

Tomo XXXII

Nº 2

ACADEMIA NACIONAL
DE AGRONOMIA Y VETERINARIA

BUENOS AIRES

REPUBLICA ARGENTINA

Fijación del Nitrógeno Atmosférico en el
suelo por Bacterias Asimbióticas del
Grupo Azotobacter

COMUNICACION DEL
DEL
ACADEMICO DE NUMERO

Ingº. Agrº. Santos Soriano



Sesión Ordinaria del 12 de mayo de 1978

ACADEMIA NACIONAL DE AGRONOMIA Y VETERINARIA

Fundada el 16 de octubre de 1909

Arenales 1678

Buenos Aires

MESA DIRECTIVA

<i>Presidente</i>	Dr. Antonio Pires
<i>Vicepresidente</i>	Ing. Agr. Gastón Bordeois
<i>Secretario General</i>	Dr. Enrique García Mata
<i>Secretario de Actas</i>	Dr. Alfredo Manzullo
<i>Tesorero</i>	Ing. Agr. Eduardo Pous Peña
<i>Protesorero</i>	Dr. Oscar M. Newton

ACADEMICOS DE NUMERO

Dr. Héctor G. Aramburu
Dr. Alejandro C. Baudou
Ing. Agr. Gastón Bordelois
Ing. Agr. Juan J. Burgos
Dr. Miguel Angel Cárcano
Ing. Agr. Ewald Favret
Dr. Enrique García Mata
Dr. Mauricio B. Helman
Ing. Agr. Diego J. Ibarbia
Ing. Agr. Walter F. Kugler
Dr. Alfredo Manzullo
Dr. José Julio Monteverde
Dr. Oscar M. Newton
Dr. Antonio Pires
Ing. Agr. Eduardo Pous Peña
Dr. José María Rafael Quevedo
Ing. Agr. Eduardo E. Ragonese
Dr. Norberto Ras
Ing. Agr. Manfredo A. L. Reichart
Dr. José R. Serres
Ing. Agr. Enrique M. Sívori
Ing. Agr. Alberto Soriano
Ing. Agr. Santos Soriano
Dr. Ezequiel C. Tagle

ACADEMICO EMERITO

Dr. Emilio Solanet

ACADEMICO HONORARIO

Ing. Agr. Dr. Norman E. Borlaug

ACADEMICOS CORRESPONDIENTES

Dr. Telésforo Bonadonna (Italia)
Dr. Felice Cinoti (Italia)
Ing. Agr. Guillermo Covas (Argentina)
Ing. Agr. Salomón Herowitz Yarcho (Venezuela)
Ing. Agr. Antonio Krapovickas (Argentina)
Ing. Agr. León Nijensohn (Argentina)
Ing. Agr. Jorge A. Luque (Argentina)
Ing. Agr. Armando T. Hunziker (Argentina)
Ing. Agr. Ruy Barbosa P. (Chile)
Dr. Carlos Luis de Cuenca (España)

ACADEMICOS ELECTOS

Ing. Agr. Juan H. Hunziker
Ing. Agr. Ichiro Mizuno

FIJACION DEL NITROGENO ATMOSFERICO EN EL SUELO POR BACTERIAS ASIMBIOTICAS DEL GRUPO AZOTOBACTER

Ing^o. Agr^o. SANTOS SORIANO *

“Au bout d’une vingtaine d’années d’étude, on ne vaudrait en détacher les idées, sans nourrir l’idéal de’une agriculture de l’avenir”, qui apprendrait a mieux utiliser l’azote offert par la nature: s’entend, de ne pas perdre le produit de l’activite des *Azotobacter*, comme cela arrive aujourd’hui par l’effet de l’administration plus ou moins fréquente d’engrais azotés, qui dépriment la fixation. mais de chercher plutôt les moyens d’en augmenter le rendement”.

S. Winogradsky - Microbiologie du Sol - VIII:
Les Azotobacter - Avant - Propos, p. 60 - 1945.

I. INTRODUCCION

N. W. Beijerinck, en 1901 descubrió el *Azotobacter chroococcum* en el suelo y, en 1904, publicó un muy importante trabajo titulado: “La influencia de los microbios sobre la fertilidad del suelo y el crecimiento de los vegetales superiores”, en el que se describe la fijación del nitrógeno atmosférico libre, con la celulosa como fuente de carbono, mostrando, en una de sus láminas, las formas bacterianas de los agentes activos en el proceso.

No obstante haber transcurrido ya 74 años desde esa trascendental concepción, tan sólo unos pocos trabajos fueron publicados relativos al tema y prestado atención a esta importantísima, aunque muy simple metodología, consistente en la fijación microbiológica del nitrógeno elemental atmosférico en el suelo, a pesar de la enorme importancia biológica y económica que tiene para la nutrición y el crecimiento de las plantas, los animales y el hombre.

* Con la colaboración del Sr. Carlos A. Zoratti.

En la aludida lámina aparecen identificados los dos elementos microbianos necesarios para el funcionamiento del proceso existentes en el suelo: las bacterias anaerobias de la celulosa que, al fermentarla, producen las sustancias carbonadas utilizables por el *Azotobacter* y esta bacteria aerobia, específica ejecutora asimbiótica del proceso de asimilación del nitrógeno elemental atmosférico. Los detalles de su integración constituyen el objetivo del presente trabajo.

Jensen H. L., en 1940, presentó un trabajo sobre economía del nitrógeno de los suelos trigueros australianos, donde se analiza la actividad de los microorganismos no simbióticos fijadores del nitrógeno atmosférico. Cita a diez autores de diversos países, quienes manifestaron su opinión acerca del contenido de *Azotobacter* en el suelo, que con frecuencia alcanza, según ellos, a unos pocos cientos y sólo raramente a unos pocos miles de células por gramo de tierra.

Menciona también a Dahr y Seshacharyulu (1936) quienes, en la India, hallaron de 1,3 a 2,8 millones de *Azotobacter* por gramo de suelo seco.

Jensen opina, además, que donde se verifica una fijación de nitrógeno, como en los experimentos con glucosa, la misma siempre está acompañada por una activa multiplicación celular del *Azotobacter* y que, generalmente, el número de esos microorganismos resulta tan alto, como para sugerir que el proceso de fijación del nitrógeno, por su intermedio, consiste simplemente en una síntesis de células de *Azotobacter*.

En 1963, el primer autor de esta comunicación y sus colaboradores de la Sección Suelos en la Cátedra de Microbiología, Facultad de Agronomía (U.Bs.As.) realizaron un trabajo en que se detallaban los métodos relativos al enriquecimiento y aislamiento de bacterias del suelo, entre las cuales las asimbióticas, aerobias, fijadoras del Nitrógeno atmosférico, que fue publicado en 1966.

En 1973 S. Soriano, M. J. Amor Asunción y M. Cusato, presentaron un trabajo sobre la "Influencia de la Descomposición de la paja de maíz en el Desarrollo de Bacterias del Género *Azotobacter*", a la IVª Conferencia Internacional de Impactos Globales de la Microbiología Aplicada" (GIAM - IV), realizada en San Pablo, Brasil.

El mismo fue luego publicado en extenso, en 1975, en la Revista de la Asociación Argentina de Microbiología, comunicándose la realización de ensayos de laboratorio acerca del efecto obtenido por el agregado de celulosa de chala de maíz en polvo, a muestras de tierras con 80 a 100 % de agua y, como consecuencia, en condiciones anaeróbicas, durante un máximo de 25 días, a 30° C.

Otro trabajo, que fue ya entregado para su publicación en la revista "Ciencia e Investigación", fue realizado por S. Soriano, M. J. Amor Asunción, M. Cusato, G. Frontera y M. González Pérez, versó sobre la "Influencia de la Descomposición Anaeróbica de la *Paja de Maíz* sobre el desarrollo de *Azotobacter* y *Beijerinckia*, en el que se estudió el efecto de la paja de maíz molida agregada, en cantidad del 2 %, a siete muestras de suelos incubados a 30° C, con un contenido de agua al 100 % de la capacidad de campo y, en consecuencia, también en condiciones de anaerobiosis.

En los nueve ensayos que fueron estudiados en esa ocasión se determinó la cantidad de células de ambos géneros de bacterias asimbióticas fijadoras de Nitrógeno atmosférico en las muestras que recibieron paja y en los respectivos controles sin paja, deduciéndose, por diferencia, la cantidad de células que corresponde atribuir al efecto de la paja. También figuran en ese trabajo las cantidades que deben atribuirse a la adición de fosfato de potasio y de carbonato de calcio, en los casos en que fueron utilizados.

En ese segundo trabajo se han obtenido, también, valores relativos a la cantidad de nitrógeno atmosférico fijado, mediante determinaciones de la actividad de la "nitrogenasa", llegándose, por extrapolación, a la especificación del número de Kgrs. de nitrógeno fijado, que llegó, en un caso, con agregado de paja y de Carbonato de Calcio, a la extraordinaria suma de 55,9 Kgrs., *por hectárea y por día*.

La fijación de nitrógeno atmosférico en esa extraordinaria cantidad, constituye, ciertamente una comprobación, casi increíble, de la enorme cantidad de nitrógeno que puede ser fijado en el suelo, mediante este método biológico del *Azotobacter*, utilizando material celulósico de rastrojos y alguna labor complementaria.

Bastarían tres días, con este método, para fijarse 167.7 Kgrs. de nitrógeno por hectárea, que representan 37,7 Kgrs. más que el promedio de 130 Kgrs. por Ha. y por año, universalmente aceptado para la fijación simbiótica del nitrógeno atmosférico por el *Rhizobium* activo en los nódulos de las raíces de las Leguminosas.

Aparte de que en el método del *Azotobacter* puede, también, intercalarse el cultivo de Leguminosas, si se lo considera conveniente, la cantidad de nitrógeno fijado y las posibilidades de reiterarlo más de una vez y en diversas épocas del año, de acuerdo con los cultivos estacionales, el mismo presenta oportunidades tecnológicas inigualables para la provisión de alimentos nitrogenados a bajo costo, que lo convierten en un problema social prioritario, del punto de vista eco-

nómico, para países de gran producción agropecuaria y en pujante desarrollo, como es típicamente el nuestro.

Dos de las muestras contenían bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno atmosférico de los géneros *Azotobacter* y *Beijerinckia* y las restantes solo *Azotobacter*, encontrándose las cantidades de células, determinadas, cuantitativamente, mediante la formación de colonias en cajas de Petri, cuyos valores se resumen a continuación:

I. — *Azotobacter* y *Beijerinckia*: Controles (sin paja): 910 a 18.000. Con 2 % de paja de maíz: 23,15 millones a 939 millones.(!)

II. — *Azotobacter* solo: Controles: 510 a 5.200. Con 2 % de paja: 2,4 millones a 13 millones. Con 2 % de paja más 0,2 % de Carbonato de calcio: 7,3 millones a 27 millones.

II. ENRIQUECIMIENTO

El método desarrollado en el trabajo se basa en una lámina contenida en el libro de F. Löhnis y E. B. Fred, utilizado como texto en la Cátedra de Microbiología Agrícola de la Universidad de Wisconsin, USA. En ella se muestran dos probetas de vidrio, en cada una de las cuales se ha fijado una tira de papel de filtro en la parte superior, la que queda colgando hasta su fondo, en el medio de cultivo líquido especial para bacterias celulolíticas. La diferencia entre ambas es que en una el líquido nutritivo se reemplaza, periódica y parcialmente, por otra parte alícuota nueva, mientras que en la segunda queda siempre el inicial durante todo el período de incubación.

El resultado final es que en la probeta de líquido renovado se produce una intensa desintegración de la celulosa, efectuada por las bacterias anaeróbicas descritas por W. L. Omeliansky en 1902-1904, las que aparecen, típicamente, en abundancia, en los restos celulíticos del fondo.

Con el objeto de acelerar el proceso y simplificar las operaciones, utilizamos tubos de vidrio aproximadamente del mismo diámetro que el de las probetas, que se afinan en su parte inferior hasta un diámetro de $1/4 - 1/5$ del de la superior. Al tubo fino se une un caño de plástico flexible, que se lleva fuera de la estufa de incubación, regulada a 37° C, a un recipiente común de desecho.

El medio de cultivo líquido destinado a reemplazar al eliminado por el caño de desecho en el tubo de fermentación, se colocó en un

frasco Erlenmeyer de medio litro, que se mantuvo fuera de la estufa, apoyado en el techo de la misma. El líquido fue hecho penetrar en el tubo fermentador mediante un caño de plástico flexible como el de eliminación, introduciéndolo en la estufa a través del agujero destinado al termómetro (que se pasó al interior), y fue goteándose, adecuadamente, en el tubo de fermentación, regulado por una roseta de presión, de material plástico, sin inconveniente alguno.

Con este simple sistema de funcionamiento continuo se ha logrado acelerar el proceso de fermentación de la celulosa y el correspondiente enriquecimiento de sus bacterias anaerobias específicas, hasta el punto de obtener, en 24 horas, un comienzo neto de fermentación de la celulosa y una terminación del proceso de 0,5 gramos en 3 días.

III. AISLAMIENTOS

1. — El aislamiento en cultivo puro del *Clostridium Omelianskii* fue efectuado en series de tubos de ensayo y otros de mayor diámetro, de 2,4 x 25 cms, con el mismo medio de cultivo solidificado con agar, incubándose a 37° C por unos ocho o más días.

Las colonias obtenidas se reconocen con relativa facilidad por su forma lenticular y su color levemente bronceado. Se transplantan, separadamente, a tubos de ensayo del mismo medio, o en medio líquido con celulosa, en tubos de Hall de bolita, y luego de su incubación y desarrollo se observan, de preferencia, con objetivos de inmersión y óptica de contraste de fase reconociéndose, fácilmente, por su morfología característica de plectridios rectos o levemente curvados, con esporas esféricas terminales.

Posteriormente se efectuaron, también, aislamientos en cajas de Petri, por dilución en el mismo medio, incubándolas en recipientes cerrados, con avena remojada, para obtener la anaerobiosis.

La apariencia de las colonias desarrolladas en cajas de Petri es totalmente diferente de la de los tubos: son blancas, planas y circulares, aunque las células, con esporas esféricas terminales, son idénticas en ambos casos.

Otro medio de cultivo que puede utilizarse es el agar de agua de levadura descrito por Soriano S. y Cataldi M. S. (1943-44) en un trabajo sobre bacterias celulolíticas anaerobias del intestino del hombre y de los animales.

2. — El aislamiento en cultivo puro del *Azotobacter chroococcum* es una operación muy sencilla, que fue efectuada en nuestros labora-

torios desde hace ya unos sesenta años y reiterada muchísimas veces durante ese largo período de tiempo. En los últimos diez años fueron aislados también del mismo modo otros representantes del mismo grupo, *Beijerinckia* y *Derxia*, con igual facilidad.

IV. FIJACION DEL NITROGENO ATMOSFERICO POR EL AZOTOBACTER UTILIZANDO SUBSTANCIAS CARBONADAS PRODUCIDAS POR LAS BACTERIAS ANAEROBIAS DE LA CELULOSA

Una vez obtenidos los dos elementos microbianos que integran el proceso: las bacterias anaerobias de la celulosa, que, al fermentarla, producen las sustancias carbonadas utilizables por el *Azotobacter*, y esta bacteria aerobia, específica del proceso de fijación del nitrógeno elemental atmosférico, resta por determinar:

- 1) La identificación química de las sustancias orgánicas carbonadas formadas durante el proceso fermentativo de la celulosa, y
- 2) La asimilación cuantitativa del nitrógeno, por cromatografía de gases, trabajos que serán efectuados, por separado, por especialistas en la materia.

Finalmente, la aplicación práctica de este magno proceso, de la que se hará cargo el Profesor Ing.º Agr.º Jorge S. Molina, en varios extensos lugares de nuestras zonas agrícolas-ganaderas, que ya han sido ofrecidas para ese fin, culminará el objetivo final de todo el estudio.

En la ilustración adjunta se muestra una caja de Petri donde el *Azotobacter chroococcum* desarrolla en un medio que contiene las sustancias carbonadas derivadas de la fermentación anaeróbica de la celulosa como único material orgánico.

BIBLIOGRAFIA

- BEIJERINCK, M. W. 1901. Zentralblatt für Bakteriologie. IIe Abt. Band 7. s. 561-582.
- 1904. Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, Série II, Tome IX, 1904, p. VIII-XXXVI. Obras Reunidas: págs. 249-265, con 9 figuras en 2 láminas.
- CLAUSEN, P. 1931. Zentralbl. f. Bakteriol. IIe Act. Band 84. s. 20-59.
- HENNEBERG, W. 1922. Zentralbl. f. Bakteriol. IIe Abt. Band 55. s. 242.
- 1926. Handbuch der Gärungsbakteriologie. Zweite Auflage. 2er. Band. s. 293-295.
- JENSEN, H. L. 1940. Thesis presented at the Royal Veterinary and Agricultural College, Copenhagen. 122 pages.
- KELLERMANN, K. F. und Mc Beth, J. G. 1912. Zentralbl. f. Bakteriologie. IIe Abt. Band 34. s. 485-494.
- LÖHNIS, F. and Fred, E. B. 1923. Textbook of Bacteriology. Mc Graw Hill Book Co. New York. U.S.A. (Fig. 32; page 126).
- OMELIANSKI, W. 1904-1906. Lafar's. "Handbuch der Technischen Mycologie". Band 3. s. 245-268.
- 1902. Zentralbl. f. Bakteriologie. IIe. Abt. Band 8. s. 193.
- 1904 a. Ibidem. Band 11. s. 369.
- 1904 b. Ibidem. Band 12. s. 33.
- SORIANO, S. y Cataldi, M. L. 1942-1943. Recopilac. Trabajos Científ. Instituto Nac. Nutrición. ps. 409-430.
- SORIANO, S., Amor Asunción, M. J., Cusato, M., Trontera, G. y González Pérez, M. 1978. "Ciencia e Investigación" (en prensa).
- SORIANO S., Amor Asunción, M. J., y Cusato, M. 1975. Rev. Asociac. Argent. Microbiol. Vol. 7(2), págs. 56-60.