, llevándome, por otra parte, al convencimiento de que las leguminosas tienen la propiedad de fijar el ázoe atmosférico, siempre que ellas estén provistas en sus raíces de las nudosidades típicas y que éstas nudosidades á su vez, están constituidas por una agrupación de células parenquimáticas, encerrando numerosos microorganismos susceptibles de ser cultivados en medios adecuados.

a) Estructura de las nudosidades. — Con objeto de estudiar su estructura y constatar su contenido, he practicado cortes microtómicos que convenientemente coloreados me han permitido observar la constitución anatómica de estos órganos.

Los tubérculos de raíces de habas, recogidos en pleno desarrollo de la planta, previamente lavados con agua, han sido fijados con el líquido cromo-aceto-ósico de Fleming durante veinticuatro horas y después de lavados nuevamente y deshidratados, han sido incluídos en parafina.

Los cortes obtenidos, fijados con albúmina de Mayer, privados de parafina han sido coloreados, deshidratados y finalmente incluídos en bálsamo del Canadá.

De los varios colorantes empleados, los mejores resultados han sido obtenidos con la fuscina y el fenato de thionina. Este último permite hacer muy bien la diferenciación de los elementos anatómicos del tejido, lo mismo que la de los bacterios en él conte-

nidos. Para fijar el colorante he empleado la solución de tanino al 5 por ciento.

Otro procedimiento, ha consistido en colorear directamente los cortes con violeta de Dahlia, lo que pone en evidencia las células parenquimáticas, que encierran los bacteroides.

El aspecto de los cortes (oc. 4 obj. imm.) es el de un tejido parenquimático laxo, con grandes espacios intercelulares, con núcleos esféricos muy aparentes. El protoplasma celular, aparece teñido de un color celeste mientras que los núcleos son amarillentos.

Cuando jóvenes, los tubérculos son enteramente meristemáticos y llenos de una materia albuminoidea densa; al estado adulto en cambio, presentan dos categorías de células bien diferenciadas. Las primeras, ocupan la parte central, son relativamente grandes y aparecen llenas de un contenido denso y granuloso. Á su alrededor, una capa de células más ó menos gruesa forma una especie de corteza, cuyos corpúsculos son más pequeños é hialinos. Comprendidos entre estas dos capas, hállanse hacecillos liberoñosos, probablemente en relación con los mismos tejidos nutritivos de la planta.

Como he dicho antes, la capa exterior de la nudosidad sufre la evolución propia del órgano vegetal en que crece, llegando en el último período de su vida á quedar constituída únicamente por una capa de suber.

Hacia la periferia de las células centrales en unos

casos y en otros rodeando al núcleo, aparecen numerosos corpúsculos oscuros que observados atentamente resultan ser de formas alargadas, unos rectos, otros algo encurvados á veces ramificados en forma de Y ó en forma de T.

Dentro del polimorfismo que afectan estos corpúsculos, es aun difícil admitir que ellos no sean otra cosa que restos de células como opina Frank ó simples fragmentos de tejido anormal (Brunchorst).

b) Microbios de las nudosidades. — La duda que pudiera subsistir aún, se aclara cuando se hacen preparados del contenido de las nudosidades. He hecho preparaciones con los tubérculos de las raíces de alfalfa, trébol, habas, arvejas y siempre he hallado las mismas formas descritas en las inclusiones. Estos preparados han sido hechos tomando asépticamente con una aguja una pequeña porción del contenido del tubérculo y coloreándolo con fuscina ó thionina. Del mismo modo he podido observarlo, haciendo frotis con los mismos tubérculos, los que han revelado un abundante contenido bacterico de formas, análogas á las ya descritas. El diámetro aproximado es de un milímetro, semejando unos *bacillus* otros Y ó T. Hay aún entre ellos algunos más irregulares que tienen ramificaciones dicotómicas.

La acción del iodo muestra la presencia del almidón en la mayoría de las células que contienen bacteroides.

c) Cultivos. — Con objeto de seguir la identificación de estos bacterios, los he cultivado utilizando para ello el siguiente medio nutritivo :

Infusión de porotos blancos (6 ‰).....	1000 c. c.
Azúcar	20 gr.
Cloruro de sodio.....	10 gr.
Bicarbonato de sodio.....	Vestigios

Este medio se prepara haciendo macerar durante cinco á seis horas los porotos en agua; después se lleva á 100 grados centígrados durante media hora, operación que conviene hacer en autoclave para evitar el esparcimiento de la fécula, por la ebullición. Después de colado el líquido, se le adiciona el azúcar, el cloruro y el bicarbonato de sodio. Se filtra por papel y se esteriliza un cuarto de hora á 115 grados centígrados.

He obtenido otro medio nutritivo, reemplazando los porotos por hojas de leguminosas y agregando al líquido resultante las mismas substancias que al anterior. He preparado los medios sólidos agregando á los anteriores 1,3 por ciento de agar-agar.

En los medios líquidos, he sembrado los bacterios contenidos en los tubérculos de habas, alfalfa y trébol. Con esta dilución he sembrado en superficie en medio sólido.

Al cabo de cinco á ocho días á 20-24 grados C. se ha formado en la parte superior del caldo una película

algo viscosa mientras que el líquido se ha enturbiado haciéndose bastante denso.

En los tubos de agar y al cabo del mismo tiempo, se ha observado un desarrollo abundante de colonias blanquecinas de bordes irregulares. En aquellos tubos en los que la dilución no ha sido uniformemente distribuída, fórmase una capa única del mismo color que las colonias y de consistencia mucilaginosa.

Idéntico resultado he obtenido siguiendo el procedimiento de Laurent (1). He esterilizado por inmersión durante 20 minutos en solución de bicloruro al uno por mil, trozos de raíces de arvejas provistas de tubérculos. Lavados después en agua he sembrado en el mismo medio nutritivo pequeñas porciones del líquido obtenido por la compresión de los tubérculos.

Observados al microscopio los gérmenes contenidos en los medios, aparecen con los mismos caracteres morfológicos que en los tubérculos, habiendo además algunos más alargados y con condensaciones de protoplasma que les dan el aspecto de bacterios esporulados. Estos aparecen envueltos en una especie de envoltura ó vaina de aspecto gelatinoso á la que probablemente deberán atribuirse la dificultad con que se colorean.

Constatada así la presencia de bacterios en los tubérculos de leguminosas, he tratado de comprobar :

(1) *Ann. inst. Pasteur*, t. V, p. 105.

1° Si estos son capaces por sí solos de fijar el ázoe atmosférico ;

2° Si ellos pueden originar la formación de tubérculos en plantas desarrolladas en un medio aséptico ;

3° Si las leguminosas, en cuyas raíces no se forman tubérculos, forman la misma proporción de ázoe que aquellos que están provistos de ellos.

Para lo primero, he practicado una serie de dosajes del ázoe contenido en el medio nutritivo, tal como fué empleado para el cultivo de los bacterios y paralelamente, en el mismo medio en que había obtenido el desarrollo de los mismos. Como complemento, investigué la cantidad de almidón y azúcar, previamente invertidos, existentes antes y después del desarrollo.

Para los dosajes del ázoe, he seguido el procedimiento de Kjeldhal. La determinación de los hidratos de carbono ha sido practicada por el procedimiento de inversión con ácido clorhídrico (1).

El dosaje del ázoe practicado sobre cinco centímetros cúbicos del medio estéril, ha dado 0,00217 de ázoe total ó sea 0,0434 por ciento. En determinaciones hechas sobre el mismo medio después de un desarrollo de 14 á 16 días, las cantidades de ázoe halladas por el mismo volumen de substancias, oscilan de 0,00245 á 0,00252 ó sea entre 0,049 y 0,0504 por ciento.

(1) FRESENIUS, p. 1905.

Tomando la media de estas cantidades entre las que está comprendida la adquisición de ázoe por los cultivos, se tendrá como ganancia media por ciento 0,0497, lo cual da una diferencia en favor de estos sobre los medios esterilizados de 0,0063 por ciento.

Esta pequeña cantidad de ázoe fijada por el cultivo, confirma las opiniones de Beijerinck é Immendort, según las cuales, si bien estos bacterios pueden fijar el ázoe libre, ellos pierden gran parte de esta propiedad cuando se hallan fueran de las nudosidades propias de las leguminosas.

Es posible admitir sin embargo, que llevando el medio á las mejores condiciones nutritivas, pueda aumentarse la cantidad de ázoe fijado, como lo ha conseguido Mazé cultivando en estas condiciones y haciendo pasar al mismo tiempo sobre el medio una corriente de aire, desprovista de compuestos azoados con el objeto de poner al alcance de los bacterios, la mayor cantidad de ázoe (1).

Determinada la cantidad de hidratos de carbono contenidos en los mismos medios, he podido comprobar una disminución correspondiente á aquellos en que se ha producido el desarrollo, lo que evidencia que la fijación de ázoe que los bacterios ejecutan, implica un desgaste de energía ocasionada por la combustión de materias hidro-carbonadas que la planta

(1) *Ann. inst. Pasteur*, t. XI y XII.

les cede y que, tratándose de cultivos en medios artificiales, sería necesario poner á su disposición.

En el medio artificial, la proporción de estas sustancias calculadas en azúcar invertido es de 1,054 por ciento que baja á 0,781 por ciento cuando el cultivo alcanza 14 á 16 días. Sufren, pues ellas una disminución centesimal de 0,272 que calculado para el ázoe ganado por el medio, da la relación de 0,026 de este elemento fijado para cada gramo de azúcar quemado.

d) Acción de los bacterios sobre las leguminosas. — Para comprobarla, he hecho germinar semillas de arvejas perfectamente lavadas de antemano en macetas conteniendo arena. Ésta lo mismo que aquéllas, fué lavada primero y esterilizada después por el calor.

Para facilitar el desarrollo de las plantas, una vez iniciada la germinación, he agregado á cada una de las macetas una dilución de fosfato cálcico y cloruro potásico en las proporciones de 0,50 y 0,20 por ciento respectivamente.

Al mismo tiempo he sembrado semillas testigos en macetas conteniendo tierra de leguminosas.

Por las distintas condiciones en que estas plantas se han desarrollado, pueden ser clasificadas en cuatro grupos:

1° Plantas desarrolladas en arena lavada y esterilizada;

2° Plantas desarrolladas en arena lavada y esterilizada, regadas con cultivos de los bacterios de leguminosas;

3° Plantas desarrolladas en arena lavada y esterilizada regadas con dilución de tierra de leguminosas;

4° Plantas desarrolladas en tierra de leguminosas.

Las semillas del primer grupo, germinando han dado lugar al desarrollo de plantas de dimensiones inferiores á las normales, cuyas hojas de un verde más pálido que el de aquellas, han ido secándose á medida que el desarrollo de la planta era mayor. Esta caída de las hojas, empieza á manifestarse por las primeras, es decir aquellas más próximas á la base del tallo y produciéndose esto antes que en las plantas crecidas en buenas condiciones, debe creerse que la falta de ázoe precipita la evolución de estos órganos.

La raíz observada en la época de la floración, es de color claro y sumamente desarrollada. No presenta nudosidades, lo que constituye una prueba indirecta de su formación bacteriana, desde que en un medio aséptico, dejan de producirse. En cuanto al desarrollo adquirido, explícase por el hambre de ázoe á que ha estado sujeta la planta y facilitado por la escasa resistencia que le ofrece el suelo.

Las plantas del segundo grupo han alcanzado desarrollo mayor que las anteriores, manteniéndose sin embargo por este carácter, así como por el color y duración de sus hojas, en condiciones de inferioridad

con respecto á las plantas normales. Sus raíces, claras también y muy desarrolladas presentan numerosos tubérculos. Los preparados microscópicos obtenidos de estos tubérculos por punción y por frotis, revelan en ellos un contenido bacterico completamente análogo al de las nudosidades de las leguminosas crecidas normalmente en el suelo.

En el tercer grupo, las plantas se desarrollaron normalmente siendo ellas por su aspecto general, semejante á las crecidas en el suelo. Sus raíces, menos extendidas que las de las plantas anteriores y de color más obscuro, presentan numerosos tubérculos que no difieren en su forma y contenido, de los órganos similares de las leguminosas en general.

Las plantas del cuarto grupo, como dejo dicho al tratar de las anteriores, son completamente análogas á aquéllas y por consiguiente á las cultivadas en un suelo fértil.

En resumen, las plantas de arvejas cultivadas en medios asépticos, se desarrollan sin nudosidades. Éstas pueden originarse infectando el medio ya sea con los bacterios procedentes de las mismas leguminosas, obtenidos por cultivos en medios artificiales, ó simplemente, agregando una débil dilución de tierra que los contenga.

Para comprobar el efecto que, con respecto á la nutrición azoada, produce en las plantas la presencia de nudosidades, he determinado la cantidad total que

de ese elemento contenía una cantidad conocida de materia seca, relacionándola después con el peso total.

En las plantas crecidas sin bacteroides, la proporción de ázoe hallada es 1,652 por ciento. Las del segundo grupo, cuyos tubérculos han sido originados por el riego con cultivo de bacterios, la proporción alcanza á 1,822 por ciento. En las regadas con tierras de leguminosas el ázoe forma el 2,758 por ciento. Finalmente, en las plantas comunes del cuarto grupo la proporción hallada supera á las anteriores llegando hasta 3,780 por ciento.

De estas cifras se desprende que la presencia de bacterios y por consiguiente de tubérculos, se manifiesta por un aumento de ázoe en las plantas que los tienen, sobre aquellas desprovistas. Éste aumento, como puede verse, no depende exclusivamente de la presencia de los bacterios, puesto que las plantas que los tienen, acusan distintas ganancias según que la infección se haya producido directamente con los bacterios del suelo ó por medio de los cultivos de los mismos, lo que debe atribuirse á la atenuación que estos han experimentado en su paso sucesivo para su aislamiento, por las variadas condiciones de nutrición, aereación, calor, etc.

De las diversas determinaciones practicadas tomo las cifras medias correspondientes á cada grupo de plantas, las que comparadas con las encontradas en

las semillas, acusan una ganancia de ázoe variable con las condiciones en que aquellas se han desarrollado.

*e) Determinación del ázoe en las semillas
y en las plantas*

ÁZOE DE LAS SEMILLAS :

En 0,50 de materia seca	0.022	mg.
En 100 de materia seca.....	4.400	mg.

ÁZOE DE LAS PLANTAS : *primer grupo.*

Peso de la planta seca.....	0.670	mg.
Ázoe en 0,50 de materia seca.....	0.00826	cmg.
Ázoe en 100 de materia seca	1.652	mg.
Ázoe en la planta seca.....	0.011	mg.

Segundo grupo.

Peso de la planta seca.....	0.722	mg.
Ázoe en 0,50 de materia seca.....	0.0091	dmg.
Ázoe en 100 de materia seca	1.822	mg.
Ázoe en la planta seca.....	0.013	mg.

Tercer grupo.

Peso de la planta seca.....	1.103	mg.
Ázoe en 0,50 de materia seca.....	0.0137	dmg.
Ázoe en 100 de materia seca	3.758	mg.
Ázoe en la planta seca.....	0.019	mg.

Cuarto grupo.

Peso de la planta seca.....	1.490	mg.
Ázoe en 0,50 de materia seca.....	0.0189	dmg.
Ázoe en 100 de materia seca.....	3.780	mg.
Ázoe en la planta seca.....	0.0256	dmg.

f) Ázoe adquirido por las plantas

	Peso de la planta seca	Ázoe total	Ázoe de la planta descontando el de la semilla
Plantas del grupo 1º..	0.670	0.011	0
— 2º..	0.722	0.013	0.002 mg.
— 3º..	1.103	0.019	0.008 mg.
— 4º..	1.490	0.025	0.014 mg.

g) Aumento proporcional de la planta con respecto á la semilla

	Peso de la planta seca	Peso de la planta descontando el de la semilla	Relación de peso de la planta á la semilla
Plantas del grupo 1º	0.670	0.420	2.68
— 2º	0.722	0.472	2.89
— 3º	1.302	1.052	5.21
— 4º	1.490	1.240	5.96

Como se ve, el desigual desarrollo alcanzado por las plantas, se traduce en un aumento en peso, progresivo, en el mismo orden en que las hemos agrupado.

Se deduce, pues, que la adquisición de ázoe originada por la presencia de los tubérculos, se produce en dos sentidos: 1º el aumento de la proporción centesimal, que se revela en forma aparente por el color verde intenso, característico de aquellas plantas cuyas nutrición azoada se produce en buenas condiciones; 2º por el mayor desarrollo alcanzado.

CONCLUSIONES

1^a Los tubérculos de las raíces de las leguminosas contienen abundante cantidad de bacterios, que no pueden ser confundidos con restos de células ó tejidos;

2^a La presencia de tubérculos producidos ya sea por agregación de tierra de leguminosas ó de cultivos de bacterios de tubérculos de las mismas plantas, de la misma familia, determina una ganancia de ázoe, observándose que ésta se produce en mejores condiciones en el primer caso;

3^a Con el fin de facilitar el desarrollo de las leguminosas en general, tratándose de terrenos pobres en substancias húmíferas, es útil transportar á ellas previamente una cantidad proporcional de tierra procedente de lugares en los que ya se hubieran practicado esa clase de cultivos. Tratándose de las leguminosas que mejor se desarrollan en una región dada su cultivo en las condiciones mencionadas puede llegar á substituir como abono verde, á los diversos productos artificiales, empleados para mejorar las tierras;

4^a Las leguminosas privadas de tubérculos, contra-

riamente á lo que afirma Jamieson, no utilizan para su desarrollo más ázoe que el de la semilla;

5^a Las reacciones microquímicas de las protenías, constatadas por el mencionado autor en las partes nuevas de las plantas, deben ser atribuídas á la reconstrucción de aquellos compuestos á partir de los ácidos amidados.

La Plata, 29 de octubre de 1910.

SEGUNDO J. TIEGHI.

PROPOSICIONES ACCESORIAS

1ª Determinación del arsénico por procedimientos bioquímicos;

2ª Conveniencia de los procedimientos biológicos en la depuración de las aguas residuales;

3ª Método biológico en la investigación de sangre humana.

La Plata, octubre 29 de 1910.

En la fecha el ex alumno del doctorado en química, Segundo J. Tieghi, entregó en esta secretaría su tesis sobre *El ázoe en la vegetación*.

P. Abel Sánchez Díaz,
Prosecretario.

La Plata, octubre 29 de 1910.

Pase á la comisión examinadora para que se sirva estudiar la presente tesis.

SAMUEL A. LAFONE QUEVEDO.

La comisión examinadora que subscribe, después de revisar la tesis presentada por el ex alumno Segundo J. Tieghi, para optar el título de doctor en química, resuelve aprobarla.

Enrique Herrero Ducloux, Guillermo F. Schaefer, Juan Carlos Delfino, Pedro T. Vignau, Pedro Abel Sánchez Díaz.

ÍNDICE

I. El ázoe. Generalidades	5
II. El ázoe en los organismos vegetales.....	20
A. — Nitratos.....	20
B. — Albuminoide.....	21
C. — Compuestos amidados	24
D. — Alcaloides.....	29
III. Empobrecimiento de las tierras en sustancias azoadas..	35
IV. Restitución del ázoe al suelo.....	41
A. — Del ázoe en circulación en los seres vivos.....	41
B. — Aprovechamiento del ázoe atmosférico.....	43
1. Acción de las descargas eléctricas naturales	43
2. Acción de las descargas eléctricas artificiales.....	44
3. Procedimientos químicos	46
4. Fijación del ázoe atmosférico por los agentes bioló- gicos.....	51
a) Microbios del suelo fijadores de ázoe.....	52
Fijación del ázoe por la alinita	60
b) Microbios de las nudosidades las leguminosas.....	62
Origen y estructura de las [nudosidades.....	69
c) Simbiosis de algas y bacterios.....	70
d) Fijación del ázoe por los vegetales en general	75
Teoría de Jamieson	76
Experiencias de Zemplen y Roth...	78
5. Experiencias del autor	81
a) Estructura de las nudosidades...	82

b) Microbios de las nudosidades	84
c) Cultivos	85
d) Acción de los bacterios sobre las leguminosas	89
e) Determinación del ázoe en las semillas y en las plantas	93
f) Ázoe adquirido por las plantas	94
g) Aumento proporcional de la planta con respecto á la semilla	94
Conclusiones	95



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P



idades

.....

bre las legur

sen