

UN METODO RAPIDO DE DETERMINACION DE NUTRIENTES POR MEDIO DE AZOTOBACTER

Por **Rafael Bravo A ***

INTRODUCCION

La investigación de los suelos, especialmente la de su contenido en sustancias nutritivas, tanto de origen orgánico como inorgánico, es una de las ramas más importantes de la ciencia agronómica. Miles de trabajos científicos nos demuestran claramente el valor de esta clase de investigaciones. Los resultados obtenidos con estos experimentos y trabajos tienen como fin primordial dar una indicación al agricultor, quien emplea el suelo como medio de crecimiento para sus cultivos, los cuales han de servirle para la alimentación humana o animal, o para su posterior transformación industrial, si su suelo es capaz de garantizarle rendimientos máximos o si, faltándole dichas sustancias nutritivas, según la ley del mínimo de Liebig, disminuirán sus cosechas y con ellas el valor intrínseco de sus tierras.

Con la introducción de los fertilizantes en la agricultura, hecho que se observó desde el siglo pasado, se introdujeron en forma simultánea métodos diferentes para la determinación del contenido del suelo en sustancias nutritivas, los cuales permitían, además de dicho fin, llegar a conclusiones razonables sobre la cantidad de nutrientes que la planta aprovecha en forma inmediata o a plazo más o menos largo y daban instrucciones sobre las cantidades requeridas de fertilizantes con las cuales era necesario abonar un terreno para obtener los mayores rendimientos o decían cuándo ellos no hacían falta, evitando con esto la inversión innecesaria de dinero en abonos que la planta no va a aprovechar en forma inmediata.

Para la investigación de sustancias nutritivas en el suelo, se han introducido dos grupos de métodos:

- 1º—Los análisis químicos, que usan reactivos de esta misma naturaleza para determinar las cantidades y clases de nutrientes aprovechables, o nó, por las plantas.
- 2º—Los métodos biológicos, que en contraste con los análisis anteriores usan plantas como agentes extractivos, para lograr el mismo fin.

Los análisis químicos tienen un alto valor intrínseco, de aquí que

* Tesis presentada como requisito parcial para obtener el título de Ingeniero Agrónomo.

los haya usado como punto de referencia para comprobar los resultados obtenidos por medio del "test" biológico que he querido ensayar.

Los distintos métodos biológicos son objeto de una breve descripción en este trabajo. Ellos han sido creados bajo diferentes aspectos y necesidades, que pueden enumerarse así:

- 1º—Rapidez en la determinación de sustancias nutritivas.
- 2º—Necesidad de cantidades pequeñas de tierra.
- 3º—Mayor sensibilidad de estos "tests", que la representada por los análisis químicos.
- 4º—Conocimiento de las sustancias aprovechables en forma inmediata por la planta.
- 5º—Falta de solución extractiva ideal para los "tests" químicos.
- 6º—Necesidad de métodos baratos para el análisis de suelos.
- 7º—Necesidad de pruebas fácilmente asequibles, sin que sea necesario profundizar demasiado en los dominios de la química.

El método biológico más antiguo y mejor conocido es la técnica de la parcela experimental. Sin embargo este método no es adaptable para una aplicación extensa por razón del tiempo y gastos incluidos y además porque son varios los factores involucrados en el desarrollo del experimento: prácticas de manejo del suelo, factores climáticos y propiedades físicas del suelo. Por esta razón se ha acudido a métodos biológicos que emplean menores cantidades de suelo y en que el crecimiento de las plantas (superiores e inferiores) empleadas, sea fácilmente controlable en el invernadero o en el laboratorio. El crecimiento comparativo de las plantas, o la extracción de nutrientes por ellas, de porciones de suelos sometidas a diferentes tratamientos, se toma usualmente como índice de deficiencias de nutrientes. Y aunque ellos puedan ser empíricos en su naturaleza constituyen una ayuda valiosa para quien se dedique al estudio del problema de la fertilidad de los suelos.

Los métodos biológicos, exclusión hecha de los experimentos de parcelas en el campo, se dividen en dos grandes grupos generales:

- 1º—Aquéllos en que se emplean plantas superiores como agentes extractivos de nutrientes.
- 2º—Aquéllos en que son empleadas plantas inferiores, como bacterias y hongos, para lograr el mismo fin.

METODO DE MITSCHERLICH

Los métodos principales en los cuales se emplean plantas supe-

riores son: el cultivo en potes, técnica original de **Mitscherlich** (31, 1930) y el método de plántulas desarrollado por **Neubauer** (35, 1923).

Los experimentos de cultivos en potes, fueron conducidos por **Boussingolt** (5) en 1838, para investigaciones de fertilidad de suelos, pero se les concedió poco valor cuantitativo hasta cuando **Mitscherlich** desarrolló el método con base en sus estudios del efecto de un solo factor en el crecimiento de las plantas bajo condiciones controladas.

El método de **Mitscherlich** es una prueba de fertilizantes en potes en que se estudian requerimientos de la planta para Nitrógeno, Fósforo y Potasio, simultáneamente. Se usan para cada "test" potes de metal esmaltado y como plantas extractivas se usa avena, la cual se deja crecer hasta la madurez. La descripción completa del método, así como de los demás mencionados en este trabajo se encuentra en el libro "Diagnostic Techniques for Soils and Crops", especialmente en el capítulo VII, de **S. C. Vandecaveye** (44).

METODO DE JENNY

A este método de **Mitscherlich** se le han introducido algunas modificaciones, sobresaliendo la técnica desarrollada por **Jenny** en 1944 (23) que consiste en el crecimiento de la lechuga romana en potes, en el invernadero o bajo las condiciones ambientales bajo el verano. Las plantas crecen en potes de 6 pulgadas de diámetro revestidos de pintura asfáltica, requiriéndose 4 libras de suelo para cada pote. Las plantas de lechuga, germinadas y desarrolladas en semilleros, se transplantan al suelo húmedo de los potes, a razón de una por pote, alrededor de las cuatro semanas de edad. Aproximadamente a las seis semanas se cosechan y se secan a 70° y se pesan. Los porcentajes relativos de peso obtenidos por la comparación de un tratamiento cualquiera con el tratamiento completo correspondiente, se usa para estimar las deficiencias de nutrientes.

Stephenson y **Schuster** en 1941 (41) desarrollaron otra técnica de cultivo en potes, que es una adaptación a otros nutrientes de los métodos de los investigadores anteriores y de **Colwell** (11, 1943) para determinar el Boro aprovechable en los suelos. Usa como agente vegetal extractivo el girasol. Este método es aplicable a la investigación de N, P, K, Mg, S y B. Las plantas de girasol crecidas en los potes, de seis a diez semanas, se cortan, se secan a 70° y se pesan. La estimación de las deficiencias se hace en la misma forma que para el método de **Jenny**.

Colwell (11) desarrolló una técnica parecida, para la determinación de deficiencias de Boro, utilizando la variedad de girasol **Mammoth Russian**. Después de 9 días de sembrados los girasoles se dejan solamente cinco plantas uniformes. Después de añadidas las soluciones nutritivas correspondientes se estudian los "valores de edad" (la

edad de los cultivos en que la primera de las cinco plantas muestre síntomas de deficiencias en Boro) los cuales sirven para juzgar las deficiencias del suelo investigado en ese elemento.

METODO DE NEUBAUER

Neubauer desarrolló una técnica basada en el principio de la extracción de nutrientes por un gran número de plántulas desarrolladas en una pequeña cantidad de suelo. Ya que se forma una gran cantidad de raíces es muy poco suelo, las plántulas agotan el suministro de nutrientes aprovechables, en un tiempo relativamente corto. Los nutrientes extraídos se pueden determinar cuantitativamente por el análisis químico de tallos y raíces de las plantas.

Haciendo uso de este principio, **Neubauer** y **Schneider** desarrollaron en 1923 una técnica para la determinación de Fósforo y Potasio.

Thornton (43, 1935) en los Estados Unidos ha encontrado una adaptabilidad bastante amplia para este método.

Mc George, desde 1939 (27) la ha extendido al estudio de la aprovechabilidad del Calcio y varios elementos menores.

En cuanto al uso de plantas inferiores para la determinación de nutrientes se pueden mencionar los siguientes "tests" biológicos:

METODO DEL ASPERGILLUS NIGER

El método del **Aspergillus niger**, fue sugerido como un indicador biológico de nutrientes aprovechables en el suelo por **Butkewitsch** (8) en Rusia, desde 1909. Más tarde, en 1928, **Benecke** y **Soding** (1) lo usaron para determinar deficiencias de Fósforo y Potasio, por comparación del crecimiento de **Aspergillus niger** en cultivos de líquidos nutrientes que contenían cantidades pequeñas de suelo. Después de extensos estudios, **Niklas** y **Poschenrieder** (36) en 1936, desarrollaron el método en forma cuantitativa, para determinar el Fósforo, el Potasio y también el Magnesio aprovechables en el suelo. **Mulder** en 1938 (32) usó el **Aspergillus niger** para la determinación de las deficiencias de Cobre y Magnesio. Su técnica difiere de la de **Niklas** y **Mehlich** en que es el color del micelio y de las esporas el que sirve como índice cuantitativo de deficiencias, en lugar del peso del micelio.

METODO DE LA PLACA DE CUNNINGHAMELLA

Después en 1932 **Mehlich et al** (30) hicieron un estudio crítico del método de **Niklas** y desarrollaron una técnica diferente para determinaciones del potasio aprovechable en los suelos. En 1933, **Mehlich et al** (29) propusieron la placa de **Cunninghamella**, para las determinaciones cuantitativas del Fósforo aprovechable en los suelos. Este "test" está basado en el desarrollo denso de una colonia de **Cunninghamella**.

spp. en la superficie de suelo húmedo al que se ha suministrado la solución nutritiva requerida para promover el desarrollo del hongo. Mehlich et al encontraron que el diámetro de la colonia de *Cunninghamella* es un índice valioso de la relación del crecimiento con la cantidad de Fósforo aprovechable en el suelo y usaron esta medida en la construcción de las curvas de crecimiento de Mitscherlich, para 10 tipos de suelos.

“TEST” DE AZOTOBACTER

Otro método biológico para la determinación de nutrientes es el que estudia el desarrollo de una bacteria, *Azotobacter*, como índice de deficiencia de nutrientes en el suelo. Uno de los métodos usados para la determinación de nutrientes con esta bacteria es el de la “placa de tierra”. Con base en los trabajos de Winogradsky, Sackett y Stewart en 1931 (39) propusieron un método para el estudio de deficiencias minerales en los suelos de Colorado. Su técnica es la siguiente: Se preparan muestras de suelo, mezclando muestras tomadas en 20 a 25 puntos distribuidos sistemáticamente en el área que se va a ensayar. Se ca la muestra al aire, se pasa por un tamiz de 20 mallas, para remover piedras y asegurar una mezcla perfecta. Si el valor del PH del suelo es menor que 6.8, mezclar 10% de CO_3Ca al suelo. Se pesan 4 porciones de 50 gramos de la tierra seca al aire y se añaden a cada porción 2.5 gramos de almidón de maíz. Para suelos arenosos sustituir el almidón por 1 ml. de una solución de sucrosa al 100%. Se añaden los materiales fertilizantes requeridos, que consisten en soluciones al 3% de K_2SO_4 y K_2HPO_4 y una solución del 6% de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, así:

Primera porción del suelo.— Sin tratamiento. Para testigo.

Segunda porción.— 5 ml. de la solución de K_2SO_4 para deficiencias de Potasio.

Tercera porción.— 5 ml. de la solución de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ para deficiencias de Fósforo.

Cuarta porción.— 5 ml. de una solución de K_2HPO_4 para deficiencias de Fósforo y Potasio.

Para suministrar buena textura y aereación, se añaden de 5 a 10 gramos de kaolina a cada porción de suelos arenosos y 10 gramos de arena gruesa lavada a cada porción de suelos arcillosos. Inocular cada cultivo con 1 ml. de una suspensión hecha lavando un cultivo de *Azotobacter* sembrado en un tubo de ensayo, después de un período de incubación de 72 horas, con una solución al 0.85% de NaCl , lavando con suficiente agua destilada. Con una pipeta se añade suficiente agua destilada a cada cultivo para darle la consistencia de arcilla modelada, o un poco más suave. Mézclase la masa con una espátula y pásese a una caja de Petri, de 9 cms. de diámetro y 4.5 de profundidad. Fo-

mar una lámina y suavizar la superficie con un porta-objetos mojado en agua destilada. Pónganse las placas listas para la prueba en un cristalizador, sobre un papel secante humedecido y tapanlo con una cubierta en que se haya fijado otro papel secante. Es importante añadir cantidades iguales de agua a todos los cultivos. Incúbense las placas terminadas a 30°C durante 72 horas. Después de este período han aparecido colonias circulares de color blanco, cerosas, levantadas, en todas las placas que contienen los elementos minerales necesarios. Las otras placas contienen colonias pequeñas, acuosas, dependiendo su conformación del grado de deficiencias. Se compara el desarrollo de *Azotobacter* de acuerdo con la siguiente clasificación:

Muy deficiente.— Ninguna o escasas a numerosas colonias, en forma de puntos extremadamente pequeños, en las placas no fertilizadas. Colonias pequeñas a numerosas, medianas a grandes, definidas y vigorosas, en las placas fertilizadas.

Moderadamente deficiente.— Colonias escasas a numerosas, pero débiles y pequeñas, con poca o ninguna pigmentación en las placas no fertilizadas. Colonias escasas a numerosas, definidas y vigorosas en las placas fertilizadas.

Ligeramente deficiente.— El número de colonias en las placas no fertilizadas, tan numerosas como en las fertilizadas, pero más pequeñas y menos exuberantes. Colonias escasas a numerosas, definidas y vigorosas en las placas fertilizadas.

No deficiente.— Las colonias tanto en las placas fertilizadas como en las no fertilizadas, iguales en su número y su desarrollo.

Halverson y Hoge en 1942 (18) modificaron la técnica anterior, sustituyendo el agua por agar caliente, en la confección de las placas, y diluyendo los materiales fertilizantes con arena lavada en reemplazo del agua destilada.

Su técnica es la siguiente: Se mezcla cada porción de 50 gramos de suelo con 2 gramos de almidón de Kingsford y 1 gmo. de los materiales fertilizantes, mezclados previamente con arena lavada pasada a través de un tamiz de 200 mallas, en el siguiente orden:

Primera porción: Sin fertilizantes, testigo.

Segunda porción: 1 gmo. de una mezcla que contenga 15 gramos de K_2SO_4 en 100 gramos de arena para deficiencias de Potasio.

Tercera porción.— 1 gmo. de una mezcla de 30 gramos de $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ en 100 gramos de arena, para deficiencias de Fósforo.

Cuarta porción.— 1 gmo. de una mezcla que contenga 15 gramos

de PO₄H₂K en 100 gramos de arena, para deficiencias de P y K.

En un mortero, mézclese íntimamente cada porción de 50 gramos de suelo preparado, con 40 ml. de una solución al 2% de agar caliente y pasar la masa mezclada a una caja de Petri de 5 cms. de diámetro y 2 cms. de profundidad. Cuando la placa de agar-suelo se haya enfriado y solidificado, inocularla esparciendo sobre la superficie suave dos gotas de una suspensión de Azotobacter. Incubar las placas en una cámara húmeda a 28°C durante 72 horas. Los suelos más ácidos que pH 5.8 requieren una adición de 10% de CO₃Ca. antes de añadir los materiales fertilizantes. Determinése la deficiencia de fertilizantes en la misma forma que para el método de Sackett o mediante el uso de símbolos convencionales.

JUSTIFICACION DEL EMPLEO DE AZOTOBACTER COMO INDICADOR DE DEFICIENCIAS DE NUTRIENTES

El método que se va a describir en este trabajo para la determinación de nutrientes se ha llevado a cabo ante la necesidad de determinar en forma rápida los elementos nutrientes presentes en el suelo.

Los análisis químicos pueden ser demasiados precisos si los comparamos con el "test" de Azotobacter y con los demás métodos biológicos conocidos, los que, en una palabra, son empíricos. Pero en gracia de su precisión ellos deben ser realizados con meticuloso cuidado, por lo cual no son tan rápidos como algunas circunstancias pueden exigirlo. Otros métodos biológicos, como los experimentos de parcelas en el campo, son demasiado onerosos y se llevan una gran cantidad de tiempo, no siendo adaptables, como antes se ha dicho, para una aplicación extensa.

Los experimentos de cultivos en potes, incluyendo los métodos de Mitscherlich, Jenny, Stephenson y Schuster, lo mismo que el de Colwell, llevan envuelta la desventaja de que es necesario trabajar con cantidades grandes de suelo y que sus resultados sólo se conocen después de varias semanas de experimentación. La técnica de Neubauer emplea cantidades pequeñas de suelo y el corto tiempo gastado para obtener el resultado es relativamente corto, pero finalmente recurre al análisis químico de las plantas, para determinar cuantitativamente los nutrientes extraídos.

Los "test" biológicos que hacen uso para la determinación de nutrientes son bastante complicados. La determinación del peso micelial cuando se opera con *Aspergillus niger* para la determinación cuantitativa de deficiencias, o para la realización de un análisis químico de ese mismo micelio son operaciones difíciles y que envuelven un alto grado de manipulación. Esto mismo es aplicable al método de la placa de Cunninghamella, en que, al final del proceso es necesario

medir el diámetro de las colonias formadas, para apreciar las deficiencias presentadas.

Los métodos que emplean *Azotobacter* como indicador de nutrientes y sus deficiencias, como han sido descritos anteriormente, según las técnicas de **Sackett y Stewart** y de **Halverson y Hoge**, envuelven en sí una amplia manipulación, lo que puede dar lugar a muchos errores. Además las colonias de *Azotobacter* formadas, no son susceptibles de ser cosechadas para hacer su valoración. No sucede esto con el método propuesto en este trabajo, de sencilla realización. Las capas de bacterias se forman superficialmente sobre las soluciones nutritivas puestas sobre la cápsula de Esmarch, con lo cual se hacen fácilmente apreciables y susceptibles de cosecharse, según se explica luego. Son multitud las muestras que se pueden analizar por este método, una vez que se cuente con personal entrenado que lleve a cabo las distintas operaciones necesarias en "serie".

Al hacer una síntesis de los trabajos realizados con *Azotobacter* creo conveniente hacer una breve relación sobre la bacteria cuyo desarrollo nos sirve como índice en la investigación y demostrar, con base en la literatura científica, que en realidad el crecimiento y desarrollo de *Azotobacter* está influida en alto grado, por un gran número de nutrientes del ambiente en donde vive o se cultiva.

CLASIFICACION

Azobacter constituye un grupo de bacterias autotróficas, descubierta por **Beijerinck** en 1901. **Galloway y Burgess** (14) la clasifican dentro del orden Eubacteriales, familia Nitrobacteriaceae. **Waksman y Starkey** (7) citan las siguientes especies: *Azotobacter chroococcum*, que vive en los suelos arables; *A. indicum*; *A. vinelandii*, que vive principalmente en el agua; *A. agile*, *A. vitreum* y *A. woodstownii*.

Los métodos comunes de tinción indican que *Azotobacter* es de forma esférica, peritricosa, con 6 a 8 flagelos. Investigaciones con microscopio electrónico muestran flagelaciones peritricosas definidas con muchas células que presentan de 40 a 60 flagelos, según **Hofer** (21, 1944). Junto con el *Clostridium Pastorianum*, reportado por **Winoogradsky** en 1893, constituye el grupo más importante de microorganismos no simbióticos fijadores de nitrógeno que forman parte de la flora del suelo, constituida por bacterias, hongos y algas.

INFLUENCIA DEL pH.

El pH es el factor más importante que gobierna la ocurrencia de *Azotobacter* en el suelo. A pH inferiores a 5.9 su presencia es mucho menos abundante. Investigaciones hechas por **Helmut** (19) en 1949, prueban que *Azotobacter*, lo mismo que *Bacterium radicolica*, no pueden vivir en suelos con pH inferior a 4.5. **Gainey** afirma que Azo-

tobacter no se encuentra en suelos con pH inferior a 5.9. **Blinkov** (2) establece que el medio óptimo para su desarrollo está comprendido entre pH 7.3 y 8.

INFLUENCIA DE LA COMPOSICION FISICA DEL SUELO

Según **Mc Knight** (28) la textura del suelo tiene también efecto marcado en la presencia de *Azobacter*, estando comprobado un porcentaje mayor de muestras positivas en los suelos arenosos, limosos, limo-arcillosos y limo-arenosos. Las tierras negras son ricas en *Azotobacter*. No hay indicación de que ésta ocurra más frecuentemente en tierras vírgenes que en terrenos cultivados. Según los datos suministrados por **Naundorf**, un 60% de las muestras de suelos del Valle del Cauca, investigadas por él, acusan la presencia de *Azotobacter*. Esta es favorecida por la materia orgánica del suelo.

INFLUENCIA DE FACTORES CLIMATICOS

Las relaciones existentes entre el desarrollo de *Azotobacter* y las condiciones atmosféricas no han sido bien explicadas. La influencia de la temperatura, humedad, luz, composición del aire, presión atmosférica, oscilaciones barométricas, ionización, tensión eléctrica y radiaciones, fueron estudiadas por **Bortels** (4) en 1942, quien encontró que estos factores no tienen mayor influencia sobre el desarrollo de *Azotobacter*. Según el mismo investigador, la fijación de Nitrógeno por esta bacteria, y su desarrollo, parece ser dependiente de un factor físico desconocido, relacionado con variaciones de tensiones altas y bajas, probablemente radiaciones fuertes. La resistencia de *Azotobacter* al calor, es menor en suelos húmedos que en suelos secos.

INFLUENCIA DE LA FERTILIDAD DE LA TIERRA

Un índice característico de la fertilidad del suelo es la mayor o menor cantidad de *Azotobacter* presente en el terreno y el grado de su actividad. Los primeros estudios a este respecto fueron hechos en 1926 por **Winogradsky**, quien estudió el desarrollo de *Azotobacter* sobre una muestra de 50 gramos de tierra cribada a la que había añadido 0.5 gramos de manita, mezclando bien el conjunto, el cual humedeció convenientemente y colocó en una caja de Petri, formando una capa de 1 cm. de espesor aproximadamente. Observó que la reacción biológica comienza siempre con un crecimiento de bacilos, que alcanza en las primeras 24 horas, a 30°C, una densidad de varias decenas de millones, siendo este crecimiento marcadamente más intenso en un suelo fértil que en uno que no lo sea. A las 48 horas ha cambiado totalmente la apariencia del cultivo, por haber sido agrupados los bacilos por *Azotobacter*, cuya densidad alcanza entonces varios centenares de millones por gramo de suelo. En 1932 **Winogradsky** publicó un resumen de sus trabajos sobre este tema, en estudio realizado sobre la actividad bioquímica de los organismos.

INFLUENCIA DE LOS ELEMENTOS MAYORES

Nitrógeno.— El nitrógeno combinado parece reducir grandemente la actividad del Azotobacter. **Hitomi** (20) en 1938 estudió la relación entre Azotobacter y los nitratos. **Naundorf** (34) en 1940 afirma que Azotobacter crece mejor en suelos ricos en Nitrógeno. Experimentos realizados por él demostraron que la inoculación de semillas de papa, maíz y avena, con suspensiones de Azotobacter, sólo daba los mejores resultados en suelos ricos en Nitrógeno. Experiencias personales indican que la acción de los nitratos favorece su desarrollo inicialmente, pero concentraciones altas le son bastante perjudiciales, según se desprende los resultados de la Determinación de Nitrógeno, consignados en la Tabla No. 4. El sulfato de amonio ocasiona acidez e inhibe el desarrollo de Azotobacter, según **Xandri** (47).

INFLUENCIA DEL FOSFORO

Stoklasa (42) en 1911, **Christensen** (10) en 1915, **Cauda** (9) en 1916 (citados por **Leroux**, 25, en 1942) encuentran relaciones importantes entre el desarrollo de Azotobacter y el Fósforo. **Niklas**, **Scharrer** y **Strobel**, en 1926 (37) estudiaron las relaciones existentes entre el desarrollo de Azotobacter y la solubilidad de los fosfatos suministrados a dicho microorganismo. Llegaron a la conclusión de que parecía haber alguna relación entre la solubilidad del P, medida químicamente y su utilización por Azotobacter. **Gittonneau** en 1931 (17) afirma que Azotobacter crece activamente en un suelo al cual se adiciona ácido fosfórico. En estudios posteriores **Niklas**, en 1934 (38) estudió nuevamente las relaciones entre Azotobacter y la solubilidad del fósforo. Afirma que los mejor utilizados son los de Mg, Ca, K y Na, en su orden. El contenido de P205 fácilmente asimilable en el suelo, lo juzgó por el espesor de la capa bacterial en el medio de cultivo.

INFLUENCIA DEL POTASIO

Fred (citado por **Leroux**) en 1911 (12) encontró que el potasio favorece el desarrollo de Azotobacter. **Niklas** (39), en 1934 encontró una estrecha relación entre la solubilidad de la fuente de potasio y su utilización fisiológica por Azotobacter.

INFLUENCIA DEL HIERRO

Burk, **Lineweaver** y **Horner** (7) en 1933 estudiaron el desarrollo de Azotobacter en relación con algunos compuestos de Fe, encontrando que le son favorables, especialmente el humus. **Greaves** (16) en 1934 afirma que el Fe estimula grandemente la fijación de Nitrógeno por Azotobacter, en medios líquidos. **Bortels** (3) en 1950 también estudió la influencia del Fe sobre el crecimiento de Azotobacter, llegando a la misma conclusión.

INFLUENCIA DEL MANGANESO

Kaserer (citado por Leroux) en 1910 (24) constató el efecto favorable del Mn sobre Azotobacter. Greaves (16) en 1934 dice que el Mn estimula la fijación del Nitrógeno por Azotobacter. Leroux (25), en 1942, afirma también que el Mn influye positivamente sobre esta bacteria.

INFLUENCIA DEL COBRE

Fred (citado por Leroux) en 1911 (12) encontró que el Cu favorece el desarrollo de Azotobacter. Leroux (25) en 1942, afirma también que el Cu influye favorablemente en el desarrollo de este organismo. Mulder (34) en 1950 dice que el Cu es esencial para la producción de pigmento por *Azotobacter chroococcum*, aunque la necesidad del elemento para su desarrollo no ha podido ser demostrada.

INFLUENCIA DE OTROS ELEMENTOS

Voicu (citado por Leroux) en 1923 (45) constató la toxicidad del B para Azotobacter; sin embargo Leroux (25) en 1942, dice lo contrario, es decir, afirma la influencia favorable del B sobre el crecimiento de Azotobacter. Ziemięcka (49) en 1932 constató la influencia favorable de Si sobre Azotobacter. Greaves (16) en 1934, dice que B, Al, Br, Zn, Ti, Se y Te se ha demostrado no ser esenciales para Azotobacter, afirmando que el Zn es tóxico en cantidades muy pequeñas. Leroux (25) en 1942, después de realizar numerosas experiencias personales, afirma que el F, As, I, Cr, Mn, Cu, Zn y Pb influyen favorablemente sobre el desarrollo de Azotobacter. Burema y Wieringa (6) en 1946, estudiaron la influencia del Mo como factor de desarrollo para Azotobacter. Bortels (3) en 1950 estudió la influencia de algunos elementos, como Mo y Va sobre la fijación de N por *Azotobacter chroococcum* y *vinelandii*.

MATERIALES Y METODOS

La muestra de suelo, seca al aire, pulverizada y pasada por un tamiz de 60 mallas, a efecto de eliminar piedras y partículas que pudiesen flotar (trozos pequeños de materia vegetal) y entorpecer la investigación, se puso en cápsulas de Esmarch de 5 cms. de diámetro por 1.5 de profundidad, a razón de 3 gramos por cápsula, añadiéndose 100 mgs. de Carbonato de Calcio, a cada una, con el fin de crear un medio óptimo para el desarrollo del Azotobacter, objeto del "test", mezclándolo íntimamente con la muestra por analizar. Para la investigación del Calcio las cantidades de CO_3Ca añadidas fueron variables, tal como se detalla al transcribir la Determinación de Calcio. A cada cápsula de Esmarch se añadieron luego 15 ml. de la solución nutritiva correspondiente (cuya composición se describirá posteriormente) de acuerdo con el nutriente por investigar. A continuación se inoculó cada

una con 2 gotas de una suspensión de *Azotobacter* hecha a partir de un suelo que la contenía (de la Estación Agrícola Experimental de Palmira), para lo cual se procedió así: se tomó una porción del suelo y se le añadió una cantidad conveniente de la siguiente solución:

Fosfato ácido de potasio, PO ₄ H ₂ K	1 gramo
Manita	10 gramos
Agua destilada	1000 ml.

Una vez hecha la inoculación, se puso a cada caja su respectiva tapa, con el fin de evitar la evaporación excesiva y la presencia de materias extrañas. Después se esperó un período de incubación de 5 días, en que las cápsulas permanecieron a la temperatura ambiente, siendo evitados los rayos directos de sol por medio de cortinas, pues ellos afectan el desarrollo bacteriano, precipitándose las células muertas al fondo de la cápsula. El grado de desarrollo de la bacteria, medido por el espesor de la capa que se forma superficialmente sobre la solución nutritiva, a una concentración determinada del nutriente investigado, sirve como índice para juzgar la riqueza relativa del suelo sometido a este "test" biológico, en determinado elemento, así: si el desarrollo de la bacteria es bueno desde la solución testigo y las concentraciones bajas del elemento investigado (0.1, 0.2 por mil) el suelo es rico en él; si la capa de bacterias sólo se forma a concentraciones altas (0.9, 1.0 por mil) el suelo es deficiente en tal nutriente. Entre estos dos extremos (muy rico, muy deficiente) se pueden establecer gradaciones intermedias.

Para el estudio de 3 suelos (Bitaco, Buenaventura, Río Fraile) a efecto de comprobar las curvas de desarrollo de *Azotobacter* para cada suelo y cada elemento, se hicieron 2 repeticiones para cada uno, usándose 11 concentraciones diferentes para cada nutriente investigado.

Después de desarrolladas las capas bacteriales, se buscó un método efectivo para lograr su cosecha y valoración, además de la apreciación visual. En cuanto a la primera, se pensó en subir el nivel de la capa bacteriana mediante la adición de agua destilada por medio de una pipeta, hasta que la capa quedase formando un menisco sobre los bordes de la cápsula y luego recogerla sobre un vidrio de reloj, empujándola superficialmente por medio de un porta-objetos, pero este método no se encontró satisfactorio, pues algunas porciones de la capa se precipitaban al fondo de la cápsula. Mucho mejor resultado brindó la cosecha por medio de succión al vacío, haciéndose uso de una máquina neumática, como se ilustra en la fotografía No. 1. En lo que respecta a la valoración de las capas, se pensó primero en efectuarla por medio de pesadas, pero este método se prestó a muchas dificultades, siendo altamente susceptible de errores, por lo cual

las capas fueron valoradas volumétricamente, en tubos graduados en décimas de centímetro cúbico, que luego se pusieron a la centrifuga, durante un período de 5 minutos, a una velocidad de 1.500 revoluciones por minuto. Una vez hecha la centrifugación, se midió el volumen de la capa correspondiente a cada nutriente y a cada concentración, dando los resultados que se consignan al detallar cada experimento.

Para el estudio práctico de varios suelos, de diferentes lugares del Valle del Cauca, se utilizaron únicamente 6 cápsulas para cada nutriente investigado, así: para Nitrógeno, Fósforo y Potasio se probaron las siguientes concentraciones: Testigo; 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, y 1.0 por mil. Para Ca: Testigo, 1, 2, 3, 6 y 10 miligramos por cápsula. Quiere esto decir que, para la investigación práctica de cada suelo se hizo uso de 24 cápsulas para 4 nutrientes. Los resultados obtenidos para estos suelos se detallan al describir el experimento VII.

INVESTIGACION PRELIMINAR

Se trató de un experimento preliminar para observar el crecimiento de *Azotobacter* en cinco muestras diferentes (Invernadero No. 1, Invernadero No. 2, Frutales, Caña y Soya) tomadas en la Es-

LAMINA I



Foto 1.—Manera de efectuar la cosecha de las capas bacteriales por medio de succión al vacío.

Foto: Rengifo.

tación Agrícola Experimental de Palmira, bajo dos soluciones nutritivas diferentes, así:

Solución No. 1. Sin nutrientes 10 gramos de manita.
1000 ml. de agua destilada
1.5 gm. de PO₄2K1

Solución No. 2.
10.0 gm. de manita.
1000.0 ml. de agua destilada

De cada muestra de suelo se tomaron 10 porciones, de 5 gramos cada una, se colocaron en cápsulas de Esmarch, añadiéndose un poco de CO₃Ca a cada cápsula; a cinco de estas se aplicó la solución No. 1 y a las 5 restantes la solución No. 2; en esta forma, 25 cápsulas recibieron una solución sin nutrientes y 25 una solución que contenía fósforo y potasio. Se hizo la inoculación de Azotobacter como se ha descrito anteriormente y después de 5 días se observaron los siguientes resultados: la capa formada sobre las muestras que tenían la solución No. 2 fué más gruesa, más consistente que las formadas sobre las muestras a las cuales se había aplicado la solución No. 1.

Esto indicaba una correlación entre el desarrollo de Azotobacter y la composición de la solución añadida. Comprobada en esta forma la posibilidad de éxito para investigaciones posteriores, se llevaron a

LAMINA II



Foto 2.— Diferencia de desarrollo de las capas de Azotobacter para el suelo "Bitaco" a las concentraciones 0.1 y 1.0 por mil de PO₄H₂K.—

cabo otros experimentos para la determinación de nutrientes, como sigue:

DETERMINACION DE FOSFORO

Para la investigación de fósforo se usaron concentraciones diferentes de fosfato ácido de potasio, PO_4H_2K . Fueron usadas 11 concentraciones, compensándose el fosfato de potasio con cloruro de potasio, ClK , de tal suerte que sólo fueron variables las concentraciones del elemento estudiado, P.

Las soluciones nutritivas comprendían las siguientes concentraciones: Testigo, sin fósforo; 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1.0 por mil de PO_4H_2K . Estas cantidades, en gramos, se añadieron cada una a 1000 ml. de agua destilada, agregándose 10 gramos de manita a cada solución, y compensándose el potasio, respectivamente, con las siguientes cantidades de ClK : 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 y 0.0 gramos.

Esta investigación se llevó a cabo para 3 suelos: Bitaco, Río Fraile y Buenaventura, con pH de 5, 5, 6 y 5.2, respectivamente. Se pusieron las muestras de suelos en sus respectivas cápsulas, se añadie-

LAMINA III

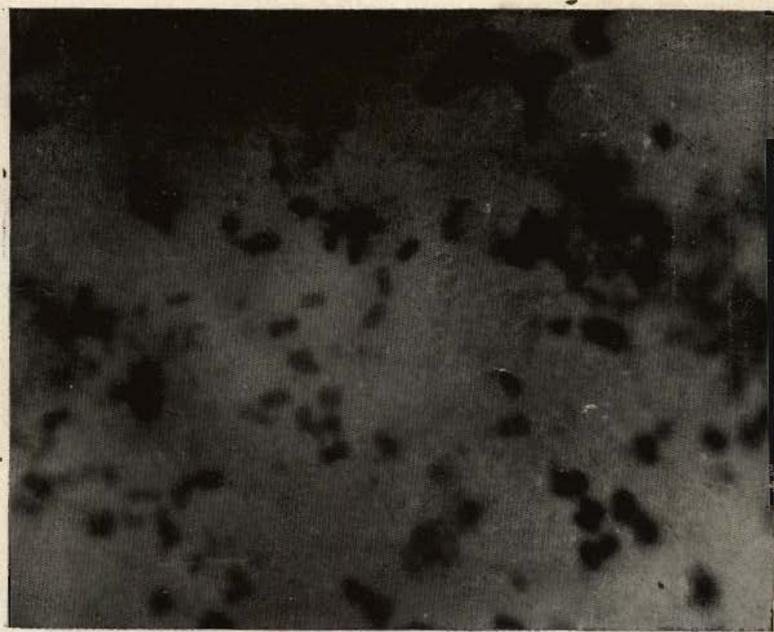


Foto 3.— Formaciones típicas de células de Azotobacter, al cuarto día de desarrollo, en solución nutritiva adecuada.— Foto: Figueroa.

ron 100 mgms. de CO_3Ca a cada muestra; se agregaron 15 centímetros cúbicos de la solución nutritiva correspondiente, por medio de una pipeta; se hizo la inoculación de *Azotobacter* y se obtuvieron los siguientes resultados, después de 5 días de incubación:

Apreciación objetiva:

Bitaco.— Formación abundante de espuma (generalmente un indicio de pobreza en el elemento investigado). Mala formación de capa en testigo y concentraciones menores. Capa óptima presente sólo entre 0.7 y 0.8 por mil.

Buenaventura.— Capas pobres. Mal desarrollo bacterial. Capa óptima en la concentración 0.8 por mil.

Río Fraile.— Buena formación de capas desde testigo. Capas uniformes. Óptima: 0.2 por mil.

La valoración volumétrica, hecha conforme se ha descrito antes, dió los siguientes resultados:

TABLA No. 1

INFLUENCIA DEL FOSFORO DE LOS SUELOS Y DE LAS SOLUCIONES NUTRITIVAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE AZOTOBACTER

Análisis químico:	P total	P soluble
Bitaco	0,010 %	11,25 Kgms.
Buenaventura	0,010 %	11,25 "
Río Fraile	0,050 %	337,50 "
La Motte:		
Bitaco		23 Kgms.
Buenaventura		28,75 "
Río Fraile		230,00 "

Concen- tración	Volumen de capas bacteriales. (Cantidades en décimas de cm. cub.)								
	1a. replicación			2a. replicación			P r o m e d i o		
	Bit.	B tura.	Fraile	Bit.	B tura.	Fraile	Bit.	B tura.	Fraile
Tgo.	2	2	4	2	2	3	2	2	3,5
0.1	3	3	6	3	3	4	3	3	5
0.2	5	6	6	5	5	7	5	5,5	6,5
0.3	6	6	5	6	10	6	6	8	5,5
0.4	6	8	5	7	8	5	6,5	8	5
0.5	7	8	4	8	9	7	7,5	8,5	5,5
0.6	7	8	5	7	7	6	7	7,5	5,5
0.7	8	8	10	8	10	9	8	9	9,5
0.8	6	15	15	6	12	20	6	13,5	17,5
0.9	6	13	14	6	5	20	6	9	17
1.0	6	6	15	5	7	23	6	6,5	19

Los promedios obtenidos se tomaron para la construcción de las curvas de desarrollo de Azotobacter, para cada uno de los suelos estudiados, como puede apreciarse en las curvas 1,2 y 3.

Al comparar los resultados obtenidos para el suelo de Bitaco por el método de Azotobacter, con el análisis químico, se encuentra una coincidencia notable. Tanto el análisis químico como el de La Motte, dan una deficiencia notoria para fósforo; por lo tanto las capas de Azotobacter cuyo aspecto se usa para determinar la riqueza relativa del suelo en dicho elemento, deben ser óptimas a concentraciones elevadas de las soluciones nutritivas. Es esto precisamente lo que se ha encontrado, ya que la apreciación objetiva de las capas dice que éstas son óptimas a las concentraciones 0.7 a 0.8 por mil. Además, el volumen de la capa corresponde perfectamente con esta apreciación visual, lo mismo que con el análisis químico. Esta misma explicación es satisfactoria para el suelo "Buenaventura", deficiente también en el elemento investigado, fósforo.

Para el suelo "Río Fraile", en que la mejor capa, apreciada visualmente, está en la concentración 0,2 por mil, el análisis químico da un contenido muy alto en fósforo soluble, coincidiendo perfectamente con el resultado ofrecido por Azotobacter. La valoración volumétrica da también un valor alto correspondiente a dicha concentración, a excepción de que en las concentraciones 0.7 a 1.0 por mil, tenemos nuevamente un máximo de capas, aumento que no se podía determinar objetivamente. En estas concentraciones altas se observó que había presenciado de mucílago, que no era producto del desarrollo de Azotobacter, sino de otra clase de bacterias y hongos, que necesitan para su desarrollo normal concentraciones altas de fósforo, lo cual causó un aumento en la valoración volumétrica.

LAMINA IV

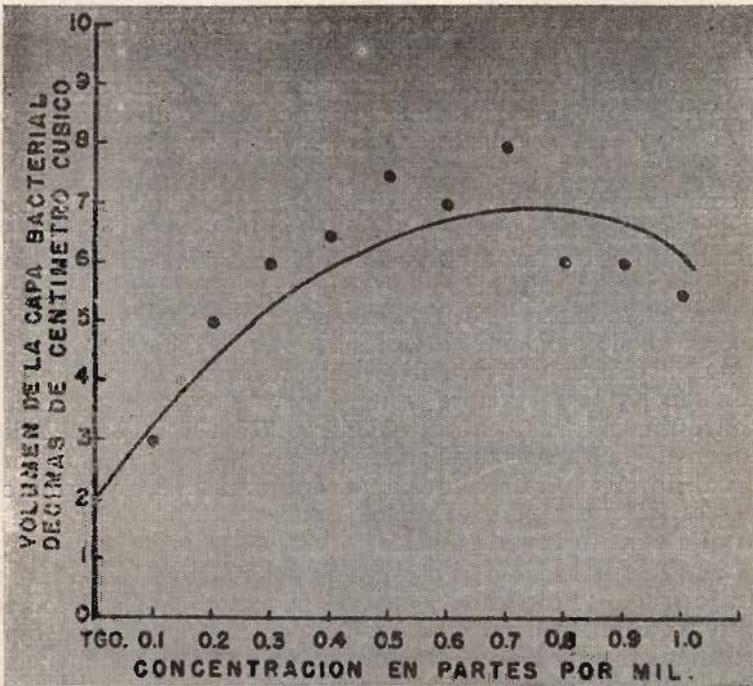


Gráfico 1, que muestra la curva de crecimiento de Azotobacter para el suelo "Bitaco", en diferentes concentraciones de PO_4H_2K . (Determinación de Fósforo).

LAMINA V

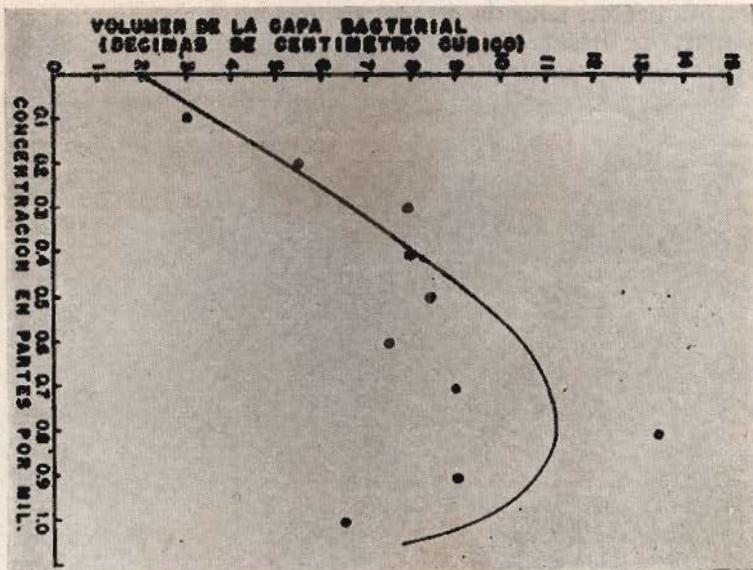


Gráfico 2. Curva de crecimiento de Azotobacter para el suelo "Buenaventura", en diferentes concentraciones de PO_4H_2K . (Determinación de Fósforo).

DETERMINACION DE POTASIO

Para la determinación de potasio fueron empleadas concentraciones diferentes de fosfato de potasio, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, usándose 11 concentraciones distintas y haciéndose la compensación de fósforo a base de fosfato de sodio y amonio, $\text{NH}_4\text{NaPO}_4\text{H}$. En esta forma, sólo variaron las concentraciones de potasio. Cada solución llevaba como elementos comunes 1000 ml. de agua destilada y 10 gramos de manita; se emplearon las siguientes cantidades de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$: Testigo, sin potasio; 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1.0 gramo. La compensación de fósforo se hizo, respectivamente, con las siguientes cantidades de $\text{NH}_4\text{NaPO}_4\text{H}$: 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 y 0.0 gramos.

Se siguió la investigación para los suelos de Bitaco, Buenaventura y Río Fraile. Llevado a cabo el proceso descrito anteriormente, se obtuvieron los siguientes resultados:

Bitaco.— Capas malas para las concentraciones inferiores. Capa óptima en 0.7 por mil. Deficiencia en potasio.

Buenaventura.— Capas malas para concentraciones inferiores. Óptima: 0.8.

Río Fraile.— Capas buenas desde testigo y concentraciones menores. Óptima: 0.2 por mil.

La valoración volumétrica dió los siguientes resultados:

LAMINA VI

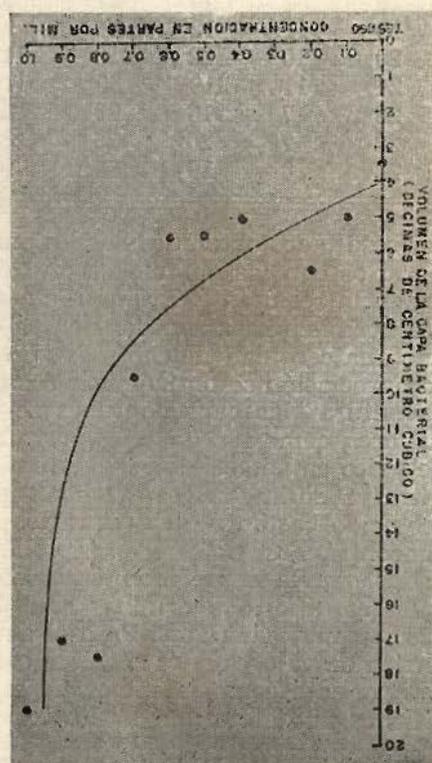


Gráfico 3. Curva de crecimiento de Azotobacter para el suelo "Río Fraile", en diferentes concentraciones de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$. (Determinación de Fósforo)

TABLA No. 2

Análisis químico:		K
Bitaco	76,92	Kgms.
Buenaventura	36,33	"
Río Fraile	370,88	"
La Motte:		
Bitaco	233	Kgms.
Buenaventura	253	"
Río Fraile	402,5	"

Volumen de capas bacteriales. (Cantidades en décimas de cm. cub.)

Concen- tración	1a. replicación			2a. replicación			P r o m e d i o		
	Bit.	Btura.	Fraile	Bit.	Btura.	Fraile	Bit.	Btura.	Fraile
Tgo.	1	1	6	3	1	6	2	1	6
0,1	6	8	9	6	10	8	6	9	8,5
0,2	10	13	13	8	14	11	9	13,5	12
0,3	11	16	16	10	15	20	10,5	15,5	18
0,4	9	8	19	7	10	21	8	9	20
0,5	7	9	19	11	12	14	9	10,5	16,5
0,6	12	16	20	10	22	18	11	19	19
0,7	12	18	24	11	19	30	11,5	18,5	27
0,8	10	19	23	7	16	23	8,5	17,5	23
0,9	10	14	22	7	20	25	8,5	17	23,5
1,0	10	16	22	8	16	23	9	16	22,5

Al examinar los resultados obtenidos por los análisis químico y de La Motte, y compararlos con los obtenidos con test de Azotobacter, es notoria la coincidencia resultante. El análisis químico dice que los suelos "Bitaco" y "Buenaventura", son deficientes en potasio, al paso que Río Fraile tiene una cantidad mucho más apreciable de este elemento. Esta misma apreciación se obtiene con Azotobacter, pues para "Bitaco" y "Buenaventura" las capas óptimas se encuentran sólo a concentraciones mayores, como son 0,7 y 0,8 por mil. En cambio, para el suelo "Río Fraile", rico en potasio, la capa óptima obtenida por Azotobacter se encuentra ya en la concentración 0,2 por mil. La valoración volumétrica coincide bastante bien para los suelos "Bitaco" y "Buenaventura", encontrándose los mayores volúmenes en las concentraciones señaladas, o en la inmediatamente próximas. Esto es bastante explicable pues es difícil determinar cuál es la capa óptima cuando dos de ellas son muy similares. Para el suelo "Río Fraile" la valoración volumétrica da valores altos desde la concentración 0,2 por mil, señalada objetivamente como la mejor. Aparecen luego ligeros aumentos, muy difíciles de determinar a simple vista.

DETERMINACION DE CALCIO

Para la determinación de calcio se agregaron cantidades variables de CO_3Ca a 11 muestras de cada uno de los tres suelos investigados, cada una con un peso de 3 gramos y preparada conforme se ha descrito antes. Dichas cantidades, expresadas en miligramos, fueron las siguientes: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 6.0 y 10.0.

En esta forma, la cantidad proporcional de CO_3Ca añadido al suelo varió desde 0 kilos hasta 8.250 kilos por Hectárea, con las respectivas gradaciones intermedias.

Añadido el carbonato de calcio correspondiente a cada muestra, se pusieron a cada cápsula de Esmarch 15 ml. de una solución nutritiva standard de la siguiente composición:

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ (nutrientes), 1 gramo; Manita (materia energética), 10 gramos; agua destilada, 1000 centímetros cúbicos.

LAMINA VII

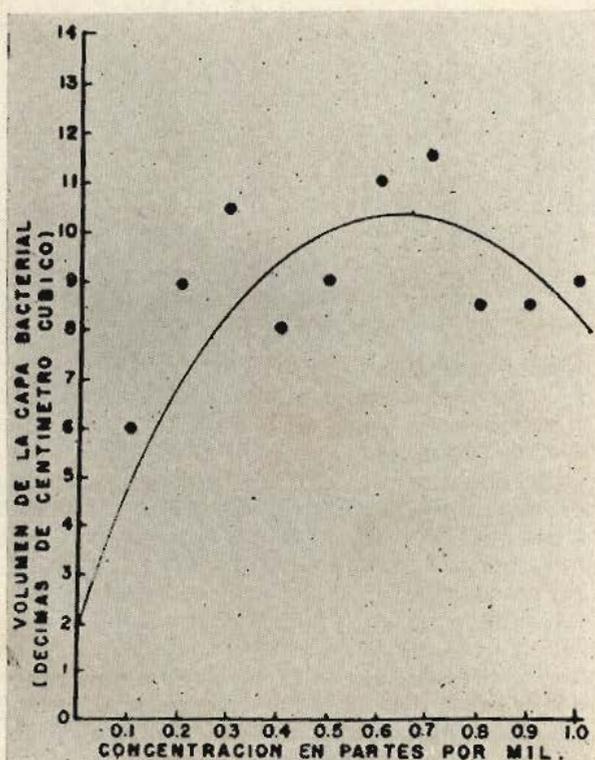


Gráfico 4. Curva de crecimiento de Azotobacter para el suelo "Bitaco", en diferentes concentraciones de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ (Determinación de Potasio).

Se hizo luego la inoculación con *Azotobacter* y después de 5 días se obtuvieron los siguientes resultados:

Apreciación objetiva:

Bitaco.— Capas aparentemente iguales, pero muy débiles, acuosas. La capa óptima estaba en la caja que contenía 3 mgms. de CO_3Ca .

Buenaventura.— Capas débiles, con el mismo aspecto que para el suelo anterior.

Río Fraile.— Las capas comienzan a ser normales desde el tratamiento correspondiente a 1 mgmo. por muestra. Las capas son bastante uniformes, más gruesas que las correspondientes a los dos suelos anteriores.

La valoración volumétrica de las capas, después de realizada la centrifugación, dió los siguientes resultados:

LAMINA VIII

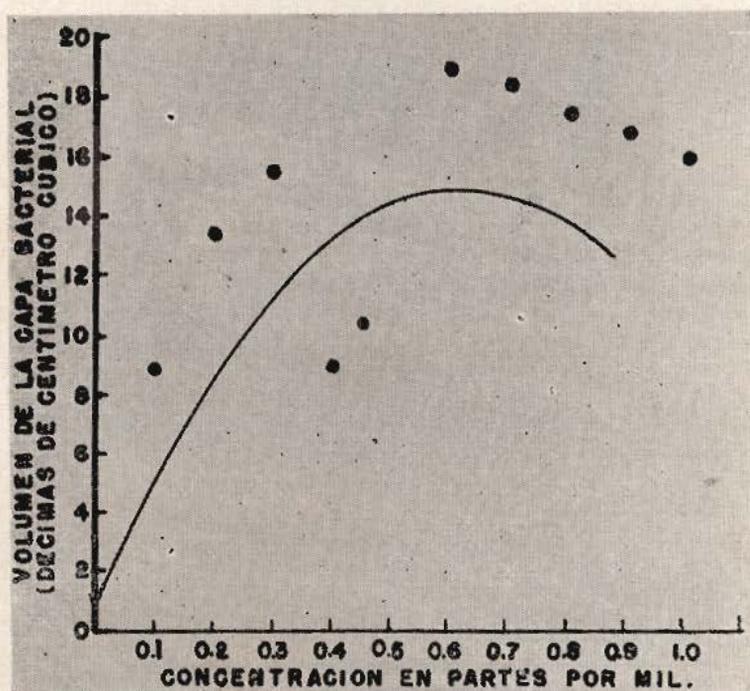


Gráfico 5. Curva de crecimiento de *Azotobacter* para el suelo "Buenaventura", en diferentes concentraciones de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$. (Determinación de Potasio).

TABLEA No. 3
Influencia del Calcio de los suelos y de las soluciones nutritivas
sobre el crecimiento de Azotobacter

Análisis químico:

Ca

Bitaco	2250	Kgms.
Buenaventura	1562,5	"
Río Fraile	3375	

Volumen de capas bacteriales. (Cantidades en décimas de cm. cub.)

Concen- tración	1a. replicación			2a. replicación			P r o m e d i o		
	Bit.	Btura.	Fraile	Bit.	Btura.	Fraile	Bit.	Btura.	Fraile
Tgo.	1,5	1	1	2	1	2	1,75	1	1,5
0,5mgm	2	2	2	2	2	3	2	2	2,5
1	2	3	2	2	2	3	2	2,5	2,5
1,5	2	3	2	2	2	3	2	2,5	2,5
2	2	2	2	2	2	3	2	2	2,5
2,5	2	3	3	2	2	3	2	2,5	3
3	2	3	3	2	3	3	2	3	3
3,5	2	3	4	2	2	3	2	2,5	3,5
4	2,5	3	5	3	2	3	2,75	2,5	4
6	3	4	7	3	2	4	3	3	5,5
10	3	3	10	3	2	5	3	2,5	7,5

También para la investigación del Calcio existente en el suelo, Azotobacter ofrece coincidencias bastante notables con los resultados brindados por el análisis químico. Mientras mayor es la cantidad de Calcio contenida por un suelo, a menores concentraciones se forman las mejores capas de Azotobacter. "Bitaco" y "Buenaventura", que poseen cantidades moderadas de calcio, muestran formación de capas óptimas de la bacteria objeto del test, a concentraciones más o menos elevadas de CO_3Ca . En cambio "Río Fraile", el suelo que, según el análisis químico tiene más cantidad de calcio, muestra la formación de la capa óptima a concentraciones menores, habiendo así una coincidencia bastante notable entre los resultados de la prueba química y el test de Azotobacter. Este test, según resultados obtenidos y los posteriores que más adelante se indican, muestra una perfecta aplicación para la determinación del pH del suelo, pues mientras más ácido es éste, la capa bacteriana óptima se forma a concentraciones mayores. En cuanto a la valoración volumétrica, vemos cómo las capas permanecen casi iguales y bajas en las concentraciones menores, lo cual es explicable porque en estas condiciones la bacteria no encuentra su medio óptimo de desarrollo, elevándose un poco para las concentraciones mayores, a pesar de lo cual la apreciación objetiva coincide con el análisis químico.

LAMINA IX

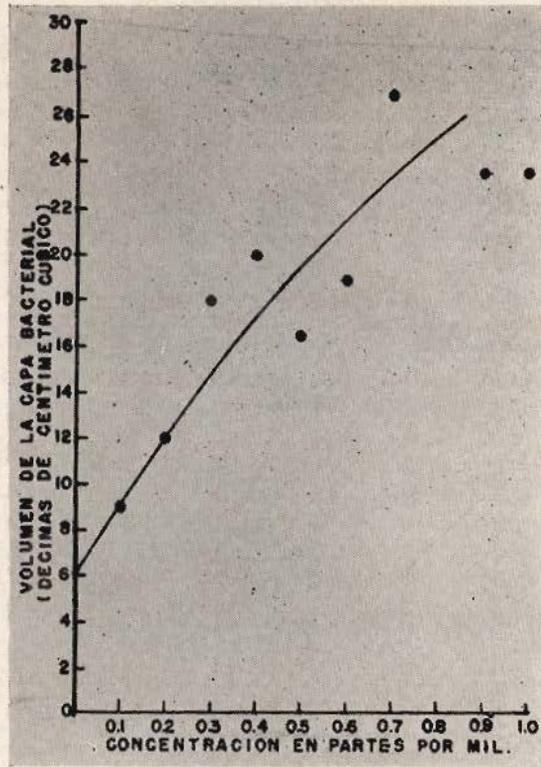


Gráfico 6. Curva de crecimiento de Azotobacter para el suelo "Río Fraile" en diferentes concentraciones de PO_4H_2K . (Determinación de Potasio).

LAMINA X

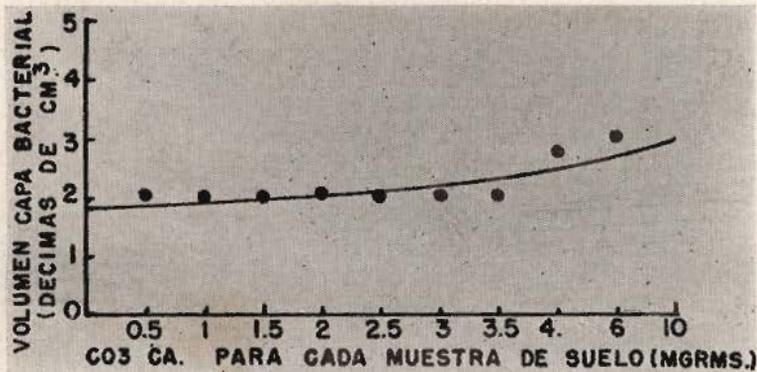


Gráfico 7. Curva de crecimiento de Azotobacter para el suelo "Bitaco", en diferentes concentraciones de CO_3Ca .

DETERMINACION DE NITROGENO

Para la determinación de nitrógeno se hizo uso de diferentes concentraciones de nitrato de sodio, NO_3Na , añadiéndose a cada litro de la solución 1 gm. de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ y 10 gramos de manitol, como fuente energética. Se prepararon 11 soluciones, con diferentes concentraciones de NO_3Na , desde la solución testigo, sin nitrógeno, hasta la concentración 1.0 por mil, siendo las concentraciones intermedias: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, y 0.9 por mil.

Este ensayo se llevó a cabo para los tres suelos investigados, Bitaco, Buenaventura y Río Fraile. Se hicieron 2 replicaciones para cada suelo, tomándose 11 muestras para cada replicación. Se añadieron 100 mgm. de CO_3Ca . a cada vaso, se pusieron 15 ml. de la solución nutritiva correspondiente y se hizo la inoculación con *Azotobacter*. Los resultados obtenidos muestran que el desarrollo de la bacteria en este medio nitrogenado es exuberante. Desde la solución testigo hay un buen desarrollo bacterial. Sin embargo, se puede determinar un punto óptimo en el desarrollo de la capa, para cada suelo. Se observa también que a concentraciones altas desmejora notablemente la calidad de la capa obtenida, lo cual es comprobado por la valoración volumétrica, como puede apreciarse en el cuadro correspondiente.

La apreciación objetiva de las capas mostró que:

Bitaco.— Tiene buena capa desde testigo, siendo óptima para 0.1 y 0.2 por mil.

Buenaventura.— Capas buenas desde testigo. Capa óptima en 0.4 por mil.

Río Fraile.— Capas muy buenas y abundantes desde la solución testigo. Capas muy uniformes, lo que demuestra buena cantidad de nitrógeno en el suelo. En general, estos tres suelos parecen contener buenas cantidades de nitrógeno.

LAMINA XI

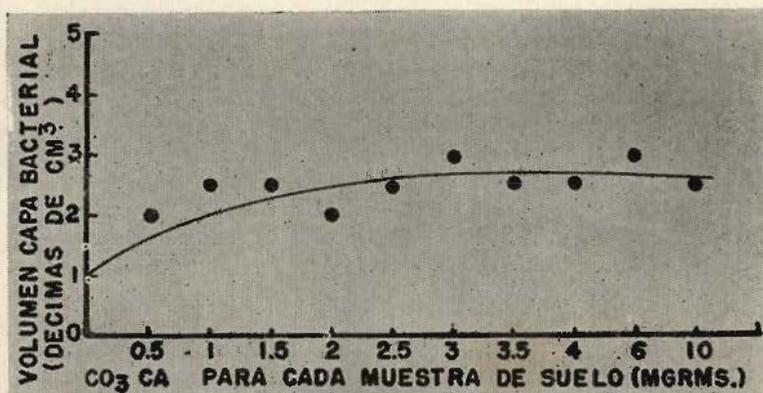


Gráfico 8. Curva de crecimiento de *Azotobacter* para el suelo "Buenaventura", en diferentes concentraciones de CO_3Ca .

La valoración volumétrica de las capas dió los siguientes resultados:

TABLA No. 4

Influencia del Nitrógeno de los suelos y de las soluciones nutritivas sobre el crecimiento de Azotobacter.

Análisis químico:		N total		Nitratos (La Motte)	
Bitaco		0.343 %		30 p.p.m.	
Buenaventura		0.225 %		8 "	
Río Fraile		0.383 %		12 "	

Volumen de capas bacteriales. (Cantidades en décimas de cm. cub.)									
Concen- tración	1a. replicación			2a. replicación			P r o m e d i o		
	Bit	B tura.	Fraile	Bit.	B tura.	Fraile	Bit.	B tura.	Fraile
Tgo.	7	5	43	6	6	40	6,5	5,5	41,5
0.1	9	6	50	8	7	51	8,5	6,5	50,5
0.2	11	7	51	9	8	53	10	7,5	52
0.2	10	8	58	11	8	65	10,5	8	61,5
0.4	11	11	60	13	9	70	12	10	65
0.5	13	10	58	12	10	63	12,5	10	60,5
0.6	16	10	58	15	10	60	15,5	10	59
0.7	16	8	58	12	8	55	14	8	56,5
0.8	14	8	40	16	7	49	15	7,5	44,5
0.9	8	8	31	9	8	35	8,5	8	33
1.0	7	7	29	8	6	29	7,5	6,5	29

Al comparar los resultados del análisis químico y de La Motte para la investigación de Nitrógeno total y nitratos respectivamente, con los datos suministrados con el test de Azotobacter, se puede observar una coincidencia muy notable entre los datos reportados por estas pruebas. Las cantidades de Nitrógeno para los suelos "Bitaco" y "Río Fraile" son abundantes y aproximadamente iguales, según el análisis químico, lo cual es confirmado por el test de Azotobacter, ya que para dichos suelos la capa óptima se forma desde las concentraciones inferiores, y aún desde la solución testigo. Para el suelo "Buenaventura" más bajo en nitrógeno, la capa de Azotobacter se forma a una concentración mayor, lo cual nos demuestra la disminución en dicho elemento, dato que es confirmado por el análisis químico. También con los nitratos, determinados por el test "La Motte" coinciden los datos suministrados por Azotobacter. La valoración volumétrica coincide con la visual, especialmente en el caso de "Buenaventura". Para "Bitaco" y "Río Fraile" la apreciación objetiva señala que desde la solución testigo se encuentran buenas capas, lo cual es confirmado por la valoración volumétrica, aunque ésta da algu-

nas cantidades mayores para concentraciones más altas, siendo difícil apreciar estos aumentos, a simple vista. Investigaciones posteriores, de carácter más amplio, deben decidir si el test determina más exactamente el Nitrógeno total que los nitratos, o viceversa.

ENSAYO GENERAL PARA VARIOS SUELOS

Por medio de este ensayo se llevó a cabo el "test" biológico de Azotobacter para la determinación de Nitrógeno, fósforo, potasio y calcio, para los siguientes suelos: Bolo, con pH de 6;9 Invernadero con pH 6; Posada, con pH 6.5; La Cabaña, con pH 6.4; Varela, con pH 7.5; La Isla, con pH 4.7; Calima, con pH 4.6 y Carretera al Mar, con pH. 4.8.

Para cada nutriente investigado se usaron 6 concentraciones, de tal manera que el estudio de cada suelo, para 5 nutrientes, abarcó un total de 30 cápsulas de Esmarch. Llevado a cabo el proceso des-

LAMINA XII

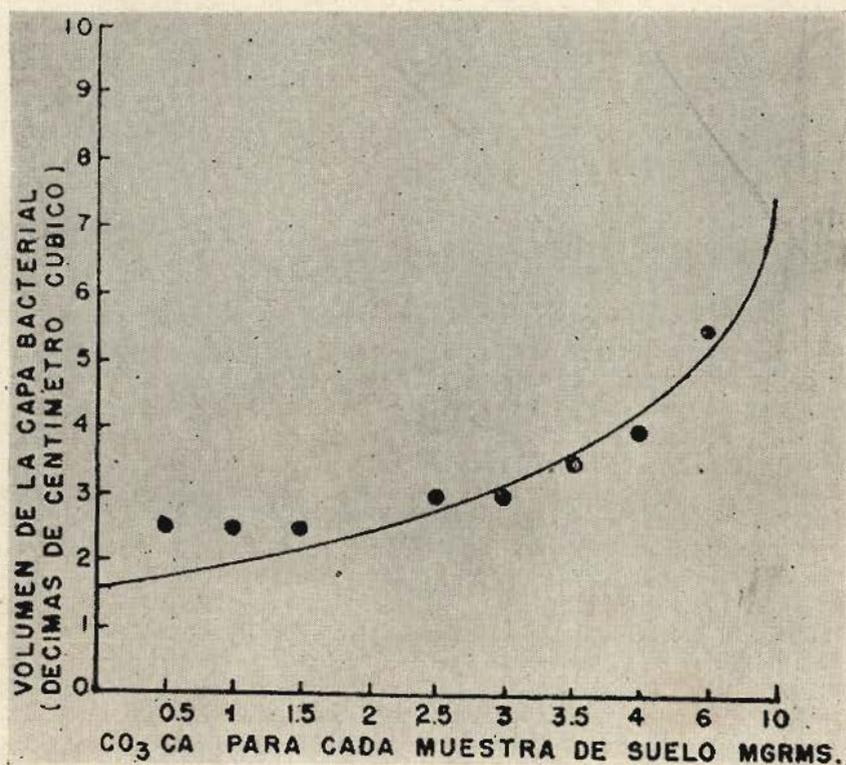


Gráfico 9. Curva de crecimiento de Azotobacter para el suelo "Río Fraile", en diferentes concentraciones CO_3Ca .

crito anteriormente para cada suelo y cada nutriente, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Fósforo

Bolo.— Capas buenas desde la solución testigo. Capa óptima: 0.2 por mil. Bastante rico en fósforo.

Invernadero.— Capas buenas desde la solución testigo. Capa óptima 0.2 por mil.

Posada.— Capas óptimas entre 0.4 y 0.6 por mil. Mediano.

La Cabaña.— Capa óptima 0.4 por mil. Mediano en fósforo.

Varela.— Capas óptimas entre 0.2 y 0.4 por mil. No deficiente

LAMINA XIII

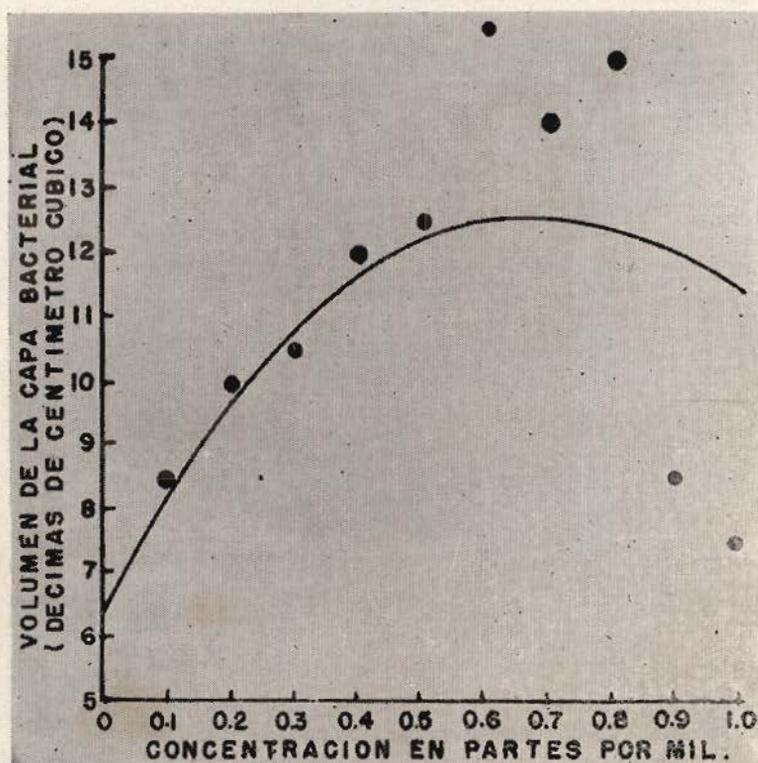


Gráfico 10. Curva de crecimiento de Azotobacter para el suelo "Bitaco", en diferentes concentraciones de NO_3Na .

LAMINA XIV

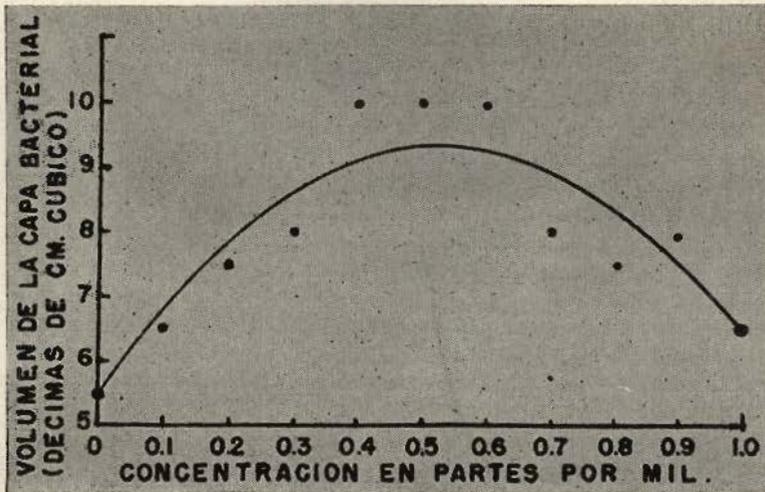


Gráfico 11. Curva de crecimiento de Azotobacter para el suelo "Buenaventura", en diferentes concentraciones de NO_3Na .

LAMINA XV

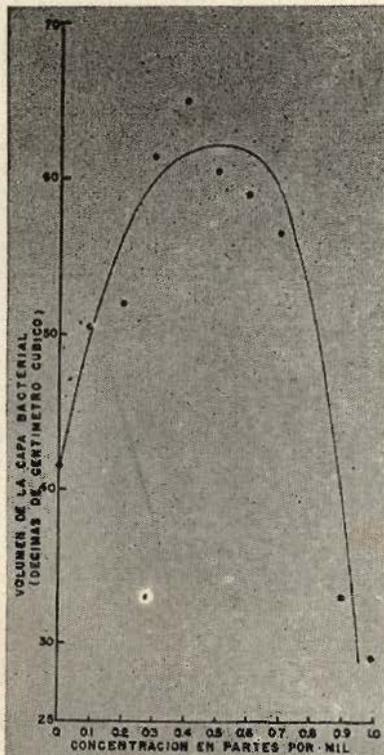


Gráfico 12. Curva de crecimiento de Azotobacter para el suelo "Río Fraile", en diferentes concentraciones de NO_3Na .

en fósforo.

La Isla.— Capas mal formadas. Optimas en 0.8. Pobre en fósforo.

Calima.— Buenas capas desde la concentración 0.2. Optima: 0.6 por mil.

Carretera al mar.— Capa óptima 0.4 por mil.

Potasio

Bolo.— Capa óptima 0.2 por mil. Bastante rico en Potasio.

Invernadero.— La capa óptima se encuentra a la concentración 0.4 por mil. No deficiente.

Posada.— La mejor capa se encuentra en la concentración 0.6 por mil. Mediano.

La Cabaña.— Capas óptimas formadas desde las concentraciones inferiores. Rico en potasio. Capa óptima: 0.2 por mil.

Varela.— Buenas capas desde la solución testigo. Optima: 0.2 por mil. Rico en potasio.

La Isla.— Buenas capas desde las concentraciones menores. Optima 0.2 a 0.4 por mil.

Carretera al Mar.— Buenas capas desde concentraciones menores. Optimas entre 0.2 a 0.4 por mil. Rico en potasio.

Calima.— Buenas capas desde 0.2 por mil. Capa óptima en 0.4 por mil. No deficiente.

Calcio

Bolo.— Capas más o menos uniformes desde testigo.

Invernadero.— Capa testigo débil. Buena capa desde 1 mgmo/caja. Optima en 2 mgms/caja.

Posada.— Capas bastante uniformes. No deficiente en calcio.

La Cabaña.— Buenas capas desde testigo.

Varela.— Capas muy buenas desde testigo. Uniformes. Rico en Calcio.

La Isla.— Presencia abundante de espuma, con formación muy mala de capas. La mejor sólo se encuentra en la última concentración. Muy ácido.

Carretera al Mar.— Muy mala formación de capas. La óptima sólo se encuentra a la mayor concentración, 10 mgm/caja. Muy ácido.

Calima.— Se aprecia fácilmente la acidez de este suelo. Sólo se forma una capa buena a la concentración más alta.

Nitrógeno

Bolo.— Testigo y 0.2 por mil, regulares. Capa óptima, 0.4 por mil. Invernadero.— Capas regulares. Óptima en 0.4 por mil.

Posada.— Testigo, regular. Las capas siguientes son uniformes. Óptimas en 0.4 por mil.

La Cabaña.— Las capas son buenas desde la solución testigo. Bastante uniformes desde la concentración 0.2 por mil.

Varela.— Capas buenas, uniformes. Capa óptima 0.4 por mil. Mediano.

La Isla.— Capas bastante uniformes. Bien desde testigo. Óptima 0.4 por mil.

Calima.— Buenas capas desde la solución testigo. Óptima 0.4 por mil.

Carretera al Mar.— Buenas capas desde testigo.

Para tener comparación de todos los resultados obtenidos con el test de Azotobacter, quiero dar a continuación, para cada suelo investigado, en forma esquemática, los análisis químicos en relación con el test biológico empleado. Los números de la columna "Test de Azotobacter" significan:

- | | |
|---|------------|
| 1 | Muy rico |
| 2 | Rico |
| 3 | Suficiente |
| 4 | Deficiente |
| 5 | Pobre |
| 6 | Muy pobre |

SUELO "BITACO"

Sustancia nutritiva	Análisis químico	Análisis según La Motte	Test de Azotobacter
N total nitratos	0. 343 %		
P total soluble	0. 010 % 11. 25 Kgs.	30 p.p.m. 23 lbs/acre	1 5
K	76. 92 "	253 "	5
Ca	2.250. 0 "		4
pH	5. 5	5.8	

SUELO "BUENAVENTURA"

Sustancia nutritiva	Análisis químico	Análisis según La Motte	Test de Azotobacter
N total nitratos	0. 225 %		3
P total soluble	0. 010 % 11. 25 Kgs.	28.75 lb/acre	5
K	36. 33 "	253 "	5
Ca	1.562. 5		4
pH	5. 2	5.3	

SUELO "LA ISLA"

Sustancia nutritiva	Análisis químico	Análisis según La Motte	Test de Azotobacter
N total nitratos	0. 136 %		
P total soluble	0. 050 % 112. 5 Kgs.	30 p.p.m. 230 lbs/acre	3 2
K	312. 5 "	402.5 "	3
Ca	4.500. "		2
pH	6. 0	6.0	

SUELO "INVERNADERO"

Sustancia nutritiva	Análisis químico	Análisis según La Motte	Test de Azotobacter
N total	0. 136 %		
nitratos		30 p.p.m.	3
P total	0. 050 %		
soluble	112. 5 Kgs.	230 lbs/acre	2
K	312. 5 "	402.5 "	3
Ca	4.500. "		2
pH	6. 0	6. 0	

SUELO "POSADA"

Sustancia nutritiva	Análisis químico	Análisis según La Motte	Test de Azotobacter
N total	0. 233 %		
nitratos		25 p.p.m.	3
P total	0. 025 %		
soluble	168. 75 Kgs.	172,50 lbs/acre	3-4
K	362. 90 "	402.50 "	4
Ca	5.625. "		1
pH	6. 5	6. 5	

SUELO "CALIMA"

Sustancia nutritiva	Análisis químico	Análisis según La Motte	Test de Azotobacter
N total	0. 233 %		
nitratos		12 p.p.m.	3
P total	0. 005 %		
soluble	22. 50 Kgs.	23 lbs/acre	4
K	293. 47 "	402.5 "	3
Ca	562. 50 "		6
pH	4. 6	4. 6	

SUELO "LA CABAÑA"

Sustancia nutritiva	Análisis químico	Análisis según La Motte	Test de Azotobacter
N total	0. 249 %		
nitratos		30 p.m.	1
P total	0. 025 %		
soluble	112. 5 Kgs.	172. 50 lbs/acre	3
K	703. 12 "	460 "	2
Ca	3.375. "		1
pH	6. 4	6.2	

SUELO "VARELA"

Sustancia nutritiva	Análisis químico	Análisis según La Motte	Test de Azotobacter
N total	0. 265 %		
nitratos		20 p.p.m.	3
P total	0. 040 %		
soluble	112. 50 Kgs.	230 Kgs.	2—3
K	784. 88 "	460 "	2
Ca	4.500. "		1
pH	7. 5	7.2	

SUELO "RIO FRAILE"

Sustancia nutritiva	Análisis químico	Análisis según La Motte	Test de Azotobacter
N total	0. 383 %		
nitratos		12 p.p.m.	2
P total	0. 050 %		
soluble	337. 50 Kgs.	230 lbs/acre	2
K	370. 88 "	402. 5 "	2
Ca	3.375. "		2
pH	6. 0 "	6.2	

SUELO "BOLO"

Sustancia nutritiva	Análisis químico	Análisis según La Motte	Test de Azotobacter
N total	0. 233 %		
nitratos		20 p.p.m.	3
P total	0. 050 %		
soluble	225. Kgs.	230 Kgs	2
K	613. "	402.5 "	2
Ca	3.375. "		1
pH	6. 9	6.8	

SUELO "CARRETERA AL MAR"

Sustancia nutritiva	Análisis químico	Análisis según La Motte	Test de Azotobacter
N total	0. 667 %		
nitratos		40 p.p.m.	1
P total	0. 025 %		
soluble	11. 25 Kgs.	25 Kgs.	3
K	379. 51 "	350 "	2—3
Ca	4. 8		6
pH	562. 50 "	4.5	

Al observar estas tablas anotamos que en la determinación del fósforo coinciden los valores obtenidos con el "test" de Azotobacter en un 90%; para la determinación del potasio en un 90%; para Nitrógeno en un 100% y para Calcio en 100%.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS Y VALORACION DEL "TEST" DE AZOTOBACTER

Al hacer una comparación entre los valores obtenidos con este "test" y relacionando este método con el análisis químico y el análisis de La Motte, podemos afirmar que esta prueba de determinación de nutrientes puede servir perfectamente como una prueba rápida y de fácil manejo para la comprobación de la suficiencia o deficiencia de las sustancias nutritivas mencionadas, en el suelo. Es natural que cada "test" biológico y también este método, tiene algunas fuentes de

error, ya que todos los procesos vitales dependen de muchos factores, ya conocidos, ora de naturaleza desconocida. El alto porcentaje de coincidencia entre el análisis químico y este "test", permite desde luego recomendarlo, especialmente cuando se trata de gran número de muestras cuya determinación necesita el agricultor en forma rápida. Sin duda un "test" biológico para la determinación de una deficiencia de una sustancia nutritiva es muchas veces más diciente que los datos de un análisis químico, el cual nos da la cantidad que de esa sustancia existe en el suelo, pero no nos indica la aprovechabilidad inmediata de ella. Sobre las ventajas de este método, respecto a otros que también emplean *Azotobacter*, ya se trató en la "Justificación del empleo de *Azotobacter* como indicador de deficiencias de nutrientes". Debe decirse también que este "test" no es aplicable para algunos suelos, que constituyen una minoría. Como ejemplo damos el suelo denominado "Carretera al Mar", que contenía muchas partículas de material vegetal que al flotar formaban una capa superficial sobre la solución nutritiva, impidiendo en esta forma la correcta valoración volumétrica y visual de la capa de *Azotobacter* formada. Desde luego, por procedimientos más o menos dispendiosos puede quitarse esa capa de materia vegetal que flota, pero ello ya entorpece la naturaleza del "test", restándole rapidez y haciéndolo susceptible de errores, por lo cual no es recomendable para esa clase de suelos. En casos excepcionales, como en el de suelos que tuvieran una acumulación apreciable de CO_3Na_2 , como sucedió con algunas muestras de suelos llevadas para su análisis a la Sección de Suelos de la Estación Agrícola Experimental de Palmira, probablemente tampoco sería recomendable este "test".

Es posible que este método de determinación de nutrientes también sea aplicable a la valoración de humus. A este respecto podemos decir que se llevaron a cabo algunos trabajos, cuyos resultados no consigno por no tener datos fidedignos de comparación, pues los brindados por medio de ignición de las muestras de suelos, fueron sumamente variables y no contaba con los elementos necesarios para hacer determinaciones más precisas. Por lo tanto, la aplicabilidad de este método biológico a la determinación del humus, debe ser objeto de estudios posteriores, de carácter mucho más amplio.

En cuanto a la valoración de este método, podemos decir que él es barato y que con un personal entrenado, compuesto por tres personas, podrían efectuarse unas doscientas a trescientas muestras, semanalmente, disponiendo de todos los elementos necesarios.

RESUMEN

Después de una descripción de los diferentes métodos existentes para la determinación de la deficiencia de sustancias nutritivas en el suelo, el autor describe un nuevo método biológico que emplea *Azotobacter* como agente indicador de esas deficiencias. Existen ya dos

métodos que emplean también la misma bacteria como indicadora de sustancias nutrientes, pero que ofrecen algunas desventajas para la valoración de las bacterias crecidas en medios nutritivos y que se emplean en la determinación de nutrientes. Con la ayuda de este nuevo método y comparando los valores obtenidos, con los suministrados por el análisis químico y los datos observados según La Motte (muy imprecisos algunas veces), se pueden determinar Nitrógeno (o nitratos), en un 100%; Fósforo en un 90%; Potasio en un 90% y Calcio, en un 100%.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—**Benecke, W., y Soding H.**— Beitrage zum Ausbau der Microbiologischen Bodenanalyse. Ztschr. Pflanzenernahr, Dúngung, u Bodenk. (A) 10: 129 - 159 - 1928.
- 2.—**Blinkov, G. N.**— Vliianie reakcii sredi na intensivnost azotfixacii i rost azotobaktera. (The effect of the reaction of medium an the rate of nitrogen fixation and the growth of Azobacter). Mikriobiología. 17 (1): 48-53.
Extractado en Biological Abstracts. 24 (1): 181 1950.
- 3.—**Bortels, H.**— Weitere Untersuchungen uber die Bedeutung einiger Spuren elemente und Kollodstoffe fur die biologische Stickstoffdungung. (Further investigations on the significance of some trace elements and colloid substances for nitrogen-fixation).
Landw. Jahrb. 90: 271 — 1941.
Extractado en Biological Abstracts. 24: 2863. 1950.
- 4.—**Bortels, H.**— Meteorobiologische Untersuchungen au Azotobakter. Zentralbl. Bakt. II Abt. 102 (7/9): 129 — 153. 1940.
Extractado en Biological Abstracts. 16: 699. 1942.
- 5.—**Boussingault, J. B.**— Recherches chimique sur la vegetation enterprises sur le but d'examiner si les plantes prennent de lazote a l'atmosphere. Ann. Chim. Phys. 67: 5 — 54.1838.
- 6.—**Burema, S. J. y Wieringa, K. T.**— Molybdenum as a growth factor of Azotobacter chroococcum. Antonie van Leeuwenhoek, Jour. microbiol. and Ser. 8 (3): 123 — 125. 1942.
Extractado en Biological Abstracts. 20 (10): 2182. 1950.
- 7.—**Burk Dean, Hans Lineweaver y Horner, K. C.**— The physiological nature of humic acid stimulation of Azotobacter growth. Soil Science. 33 (6): 455—487. 1932.
Extractado en Biological Abstracts. 7 (2): 408. 1933.
- 8.—**Butkewitsch, W. Die.**— Kultur des schimmelspilzes Aspergillus

niger. Als Mittel zur Bodenuntersuchung. Zhur. Opytn. Agron. (Russian Jour. Landw.) 10: 136—141. 1909.

- 9.—**Cauda, A** — Stazion. Sperimentali Agrar. Ital., 49: 125. 1916.
- 10.—**Christensen, H. R.**— Centralbl. f. Bakkt. II, 29, 385. 1911.
- 11.—**Colwell, W. E.**— A biological method for determining the relative boron contents of soil. Soil Sci. 56: 71 — 94. 1943.
- 12.—**Fred, E. B.**— Centralbl. f. Bakt. II, 31: 185. 1911.
- 13.—**Gainey, P. L.**— The significance of soil reaction in controlling nitrogen fixation in soils. Actes 4eme. Conf. Internation. Pédol. 3: 31—73. 1924.
- 14.— **Galloway, L. D. y Burgess, R.**— Microbiology. p. 21. London, Leonard Hill, Limited. 1946.
- 15.—**Gonick, W. N. y Reuszer, H. W.**— The distribution of Azotobacter chroococcum and Azotobacter vinelandii in Colorado Soils and surface waters. Soil Sci. Sos. Amer. Proc. 13: 251—257. 1948.
Extractado en Biological Abstracts. 24 (5): 1264. 1950.
- 16.—**Greaves, J. E.**— Some factors influencing nitrogen fixation. Soil Sci. 36 (4): 267—280. 1933. Extractado en Biological Abstracts. 8 (5): 1243. 1934.
- 17.—**Guillonneau, G.**— Les besoins en éléments fertilizante desterrés á pruniers de l'Agénais et le role de l'acide phosphorique. Extractado en Biological Abstracts. 5 (2): 551. 1931.
- 18.—**Halversen, W. V. y Hoge, W. G.** —The Azotobacter plaque test as plaque test as applied to the determination of phosphate deficiency in Idaho soils. Jour. Amer. Soc. Agron. 34: 503—512. 1942.
- 19.—**Helmut, B.**— Bodenbiologische Studien der Nahkriegszeit. (Biological studies of the ground in post-war times) Naturwiss. Rundschau. 1949 (2): 73—75. 1949. Extractado en Biological Abstracts. 24 (4): 985. 1950.
- 20.—**Hitomi, Sikazo.**— Studien uber Azotobacter chroococcum. (Studiez on A. chroococcum). Jour. Sci. Agric. Soc. 232: 206—210. 1926.
Extractado en Biological Abstracts. 2 (1—2): 205. 1928.
- 21.—**Hofer, Alvin.**— Electron microscope studies on Azotobacter fla-

- gellation and Rhizobium bacteriophage. Jour. Bact. 47 (5): 415—416—1944. Extractado en Biological Abstracts. 18 (7): 1535. 1944.
- 22.—**Horner, C. Kenneth, Dean Burk, Franklin E. Allison y Mildred S. Sherman.**— Nitrogen fixation by Azotobacter, as influenced by molybdenum and vanadium. Jour. Agric. Res. 65 (4): 173—193. 1942. Extractado en Biological Abstracts. 16 (10): 2296. 1942.
- 23.—**Jenny, H.**— Nutrient level determinations by greenhouse and field methods of studying fertilizers needs. Unpublished work. 1944.
- 24.—**Kaserer, H.**— Ber. d. Deuts. Bot. Gesellsch. 28: 208. 1910.
- 25.—**Leroux, Desire.**— Theses présentés a la Faculté des Sciences de l'Université de Paris. p. 126—134. 1942.
- 26.—**Maximov, Nicolai.**— Fisiología Vegetal. p. 206—207. 1946.
- 27.—**Mc. George, W. T.**— Factors influencing the availability of native phosphates and phosphate fertilizers for Arizona soils. Ariz. Agr. Exp. Sta. Tech. Bul. 82: 295—331. 1939.
- 28.—**Mc Knight, T.**— Non-symbiotic nitrogen-fixing organisms in Queensland soils. Queensland Jour. Agric. Sci. 6 (2): 177—195. 1949.
- 29.—**Mehlich, A., Fred, E. B., y Truog, E.**— The Cuninghamella plaque method of measuring available phosphorus in soil. Soil Sci. 35: 259—279. 1934.
- 30.—**Mehlich, A., Truog, E. y Fred, E. B.**— Aspergillus niger method of measuring available potassium in soil. Soil. Sci. 35: 259—279. 1933.
- 31.—**Mitscherlich, E. A.**— Die Bestimmung des Dungerbedurfnisses des Bodens, Ed. 3. Paul Parey, Berlín. 1930.
- 32.—**Mulder, E. G.**— On the use of micro-organisms in measuring a deficiency of copper, magnesium and Molybdenum in soils. Antonie van Leeuwenhoek, Jour. Microbiol. and Serol. 6 (2): 99—109. 1940. Extractado en Biological Abstracts. 14 (10): 1598. 1940.
- 33.—**Mulder, E. G.**— Über die Bedeutung des Kupfers für das Wachstum von microbiologische methode zur Bestimmung des pflanzenverfügbaren Bodenkupfers. Arch. Mikrobiol. 10: 72—86. 1939.

- Extractado en Biological Abstracts. 14: 308. 1940.
- 34.—**Naundorf, C.**— Ertragssteigerungen durch Bakterienimpfung des Bodens. Deutsche. Landwirtschaftliche Presse. No. 47. 1940.
- 35.—**Neubauer, H. y Schneider, W.**— Die Nährstoffaufnahme des Keimpflanzen und Ihre Anwendung Auf Die Bestimmung Des Nährstoffgehalts Der Boden. Ztschr. Pflanzenernähr. u. Düngung. (A) 2: 329 — 362.
- 36.—**Niklas, H., y Poschenrieder, H.**— Zur feststellung der Magnesia Dungebedürftigkeit und Magnesia—Dungewirkung Im Boden Mittels Aspergillus niger. Bodenk. u. Pflanzenernähr. 1: 235 — 247.
- 37.—**Niklas, H., K. Scharrer y Strobel.**— Phosphatlöslichkeit und Azotobakterwachstum. (Phosphate solubility and growth of Azotobacter). Landwirtschaftl. Jahrb. 63 (3): 387 — 410. 1926.
- 38.—**Niklas, H.**— Die Frage der Ermittlung des Nährstoffgehaltes der Boden auf biochemischem Wege. Ergeb. Agrikulturchem. Jahrb. Landw. Chem. 2: 21 — 34. 1930.
Extractado en Biological Abstracts. 8 (5): 1275. 1934.
- 39.—**Sackett, W. G. y Stewart, L. C.**— A bacterial method for determining mineral soil deficiencies by use of the soil plaque. Colo. Agr. Exp. Sta. Bul. 375: 1—36. 1931.
- 40.—**Smith, A. M. y Coull, R.**— Available plant food in soils. New biochemical methods of estimation. Scottish Jour. Agric. 15 (3): 262 — 271. Extractado en Biological Abstracts. 7 (8): 1954. 1933.
- 41.—**Stephenson, R. E. y Schuster, C. E.**— Laboratory, greenhouse, and field methods of studying fertilizer needs. Soil Sci. 52: 137 — 153.
- 42.—**Stoklasa, J.**— Centralbl. f. Bakt. II. 29: 385. 1911.
- 43.—**Thornton, S. F.**— Soil and fertilizer studies by means of the Neubauer method. Ind. Agr. Exp. Sta. Bul. 399: 1 — 38. 1935.
- 44.—**Vandecaveye, S. C.**— Biological Methods of determining nutrients in soil. En: Diagnostich Techniques for Soils and Crops. p. 199 — 228. The American Potash Institute. 1948.
- 45.—**Voicu, J.**— These Faculté de Sciences. Paris. p. 95. 1923.

- 46.—**Waksman, S. A., y Starkey, R. L.**— Soil and the microbe. p. 106—113. John Wiley and Sons, Inc. New York. 1931.
- 47.—**Xandri Tagueña, José María.**— Revisión de técnicas aplicables al estudio de Azotobacter por el lignito coloidal. Cuaderno No. 34 1943.
- 48.—**Ziemiecka, J.**— Metody mikrobiologicznego oznaczania zysnosci gleby. Studja and mikrobiologja glebe. Czésé I (Microbiological analysis of soil fertility. Soil Microbiology. I) Roczniki Nauk i Lesnych (polish Agric. and Forest Ann.) 21 (1): 79 — 102. 1929. Extractado en Biological Abstracts. 6 (5): 1413. 1932.
- 49.—**Ziemiecka, J.**— O wplywie gelu Krzemionkowego na pobieranie fosforu przez Azotobaktera. (Influence of silicagel on assimilation of P by N fixers). Roczniki Nauk i Lesnych (Polish Agric. and Forest Ann.). 22: 343—350. 1929. Extractado en Biological Abstracts 6 (5): 1413. 1932.