

# EFFECTOS DE ACIDOS ORGANICOS Y ETANOL EN EL PROCESO DE FIJACION DE NITROGENO ATMOSFERICO EN EL SUELO\*

M. J. Amor Asunción, (1), María A. Monzón de Asconegui, (2) y E. Dellepiane, (3).

## RESUMEN

Los efectos de ácidos orgánicos (acético, butírico, láctico y propiónico) y etanol, compuestos que se producen en la descomposición anaeróbica de la celulosa y otros carbohidratos asociados en la paja de maíz, se compararon con los efectos producidos por la paja de maíz, en las mismas condiciones de experimentación, en suelos incubados con un grado alto de anaerobiosis (contenido de agua del 100 % de la capacidad de campo).

En los dos tratamientos se produjo un proceso microbiano de fijación de nitrógeno atmosférico intenso que fue medido por el número elevado de bacterias del género *Azotobacter* desarrolladas y por el ensayo acetileno/etileno que dio valores altos de nitrógeno fijado.

Estos resultados prueban que los compuestos utilizados por las bacterias citadas para fijar nitrógeno atmosférico, cuando los suelos son incubados con paja de maíz, provienen de la descomposición microbiana anaeróbica de la celulosa y otros carbohidratos asociados con la paja de maíz, como ácidos orgánicos (acético, butírico, láctico y propiónico) y etanol, los mismos productos usados directamente en esta investigación en los suelos incubados.

## SUMMARY

The effects of organic acids (acetic, butiric, lactic and propionic) and ethanol, compounds produced in the anaerobic decomposition of cellulose and other associated carbohydrates in the maize straw have been compared with effects produced by the maize straw in the same conditions of experimentation, in incubated soils with a high degree of anaerobiosis (water content of 100 % of field capacity).

In the two treatments an intense microbiological atmospheric nitrogen fixation process was produced, which was measured by the elevated number of the *Azotobacter* genus developed and by the acetylene/ethylene assay (nitrogenase activity), which gave high values of atmospheric fixed nitrogen.

These results prove that the compounds used by above mentioned bacteria to fix atmospheric nitrogen, when the soils are incubated with maize derive from the anaerobic decomposition of cellulose and other associated carbohydrates in the maize straw, such as organic acids (acetic, butiric, lactic and propionic) and ethanol, the same products used directly in this investigation, in the incubated soils.

---

(1), (2) y (3): Profesor Asociado, Profesora Adjunta y Jefe de Trabajos Prácticos, respectivamente, de Microbiología Agrícola de la Facultad de Agronomía de UBA.

\* Trabajo realizado con plan CAFPTA N° 143, presentado en el III Congreso Argentino de Microbiología, 25-28 Junio, 1979, Bs. As.

## INTRODUCCION

Soriano *et al.* (1975, 1978) demostraron que incubando suelos con paja de maíz (2%) molida, en condiciones controladas de temperatura, 28°C, con un grado elevado de anaerobiosis producida por el agregado de agua en una cantidad equivalente al 100% de la capacidad de campo, se produce un proceso microbiológico de fijación de nitrógeno atmosférico muy intenso. El mismo fue evaluado por: a) el número elevado de bacterias específicas desarrolladas del género *Azotobacter* y b) la gran cantidad de nitrógeno atmosférico fijado, determinada por el empleo del ensayo acetileno/etileno (actividad de la nitrogenasa).

La interpretación que se dio a estos hechos fue que la descomposición anaeróbica de la celulosa y otros carbohidratos asociados en la paja de maíz producía sustancias energéticas, como ácidos orgánicos (acético, butírico, láctico y propiónico) y etanol que eran utilizadas por las bacterias fijadoras de

nitrógeno atmosférico, géneros *Azotobacter* y *Beijerinckia* para asimilar el elemento gaseoso citado. Posteriormente, Amor Asunción *et al.* (1978) aislaron en un suelo incubado la especie *Derxia gummosa*, representante también de la familia *Azotobacteriaceae*.

Sobre la base de lo expuesto se proyectó incubar muestras de suelo con el agregado directo de las sustancias mencionadas, ácidos orgánicos y etanol, comparando tales experiencias con otras similares usando paja de maíz, con el objetivo de tratar de probar, si la interpretación señalada era confirmada por los resultados que se logaran, en una investigación conducida en forma igual que en ocasiones anteriores, cuando se utilizó paja de maíz.

## MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron cuatro muestras de suelo, cuya procedencia y características principales se muestran en el cuadro 1.

CUADRO 1: Procedencia y características de los suelos estudiados.

Muestra	Procedencia	pH	Conductividad específica milimhos/cm.	% Materia orgánica	% Cap. de campo
63	Entre Ríos	8,25	1,38	2,34	58
69	Río Negro	8,05	0,43	1,10	46
73	Mendoza	8,90	0,61	0,51	32
74	Mendoza	8,30	0,86	1,98	40

Las determinaciones se hicieron así: el pH por medición potenciométrica, la conductividad específica por la determinación de la conductividad eléctrica en pasta de suelo saturado de agua, la materia orgánica por el método de Walkley (1947) y la capacidad de campo por la determinación de la capacidad de retención que da valores similares, por la técnica expuesta detalladamente por Soriano *et al.* (1975).

Las muestras de suelo fueron extraídas desde la superficie hasta 10 cm de profundidad, secadas al aire y tamizadas por tamiz de 1 mm.

Porciones de 100 g de cada muestra se incubaron de acuerdo con el método de Soriano *et al.* (1978) en frascos de plástico, de 11 cm de altura y 6 cm de diámetro, con agregado de cantidades variables de agua (100 y 75% de la capacidad de campo) y de

las siguientes sustancias, 0,3% de cada una: ácidos orgánicos (acético, butírico, láctico y propiónico) y etanol. Los frascos fueron cerrados con tapa a rosca e incubados a 28°C.

Periódicamente se reponía el agua evaporada.

Se realizaron incubaciones similares utilizando paja de maíz (2%) molida y agua en cantidad equivalente al 100% de la capacidad de campo.

En todas las incubaciones se agregaron también sustancias minerales,  $PO_4HK_2$  al 0,18% y  $CO_3Ca$  al 0,7%, que frecuentemente exaltan la intensidad del proceso estudiado.

De los suelos incubados se efectuaron periódicamente las siguientes determinaciones: a) análisis microbiológico cuantitativo de las bacterias del género *Azotobacter*, según el método de Amor Asunción (1965) y b) evaluación de la fijación del nitrógeno atmosférico por medio del ensayo acetileno/etileno (actividad de la nitrogenasa) midiendo el etileno producido por cromatografía en fase gaseosa en un cromatógrafo Perkin-Elmer 881 (\*) con columna de cobre de 1,8 m de longitud por 3,2 mm de diámetro. Como material de relleno de la columna se usó Porapak S.

El procedimiento seguido fue el siguiente: en frasquitos de vidrio de 20 ml se colocó 4 g de suelo incubado, se tapó con tapón de caucho y se cerró herméticamente con un anillo de aluminio que no cubría la parte central del tapón de goma. Mediante una aguja hipodérmica conectada a una jeringa graduada, se extrajo 1 ml de la atmósfera del frasquito, introduciéndose después 1 ml de acetileno. Se mantuvo 48 horas a 28°C y luego se determinó el etileno formado.

Como según Young *et al.* (1951), Freedbairn y Buddenhagen (1964) e Ilag y Curtis (1968), algunas bacterias y hongos producen etileno en su metabolismo y con el objeto de saber si la población microbiana presente en los suelos incubados producía etileno, se investigó la presencia del mismo en frasquitos que contenían 4 g de suelo incubado, a

los cuales no se les agregó acetileno. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado y se promediaron los resultados.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados se presentan en el cuadro 2.

La determinación de etileno en las muestras en las que no se había agregado acetileno dio resultados negativos, lo que significa que la población microbiana de los suelos incubados no genera etileno en su metabolismo.

Los datos del cuadro 2 muestran que los ácidos orgánicos y el etanol producen en los suelos incubados un proceso de fijación de nitrógeno atmosférico muy intenso, comparable con el producido por la paja de maíz y las diferencias respecto del testigo son, en ambos tratamientos y en todas las muestras, de acuerdo al análisis estadístico efectuado, muy significativas.

El número de bacterias del género *Azotobacter* es mayor en los tratamientos con ácidos y etanol que con paja de maíz, excepto en la muestra 73, pero el nitrógeno fijado da valores parecidos; en dos muestras, 69 y 74 los registros son mayores para los ácidos y etanol y en otros dos casos, muestras 63 y 73, son menores.

Respecto al grado de anaerobiosis, ensayado únicamente cuando se usaron ácidos y alcohol, se observa que la cantidad de bacterias es más alta con mayor aerobiosis pero sucede lo contrario con respecto al nitrógeno fijado. El mayor número de los microorganismos se explica porque las bacterias del género *Azotobacter* son aerobias. Respecto a la disminución del nitrógeno fijado a mayor aerobiosis puede explicarse por dos razones: 1) el proceso de fijación se efectuaría más eficientemente con reducidas presiones de oxígeno, lo que está de acuerdo

(\*) Agradecemos al Dr. Raúl Cadenas, Profesor de Química Orgánica en la Facultad de Agronomía de Buenos Aires por haber tenido la gentileza de permitirnos usar el cromatógrafo de su laboratorio.

CUADRO 2: Valores del proceso de fijación de nitrógeno atmosférico obtenido en los suelos incubados.

Muestra	Tratamiento	Agua agregada % de Cap. de campo	Días de Incubación	Nº de Azotobacter g de suelo	Ensayo acetileno/etileno	
					nM etileno g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	kg de N fijado por día y ha F. conv. 3
63	T	100	10	2,0 x 10 <sup>2</sup>	0	0
63	M	100	10	2,1 x 10 <sup>7</sup>	52,2	18,3
63	Pa	100	10	3,1 x 10 <sup>6</sup>	61,1	21,4
63	M	75	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	18,3	6,0
69	T	100	12	4,5 x 10 <sup>3</sup>	0	0
69	M	100	12	4,4 x 10 <sup>6</sup>	112,8	36,6
69	Pa	100	12	2,0 x 10 <sup>6</sup>	62,4	20,3
69	M	75	12	2,1 x 10 <sup>7</sup>	59,1	17,7
73	T	100	11	3,5 x 10 <sup>3</sup>	0	0
73	M	100	11	3,9 x 10 <sup>6</sup>	57,9	17,3
73	Pa	100	11	4,5 x 10 <sup>6</sup>	71,1	21,2
73	M	75	11	4,3 x 10 <sup>6</sup>	28,2	7,9
74	T	100	11	3,4 x 10 <sup>3</sup>	0	0
74	M	100	11	1,2 x 10 <sup>7</sup>	48,3	15,5
74	Pa	100	11	2,9 x 10 <sup>7</sup>	44,7	14,3
74	M	75	11	1,8 x 10 <sup>7</sup>	39,6	11,5

T: testigo; Pa: paja de maíz; M: mezcla de ácidos y etanol.

Todos los tratamientos, excepto los testigos llevan fosfato dipotásico al 0,18% y carbonato de calcio al 0,7%.

con lo conocido sobre el mecanismo bioquímico del proceso y, 2) además en el caso de mayor anaerobiosis es probable que se desarrollen bacterias anaerobias fijadoras de nitrógeno atmosférico como *Clostridium pasteurianum* y las mismas no lo hagan o si lo hacen sea en menor cantidad, en ambientes más aerobios.

La presencia de estas bacterias también podría explicar que no haya, en general, relación entre el número del género *Azotobacter* y la cantidad de nitrógeno gaseoso elemental fijado.

Al expresar la cantidad de nitrógeno fijado en kg por ha y por día en modo alguno se quiere significar que tales resultados se

lograrían en el campo, porque en ese medio natural, las condiciones serían diferentes y por lo tanto también los resultados. Los datos se han expresado así para demostrar la intensidad muy elevada del proceso microbiológico estudiado en el laboratorio, lo que permite con fundamento suponer, con posibilidades grandes, que el proceso pudiera ser manejado en el campo con el objetivo de obtener cantidades importantes de nitrógeno atmosférico incorporado al suelo y conseguir una fertilización nitrogenada muy barata. Desde luego se deberán realizar las investigaciones necesarias empleando los rastros de las cosechas como materiales energéticos.

## CONCLUSIONES

De lo expuesto se desprende:

1) La incubación de suelos con ácidos orgánicos (acético, butírico, láctico y propiónico) y etanol con un grado elevado de anaerobiosis (contenido de agua del 100% de la capacidad de campo) provoca un proceso microbiano de fijación de nitrógeno atmosférico muy intenso.

2) La magnitud del proceso, medido por el número elevado de las bacterias del género *Azotobacter* desarrolladas y por la cantidad de nitrógeno fijado, determinado por el ensayo acetileno/etileno, es comparable al obtenido cuando los suelos son incubados con paja de maíz como único material energético, en iguales condiciones experimentales.

3) Lo expresado en los puntos 1 y 2 prueba que la descomposición microbiana anaeróbica de la celulosa y otros hidratos de carbono de la paja de maíz: pentosanos y pectina, producen compuestos como ácidos orgánicos (acético, butírico, láctico y propiónico) y etanol, que constituyen las sustancias energéticas que utilizan las bacterias del género *Azotobacter* para fijar nitrógeno atmosférico, cuando los suelos son incubados con paja de maíz con un grado alto de anaerobiosis.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Amor Asunción, M.J. (1965). Determinación de *Azotobacter* en cajas de silicogel sin secado. *Ciencia e Investigación*, 21: 368-370.
- 2) Amor Asunción, M.J., Frontera, G. y Dellepiane, E. (1978). Presencia de *Derris gummosa* en la República Argentina, Presentado en la 8a. Reunión Argentina de la Ciencia del Suelo, 25-30 sept., Buenos Aires.
- 3) Freedbairn, H.T. and Buddenhagen, L.M. (1964). Ethylene production by *Pseudomonas solanacearum*, *Nature*, 202:313-314.
- 4) Ilag, T. and Curtis, R.W. (1968). Production of ethylene by fungi, *Science*, 159: 1357-1358.
- 5) Soriano, S., Amor Asunción, M.J. y Cusato, M. (1975). Influencia de la descomposición de la paja de maíz en el desarrollo de las bacterias del género *Azotobacter*, *Rev. Arg. Microbiol.*, 7: 56-60.
- 6) Soriano, S., Amor Asunción, M.J., Cusato, M., Frontera, G. y González Pérez, M. (1978) Influencia de la descomposición anaeróbica de la paja de maíz sobre el desarrollo de *Azotobacter* y *Beijerinckia*. *Ciencia e Investigación*, 33: 409-412.
- 7) Walkley, A. (1947). A critical examination of rapid method for determining organic carbon in soils. *Soil Sci.*, 63: 251-264.
- 8) Young, R.E., Pratt, H.K. and Biale, J.B. (1951). Identification of ethylene as volatile product of the fungus *Penicillium digitatum*, *Pl. Physiol.*, 26: 304-310.