

Estudios sobre fisiología y ecología del *Azotobacter chroococcum*

POR

SANTOS SORIANO, MANFREDO A. L. REICHART, ESTHER ATLAS
y CANDIDA CARABALLO

(Cátedras de Microbiología Agrícola y de Edafología)

I. Introducción.

La fijación del nitrógeno atmosférico en el suelo tiene una enorme importancia práctica puesto que constituye el único mecanismo natural que permite un aporte de materia nitrogenada, no existente anteriormente en el mismo, que llega a ser aprovechable por las plantas.

La forma de fijación simbiótica ha sido la más estudiada y en la agrotecnia moderna es ya una práctica común el agregado de la bacteria radicícola al sembrarse cualquier leguminosa, aún en tierras en que la misma ha sido anteriormente cultivada, por haberse demostrado la innegable ventaja de asegurar, en esa forma, la presencia de un elevado número del *Rhizobium* correspondiente en el momento de la germinación de las semillas.

Respecto a la fijación asimbiótica, que se realiza por bacterias libres, la que corresponde a las del género *Azotobacter* le sigue en orden de importancia, la que se ha visto aumentada en los últimos tiempos a raíz de una serie de trabajos, especialmente de autores rusos, que pretenden haber demostrado la conveniencia de un agregado de cultivos artificiales de dicha bacteria al suelo, en forma semejante a la que se efectúa habitualmente con las del género *Rhizobium*.

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico en el suelo fue

demostrada por *Schloesing* y *Muntz* en 1877, pero el agente microbiano incuestionablemente específico, que resultó ser una bacteria anaerobia absoluta fue aislada por *Winogradsky* en 1893.

Beijerinck, en 1903, trabajando en condiciones aerobias, descubrió otras bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico a las que dominó: *Azotobacter chroococcum*, proveniente del suelo y *Azotobacter agilis*, proveniente de agua de canal, y a las que, curiosamente, no atribuyó en un principio capacidad de fijación sino por intermedio de otras bacterias asociadas aunque, poco tiempo después, reconoció a la primera como el agente específico del mencionado proceso en las condiciones antedichas.

Posteriormente, diversos autores aislaron otras formas de *Azotobacter* a las que atribuyeron categoría específica, a saber: *Az. Vinelandii* (*Lipman*, 1903), *Az. Beijerinckii* (*Limpman*, 1904), *Az. vitreum* (*Löbhnis y Westermann*, 1908), *Az. indicus* (*Starkey y De*, 1939) todas las cuales no han recibido un cabal reconocimiento como tales, a juzgar por la mención de sólo las dos especies iniciales de *Beijerinck* y la de *Starkey*, en la 7ª. edición del Manual de *Bergey* (1957), figurando las demás como variedades o entidades sistemáticas de menor categoría. (*)

En nuestro país la bibliografía referente a las bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno atmosférico no es muy abundante. Si bien uno de los autores de este trabajo (*S. Soriano*) recuerda haber aislado el *Azotobacter chroococcum* en diversas ocasiones, desde 1922 y en años posteriores, durante la preparación y realización de trabajos prácticos en la cátedra de Microbiología del Prof. *L. Hauman* en la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires, no existe mención bibliográfica alguna de dicha operación hasta 1938, en que el mismo *Soriano* comunicó la presencia de *Azotobacter agilis* en Norte y Sud América, en cuya ocasión se aisló también *Azotobacter chroococcum* y otras formas relacionadas.

En 1935, *Medina*, en el laboratorio de la Cátedra de Microbiología Agrícola en la Facultad de Agronomía de la Universidad de La Plata, y bajo la dirección del autor anterior (*S. Soriano*), efectuó una extensa investigación sobre la determinación de elementos minerales en el suelo (P, K, Ca), de una región de la Provincia de Córdoba, empleando el método del *Azotobacter*, en cuyo transecurso se realizaron numerosos aislamientos de *Azotobacter chroococcum*. Los resultados de estos trabajos fueron presentados a la Comisión del Arco de Meridiano (que hizo fac-

* Aunque algunas erróneamente, como *Azotobacter agilis* y *Azotobacter Vinelandii*, que constituyen buenas especies (Véase a este respecto: *Winogradsky*. S; *Soriano*, S.).

tible la realización del trabajo), pero los presentes autores no tienen noticia de que hayan sido publicados hasta ahora.

Molina, en 1946, comunica el aislamiento de *Azotobacter Vinelandii* en la Argentina, especie sumamente rara en el suelo, como lo certifica la circunstancia de no haberlo hallado más que en una sola muestra de la Provincia de Santa Fe y de no haber aparecido nunca más en las numerosas ocasiones en que se realizaron aislamientos de *Azotobacter* en el país, desde 1922 en adelante. (*)

Desde 1950 comenzaron a aparecer una serie de trabajos referentes al "*Azotobacter*", realizados por *Tschapek* y *Garbosky* (1950-1951a-1951b-1952-1953a-1953b), que aparte de constituir el cuerpo de trabajos más extenso sobre este tema publicado en nuestro país, resultan interesantes por más de un concepto, como se verá más adelante.

La importancia concedida en el país a estos trabajos sobre actividad del *Azotobacter* en el suelo y la circunstancia de que en ellos se hayan emitido opiniones totalmente divergentes con los conceptos generalmente admitidos sobre la actividad de estas bacterias en la naturaleza, hizo imperativo proceder a la verificación de los resultados aducidos por sus autores, en especial modo por las implicaciones de orden agronómico que parecen derivarse de las conclusiones a que se llega en los últimos trabajos de la serie, lo que no se translucía aún de los primeros, a pesar de hallarse expresamente enunciadas sus "aplicaciones agronómicas" en el título.

Los resultados que se comunican en este trabajo derivan de experiencias realizadas en su mayor parte durante los años 1953-1954 y continuadas ocasionalmente, hasta fines del año anterior, para confirmar y ampliar algunos datos que se consideraron de mayor importancia.

II. *Métodos.*

A continuación y separados en los cuatro puntos que comprende la estructura del trabajo, se detallan los métodos de investigación utilizados.

1. *Influencia del oxígeno sobre el desarrollo.*

Fue estudiada con los métodos siguientes:

a. *Método del medio blando*: se empleó el método de *Beijerinck* (1901) consistente en la siembra abundante de tubos de ensayo comunes conteniendo el medio de cultivo apropiado (fórmula de *Winogradsky*

* Salvo la mención que hacen *Tschapek* y *Garbosky* (1951), al pie de una tabla, en que dicen, textualmente: "Especie obtenida en la Argentina por Antonio Garbosky", no aclarándose el origen del cultivo.

1938) con concentraciones decrecientes de la substancia energética: manita: 3-1-0,3-0,1-0,03-0,01 ‰ solificando con cantidades reducidas de agar o de sílico-gel, que permite la formación de un medio "blando": agar 0,2-0,4 % o sílico-gel preparando con soluciones N/10 de mezcla de ácidos y de silicato. (Soriano y Garassini 1941).

El nivel de desarrollo indica su dependencia del O.

b. *Figuras de respiración*: Se empleó también el método de *Bejerinck* (1901), para la formación de sus "figuras de respiración" microbianas, efectuando preparados directos entre porta y cubre-objetos, con cultivos jóvenes (24 horas) densamente suspendidos en agua o en medio de cultivo sin material energético, colocando el cubre de modo tal que uno de sus lados apoye sobre una esquirla de vidrio, para levantarlo algo y permitir así la formación del menisco de líquido en contacto con el aire; se cierra enseguida con vas-par (mezcla de vaselina sólida y parafina en partes iguales) tres lados del cubre-objeto dejando abierto el levantado. A los pocos minutos se observan las figuras de respiración resultantes, típicas para los microorganismos aerobios, microaerófilos o anaerobios usados.

El empleo de estos dos procedimientos, especialmente el primero, hace innecesario el uso del dispositivo ideado por *Tschapek* y *Garbosky* (1952) que, en el mejor de los casos, resulta más complicado y menos exacto.

2. *Distribución del Azotobacter chroococcum en profundidad, en el suelo.*

Para determinar la cantidad real de células de *Azotobacter* existentes en el suelo, a distintas profundidades, se construyeron dos "calicatas" en dos lugares diferentes, sacándose muestras de las tierras respectivas a las siguientes profundidades: 0 a 0,2-10-20 cm. etc. hasta 1 metro. En la toma de nuestras se usaron todas las precauciones de asepsia debidas: en la pared libre de la calicata se marcaron las profundidades correspondientes a cada 10 cm. y, a continuación, con una palita de mano y dos espátulas metálicas, se cavaron nichos laterales de unos 10 cm. de profundidad a lo largo de toda la pared, esterilizando cuidadosamente los instrumentos citados, por flameados con alcohol, cada vez que se comenzaba un nuevo nicho.

Las muestras de cada nivel fueron extraídas de la parte profunda de cada nicho, empleado las espátulas de nuevo cuidadosamente esterilizadas cada vez y usando una para limpiar la parte superficial y otra

para extraer la muestra; éstas se fueron colocando en recipientes estériles para su conducción al laboratorio.

El número de células de *Azotobacter* existentes en cada nivel fue determinado luego empleando los dos métodos bacteriológicos cuantitativos habituales siguientes:

a. *Método de las cajas de Petri*, con sílico-gel de *Winogradsky* (1950), dializada: sembrando en superficie 0,25 g. cada muestra, tamizada en recipientes esterilizados. Se incubó, por 3-4 días a 28°C., luego de lo cual se contaron las colonias características de *Azotobacter* aparecidas, controlando su identidad por observaciones microscópicas y, en caso necesario, por cultivos en medios diferenciales, y se calculó su número referido a un gramo (*).

b. *Método por dilución, en medios líquidos*:

Sembrando en frascos con 50 ml. de medio, diluciones sucesivas de las muestras hechas en agua estéril: 5-1 y 0,2 g., directamente sin diluir y diluciones al 1/25-1/125-1/625 y 1/3.125, sembrando 1 ml. de cada dilución en los respectivos frascos. La última dilución de cada muestra en que se obtuvo desarrollo incuestionable de *Azotobacter*, aseverado por observación y por cultivo en medios apropiados, expresa el contenido (mínimo) de la citada bacteria referido a lg.

3. *Desarrollo del Azotobacter chroococcum en el suelo, con cantidades variables de material energético y de humedad*:

Se utilizó una mezcla de tierra de las dos calicatas (primeros 15 cm) empleándose el método de los cilindros de *Winogradsky* (1926), en dos series paralelas: con 1 % y con 0,1 % de manita, y con cinco graduaciones de humedad en cada serie: 15-17,5-20-22,5- y 25 %, lo cual corresponde al: 30-35-40-45 y 50% de la capacidad máxima de saturación con agua de la muestra, que resultó ser aproximadamente del 50% respecto del peso de tierra secada al aire.

Para garantizar el buen desarrollo del *Azotobacter* se agregó además de la manita, 0,2 % de fosfato de potasio y 2% de creta, sembrándose con cultivos de *Az. chroococcum* aislados de las mismas muestras regándose a continuación con la cantidad de agua requerida y colocando, finalmente, la tierra humedecida en los cilindros de vidrio, con las precauciones que indica el autor del método.

* De las muestras profundas de tierra, se obtuvieron con frecuencia colonias del "bacilo gomoso" de *Winogradsky*, que debe tomarse especial cuidado en no confundir con las de *Azotobacter*: se trata de una bacteria esporulada (de esporulación difícil!), que desarrolla en ese medio debido a su carácter oligonitrofilo.

A los 4-5 días de incubación a 28°C., se efectuó la cuenta de las células existentes en la superficie (primeros 2cm.) y en la profundidad de cada tubo (últimos 2cm.), luego de sacar el tapón parafinado del extremo cerrado, utilizando el método de coloración directa de *Winogradsky* (1925) con eritrosina, cubriendo un volumen determinado de una dilución conocida (generalmente 1/100 o más) con un cubreobjeto de 2x2 cm y contando 20 campos distribuidos lo más uniformemente posible en toda la superficie, después de lo cual se hicieron los cálculos correspondientes.

4. Capacidad de fijación del nitrógeno atmosférico:

Se utilizaron cajas grandes (de 20 cm. de diámetro) según aconseja *Winogradsky* (1926), en las que se colocaron 200 ml. de medio de cultivo con 10-1-0,1-0,01 ‰ de manita solidificando luego con sílico-gel, en cantidad tal que resultara más bien blando, pero suficientemente resistente como para no romperse al mover las cajas, que quedan así con la sílico-gel sin dializar. El medio, antes de solidificarse, se sembró, abundantemente, con cultivos puros de *Azotobacter chroococcum*, se incubó luego por 5 días a 28°C., después de lo cual se secó en estufa o sobre platina caliente a 55°C. y finalmente se determinó el Nitrógeno por Kjeldahl; con las cifras obtenidas se calculó la cantidad de nitrógeno fijado por gramo de manita.

Se hicieron dos series: cada vez con las concentraciones de material energético indicadas y con sus respectivos controles en blanco, sembrados estos últimos y secados de inmediato, sin incuban.

Como la altura del medio en las cajas llega a más de 1 cm. y la siembra del cultivo fue uniformemente en todo su espesor, queda asegurado así el desarrollo del mismo aún en la concentración inferior del material energético (0,01 ‰), puesto que todavía en ese caso sobrepasa los 12 mm. de profundidad requeridos para esa concentración, según se verá, más adelante, en la exposición de los resultados.

III. Resultados.

Los resultados obtenidos en el curso de las investigaciones realizadas se exponen a continuación agrupados, como en el capítulo anterior, en los 4 puntos que siguen.

1. Determinación de la influencia del oxígeno del aire sobre el desarrollo microbiano.

Se emplearon varios cultivos.

A. Una mezcla de aislamientos de *Azotobacter chroococcum*, provenientes de las muestras de tierra en ensayo.

B. Dos cultivos de otros microorganismos incuestionablemente aerobios: *Bacillus subtilis* y *Candida mycoderma*, para servir de término de comparación con los primeros.

A. *Azotobacter chroococcum*:

Los cultivos de *Az. chroococcum* fueron probados, como ya se dijo,

a) Con el método del medio blando, en tubos, y

b) Con el del preparado directo, entre porta y cubre-objeto, para la obtención de las figuras de respiración correspondientes.

a. *Método de los tubos*: a las 24 horas de incubación a 28°-30°C. (y aún antes), se encuentra ya un desarrollo bien visible, en forma de discos a distintas alturas de la columna de agar (o de sílico-gel), mostrando así su respuesta a la influencia del oxígeno.

El desarrollo resultante puede resumirse así:

Planilla Nº 1. Profundidad de nivel del desarrollo de *Azotobacter chroococcum* en tubos de medio blando con diversas concentraciones de manita.

Concentración de manita ‰	Profundidad de desarrollo	
	Límites mm.	Nivel medio mm.
3	0 - 0,8	0,4
1	0 - 1	0,5
0,3	0 - 1,5	0,75
0,1	0,5 - 4,5	2,5
0,03	4 - 9,5	6,75
0,01	12	12

En los tres tubos, con 3-1 y 0,3 ‰ de manita, el desarrollo se produce en superficie, formando discos de un espesor respectivo aproximado de: 0,8-1-1,5 mm.

Con 0,1 ‰ de manita el desarrollo mayor se produce apenas un poco por debajo de la superficie, comenzando a unos 0,5 mm y estando el espesor medio a unos 2mm de profundidad. Inmediatamente debajo se encuentra otro disco más fino, separado del anterior por unos 0,5 mm, estando el mismo a unos 4mm de la superficie.

En el tubo con 0,03 ‰ de manita, el primer disco se produce a unos 4mm por debajo de la superficie, con un espesor de unos 3mm, y luego

otro de aproximadamente 1,5 mm., separado del anterior por 1 mm. Finalmente, en el último tubo con 0,01 ‰ de manita sólo se alcanza a observar (posiblemente por la escasez de material energético) un fino disco de aproximadamente 0,5 mm de espesor, con desarrollo, a la profundidad de unos 12 mm. de la superficie del agar.

A los 5 días de incubación, en la serie de tubos con 0,4 % de agar, los dos primeros: con 3 y 1 ‰ de manita comienzan a mostrar el pigmento oscuro característico de la especie, produciéndose también algo en el tercer tubo con 0,3 ‰. El tubo con 0,1 ‰ de manita tiene ya formados 5 discos con desarrollo alternando con otros sin desarrollo, llegando el último a unos 10 mm de profundidad. El siguiente tubo con 0,03 ‰ de manita presenta también ya 6 discos de desarrollo alternado, con el último situado a unos 20 mm de profundidad. Finalmente el último tubo, con 0,01 ‰ de manita, tiene el disco original a unos 12 mm. y además otro, apenas visible, a unos 30 mm de la superficie.

En los tubos con agar al 0,2 % el desarrollo se presenta aproximadamente en la misma forma, con la diferencia que en el primero, con 3 ‰ de manita la formación de pigmento oscuro es mucho menos intensa que en el segundo, con 1 ‰ de dicha substancia.

Como se ha podido observar por la descripción anterior, los tres últimos tubos de la serie con cantidades de manita desde 0,1 ‰ e inferiores, presentan niveles óptimos de desarrollo por debajo de la superficie del medio, tanto más profundos cuanto menor es la cantidad de material energético carbonado existente en el mismo.

En todos estos tubos, como se ha visto, se produce claramente el interesante fenómeno de alternancia de discos con y sin desarrollo, en la forma típica que lo hacen los anillos de *Liesegang*. En la suposición que esta forma particular de desarrollo pudiera ser causada por la mezcla de cepas de *Azotobacter chroococcum* empleadas en el ensayo, se repitió el mismo, usando esta vez uno sólo de los cultivos puros integrantes de la mezcla anterior, repitiéndose el fenómeno en todas sus partes, con lo cual quedó invalidada dicha suposición.

b. *Figuras de respiración*: Se eligió una cepa de *Azotobacter chroococcum* de la colección, con células un tanto alargadas y movilidad más bien activa, un cultivo fresco del cual fue colocado en suspensión espesa entre porta y cubre-objeto levantado, de acuerdo al método de *Beijerinck* ya descripto. La profundidad del líquido interpuesto, a partir del menisco, alcanzó a unos 15 mm.

Después de unos pocos minutos, pudo observarse claramente que las células de *Azotobacter* que se hallan móviles a la inspección micros-

cópica alcanzan a no más de 1,5 mm de distancia de la superficie del líquido, pero después de unos 30 minutos, la movilidad y la acumulación consiguiente de células se manifiesta con toda nitidez en una capa superficial de unos 2mm de espesor, encontrándose tan solo algunas pocas células móviles algo más abajo de ese nivel. Las células inmóviles se encuentran diseminadas en el preparado, disminuyendo gradualmente su número hacia abajo, debido a la disminución paulatina del espesor del líquido, a causa de la leve inclinación del cubre-objeto.

B. Otros microorganismos:

Se emplearon, como se dijo anteriormente, los siguientes cultivos de microorganismos típicamente aerobios:

a. *Bacillus subtilis*

b. *Candida mycoderma* (*Mycoderma vini*).

Cultivos frescos de ambas especies se sembraron profusamente en agar blando (al 0,3 %) de caldo de carne y mosto de malta respectivamente, en diluciones sucesivas de 1/3, lo cual se consigue con relativa facilidad diluyendo 1 parte del contenido de cada tubo inicial en 2 partes del agar-agua también en la misma concentración, y así sucesivamente, cuando aún se hallan liecuados, después de haberlos hervido y entibiado convenientemente, luego de lo cual, la serie entera se siembra con una cantidad más bien abundante y uniforme del cultivo en ensayo.

Tanto en el caso de la bacteria como en el de la levadura citadas, el resultado del desarrollo fué, en líneas generales, una reproducción de lo que se describió respecto del *Azotobacter chroococcum*, en el sentido de que en ambos casos se manifestó también un desarrollo por debajo de la superficie del medio, tanto más profundo cuanto mayor es la dilución del medio, abstracción hecha de la naturaleza del cultivo.

Por lo que se ha visto, en consecuencia, debe admitirse que, con toda probabilidad, todos los microorganismos aerobios, y entre ellos, por supuesto también el *Azotobacter chroococcum*, presentan niveles de desarrollo más profundo cuanto menor es la cantidad de sustancia energética, ocupando el nivel de desarrollo máximo la profundidad en que la relación entre la concentración del oxígeno disuelto en el medio y de la sustancia energética oxidable sea óptima. De modo que, cuando disminuye sucesivamente la concentración de la fuente carbonada, los microorganismos respectivos desarrollan más favorablemente en el lugar donde se encuentra la concentración óptima correspondiente del oxígeno disuelto, es decir en las capas más profundas del medio.

2. *Determinación cuantitativa del *Azotobacter chroococcum*, a distintas profundidades del suelo.*

La cantidad real de la células de *Azotobacter chroococcum*, a distintas profundidades, que se encuentran en el suelo, fue determinada empleando los dos procedimientos cuantitativos citados en el capítulo anterior.

A. Siembra directa de tierra sobre sílico-gel, en cajas de Petri.

Como ya se ha dicho anteriormente, se usó el método de preparación de la sílico-gel dializada de Winogradsky (1950), de acuerdo con las últimas recomendaciones del autor. Las muestras de tierra se sembraron en granitos de 0,5-1 mm de diámetro, pasadas por cedazo esterilizado, provenientes de las dos calicatas A y B, correspondientes a los 2 primeros centímetros de la superficie y luego, sucesivamente, cada 10cm. hasta la profundidad de 1m.

Los resultados están consignados en forma abreviada en la planilla Nº 2 adjunta.

Como puede verse claramente por las cifras que se consignan, el número real de células de la especie citada existente en cada muestra, revelables por el método empleado, se encuentra formando la mayor acumulación en los primeros 10 cm. superficiales, bajando luego casi bruscamente, a una mayor profundidad, mostrando ya a los 20 cm. valores equivalente al 1/10-1/20 de los anteriores, para anularse (o aparecer con cifras despreciables) a los 30-50 cm de profundidad.

Esto no significa, por supuesto, que no puedan encontrarse algunas células aisladas de *Azotobacter* a mayores profundidades, pero su presencia allí carece entonces de significado y no tiene importancia práctica alguna, del punto de vista agronómico, si en la superficie correspondiente del mismo lugar se las encuentra en número incomparablemente superior, como se acaba de ver.

B. Siembra de diluciones sucesivas de tierra en medios líquidos, en frascos:

Las muestras de las dos calicatas, provenientes de cada uno de los niveles que se indican más adelante, fueron sembradas en frascos conteniendo 50ml. de medio de cultivo líquido en las cantidades anteriormente citadas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el método anterior, no se consideró necesario con éste, efectuar las siembras de las muestras

provenientes de todos los niveles, empleándose sólo las que se indican en la planilla N° 2 con los resultados obtenidos después de 6 días de

Planilla N° 2. Contenido de *Azotobacter chroococcum* en muestras de tierras tomadas a diversas profundidades, sembradas sobre sílico-gel en cajas de Petri y en medios líquidos en frascos.

Profundidad de las muestras en cm.	N° de colonias en caja de Petri por g. de tierra	Desarrollo en medio líquidos Cantidad de tierra sembrada						
		Gramos			Diluciones			
CALICATA A		5	1	0,2	1/25	1/125	1/625	1/3125
0 — 2	228							
10	260	+	+	+	+	+	+	+
20	20							
30	16	+	+	—	—	—	—	
40	4							
50	0	+	+	—	—			
60	0							
70	0	+	—	—				
80	0							
90	0	+	—	—				
100	0							
CALICATA B								
0 — 2	100	+	+	+	+	—	—	—
10	60	+	+	+	+	+	—	
20	4							
30	0	+	+	+	—			
40	0							
50	0	+	+	—				
60	0							
70	0	—	—	—				
80	0							
90	0							
100	0							

incubación, y comprobación final a los 12 días, del desarrollo de *Azotobacter* obtenido.

También aquí puede verse que la distribución del *Azotobacter chroococcum* en el suelo se revela, por este método, como abundante en las capas superficiales, disminuyendo rápidamente hasta encontrarse

sólo en cantidades mínimas hacia los 50cm. de profundidad, con alguna presencia ocasional a profundidades mayores, que pueden alcanzar hasta 1m. (y quizás más).

Los resultados obtenidos con ambos métodos si bien no coinciden exactamente, son suficientemente claros en el sentido de poner en evidencia que el *Azotobacter chroococcum* sólo pulula en los niveles superiores del suelo, y que por debajo de los 50cm. ya no se lo encuentra sino en mínimo número, en las tierras ensayadas, a pesar de que en las mismas tierras se lo ha encontrado relativamente abundante a los 10-15cm.

A este respecto, finalmente, merece destacarse el hecho de que todas las muestras probadas con el método del medio líquido sembrando 5g. dieron resultado positivo respecto de la presencia de *Azotobacter* aún a la profundidad de 90cm. (calicata A), a pesar de lo cual, utilizando métodos cuantitativos apropiados (p. ej. siembras de diluciones sucesivas en el mismo medio) se puso de manifiesto que si bien puede encontrarse como mínimo una célula de dicha bacteria en 5 g. de la muestra, tomada a esa profundidad, que da origen al desarrollo en el medio sembrado, la misma tierra contiene innumerablemente más: 15.625, en la muestra tomada a sólo 10 cm.

3. Determinación del desarrollo del *Azotobacter chroococcum* en el suelo con diversas cantidades de material energético y de humedad:

Se hicieron dos series de pruebas, empleando el método de los cilindros de vidrio descriptos por Winogradsky, conteniendo columnas de tierra de diversas alturas: una con 1 % y otra con 0,1 ‰ de manita, y humedad relativa al peso de la tierra seca, de: 15-17,5-20-22,5 y 25 % como se detalló en el capítulo anterior.

Después de sembrar con *Azotobacter chroococcum* y luego del período de incubación, se obtuvieron los resultados que se consignan en la planilla N° 3 adjunta.

Comparando las cifras de la planilla puede observarse que el *Azotobacter chroococcum* desarrolla en cantidad mucho mayor (30-60 veces más) cuando dispone libremente de material energético (1 % de manita), que cuando dicho material se encuentra en cantidad seguramente escasa (0,1 ‰), siendo éste, evidentemente, un factor limitante.

Con 1% de manita las cifras que indican el mayor desarrollo se alcanzan en la tierra con 17,5 % de humedad (35 % de la capacidad de saturación), lo cual parecería inconcebible.

Aún con menor humedad (sólo 15 %) (30 % de saturación) las cifras no son muy inferiores, y en ambos casos, también se aproximan mucho las correspondientes al desarrollo superficial (0,2 cm.) y más

profundo (13-15cm. y 18-20cm. respectivamente en las calicatas A y B); pero en cambio, ya con 20% de humedad (o sea 40% de la capacidad de saturación) no sólo la cantidad de células desarrolladas en la superficie comienza a disminuir, con respecto a los casos anteriores sinó, lo que parece mucho más importante aún, dicha cantidad se reduce sensiblemente, (casi a la mitad) a los 8-10cm de profundidad.

Con 22,5 % de humedad, y más aún con 25 % (45 y 50 %, respectivamente de la capacidad de saturación) la disminución del desarrollo es mucho mayor, y siempre las cifras alcanzadas son menores a una mayor profundidad (en ambos casos 3-5cm.) que en superficie (en los 2 primeros centímetros).

Planilla N° 3. Desarrollo de *Azotobacter chroococcum* en profundidad en tierras con diversos grados de humedad y de material energético.

% de la Capacidad de saturación con agua	Grado de humedad %	Profundidad de las muestras cm	Millones de células por gramo de tierra M A N I T A	
			1 %	0,1 ‰
30	15	0 - 2	339	5
		12 - 20	326	5
35	17,5	0 - 2	349	10
		13 - 15	360	7
40	20	0 - 2	291	7
		8 - 10	164	5
45	22,5	0 - 2	92	7
		3 - 5	57	6
50	25	0 - 2	63	19
		3 - 5	40	12

Con 0,1 ‰ de manita el desarrollo es tan escaso, comparando con el del caso anterior, que toda deducción relativa a sus mutuos valores pierde realmente importancia, no acusándose, por otra parte, mayores diferencias entre sí, salvo con 25% de humedad (50% de la capacidad de saturación) en que las cifras aparecen más elevadas (cerca del doble que las mayores de las otras).

Resulta, en cambio, evidente el efecto de la carencia de material energético con esa escasa cantidad de manita utilizable, por lo que cabe interpretar el fenómeno como un efecto de lo que puede denominarse *oligocarbofilia*. Además en todos los niveles de humedad (del 15 al 25 % probados) se observa mayor cantidad de desarrollo (igual sólo con 15%) en superficie que en profundidad como en el caso anterior.

4. *Determinación de la capacidad de fijación del nitrógeno atmosférico por el Azotobacter chroococcum, con distintas cantidades de material energético.*

Se probaron aquí 4 proporciones de material energético: manita al 10-1-0,1 y 0,01 ‰ consideradas, escalonadamente, como satisfactoria hasta muy deficiente para la obtención de un amplio desarrollo y consiguiente fijación total del nitrógeno del aire, del microorganismo en estudio.

Planilla N° 4. Capacidad de fijación del Nitrógeno atmosférico por el *Azotobacter chroococcum* con diversas concentraciones de material energético.

SERIE I

Manita ‰	NITRÓGENO fijado			Relación g. manita /. mg. N.	mg. de N por Kg.
	encontrado	controles	calculado		
	mg.	mg.	mg.		
0,01	2,10	1,2	0,9	90	4,5
0,1	2,24	1,2	1,04	52	5,2
1	4,5	1,25	3,25	16,25	16,25
10	26,4	1,72	24,68	12,34	123,4

SERIE II

0,01	1,14	1,2	0,06	30	3
0,1	1,45	1,2	0,25	12,5	1,25
1	4,5	1,25	3,25	16,25	16,25
10	26	1,72	24,28	12,14	121,4

Se hicieron dos series de ensayos con dichas proporciones de manita, en el medio de cultivo de *Winogradsky*, libre de N, con sílico-gel blanda sin dializar, anteriormente citado, distribuido en cajas con 200 ml. de medio, y sus respectivos controles, para poder deducir la cantidad de N. que pudiera contener el medio de cultivo junto con el material de siembra.

Los resultados obtenidos se exponen en la planilla N° 4, que se adjunta.

Para cada cantidad de manita utilizada, en la planilla figura la cantidad de Nitrógeno, en miligramos, encontrada en los análisis (columna 2) y la resultante de la misma luego de la deducción correspondiente a los controles. (columna 4). Se incluye también, en la columna 5 las cifras

calculadas correspondientes a la cantidad, en miligramos, de N asimilado referidos a 1 g. de manita y, finalmente, en la columna 6, la cantidad total de N. asimilado, también en miligramos, calculado por cada Kilo-gramo del medio utilizado.

Como puede verse por las cifras expuestas, los resultados de ambas series indican que la cantidad mayor de N fijado corresponde al medio con 1 ‰ de manita: 16,25 mg de N por 1 g. de manita; en el medio con 10 ‰ de manita la cantidad de N fijado es algo inferior: 12,24 mg. de N por gramo de sustancia energética (término medio de 12,34 y 12,14 de las dos series), cifras que se consideran, no obstante, como de un rendimiento bien satisfactorio para este tipo de fijación.

Los datos referentes al medio con 0,1 ‰ de manita, en que figura la cifra evidentemente muy exagerada de 52 mg. de N. fijado por gramo de sustancia energética en la serie 1, y solo de 12,5 mg en la serie 2 son, como se ve, poco satisfactorios y es aconsejable no tomarlos en consideración. Con mayor razón aún, deben descartarse los datos relativos al medio con 0,01 ‰ de manita, debido al muy alto valor del error experimental en que se incurre cuando se trabaja con cantidades tan pequeñas de sustancias energéticas, como las citadas, puesto demanifiesto por la enorme discrepancia y lo exagerado de las cifras que figuran en la planilla.

Finalmente, al considerar las cifras de la última columna que se refieren a la cantidad de N total fijado, calculado para cada concentración de sustancia energética utilizable, se observa que si bien con las concentraciones menores de material energético se obtiene un mayor rendimiento de fijación, la cantidad total de N fijado, por unidad de medio, es incomparablemente mayor cuanto más alta es la concentración de dicho material, lo que equivale a reconocer que, para asegurar una máxima fijación total de N en el suelo por el *Azotobacter chroococcum* es absolutamente imprescindible proveer al mismo de la suficiente cantidad de material energético carbonado, no nitrogenado, que hace factible dicha fijación.

IV. *Discusión.*

I. Al estudiar el problema de la fijación de N atmosférico, *Meyerhof* y *Burk* (1928) demuestran que el exceso de oxígeno libre inhibe la respiración y la fijación del N. del *Azotobacter*, llegando a la conclusión de que la concentración del oxígeno tiene una importante influencia sobre el valor del nivel de la fijación de nitrógeno y sobre la relación: Moles de N₂ fijado ÷ Moles de O₂ consumido, mientras que el máximo

absoluto de la fijación de N y del desarrollo corresponden a 4-5 % de O, y finalmente establecen que con la disminución de la cantidad de O aumenta todavía más la relación entre la cantidad de N fijado y O consumido.

Burk (1930), encuentra que la relación óptima entre la cantidad de O y de C para el *Azotobacter* es de 0,002-0,003.

Tschapek y Garbosky (1952), fijan esa relación como igual a 5, lo cual constituye una diferencia enorme con las cifras dadas por los autores citados, y afirman que con valores inferiores a esta cifra el *Azotobacter* desarrolla en superficie formando película, pero, en el caso inverso, el desarrollo se establece a determinadas profundidades. Llegan a la conclusión de que el desarrollo superficial en película se obtiene únicamente si la concentración de la sustancia energética es igual o mayor de 0,1 g por litro y si es menor se forma una capa de gérmenes móviles a diversas profundidades que están en relación inversa con dicha concentración. Afirman también, aunque sin demostrarlo ni citar datos bibliográficos fehacientes, que: "normalmente las soluciones del suelo contienen menos de 0,1g/L de sustancia energética; por lo tanto el *Azotobacter* debe encontrar suficiente profundidad para poder desarrollar, es decir, en otros términos, debe hallar suficiente cantidad de agua en el suelo", concluyendo que los suelos "inundados, irrigados y en general muy húmedos, deben ofrecer mejores condiciones de desarrollo para el *Azotobacter*".

En el presente trabajo se han confirmado, por una parte, los resultados de *Meyerhoff y Burk* (1929), *Burk* (1930) y *Tschapek y Garbosky* (1952), en lo que respecta a la existencia de una relación óptima entre la cantidad de oxígeno necesario para la oxidación y la de carbono de la sustancia oxidable, que se hace evidente con la visualización del fenómeno descrito por los últimos autores citados, si bien empleando aquí métodos mucho más simples, conocidos anteriormente en la literatura.

Por otra parte, los resultados comunicados en este trabajo demuestran que el fenómeno observado y descrito por *Tschapek y Garbosky* (1952) en el *Azotobacter Vinelandii*, relativo a su desarrollo en profundidad, cuando la concentración de la sustancia energética carbonada disminuye hasta valores mínimos es, en realidad, de orden general, pudiéndose observar también muy claramente en otros microorganismos aerobios absolutos típicos, como se ha detallado en el capítulo anterior.

Importa un error de concepto confundir este fenómeno con la anaerobiosis puesto que esta forma de vida se caracteriza por manifestarse en ausencia o con disminución muy acentuada del oxígeno respecto de

la concentración en que se halla en el aire, pero, siempre con cantidades normales, relativamente elevadas, de la sustancia energética carbonada y no en concentraciones carenciales de la misma, características de la "oligocarbofilia", como lo exige la modalidad descripta por los autores citados.

Además, *Tschapek y Garbosky* (1952), consideran como normal una concentración del extracto o "jugo" de suelo, como lo denominan, la obtenida con la proporción de 10 g. de tierra y 25 ml. de agua, sin tomar en consideración que de acuerdo con los trabajos de *Winogradsky* (1926) el grado óptimo de humedad para el desarrollo del *Azotobacter chroococcum* en el suelo, aunque depende de la composición de éste, se encuentra, en general, alrededor del 15-20 %, lo cual ha sido plenamente confirmado en el presente trabajo, según se ha detallado también en el capítulo anterior. De lo que se deduce que los autores citados usaron pues, equivocadamente en sus experimentos, extractos de suelo unas 15 veces más diluidos de lo que corresponde, viciando, en consecuencia, sus resultados.

Finalmente, es de lamentar que los autores del trabajo que se comenta no hayan realizado sus investigaciones empleando directamente suelo en sus ensayos, en lugar de un extracto exageradamente diluido del mismo, y que no hayan utilizado la típica especie de *Azotobacter* de ese "habitat" que es el *Azotobacter chroococcum*, como correspondía, en lugar del *Az. Vinelandii* que, tras de ser una especie predominantemente acuática (*Winogradsky* 1938), no parece encontrarse con frecuencia (*Soriano* 1941).

II. La bibliografía relativa a la distribución vertical del *Azotobacter chroococcum* en el suelo no es muy numerosa. *Ashby* (1907-8) usa el método indirecto de la fijación de N en medio líquido, sembrando muestras de varias profundidades (10-20-30 cms.), obteniendo mayor fijación en las muestras más superficiales hasta los 10 días de cultivo, pero luego, a los 13 días, los valores tienden a uniformarse.

Lipman (1912), (citado por *Burgess* 1930), manifiesta que la fijación de N por el *Azotobacter* no se realiza, usualmente, por debajo de 2 pies en los suelos semiáridos de California, en cambio encuentra que hay aún activa nitrificación a 6 pies y amonificación a 12 pies.

Burgess (1930), además de efectuar una investigación semejante, con el mismo método inconveniente usado por *Ashby*, agrega la numeración de colonias de bacterias desarrolladas en agar de *Ashby* con manita; estudia dos suelos, citando valores tan altos que resultan sospechosos: 400.000 y 280.000 por gramo de tierra en las primeras 6

pulgadas, y 12.000 y 10.000, respectivamente, a la profundidad de 6 pies. El error se debe, probablemente, a que en el medio usado, además del *Azotobacter*, desarrollan también otras bacterias "oligonitrófilas", muy poco exigentes en N combinado, que puede ser aportado en cantidades mínimas por el agar.

Waksman (1932), menciona que: en regiones húmedas los organismos fijadores de nitrógeno están confinados en las pocas pulgadas superiores del suelo. Pero en las regiones áridas pueden ser bastante activos hasta una profundidad de 3-4 pies.

Paulie (1934) encuentra "células semejantes al *Azotobacter*" hasta unos 3 mts. de profundidad, identificadas por el método de coloración directa de Winogradsky, aunque no por cultivo. Menciona además que Komonowa halló *Azotobacter* hasta 2 metros en suelos de Bakaza. No se aclaró, según el autor, si las observadas por él son realmente células de *Azotobacter* y si fijan nitrógeno.

Genkel (1946) (citado por Tschapek y Garbosky, 1952), encuentra, según estos autores, que el "Azotobacter abunda más en el horizonte B pero no en el A", sin aportar otros datos.

Stevenson (1953), estudiando el contenido microbiológico de seis muestras de suelo, encuentra, para el *Azotobacter*, en las primeras 6-8 pulgadas, las cifras siguientes por g. de tierra: 100-1 500-75-195-15 y 360; y a las 10-28 pulgadas respectivamente: 0-0-0 5-15-115. En un caso (muestra 4) con alto contenido de materia orgánica, hasta niveles profundos, encuentra 150 a 38-46 pulgadas, en que continuó el ensayo, después de las 5 anteriores halladas a las 20-28 pulgadas.

Tschapek y Garbosky (1953) someten a la comprobación experimental los conceptos elaborados en sus anteriores trabajos, a cuyo fin investigan diversas muestras de suelos respecto de la presencia y distribución del *Azotobacter*. Los resultados obtenidos, corroboran por completo, según los autores, los conceptos expuestos en las ocasiones anteriores, llegando a la conclusión de que: "el *Azotobacter* se encuentra hasta 2 o más metros de profundidad en nuestros suelos pampeanos, en cuyos horizontes superiores no siempre se encuentra; que abunda más en el horizonte glei de los suelos inundados o pantanosos que en los horizontes superiores; y que se encuentra finalmente, en el subsuelo de las calles o plazas pavimentadas de la ciudad de Buenos Aires".

No obstante estas categóricas afirmaciones, las conclusiones del trabajo de Tschapek y Garbosky (1953) son objetables por haber incurrido en serios errores de técnica experimental. En efecto: resulta inconcebible comprobar que en sus investigaciones de índole cuantita-

tiva y respecto del "*Azotobacter*", no han empleado método alguno de análisis microbiológico *cuantitativo*, como es fácil de comprobar mediante un somero examen del trabajo aludido. El método utilizado por los autores, consiste en la siembra de 5 gr. de suelo en 50 ml. de solución nutritiva líquida, con 1 % de manita y observar, el cabo de 7-8 días de incubación a 28°C., el "grado de desarrollo de la película formada" que no es, de ninguna manera, un método "*cuantitativo*" que sirva para indicar el contenido de *Azotobacter* del material original sino, simplemente, un método cualitativo utilizable para investigar la presencia o ausencia de la mencionada bacteria en la cantidad de suelo sembrada.

El estado de desarrollo de la película, en cada frasco, que ha sido interpretado por los citados autores como indicativo del contenido original en *Azotobacter* de las muestras de suelos examinadas, no indica otra cosa más que el mayor o menor desarrollo alcanzado por la mencionada bacteria en cada frasco que depende, en primer término, de la composición química de cada muestra en examen, así como de su contenido microbiano total y en *Azotobacter*. Una siembra masiva del material, tal como la indicada, altera sustancialmente la composición del medio de cultivo usado, libre de N, permitiendo, de acuerdo a su contenido de materia orgánica en cada caso, el desarrollo hasta profuso de otros microorganismos "oligonitrófilos", fuera del *Azotobacter*, que afectan a su vez el desarrollo y formación de la película superficial característica de esta bacteria. De esta manera, en aparente paradoja, las muestras superficiales de suelo, más ricas en materia orgánica que las profundas, no suelen dar películas mejor formadas, abstracción hecha de su contenido original en células de *Azotobacter*.

La simple inspección de los resultados contenidos en las tres tablas del trabajo de *Tschapek y Garbosky* permite localizar, fácilmente, las causas del error en que estos autores han incurrido, puesto que, por las razones expuestas, no están autorizados a deducir de sus tablas 1 y 2 un mayor contenido de *Azotobacter* en las muestras sembradas por el mero hecho de haber dado origen a películas mejor formadas o más desarrolladas, así como tampoco están autorizados a deducir de la tabla 3 relación convincente alguna de la pretendida "anaerobiosis" del *Azotobacter*, por haberlo encontrado vivo en el subsuelo de calles cubiertas con pavimentos impermeables, puesto que en esta última tabla aparte de la existencia del mismo error en el aspecto cuantitativo, los autores parecen no haber tomado en consideración que el *Azotobacter chroococcum* puede perdurar durante años en anaerobiosis, al estado

inactivo, debido a su peculiar capacidad de formación de “quistes” resistentes a condiciones ambientales adversas.

Como se ve, los hechos aportados en este nuevo trabajo de *Tschapek y Garbosky* lejos de corroborar los conceptos elaborados en otros anteriores han permitido puntualizar graves deficiencias de índole experimental cometidas por la utilización de técnicas de investigación inapropiadas.

III. Además de la concentración de la materia energética carbonada la humedad figura entre los factores ecológicos más importantes, en relación con la aireación, que condicionan el desarrollo del *Azotobacter chroococcum* en el suelo.

Aparte de la mención de *Waksman* (1932), ya citada anteriormente, relativa a las condiciones de humedad para la fijación del N, *Winogradsky* (1926) realizó una serie de investigaciones encaminadas a dilucidar este punto en forma experimental. Mediante el uso de cilindros de vidrio, relativamente anchos (5 cm. de diámetro), y de alturas progresivas (5-10-etc. hasta 25 cm), taponados en un extremo y llenados con tierra ajustadas a diversos grados de humedad, con agregado liberal de material energético (0,5-1 % de manita o glucosa) pudo poner de manifiesto que, en su ambiente natural, el *Azotobacter chroococcum* desarrolla profusamente hasta 20-23 cm de profundidad con 15 % de humedad a 16 cm. con 18 %, tan solo a 5 cm. con 20 % y no desarrolla en absoluto, ni aún en superficie, (donde se establecen entonces condiciones de anaerobiosis), con 23 % de humedad (!).

En abierta oposición con estos resultados están los de *Tschapek y Garbosky* (1952) (1953), en que llegan a formular sus nuevos “conceptos” acerca de la actividad del *Azotobacter* en la naturaleza, de acuerdo con los cuales, según dicen textualmente, esta bacteria” en el suelo puede desarrollarse únicamente en condiciones de anaerobiosis pese a ser considerada una bacteria aerobia”.

Una contradicción tan manifiesta sólo se explica por la diferencia de concentración de la materia energética utilizable por el *Azotobacter* en ambos casos: en sus experiencias *Winogradsky*, agrega ésta, generalmente en proporción de 1 %, mientras *Tschapek y Garbosky* “deducen” y admiten que debe estar en concentraciones inferior al 0,01 % (es decir 100 veces menor !), basándose en experimentos comparativos en los que emplearon extractos acuosos de suelo extremadamente diluidos, como ya se ha mencionado anteriormente.

Del todo de acuerdo con las experiencias de *Winogradsky*, en el presente trabajo ha quedado establecido que la cantidad de agua neces-

ria para el desarrollo óptimo del *Azotobacter chroococcum* en el suelo, en presencia de cantidades suficientes de material energético, se encuentra con valores relativamente bajos (15-20 % de humedad!), como consta en las cifras consignadas en la planilla N° 3.

Estos resultados corroboran los conceptos clásicos elaborados por *Beijerinck*, descubridor del género, por *Winogradsky*, creador de la microbiología del suelo, y por otros muchos investigadores, acerca de la biología del *Azotobacter* y han servido para poner de manifiesto los errores experimentales, de interpretación y de concepto en que han incurrido *Tschapek* y *Garbosky*, entre los que cabe destacar, como fundamentales en sus experiencias más decisivas, el empleo de extractos de suelo 1.500 % más diluidos de lo que corresponde, y la falta de utilización de métodos microbiológicos analíticos "cuantitativos", como ya se ha puntualizado en otras partes de este trabajo.

IV. El proceso de fijación del N. atmosférico por bacterias libres y en especial por las consideradas como aerobias correspondientes al género *Azotobacter* ha sido objeto de numerosos trabajos (*Winogradsky S.*, *Beijerinck M. W.*).

Lipman (1903) (1908), encuentra mayor fijación de nitrógeno por *Azotobacter* en medios con menor concentración de sustancias energéticas: 10,5 y 4,68 mg. de N. por g. de manita en concentración de esta última de 0, 1 y 1 % respectivamente.

Ashby (1907-8), menciona haber obtenido mayores valores de fijación de nitrógeno en los primeros 7 días, de muestras provenientes de menor profundidad tendiendo a equilibrarse a los 13 días, con una máxima de 13,13 mg. de nitrógeno por g. de manita a los 10 días, de la muestra tomada a los 10 cm.

Traaen (1916) (citado por *Waksman* (1932), encuentra mayor fijación de nitrógeno con 25 % de humedad (16,6 mg. por g. de manita), que con mayor o menor grado de humedad (en experiencias donde no parece haberse diferenciado el tipo de fijación aerobia y anaerobia!).

Burgess (1930) obtiene fijación aerobia mayor en el suelo, en muestras provenientes de menor profundidad: 13 y 19 mg. de N por gramo de manita, en dos muestras provenientes de las primeras 6 pulgadas, en comparación con 7 y 1 mg. por g., respectivamente, en muestras de los mismos suelos tomadas al tercer pie de profundidad.

Waksman (1932), en la segunda edición de su texto, menciona que el *Azotobacter chroococcum* fija hasta 10 mg. de N. por gramo de manita, en solución, y 12,6 mg. por gramo en suelo, en cultivos puros.

Fischer (1950), a diferencia de *Traaen*, encuentra que la fijación de nitrógeno es menor con menores cantidades de hidratos de carbono.

Bukatsch y Heitzer (1952), en una larga serie de experiencias, encuentran que la capacidad de fijación de N de distintas cepas de *Azotobacter*, usando diversas concentraciones de sustancias carbonadas (del 1 al 0,063 %), es mayor en algunos casos (2 cepas) con concentraciones menores de esas sustancias (0,25 %), pero que en la mayoría de ellos, (otras 5 cepas, la fijación es mayor con las mayores concentraciones (0,5-1 %).

Los resultados de la presente investigación, expuestos en la planilla N° 4, indican que el rendimiento mayor en la fijación del nitrógeno por unidad de sustancia energética, se obtiene con concentraciones de 0,1 % de manita: 16,25 mg. de N por 1 g. de manita, en las dos series hechas: mientras que con 1 % se fijan 12,14 y 12,34 mg de N (promedio 12,24 mg.), respectivamente en ambas series.

Este valor de 12 mg., en cifras redondas, de N fijado por gramo de manita utilizable, puede considerarse como muy bueno, comparado con el de 10 mg. que se acepta en general como satisfactorio (*Winogradsky S.*), de modo tal que, como se ha hecho constar anteriormente, el empleo del medio de sílico-gel modificado, blando, y sin dializar, que se ha usado en este trabajo, parece ser preferible, no solamente por la mayor simplicidad de su preparación, sino también por presentar esta ventaja adicional como mejor medio de fijación.

Con menores concentraciones de sustancia energética (0,01-0,001 %) los valores de fijación son dispares o exagerados por lo que resulta aconsejable no tomarlos en consideración, debido a la alta incidencia a que llega el error experimental a esos niveles de concentración tan bajos.

Por otra parte, del punto de vista agronómico, interesa mucho más que el rendimiento de fijación la cantidad de N fijado por unidad (superficie, volumen o peso) del medio en que la fijación se realiza. Las cifras calculadas relativas a este punto, que también figuran en la planilla aludida, resultan elocuentes, indicando que las mayores cantidades totales de nitrógeno fijado por kilogramo de medio, se obtienen, naturalmente, con los niveles altos de concentración de sustancia energética: 122,4 mg. de Nitrógeno (promedio de las dos series) por Kg. de medio en la concentración de 1 % de manita, y tan solo 16,25 mg. de N en igual cantidad de medio, en la concentración de 0,1 % de manita, o sea 7,5 veces menos que en el caso anterior. Mayores diferencias se obtendrían si se comparan los valores calculados resultantes de la fija-

ción en concentración aún más bajas de la sustancia energética que las ya mencionadas (como exigirían las cifras indicadas en los trabajos de *Tschapek y Garbosky*: 0,01 % y menores), en cuyo caso aún admitiendo valores de rendimiento muy altos de fijación por ej.: 20 mg. de nitrógeno por gramo de manita, tan solo se llegaría a obtener la fijación de 2 mg. de N por Kg. de medio o sea 60 veces menos que en el primer caso.

Finalmente, no está demás destacar aquí la implicación agrícola de los resultados obtenidos en el presente trabajo, puesto que en este sentido es ciertamente alentador vislumbrar la perspectiva de poder aumentar la fijación de nitrógeno en el suelo mediante el agregado de materia orgánica (por ej., en la práctica, empleando paja de rastrojos: véase a este respecto los muy importantes resultados obtenidos por *Sauberan y Molina* (1958) en nuestro país) en lugar que tener que admitir la desalentadora imposibilidad de poder hacer algo más que recurrir a la inundación de los campos para obtener, como máximo, una misérrima cantidad de nitrógeno fijado, como parece desprenderse de las conclusiones a que han conducido los trabajos de los autores anteriormente mencionados.

V. Conclusiones.

Los resultados del presente trabajo, expuestos en el capítulo anterior correspondiente, permiten establecer las conclusiones siguientes:

1. El *Azotobacter chroococcum* en una bacteria típicamente aerobia que, al igual que otros microorganismos del mismo tipo, como *Bacillus subtilis* y *Candida mycoderma*, desarrollan a diversos niveles dependientes de la concentración del material energético disponible. El desarrollo en profundidad se produce, en todos esos casos, por deficiencias de material energético carbonado, es decir en condiciones de "oligocarbofilia", pero con cantidades liberales del mismo (por ej. 1 %), el desarrollo es siempre superficial, lo que no sucede con los microorganismos típicamente anaerobios en los que el factor limitante no es el material carbonado sino el oxígeno, en la concentración en que se encuentra en el aire.

2. En la naturaleza, el *Azotobacter chroococcum* se halla distribuido en el suelo de modo tal que, en profundidad, en condiciones normales, predomina netamente en los primeros 15 cm. de su capa superficial arable.

3. Las condiciones ecológicas óptimas para el desarrollo del *Azotobacter chroococcum*, en el suelo, se encuentran con valores relativamente bajos de humedad y relativamente altos de material orgánico no nitro-

genado. En general con respecto a estos dos factores, contenidos de humedad entre 15 y 20 % y de materia orgánica no nitrogenada utilizable alrededor del 1 % aseguran un desarrollo profuso de esa bacteria en la capa superficial arable del suelo.

4. La cantidad de nitrógeno elemental asimilado por el *Azotobacter chroococcum* en cultivos puros, por unidad de material energético carbonado no nitrogenado utilizable está, dentro de ciertos límites, en relación inversa con la concentración de dicho material. Pero considerando que lo realmente importante, del punto de vista agronómico, es la cantidad total de nitrógeno fijado por unidad de volumen y de tiempo, el factor esencial en este proceso resulta ser, en último análisis, el de la provisión abundante del citado material energético carbonado.

VI. Resumen.

El presente trabajo fue planeado con el objeto de comprobar el comportamiento del *Azotobacter chroococcum* en relación con el oxígeno, su distribución en profundidad en sus condiciones naturales en el suelo, su desarrollo en relación con la humedad y material energético, y su capacidad de fijación de nitrógeno.

Como resultado de las investigaciones efectuadas, pudo establecerse que la citada bacteria se comporta igual que otros microorganismos típicamente aerobios, que en su distribución natural en el suelo predomina en la capa superficial arable, que las condiciones óptimas del mismo, respecto del contenido de agua, corresponden a valores relativamente bajos, entre el 15 y 20 % de humedad, y que, para una máxima fijación total de nitrógeno el factor más importante, en condiciones normales, es la amplia provisión de material energético orgánico no nitrogenado.

El cúmulo de datos reunidos en la presente investigación contradice las afirmaciones de *Tschapek y Garbosky* contenidas en una serie de trabajos publicados, que sólo pueden ser explicables como consecuencia de graves errores cometidos en el curso de los mismos, atribuibles, en su mayor parte, como se detalla en el texto, al incumplimiento de procedimientos elementales de metodología experimental.

BIBLIOGRAFIA

- ASHBY, S. F. *J. Agr. Sc.* 2: 35, (1907-8).
 BEIJERINCK, M. W. *Centr. f. Bakt. II abt.* 7: 561, (1901).
 BERTHLOT M. *Compt. Rend. Acad. Sc.*: 101: 775, (1885).
 BUKATSCH, F. und HEITZER, J. *Arch. f. Mikrob.* 17: 79 (1952).
 BURGESS, P. S. *Proc. 2nd Intern. Congress Soil Sc.*; Comm. 3: 42 (1930).

- FISCHER. *Arch. f. Mikrob.* 14: 385, (1950).
- LIPMAN, G. J. N. Y. Agr. Exp. St. 24: 217 (1903); 25-237 (1904); 26: 254 (1905) 29: 137 (1908); (1912: citado en Burgess, (1930).
- MEYERHOF, O. und BURK D. ZEITS, PHYSIK. Chem. 139 (A): 117; (1928).
- PAULIE, E. E. *Soil Sc.* 38: 401, (1934).
- SAUBERAN, C. y MOLINA, J. S. *Agotamiento, erosión y recuperación de suelos en la Rep. Argentina*. Ed. "Hombre y suelo", Bs. Aires, 1958. (Contiene bibliografía completa de sus trabajos de 1946 a 1958).
- SORIANO, S. y GARASSINI, L. A. *Rev. Arg. de Agron.* T. 8, n. 3; p: 177 (1941).
- STEVENSON, J. L. *Soil Sc.* 75: 225, (1953).
- TRAAEN, A. E. *C. f. Bakt.* II., 45: 119 (1916).
- TSCHPEK, y GARBOSKY, A. J. *Publ. Inst. Suelos y Agrotec.* N° 14: 5 (1950), *Ciencia e Invest.* 7: 520 (1951), *Idia*, N° 57: 12 (1952). *Idia* N° 61: 9 (1953).
- WAKSMAN, S. A. *Principles of Soil Microbiology*. 894 pp., 2nd ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1932.
- WINOGRADSKY, S. *Compt. Rend. Acad. Sc.* 116: 1385, (1893) *Ann. Inst. Pasteur* 39: 299 (1925); 40: 455, (1926); 60: 351, (1938).