

MINISTERIO DE EDUCACION
DE LA NACION

UNIVERSIDAD NACIONAL DE EVA PERON
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

ESTUDIO DE LAS ESPECIES DEL PAIS

DEL GENERO "AZOTOBACTER"

Horacio T. Akiyoshi

Eva Perón

1952

Agradezco al Profesor Doctor JOSE MARIA DE LA
BARRERA, la orientación y los consejos recibidos,
que permitieron la realización del presente trabajo

I N D I C E

Introducción	1
Antecedentes históricos	6
Los "Azotobacter", su metabolismo e influencia de los factores físicos y químicos	10
Métodos y técnicas ensayados para el aislamiento de gérmenes del grupo "Azotobacter"	23
Especies de gérmenes identificados, pertenecientes al género "Azotobacter", en distintas muestras de tierra del país	37
Influencia del molibdeno y del tungsteno en el proceso de fijación aerobia del nitrógeno molecular atmosférico	44
Conclusiones	48
Resumen	50
Bibliografía	52

INTRODUCCION

La Microbiología Pedológica constituye un capítulo esencial en el estudio de la vida sobre la superficie terrestre.

Las pérdidas continuas en nitrógeno que sufre el suelo por filtración de los nitratos disueltos en el agua y arrastrados al mar y por otra parte la reintegración a la atmósfera bajo forma de nitrógeno molecular por la acción de los gérmenes de la desnitrificación, no pueden ser compensadas por las adiciones de fertilizantes efectuadas solamente en las tierras cultivadas. Un fenómeno continuo, independiente de la energía humana y extensivo a toda la superficie de la tierra, es necesario para mantener las reservas de nitrógeno combinado en el seno de los suelos.

Es así como un cierto número de microorganismos son capaces, gracias a la energía producida por la oxidación del carbono orgánico, de fijar el nitrógeno molecular de la atmósfera y realizar así, la síntesis de su constitución celular. Son estos ejércitos de obreros incansables los que mantienen las reservas de nitrógeno en el suelo y hacen posible la vida sobre el planeta; por ellos hablan los 10 a 40 kilogramos de nitrógeno fijados anualmente por hectárea.

Dentro de la armoniosa complejidad de las interreacciones microbianas en el seno del suelo, que van desde la simple vida aislada hasta la verdadera simbiosis, pasando por todos

los grados de la sinergia, conocemos el proceso de la fijación del nitrógeno atmosférico, gracias a la acción de diversos microorganismos.

Esta fijación, en condiciones de oxibiosis, es realizada por los Azotobacter, bacterios heterótrofos que trabajan en suelos bien aireados, ricos en calcio y fósforo y pobres en nitrógeno asimilable.

En condiciones de anoxibiosis, son los Clostridium pastorianum los que trabajan, principalmente, en suelos mal aireados, impregnados de agua.

Las Leguminosas pueden realizar directamente la síntesis de sus tejidos gracias a los fijadores simbióticos, Rhizobium leguminosarum que se encuentran en el suelo, en estado latente, bajo forma de bacteroides; pero, al contacto con los pelos absorbentes de las raíces de aquéllas, penetran en los tejidos, se multiplican, fijan el nitrógeno molecular y elaboran su protoplasma, utilizado simbióticamente por la planta.

Y en la actualidad, se conoce también la fijación del nitrógeno atmosférico por las algas verdi-azules o Myxophyceae. Investigaciones realizadas por el Profesor Fogg (1947), de la Universidad de Londres, ponen en evidencia que estos organismos fotosintéticos, que son los autótrofos más completos conocidos y que efectúan la síntesis de sus sustancias a partir de anhídrido carbónico, agua, sales minerales y nitrógeno atmosférico, son capaces de vivir en la superficie desnuda de las rocas, donde no se manifiesta la presencia de glúcidos.

"Poder fijador" es el término adoptado en Microbiología para designar esta facultad del suelo de asimilar el nitrógeno

no gaseoso de la atmósfera, gracias a la actividad de los microbios que proliferan en ese medio natural.

Berthelot fué uno de los primeros promotores de la doctrina de la fijación microbiana, insistiendo sobre el rol fundamental de los microorganismos en el ciclo del nitrógeno, no sólo como agentes de análisis de los compuestos nitrogenados, sino también como agentes de síntesis, a partir del nitrógeno molecular atmosférico.

En principio, la acción de fijación parecía pertenecer a algas, especialmente a diatomeas, pero, algunas experiencias con bacterios del suelo, aislados por Guignard, lo condujeron a concluir, textualmente, "que existen microbios de especies diversas, exentos de clorofila y aptos para fijar el nitrógeno, especialmente ciertos bacterios del suelo".

La doctrina de la fijación microbiana, prevista y enunciada por Berthelot, en el año 1885, carecía, en su época, de base experimental sólida. Un problema de orden microbiológico, únicamente podía ser resuelto por medio de métodos microbiológicos. Y la microbiología de hace más de 60 años no poseía aún ningún método que permitiera abordar estas investigaciones con miras de éxito.

Esta microbiología se hallaba dominada por fórmulas imaginadas en las conclusiones de investigaciones patológicas, que no tenían ninguna relación con los microbios del suelo.

Para aislar del suelo una especie determinada no se conocía ningún procedimiento eficaz. Faltaba un principio totalmente contrario: evitar las fórmulas inadecuadas, haciendo variar la composición del medio, según los fines perseguidos.

Este principio, tan flexible, es el que ha dado impulso al desarrollo de los problemas agrobiológicos. "Principio de cultivo electivo" se ha llamado, pues permite elegir entre los microbios de los medios naturales, los agentes que interesan, u tilizando una composición apropiada del medio de cultivo.

Así, una sustancia energética rica, como la glucosa o el manitol, es atacada rápidamente por una multitud de microorganismos, pero a condición de encontrar en el medio una dosis conveniente de nitrógeno combinado asimilable. Sin este nitrógeno, ella se vuelve inatacable para la inmensa mayoría, pu diendo hacerlo, tan sólo, los microbios capaces de fijar el nitrógeno gaseoso. En consecuencia, si hay proliferación en es tas condiciones exclusivas, ésta no puede ser más que la de un fijador.

Fué así como Winogradsky aisló, en el año 1895, una especie anaerobia que recibió el nombre de Clostridium pastorianum. Y esto constituyó el advenimiento del período de las in vestigaciones puramente biológicas.

Años más tarde, en 1901, Beijerinck descubría, empleando el medio de Winogradsky y trabajando en condiciones de aerobiosis, una nueva clase de gérmenes fijadores, que genéricamente denominó AZOTOBACTER.

Desde entonces, una legión de investigadores han trabajado sobre este problema y, no obstante el número y la importancia de los trabajos publicados, el proceso de la fijación microbiana está lejos de ser comprendido en su totalidad.

En el sentido de aportar una información más sobre este tema tan extenso de la fijación del nitrógeno atmosférico, se

expone en el presente trabajo, las investigaciones realizadas sobre distintas muestras de tierra del país, tendientes a aislar especies de *Azotobacter* que proliferan en nuestro suelo, como así también, las pruebas efectuadas con el propósito de estudiar la influencia que el molibdeno y el tungsteno ejercen en el proceso de fijación aerobia.

ANTECEDENTES HISTORICOS

BEIJERINCK, en 1901, descubrió la existencia de géneros fijadores aerobios, creando el género AZOTOBACTER. En ese mismo año aisló las especies Azotobacter chroococcum y Azotobacter agile, de suelos y aguas del canal de Delft, respectivamente.

LIPMAN, en 1903, aisló, de suelos de Estados Unidos de América, tres nuevas especies: Azotobacter vinelandii, Azotobacter beijerinckii y Azotobacter woodstownii.

LÖHNIS y WESTERMANN, en 1908, aislan del suelo, otra nueva especie que denominan Azotobacter vitreum.

LIPMAN, en 1909, aísla la especie Azotobacter hilgardii.

LIPMAN y BURGESS, en 1915, aislan una nueva especie: Azotobacter sayrnii.

LÖHNIS y SMITH, en 1923, estudiando las distintas especies de Azotobacter, consideran que Azotobacter beijerinckii Lipman, Azotobacter woodstownii Lipman, Azotobacter hilgardii Lipman y Azotobacter sayrnii Lipman y Burgess, son idénticos a Azotobacter chroococcum Beijerinck. Igualmente acuerdan y afirman que Azotobacter vinelandii Lipman es idéntico a Azotobacter agile Beijerinck, considerando, además, que Azotobacter vitreum Löhnis y Westermann es otro sinónimo de Azotobacter agile Beijerinck.

SMITH, en comunicación privada, considera a Azotobacter beijerinckii Lipman como una raza R no pigmentada de Azoto-

bacter chroococcum Beijerinck. Además, afirma que Azotobacter vitreum Löhnis y Westermann, es una raza S de débil desarrollo de Azotobacter agilis Beijerinck.

WINOGRADSKY, así como KLUYVER y VAN REENEN en 1933, consideran que debe hacerse una distinción entre Azotobacter agilis Beijerinck y Azotobacter vinelandii Lipman, contrariamente a las conclusiones de los anteriores investigadores, por la imposibilidad de poner en evidencia la presencia de formas quísticas en los cultivos adultos de Azotobacter agilis.

GREENE, en 1935, analizando Azotobacter chroococcum Beijerinck y Azotobacter beijerinckii Lipman, encontró que la composición química de las células era prácticamente la misma. Por otra parte, estudiando la composición química de las células de Azotobacter vinelandii Lipman, encontró que es muy similar a la de las células de Azotobacter agilis Beijerinck.

SMITH, en 1935, aisla de varios suelos, una raza de Azotobacter chroococcum que no fermenta manitol, designándosela raza manitolnegativa.

KLUYVER y VAN DEN BOUW, en 1936, describen a Azotobacter agilis, var. atypica, como una forma de Azotobacter agilis sin la propiedad de formar pigmento.

STARKEY y DE, en 1939, aislan, de suelos de la India, la última especie descrita: Azotobacter indicum.

De acuerdo al "BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY", 6a. edición, Londres, 1948, el género AZOTOBACTER Beijerinck, de la familia AZOTOBACTERIACEAE Bergey, Breed y Murray, de la sub-orden EUBACTERIINEAE Breed, Murray y Hit-

ehens, de la orden EUBACTERIALES Buchanan, de la clase SCHIZO MYCETES Nägeli, comprende las especies siguientes:

1. AZOTOBACTER CHROOCOCCUM Beijerinck. (Cent.f.Bakt., II Abt., 7, 1901, 567 y 9, 1902, 3; Bacillus azotobacter Löhnis y Hanzawa, Cent.f.Bakt., II Abt., 42, 1914, 1; Bacillus chroococcus Buchanan, General Syst.Bact., Baltimore, 1925, 194).

De chroa, color; coccus, grano. Es la especie tipo.

2. AZOTOBACTER AGILE Beijerinck. (Cent.f.Bakt., II Abt., 7, 1901, 577). De agilis, ágil, rápido.

3. AZOTOBACTER INDICUM Starkey y De. (Soil Sci., 47, 337, 1939). De indicus, de India.

En cambio, POCHON y TCHAN, en su "PRECIS DE MICROBIOLOGIE DU SOL", Paris, 1948, consideran cuatro especies principales:

I. Especies con pigmento verde:

Azotobacter vinelandii (Lipman)

Azotobacter agile (Beijerinck)

II. Especies:

Azotobacter chroococcum (Beijerinck)

Azotobacter beijerinckii (Lipman)

Consideran que las especies Azotobacter chroococcum, Azotobacter vinelandii y Azotobacter beijerinckii, deben ser clasificadas en la familia de los Azotobacteriaceae, clase especial de la sub-ramificación de los Mycobacteriales (A.R.Prévot).

En lo concerniente a Azotobacter agile, esta especie aparece bien diferenciada de las otras tres especies de Azoto-

bacter; en particular, si se admite que la formación de quistes es uno de los caracteres esenciales del grupo, es necesario reconocer que Azotobacter agile debiera ser eliminado del mismo. Otros caracteres, sobre todo su movilidad, lo aproximan a las Monas; Winogradsky propone considerarla en un nuevo género denominado Azomonas, en el que también se incluiría Azotobacter agile, var. atypica.

LOS "AZOTOBACTER", SU METABOLISMO E INFLUENCIA
DE LOS FACTORES FISICOS Y QUIMICOS

Los "Azotobacter" son células sin endosporos, bastoncitos relativamente grandes o también cocos; a veces, casi como levaduras, en apariencia. En este género, el tipo de flagelo ha sido establecido como peritrico.

Son bacterios del suelo y del agua, aerobios obligados, Gram negativos y desarrollan en soluciones que contienen nitrógeno combinado en cantidad escasa o que no lo tienen en absoluto.

La característica de este grupo es la de fijar el nitrógeno atmosférico y convertirlo en amoníaco, nitritos y nitratos (Beijerinck y van Delden, 1902). A este objeto se les puede procurar una fuente de energía conveniente, tal como el manitol; la energía lograda con la oxidación de esta sustancia se utiliza en la fijación del nitrógeno. Gainey (1918) observó que en un medio de manitol sintético sembrado con tierra abonada se fijaban aproximadamente 8 mg de nitrógeno por 50 ml del medio.

AZOTOBACTER CHROOCOCCUM Beijerinck

Son bastoncitos de 2 a 3 por 3 a 6 micrones, que se presentan comúnmente en pares, en racimos y ocasionalmente en cadenas. Las células muestran 3 ó 4 gránulos aromáticos refringentes. Los organismos están rodeados de una membrana

viscosa de espesor variable, que generalmente se vuelve parduzca en cultivos viejos, debido posiblemente a la transformación de la tirosina en melanina. La materia colorante es insoluble en agua, alcohol, éter y cloroformo.

En *Azotobacter chroococcum*, la formación de pigmento es variable; algunos forman un pigmento pardo y otros son acromógenos; se encuentran también formas intermedias (Omeliansky y Ssewerowa, 1911).

Envejeciendo, las células disminuyen de tamaño, toman la forma de coccoides o de micrococcos, más o menos rodeados de mucilago; finalmente elaboran una membrana y se enquistan.

El análisis químico de cultivos de 4 días, desarrollados sobre manitol agar, cuando secos, ha evidenciado contener menos de 0.5 % de hemicelulosas, menos de 20 % de proteína cruda, menos de 5 % de cenizas y más de 50 % de materiales semejantes a la lignina. La fracción nitrogenada contiene menos de 1 % de nitrógeno amídico, menos de 1 % de nitrógeno húmico y alrededor de 1 % de nitrógeno básico.

Su temperatura óptima es de 25 a 28°C. Fué aislado del suelo y ocurre naturalmente en la mayoría de los suelos cultivados neutros o alcalinos.

AZOTOBACTER AGILE Beijerinck

Son bastoncitos de 4 a 6 micrones de longitud, casi esféricos. Es activamente móvil por medio de numerosos flagelos peritricos. Algunas razas parecen ser inmóviles.

El análisis químico de cultivos de 4 días, desarrollados sobre manitol agar, cuando secos, ha evidenciado contener más

de 4 % de hemicelulosas, más de 45 % de proteína cruda, más de 7 % de cenizas y menos de 4 % de materiales semejantes a la lignina. La fracción nitrogenada contiene más de 1 % de nitrógeno amídico, más de 1 % de nitrógeno húmico y 2 % o más de nitrógeno básico.

Su temperatura óptima es de 25 a 28°C. Fué aislado originalmente de aguas del canal de Delft y ocurre naturalmente en aguas y suelos.

Pochon y Tehan describen esta especie según la alimentación de las células.

Winogradsky considera que a una nutrición normal (malos alimentos: etanol, butanol, ácido butírico y benzoico, etc.), corresponde una morfología normal, mientras que a una nutrición anormal (buenos alimentos: glucosa, manitol, etc.), corresponde una morfología anormal.

1. Células sometidas a una alimentación normal.-

FORMAS JOVENES.- Células ovales, de 3.5 a 2.5 micrones, móviles. La reproducción se realiza por escisión.

FORMAS ADULTAS.- Las células son más grandes y su protoplasma, con gotitas de aspecto oleoso, está rodeado de una capa no coloreable. Estas células quedan en vida latente, durante algunos meses, siempre que se preserven de la desecación.

2. Células sometidas a una alimentación anormal.-

Sobre medios glucosados, se producen fenómenos de brotación, análogos a los de *Azotobacter vinelandii*, que perturban su normal evolución. Son células extremadamente móviles, tanto en sus formas jóvenes como en las adultas.

AZOTOBACTER AGILE, VAR. ATYPICA Kluyver y van den Bout

Son células redondas, de 3.5 micrones de diámetro, aisladas o en diplococos, de gran movilidad y de aspecto mona diforme.

AZOTOBACTER INDICUM Starkey y De

Son bastoncitos elipsoidales de 0.5 a 1.2 por 1.7 a 2.7 micrones, cuando desarrollan sobre agar glucosado, libre de nitrógeno.

Una de las características distintivas es la presencia de 2 grandes y redondos cuerpos altamente refringentes en las células, comúnmente uno en cada extremo. Es móvil por medio de numerosos flagelos peritricos.

El organismo desarrolla lentamente, pero con el tiempo produce grandes cantidades de limo. Posee gran tolerancia a los ácidos, puesto que desarrolla en pH 3 a 9.

Fue aislado de suelos de India y ocurre naturalmente en suelos.

AZOTOBACTER BEIJERINGKII Lipman

Son células casi esféricas, un poco más grandes que *Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter vinelandii*, sin movilidad.

Fue aislado de suelos y cultivado en medios sólidos se evidencia mejor la elaboración de un pigmento amarillo.

AZOTOBACTER VINELANDII Lipman

La morfología de esta especie, también descrita por

Pochon y Tehan, es muy variable según la edad del cultivo y las sustancias energéticas utilizadas.

1. Células sometidas a una alimentación normal.-

FORMAS JUVENES.- Son bastoncitos rechonchos, a extremos redondeados, de 2.5 por 1.5 micrones, dotados de un movimiento lento; el aspecto de los cultivos es perfectamente homogéneo.

FORMAS ADULTAS.- Los bastoncitos se transforman en formas ovales, más o menos redondeadas, cocoides, de menores dimensiones (2.0 por 1.2 micrones).

FORMAS VIEJAS (NANNOCITOS).- Cuando envejecen, hacia el quinto día, formado el velo en cultivos sobre medios líquidos, los cocoides disminuyen su tamaño volviéndose casi esféricos (1.5 por 1.2 micrones).

QUISTES.- El estado de enquistamiento es precedido, a veces, de otro estado inconstante y transitorio que podría ser llamado "estado prequístico", donde las células adultas o nannocitos se rodean de una sustancia viscosa que los mantiene unidos flojamente, apareciendo en el seno de los mismos, pequeñas gotitas de aspecto oleoso.

El tamaño de los quistes difiere según provengan de células adultas o de nannocitos (nannquistes, más pequeños).

La velocidad de enquistamiento es función del alimento suministrado a las células, siendo el butanol el que provoca un enquistamiento precoz que se completa a los 5 ó 6 días.

El quiste es la forma de reposo, de resistencia de los *Azotobacter* y ellos pueden ser conservados durante meses y años.

2. Células sometidas a una alimentación anormal.-

FORMAS JOVENES.- Se presenta la forma oval, móvil; mientras que el estado de bastoncillo móvil es difícil de poner en evidencia.

FORMAS ADULTAS (GEMANTES).- Sobre un cierto número de células aparecen brotes (yemas) semejantes a los de las levaduras.

QUISTES.- El número de células capaces de enquistarse es muy restringido (1 % con la glucosa) y los quistes son atípicos, enormes (2 a 3 veces el tamaño normal); el cuerpo central es refringente, apenas coloreable y tiene un aspecto de degeneración grasa. Después de cierto número de pasajes sobre medios a la glucosa, los caracteres atípicos se acentúan y la cepa se vuelvequistógena.

METABOLISMO DE LOS "AZOTOBACTER"

METABOLISMO CARBONADO

Se han ensayado una gran cantidad de sustancias susceptibles de ser utilizadas por los Azotobacter. Puede hacerse una diferencia entre los alimentos "normales" y los "anormales", siendo los primeros los artificiales de laboratorio y los segundos los hipotéticamente sospechosos de jugar un rol en la nutrición de los Azotobacter en el seno del suelo.

Nutrición carbonada en el laboratorio.-

Las distintas sustancias ensayadas han sido azúcares , alcoholes, sales de ácidos volátiles y fijos, fenoles, sustancias húmicas, poliósidos elevados naturales, inulina, almidón, celulosa, etc.

Es muy difícil establecer el valor energético efectivo de cuerpos tan diversos y la relación de nitrógeno fijado al carbono consumido (N_2/C). Los mejores rendimientos observados son del orden de 1 mg de N_2 fijado por 100 mg de C consumido.

Desde 1912, Koch y Seidel, hacen notar que, para cada concentración de substrato en C, existe un óptimo de tiempo de incubación que debe fijarse. Bonazzi, en 1921, precisaba que si la determinación de la relación se hacía una vez consumido todo el carbono, el cultivo se realizaba en malas condiciones, trabajando los Azotobacter, durante un cierto tiempo, en condiciones próximas a la inanición. De ahí, la necesidad de operar con un exceso de carbono, de detener el cultivo antes de su agotamiento y de realizar un doble dosaje de este carbono, al comienzo y a la finalización del cultivo, para conocer de esta manera la cantidad utilizada.

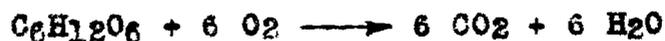
Es el método que preconiza Winogradsky para determinar el tiempo mínimo en función de la ganancia máxima en nitrógeno, para una fuente dada de carbono. En efecto, esta determinación es la más importante pues las cepas difieren, sobre todo, por su "velocidad de fijación". Si se dejan obrar suficiente tiempo cepas diferentes, se constata que los rendimientos son sensiblemente los mismos.

El "mecanismo" mismo de esta nutrición aún no se conoce

íntimamente. La fijación del nitrógeno es una reacción endotérmica, siendo *Azotobacter* el germen cuya respiración se considera más intensa; el carbono juega un rol plástico y además un rol energético considerable. El problema se ha abordado por el estudio del desarrollo de gas carbónico. Mientras que los fijadores anaerobios, como *Clostridium pastorianum*, queman incompletamente el carbono con liberación de ácidos volátiles, de alcohol y de gas carbónico, los *Azotobacter*, al menos con sus cepas puras, llegan hasta una combustión total, con desarrollo de gas carbónico solamente (Prinsheim, 1918). Este desarrollo es máximo durante la fase de crecimiento logarítmico, entre el segundo y quinto día, y disminuye luego; es tanto más intenso y precoz cuanto mejor asegurada se encuentre la aireación del cultivo.

Sin embargo, el fenómeno de combustión es complejo, pareciendo hacerse en 2 tiempos.

Después de los trabajos de Allen y de Bonazzi sobre la relación CO_2/O_2 y sobre las titulaciones de azúcares repetidas regularmente en el medio de cultivo, es posible concluir que la cantidad de gas carbónico liberado (en la atmósfera y en solución en el medio) es superior a la del oxígeno consumido, según la ecuación teórica:



Es necesario tener en cuenta fenómenos de oxidación y de respiración intracelulares; el metabolismo del carbono se haría en 2 tiempos sucesivos correspondientes a las 2 fases de la vida del cultivo.

En la primera fase, fase de poder fermentativo elevado (unidad de metabolismo por unidad de tiempo y por unidad celular), el azúcar sería transformado en uno o varios compuestos no reductores y almacenados en el cuerpo microbiano, en la sustancia capsular y quizás, difundiría en el medio. Esta fase preparatoria es corta.

Durante la segunda fase, estos compuestos son en parte quemados y en parte utilizados para la constitución de la sustancia celular y capsular. Es la fase de asimilación del nitrógeno.

Actualmente, es difícil representarse la naturaleza de los complejos intermediarios. Bonazzi emite, a título de hipótesis, la siguiente opinión: considerando que, en cultivos conteniendo nitratos, la primera fase está caracterizada por una utilización considerable de éstos, que juegan por otra parte un papel favorecedor frente a la proliferación, se puede admitir la formación de combinaciones hexosa-nitratos, análogas a los hexosa-fosfatos de Harden y Young. Es evidente que esto sería en un caso muy particular, pues los Azotobacter proliferan habitualmente en ausencia de nitratos.

Nutrición carbonada en el suelo.-

Se trata de uno de los problemas más difíciles y más discutidos de la microbiología del suelo, ya que numerosas hipótesis emitidas y categóricas afirmaciones hechas no han podido ser verificadas experimentalmente.

Dos series de experiencias permitieron obtener una idea más precisa sobre esta nutrición:

CULTIVOS ESPONTANEOS SOBRE PLACAS DE SILICO-GEL.- La

siembra de placas de sílico-gel con granos de tierra puede considerarse, según Winogradsky, como una forma de "cultivo espontáneo". El ensayo en serie, de todas las sustancias carbonadas citadas anteriormente, permitieron obtener cultivos; ateniéndose a estas solas experiencias, estos cuerpos parecen ser utilizables en el suelo.

CULTIVOS ESPONTANEOS SOBRE TIERRA EN CAPA DELGADA O EN PLACA AMOLDADA.- Una tierra conteniendo Azotobacter y presentando las condiciones requeridas para una proliferación normal de éstos, fué enriquecida (1 %) con cada una de las sustancias carbonadas a ensayar y tratada, sea con la técnica de la capa delgada, sea con la de la tierra amoldada. Después de 4 a 5 días se leyeron los resultados: presencia o ausencia de colonias sobre tierra amoldada, microscopía directa en la tierra en capa delgada. Los resultados difirieron completamente de los de las experiencias precedentes, pudiendo los alimentos ser clasificados en:

Muy favorables: Hexosas, etanol, manitol, ácido benzoico, ácido pirúvico, ácido cítrico.

Poco favorables: Pentosas, lactosa, butanol.

Inutilizables: Ácido fórmico, acético, propiónico, butírico, tártrico, succínico, láctico, salicílico, fenol.

ANALISIS CRITICO DE ESTAS EXPERIENCIAS.- Se nota una divergencia entre los resultados obtenidos con las dos series, sobre sílico-gel y sobre tierra; un cierto número de alimentos utilizables sobre sílico-gel no lo son en cultivos sobre tierra. Este hecho es curioso y paradójico; la tierra tendría un verdadero poder inhibitor sobre la utilización de es-

tos alimentos por las células de Azotobacter, al menos en presencia de otros gérmenes del suelo (Pochon y Tchan).

Hecha esta crítica experimental, cómo considerar, en este primer estado, la nutrición de los Azotobacter en el suelo ?

Los restos vegetales, que son la fuente esencial de carbono del suelo, contiene siempre gran exceso de carbono en relación a su tenor en nitrógeno; sin embargo, gracias a estas trazas de nitrógeno, los heterótrofos no fijadores entran en acción y degradan los compuestos carbonados tisulares: hemicelulosas, pentosanos, hexosanos, almidón... con formación de alcohol, ácidos y de gas; la descomposición de la celulosa por los Bacterios anaerobios liberan igualmente estos mismos cuerpos; la degradación de los compuestos con núcleos cíclicos libera ácido benzoico. Cuando las últimas trazas de nitrógeno asimilable han sido agotadas, la proliferación de los heterótrofos se detendrá y los Azotobacter entrarán en acción utilizando las sustancias carbonadas degradadas provenientes de la proliferación de los heterótrofos. Cuando los Azotobacter hayan fijado suficiente nitrógeno y enriquecido así el suelo, los heterótrofos no fijadores entrarán de nuevo en acción, llevando más lejos la degradación de los elementos carbonados del tejido vegetal y un nuevo ciclo recomenzará.

Una hipótesis complementaria, indispensable para explicar la nutrición de los Azotobacter en el suelo, ha sido emitida hace mucho tiempo bajo la forma de una simbiosis entre los Bacterios celulolíticos aerobios y estos fijadores.

En síntesis, los procesos de la nutrición carbonada de

los Azotobacter en el suelo se concretaría en la:

1. Utilización de ciertos productos, residuos de fermentación del tejido vegetal, dejados por los Bacterios heterótrofos no fijadores.

2. Simbiosis con los Bacterios celulolíticos aerobios.

Junto a estos dos procesos esenciales, se han propuesto otras hipótesis que no han sido del todo confirmadas experimentalmente:

1. Utilización de ciertos productos elaborados en la proximidad de las raicillas vegetales, en lo que habitualmente se llama la rizosfera.

2. Simbiosis con las algas.

METABOLISMO NITROGENADO

El problema del metabolismo nitrogenado de los Azotobacter debe ser considerado desde tres puntos de vista diferentes:

Acción de las sustancias nitrogenadas sobre los "Azotobacter".-

Según se trate de cultivos puros o de la flora total, las sustancias nitrogenadas tendrán acciones bien diferentes; en el primer caso se asiste a una modificación del metabolismo celular, en el segundo es el equilibrio de la flora el que se encuentra profundamente perturbado.

SUBSTANCIAS NITROGENADAS Y "AZOTOBACTER" EN CULTIVOS PUROS.- La adición de nitrógeno asimilable, en forma de nitratos o sales amoniacales, a un medio líquido o sólido, conteniendo una sustancia carbonada energética, lejos de inhibir

el cultivo de una cepa pura de Azotobacter, más bien lo favorece; pero, no hay fijación del nitrógeno molecular.

SUBSTANCIAS NITROGENADAS Y "AZOTOBACTER" EN EL SENO DE LA FLORA TOTAL.- Mientras que el solo enriquecimiento en carbono de una tierra pobre en nitrógeno trae una proliferación abundante y casi exclusiva de Azotobacter, el enriquecimiento simultáneo en carbono y en nitrógeno asimilable, permite la pululación de los heterótrofos no fijadores (Hongos y Bacterias) y de manera alguna la de los Azotobacter.

Mecanismo celular de la fijación del nitrógeno.-

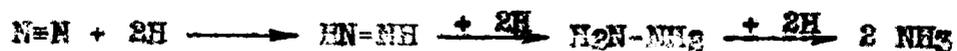
Dos grandes teorías se enfrentan, aportando cada una de ellas argumentos de peso, pero no ha sido posible conciliarlas totalmente.

Según Winogradsky, el término intermediario de la fijación sería el amoníaco, mientras que Virtanen opina que sería la hidroxilamina.

El desarrollo de amoníaco es indudable, pero, mientras que Winogradsky lo considera como el primer tiempo de la fijación, Virtanen lo interpreta como un fenómeno de desaminación.

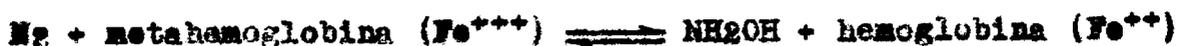
La HIPOTESIS DE WINOGRADSKY (1930, 1932) se apoya en que la cantidad de amoníaco desarrollada es muy superior a la del nitrógeno fijado definitivamente bajo forma orgánica y no puede, en consecuencia, provenir de la desaminación de éste; además, este desarrollo persiste después de la muerte de las células. Es necesario, pues, admitir en la célula azotobacteriana, un sistema enzimático "azohidrasa", catalizando la sintesis amoniacal; este sistema es deshidrogenante y la acción de deshidrogenación se ejerce sobre el alimento, hasta su con

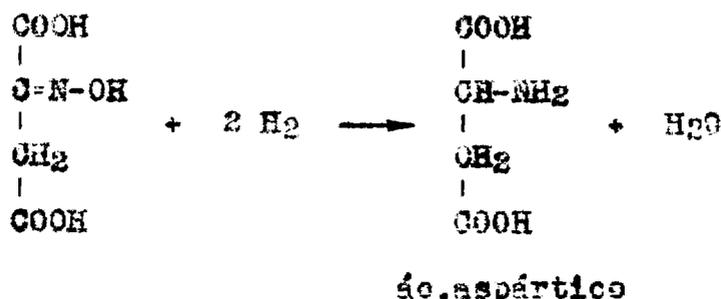
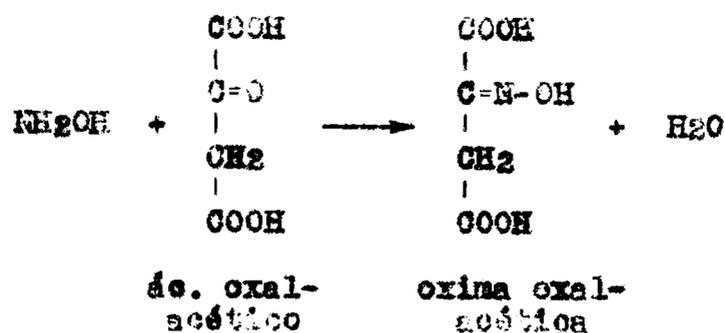
sumo total, después sobre la materia celular misma; el aceptor de hidrógeno es el nitrógeno molecular.



La HIPÓTESIS DE VIRTANEN (1936) se apoya sobre hechos y sobre una interpretación semejante a la emitida para la fijación simbiótica en las Leguminosas. En el medio de cultivo de algunas cepas de *Azotobacter vinelandii* se encontraron trazas de hidroxilamina y se ha podido evidenciar la formación de oxima de la hidroxilamina. Si se hace pasar sobre un cultivo adulto de *Azotobacter* una corriente del isótopo 15 del nitrógeno (Burris), se observa que el nitrógeno 15 es fijado en mayor parte sobre el ácido glutámico y necesariamente sobre el ácido aspártico, mientras que las sustancias nitrogenadas solubles excretadas en el medio de cultivo (y en particular el amoníaco), son extremadamente pobres. En consecuencia, es probable que estos últimos son productos de excreción provenientes de la autólisis.

Virtanen y Laine, estudiando la fijación del nitrógeno por gérmenes simbióticos (Leguminosas y *Rhizobium*), hallaron en los nódulos de las raíces metahemoglobina y creen que en ellos existe un equilibrio entre la hemoglobina y la metahemoglobina; y, como coronación de sus experiencias sobre la excreción de productos nitrogenados por las Leguminosas, han formulado la hipótesis que se sintetiza por las siguientes ecuaciones, donde relacionan la fijación del nitrógeno con los cambios de valencia de la hemoglobina:

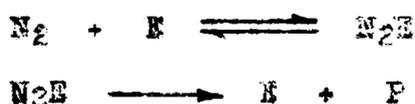




Según ellos, la hidroxilamina, no se produciría directamente del nitrógeno molecular, sino luego de una serie de fases intermedias.

Por otra parte, las experiencias realizadas por Kostytshew y Scheloumowa (1931) permiten afirmar también que el proceso inicial en la fijación del nitrógeno por el Azotobacter, es la formación de amoníaco.

Burk (1934) ha establecido una hipótesis para representar la fijación del nitrógeno por el Azotobacter, a cuyo sistema total que determina esa fijación denomina "Azotasa".



donde E representa la enzima específica (nitrogenasa), la que se combina con el nitrógeno molecular formando el complejo ENZIMA-SUBSTRATO N₂E, siendo ésta una reacción reversible. En una segunda fase, este complejo se descompone, esta vez, irre-

versiblemente en E (nitrogenasa) y los productos P correspondientes a un aumento de células de Azotobacter.

Constitución del cuerpo celular y estado químico del nitrógeno fijado.-

Los cuerpos microbianos contienen alrededor de 10 % de nitrógeno total y 8.6 % de cenizas, de las cuales, el 60 % corresponde al ácido fosfórico.

El nitrógeno excretado soluble, que pasa al medio de cultivo, corresponde de 10 a 25 % del nitrógeno fijado. Este nitrógeno soluble es complejo: los 2/3 son precipitables por el acetato de plomo, 1/2 por el ácido fosfotúngstico, 1/3 por el sulfato de aluminio y menos de 1/5 por el ácido tricloroacético; un poco más de 1/2 es dializable a través del celofán.

Además de la fracción nitrogenada se encuentra una fracción glucídica, en parte soluble y que pasa al medio, mal conocida, no es reductora y, después de hidrólisis, da un azúcar fermentescible dextrógiro.

INFLUENCIA DE LOS FACTORES FISICOS Y QUIMICOS

ACCION DE LA TEMPERATURA

La temperatura óptima corresponde a 28°C, siendo sus límites de 9 a 33°C. Las células y quistes mueren por un calentamiento de 30 minutos a 45-50°C.

ACCION DEL pH

Los *Azotobacter* trabajan en suelos neutros o ligeramente alcalinos. En cultivos puros (Fred y Davenport, 1918), su desarrollo se efectúa entre los pH 6.5 y 8.6. En el laboratorio, los límites de tolerancia varían ligeramente según las especies y asimismo las cepas:

ESPECIE	pH OPTIMO	pH LIMITE INFERIOR
<i>Azotobacter chroococcum</i>	7.4 - 7.6	5.8
<i>Azotobacter beijerincki</i>	7.7 - 7.8	5.8
<i>Azotobacter vinelandii</i>	7.5 - 7.7	5.9
<i>Azotobacter indicum</i>	-	3.0

ACCION DEL pH.-

Excluyendo los fenómenos de interreacciones bacterianas, el pH es función, en el suelo, del grado de humedad de éste.

ACCION DE LOS ELEMENTOS MINERALES

Son cuatro elementos, calcio, fósforo, potasio, magnesio, quienes tienen una acción considerable sobre el desarrollo de los *Azotobacter* y sobre la tasa de fijación. La sensibilidad de estos microorganismos frente a estos cuerpos es tal que se ha podido fundar sobre ella, un método de dosaje biológico en el suelo, en vista de las mejoras que aporta.

El calcio obra directamente sobre el metabolismo (rol catalítico); obra igualmente por la neutralización de los ácidos y el mantenimiento del suelo a un pH vecino de la neutralidad (rol tampon).

El fósforo es útil sobre todo bajo la forma de di o trifosfato alcalino (rol tampon y catalítico); existe una relación entre el fósforo presente, el fósforo consumido, el nitrógeno fijado y la proliferación; en condiciones normales se fijan 5 a 5.7 mg de nitrógeno por cada miligramo de fósforo consumido.

La adición del potasio está ligada a la de los cuerpos precedentes; para 1 gramo de azúcar consumido es necesario 0.38 mg de potasio, y casi otro tanto de calcio y magnesio.

El azufre es indispensable y tiene una acción compleja, sobre todo bajo forma de sulfato.

El hierro tiene una acción catalítica muy favorable y, con el ácido silíceico, sería el responsable de la acción estimulante de los extractos acuosos de tierra en los medios de cultivo; en el suelo, obra sobre todo bajo forma coloidal, en compuestos orgánicos.

**MÉTODOS Y TÉCNICAS ENSAYADOS PARA EL AISLAMIENTO
DE GERMENES DEL GRUPO "AZOTOBACTER"**

Desde el descubrimiento de los Azotobacter por Beijerinck en 1901 hasta el mejoramiento de las técnicas, basadas sobre un nuevo principio ecológico, por Winogradsky en 1925, los métodos de aislamiento estaban inspirados en los de la bacteriología corriente.

Los métodos antiguos de cultivo, de aislamiento y de conservación se basan en el siguiente principio: tratándose de gérmenes que utilizan el nitrógeno atmosférico, se realiza el cultivo en un medio líquido, equilibrado desde el punto de vista salino, conteniendo una substancia energética carbonada y excluyendo toda forma de nitrógeno mineral u orgánico. En un medio así, sólo pueden proliferar los fijadores de nitrógeno y mediante una serie de pasajes se puede lograr un enriquecimiento en Azotobacter. Luego, sobre medio solidificado a la gelosa, se trata de aislar colonias a partir de las cuales, mediante frecuentes repiques podrán ser mantenidas y conservadas las cepas, en cultivo puro, durante largo tiempo.

Desde 1926 hasta 1938, Winogradsky analizó las imperfecciones de estos métodos, las que explican las dificultades encontradas y los errores de interpretación cometidos.

La crítica más grave cae sobre la utilización de medios líquidos. Las partículas de tierra que sirven para la siembra caen al fondo del balón, en una zona del líquido que está

mal aireada, donde, al menor desarrollo de anaerobios, saturan el líquido de gas carbónico, haciendo más precaria la proliferación de los aerobios. El cultivo de los Azotobacter comienza, pues, en condiciones poco favorables y, únicamente las formas móviles, a expensas de las otras, son las que ganan la superficie para constituir el velo característico de su proliferación. Y a falta de estas formas móviles, es necesario que la muestra sea particularmente rica en Azotobacter para que se constituya este velo.

Un medio así, es igualmente desfavorable para obtener un enriquecimiento, base de un aislamiento ulterior. En efecto, en el fondo del balón, proliferan los Clostridium, anaerobios muy nocivos a los Azotobacter y, a medida que el nitrógeno orgánico es introducido al medio por el juego mismo de la fijación, los organismos heterótrofos entran en acción y, estas dos proliferaciones, en el curso de los pasajes, pueden llegar a anular el desarrollo de los Azotobacter.

Desde el punto de vista fisiológico, se conoce la extrema variabilidad de un gran número de especies bacterianas, la extrema labilidad de ciertos caracteres en función de las variaciones de constitución del medio o de las condiciones de cultivo. Además, es poco favorable hacer sufrir a un germen un gran número de pasajes antes de estudiar propiedades que pretenden ser las naturales que posee en su medio ambiente habitual. De ahí la enorme importancia que tiene la elección de los alimentos energéticos a utilizar. Los "buenos alimentos" (manitol o azúcares) son quemados por los heterótrofos en presencia de nitrógeno asimilable y los "malos alimentos"

dejados por ellos son los que utilizarán los Azotobacter a l entrar en acción.

Tratar de aislar una cepa en cultivo puro es una loable inquietud para un bacteriólogo, pero una tentación peligrosa para el agrobiólogo: aislada de los gérmenes con los cuales normalmente ocurre en el suelo, una especie puede, en el laboratorio, manifestar propiedades que jamás podría tener en la naturaleza. Es así como un cierto número de especies que han sido aisladas y descritas como fijadoras de nitrógeno, no han sido reencuñadas en el suelo en su forma activa, aún con métodos más adecuados.

En los métodos modernos, los cultivos son realizados sobre medios tan próximos como sean posibles del medio suelo, sea la tierra misma, sea un medio mineral, realizando una aireación perfecta de la zona de proliferación. Dichos medios permiten un "dominio absoluto" rápido de los Azotobacter sobre los otros gérmenes, facilitando así el estudio de los caracteres de las cepas, después de su aislamiento del suelo. Además, permiten dosajes fáciles de nitrógeno y de amoníaco.

De los numerosos métodos descritos, se ensayaron distintos medios líquidos y sólidos.

Para los ensayos en medios líquidos, se prepararon las siguientes soluciones:

MEDIO DE BEIJERINCK

Manitol	20.0 g
H ₂ HPO ₄	0.2 g
H ₂ O corriente	1,000.0 ml

MEDIO DE LIFMAN

Manitol	15.0 g
K ₂ HPO ₄	0.2 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂	0.02 g
FeCl ₃ .6 H ₂ O (10%) ..	1 gota
H ₂ O destilada	1,000.0 ml

MEDIO DE ASHBY

Manitol	20.0 g
K ₂ HPO ₄	0.2 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.2 g
CaSO ₄ .8 H ₂ O	0.1 g
CaCO ₃	5.0 g
H ₂ O destilada	1,000.0 ml

MEDIO DE BORK, MODIFICADO

Manitol	20.0 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
K ₂ HPO ₄	0.8 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0.2 g
CaSO ₄ .8 H ₂ O	0.1 g
Mo, Fe	1.0 ml*
CaCO ₃	20.0 g
H ₂ O destilada	1,000.0 ml

* Solución conteniendo 1 mg Fe y 0.1 mg Mo por mililitro.

MEDIO 77 DE FRED Y WAKSMAN

Manitol	10.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.2 g
MnSO ₄ .4 H ₂ O	trazas
FeCl ₃ .6 H ₂ O	trazas
H ₂ O destilada	1,000.0 ml

MEDIO BASE DE WINOGRADSKY

KH ₂ PO ₄	1.0 g
K ₂ HPO ₄	0.2 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0.6 g
NaCl	trazas
FeCl ₃ .6 H ₂ O	trazas
MnSO ₄ .4 H ₂ O	trazas
Na ₂ MoO ₄	trazas
H ₂ O destilada	1,000.0 ml

Los primeros cinco medios, al manitol, se repartieron en frascos de Erlenmeyer en capas de 2 cm de profundidad y fueron esterilizados en autoclave a 120°C.

El medio de Winogradsky también fué repartido en frascos de Erlenmeyer en capas de 2 cm de profundidad, a los que se agregaron distintas sustancias energéticas (glucosa, manitol, benzoato de sodio) y carbonato de calcio; luego se esterilizaron en autoclave a 120°C.

Preparados los medios, fueron sembrados con un poco d e

tierra e incubados en estufa a 27-28°C.

El comportamiento de los diferentes medios fué muy variable. El medio de Beijerinck (fig.1 M.1) se enturbió ligeramente hacia el segundo día, apareciendo un velo en su superficie que, observado microscópicamente, evidenció estar formado por células de Azotobacter. En cambio, el medio de Winogradsky, con adición de glucosa (fig.1 M.2), mostró netamente la ingerencia de otros gérmenes, pudiendo observarse las burbujas producidas por el gas carbónico desarrollado.

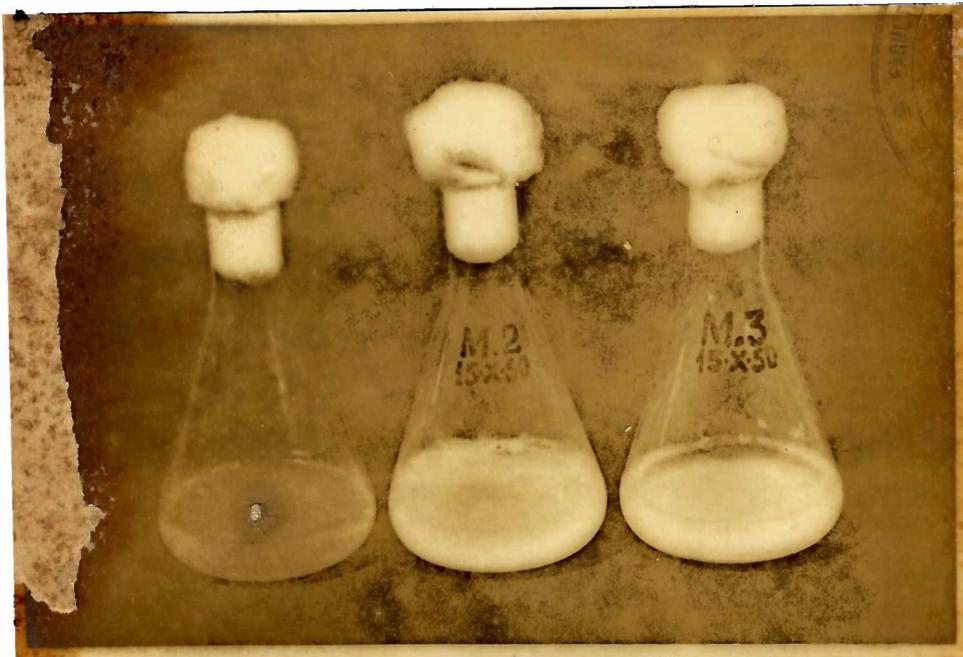


Fig. 1

En todos los casos, se efectuaron varios preparados con los velos formados y la observación microscópica de los mismos, evidenciaron notables diferencias en la morfología de los Azotobacter, como así también en la riqueza de los mismos.

Con los velos formados se realizaron repiques sobre nuevos medios líquidos para obtener un enriquecimiento en Azoto-

baeter y, finalmente, se efectuaron pasajes sobre medios solidificados hasta lograr cultivos puros.

Entre los métodos modernos, fueron ensayadas las técnicas aconsejadas por Winogradsky:

CULTIVO ESPONTANEO EN TIERRA AMOLDADA.

Las muestras de tierra fueron tamizadas y adicionadas de 5 % de almidón, 2 % de manitol y 2 % de glucosa, respectivamente; luego, malaxadas con un poco de agua hasta obtención de masas homogéneas. Hecho esto, se llenaron 3 cajas de Petri de 10 cm de diámetro con las distintas tierras preparadas y se alisaron con un porte húmedo. Dichas cajas fueron colocadas en otras más grandes, conteniendo un poco de agua y recubiertas de su tapa, formando cámara húmeda. El conjunto se llevó a estufa a 28-30°C.

Al tercer día aparecieron, sobre la superficie de las tierras, pequeñas colonias hialinas, formadas casi exclusivamente por células de Azotobacter.

Con las colonias aparecidas se realizaron pasajes sobre placas preparadas en la siguiente forma:

Placa de tierra amoldada, con su correspondiente tapa, enriquecida con 2 % de benzoato de sodio y 0.2 % de fosfato monopotásico y esterilizada a 120°C durante 20 minutos.

La siembra se realizó en estrías en la superficie de la tierra y con las colonias desarrolladas se verificó su pureza

CULTIVO SOBRE PLACAS DE GEL SILICEO

Para la preparación de placas de sílico-gel, se mez

clararon partes iguales de ácido clorhídrico puro (13°Bé) y silicato de sodio (5-8°Bé), vertiendo el silicato sobre el ácido y agitando con cuidado. Esta solución fué distribuida en cajas de Petri en la siguiente forma:

30 ml para cajas de 10 cm de diámetro
200 ml para cajas de 20 cm de diámetro

y se dejaron en reposo durante más de 24 horas hasta que el gel vibró bien bajo el choque. La eliminación del exceso de ácido clorhídrico y del cloruro de sodio formado, se logró por lavado con agua corriente durante tres días, terminando con lavados repetidos con agua destilada hirviente hasta que las últimas aguas de lavado dieron reacción negativa para cloruros.

Este medio, estrictamente mineral, sin sustancias solubles, no es más que un soporte al cual debe agregarse sales y sustancias energéticas convenientes. Para ello se preparó una solución de la siguiente composición (Winogradsky):

KH_2PO_4	0.5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.5 g
NaCl	0.3 g
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	trazas
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	trazas
H_2O destilada	100.0 ml

El pH de esta solución es 4.9-5.0; se lo ajustó a 7.3-7.5 con gotas de solución de hidróxido de potasio.

Para la preparación de las placas de gel silíceo en ca-

Las placas de Petri de 10 cm de diámetro, se vertieron 2 ml de la solución mineral en un pequeño vaso, agregando 0.5 g de manitol (glucosa y benzoato de sodio para otras cajas) y 0.15 g de carbonato de calcio, más dos gotas de hidróxido de potasio al 2 %; se agregó un poco de agua destilada, se hizo hervir unos minutos y se volcó agitando, el líquido hirviendo sobre las placas.

Las placas, sin tapa, se llevaron a estufa a 55°C durante varias horas hasta evaporación de la capa líquida y se interrumpió el secado cuando la superficie del gel tomó un aspecto mate.

Se inocularon las placas con granos de tierra, alineándolos regularmente, sobre la superficie del gel.

Al cabo de 48 horas se evidenciaron colonias de Azotobacter que se presentaban en forma de un mucus acuoso, blanco, englobando los granos de tierra (fig.2).

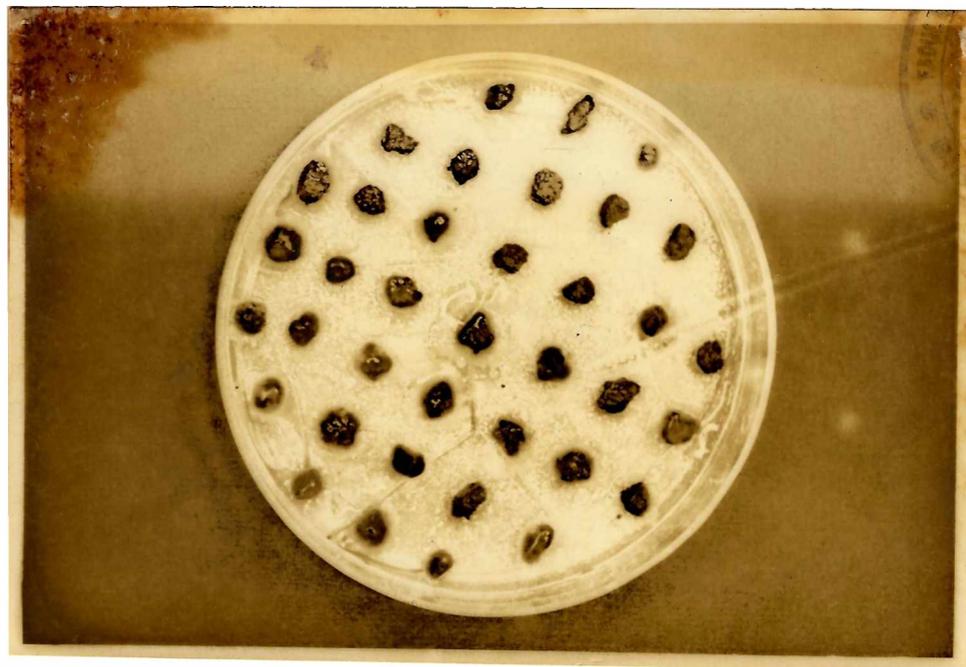


Fig. 2

**ESPECIES DE GERMESES IDENTIFICADOS, PERTENECIENTES
AL GENERO "AZOTOBACTER", EN DISTINTAS
MUESTRAS DE TIERRA DEL PAIS**

Para lograr el aislamiento de gérmenes del grupo "Azotobacter" de las muestras de tierra obtenidas*, se prepararon medios líquidos con la solución base 77 de Fred y Waksman:

K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.8 g
MnSO ₄ .4 H ₂ O	trazas
FeCl ₃ .6 H ₂ O	trazas
H ₂ O destilada	1,000.0 ml

Para cada muestra se destinaron tres frascos de Erlennmeyer (fig.3) conteniendo 25 ml de esta solución salina, a las que se agregaron, 1 ml de solución de manitol al 10 %, 0.5 ml de etanol y 1 ml de solución de benzoato de sodio al 1 %, respectivamente.

Cada medio fué sembrado con 1 ml de suspensión de la muestra

* La mayor parte de las muestras de tierra utilizadas en el presente trabajo fueron cedidas gentilmente por el Lic. RICARDO JULIO GASTALDI, del Instituto de Microbiología Agrícola del Ministerio de Agricultura y Ganadería de la Nación y por el Dr. HECTOR ENRIQUE CAMMARONA, del Instituto Médico Naval del Ministerio de Marina de la Nación.

tra de tierra al 5 %.

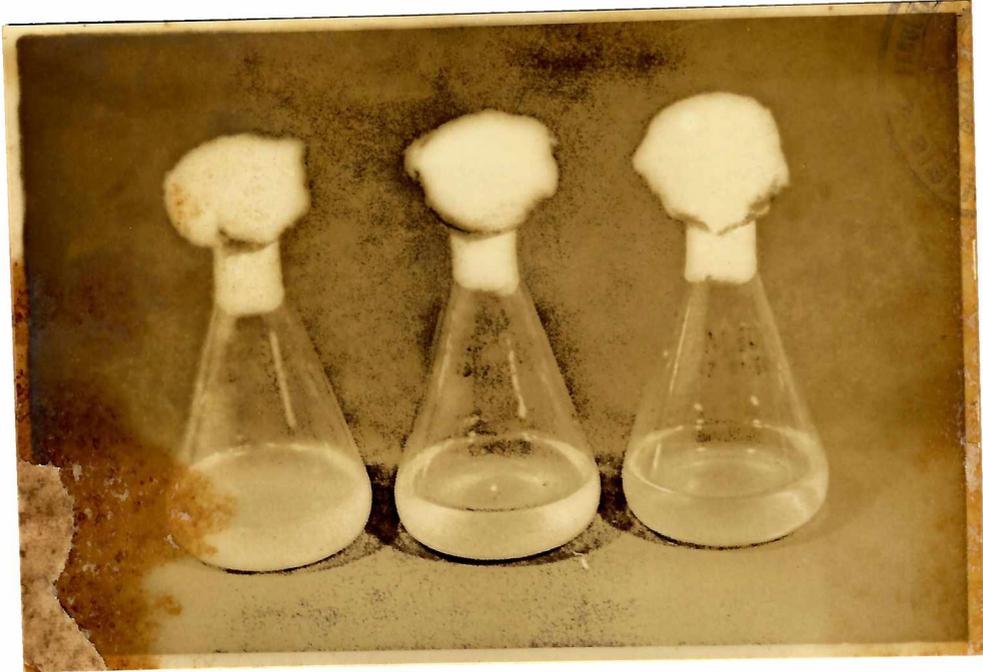


Fig. 3

A partir del segundo día de la siembra se examinó diariamente una gota de los medios hasta comprobar el desarrollo de *Azotobacter* y, logrado éste, se realizaron repiques sobre medios solidificados con 1.3 % de agar, conteniendo la misma fuente carbonada.

Las placas así sembradas fueron incubadas a temperatura ambiente y se examinaron las colonias desarrolladas.

Los aislamientos fueron realizados por pasajes sobre agar inclinado, al manitol, conservándose una cepa de *Azotobacter chroococcum* (fig.4 I-A), y otra de *Azotobacter agilis* (fig.4 II-A).



Fig. 4

El estudio de los caracteres morfológicos y tintoriales de los gérmenes aislados se realizó con las colonias desarrolladas y efectuando preparados que se colorearon con el método de Gram (fig.5), con eritrosina y con Sudan negro B, según el método de Burdon (1946).

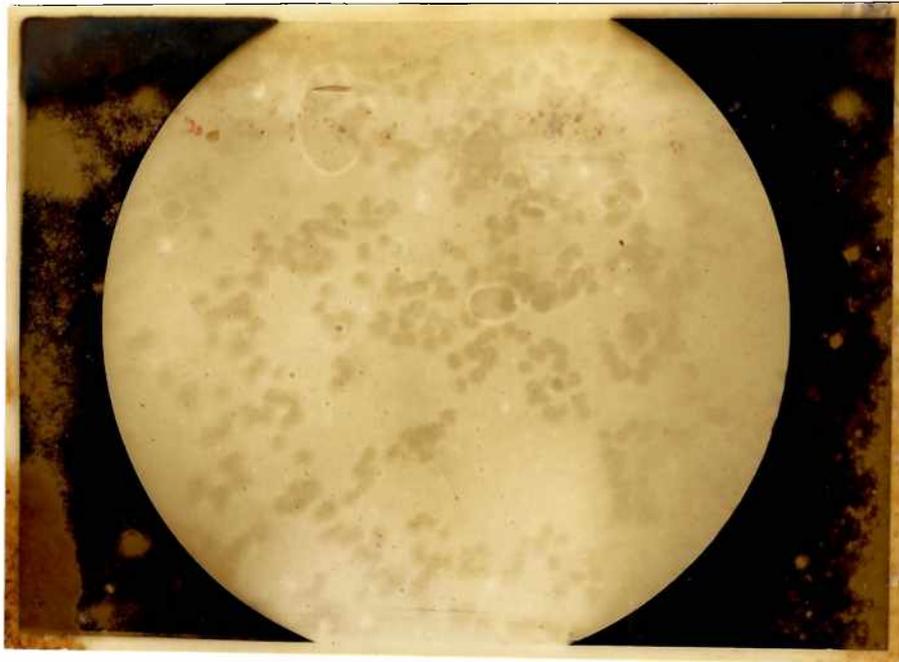


Fig. 5

El estudio de los caracteres fisiológicos distintivos de los microorganismos aislados se realizó por pasajes sobre caldo nutritivo glucosado:

Extracto de carne ..	3.0 g
Peptona	5.0 g
Glucosa	10.0 g
Agua destilada	1,000.0 g

donde desarrolla bien *Azotobacter agilis*, mientras que *Azotobacter chroococcum* no lo hace en este medio peptonado, aún con agregado de glucosa, propiedad que permitió evidenciar en un solo caso estar en presencia de *Azotobacter agilis*.

En ningún caso pudo manifestarse la presencia de *Azotobacter indicum*, por el hecho de no evidenciar en las células,

los glóbulos de grasa característicos de esta especie.

En consecuencia, se vuelve a confirmar que la especie más difundida en nuestros suelos es Azotobacter chroococcum.

A continuación, se enumeran las muestras de tierra examinadas, su procedencia y especie de Azotobacter identificada.

NUMERO DE ORDEN	ORIGEN DE LA MUESTRA DE TIERRA	ESPECIE DE AZOTOBACTER IDENTIFICADA
1	BUENOS AIRES, Capital Federal	A. chroococcum
2	BRAGADO, Buenos Aires	A. chroococcum
3	CHASCOMUS, Buenos Aires	A. chroococcum
4	FLORENCIO VARELA, Buenos Aires	A. chroococcum
5	PEHUAJO, Buenos Aires	A. chroococcum
6	SAN MARTIN, Buenos Aires	A. chroococcum
7	PORTEZUELO, Catamarca	A. chroococcum
8	RECREO, Catamarca	A. chroococcum
9	ALTA GRACIA, Córdoba	A. chroococcum
10	BALNEARIA, Córdoba	A. chroococcum
11	BELL VILLE, Córdoba	A. chroococcum
12	EL CUADRADO, Córdoba	--
13	LA FALDA, Córdoba	--
14	SERREZUELA, Córdoba	A. chroococcum
15	VILLA MARIA, Córdoba	A. chroococcum
16	CORRIENTES, Corrientes	A. chroococcum

NUMERO DE ORDEN	ORIGEN DE LA MUESTRA DE TIERRA	ESPECIE DE AZOTOBACTER IDENTIFICADA
17	GOYA, Corrientes	A. chroococcum
18	ITUZAINGO, Corrientes	A. chroococcum
19	MERCEDES, Corrientes	A. chroococcum
20	PASO DE LOS LIBRES, Corrientes	--
21	SANTO TOME, Corrientes	A. chroococcum
22	CONCORDIA, Entre Rios	--
23	LA PAN, Entre Rios	A. chroococcum
24	PARANA, Entre Rios	A. chroococcum
25	VILLAGUAY, Entre Rios	A. chroococcum
26	PICHI HUINCA, Eva Perón	--
27	CATARATAS DEL IGUAZU, Misiones	A. chroococcum
28	8 DE MAYO, Misiones	--
29	EL DORADO, Misiones	--
30	OBERA, Misiones	--
31	POSADAS, Misiones	A. chroococcum
32	PUERTO IGUAZU, Misiones	--
33	PLAZA HUINCUL, Neuquén	A. chroococcum
34	SAN CARLOS DE BARILOCHE, Rio Negro	--
35	GUANACACHE, San Juan	A. chroococcum
36	CHALANTA, San Luis	A. chroococcum
37	JUNIN, San Luis	A. chroococcum
38	ESPERANZA, Santa Fe	A. chroococcum
39	ROSARIO, Santa Fe	A. agile

NUMERO DE ORDEN	ORIGEN DE LA MUESTRA DE TIERRA	ESPECIE DE AZOTOBACTER IDENTIFICADA
40	SAN CRISTOBAL, Santa Fe	A. chroococcum
41	TOSTADO, Santa Fe	A. chroococcum
42	VENADO TUERTO, Santa Fe	A. chroococcum
43	ANATUYA, Santiago del Estero	A. chroococcum
44	MEDELLIN, Santiago del Estero	A. chroococcum
45	RIO CHICO, Tucumán	A. chroococcum

INFLUENCIA DEL MOLIBDENO Y DEL TUNGSTENO
EN EL PROCESO DE FIJACION AEROBIA DEL
NITROGENO MOLECULAR ATMOSFERICO

En el gran ciclo del nitrógeno en la superficie de la biosfera, la fijación del nitrógeno molecular atmosférico es considerada como el primer eslabón de la cadena de reacciones indispensable para mantener el equilibrio del nitrógeno.

Este proceso de fijación, en condiciones de oxibiosis, es realizado por los Azotobacter, y el poder de fijación de los mismos es función del número de células fijadoras y de su actividad, la cual, a su vez, depende de la influencia de los factores físicos y químicos.

La influencia que los elementos minerales ejercen sobre los Azotobacter, ha sido ampliamente estudiada por numerosos investigadores.

El fósforo aparece como el elemento más importante, contenido en gran cantidad en la célula azotobacteriana (Hoffmann y Hammer, Stoklasa). Papel importante juega también el calcio, indispensable al metabolismo y al equilibrio hidrogeniónico.

Asimismo, son necesarias las sales de magnesio y de potasio, al igual que el azufre, en ausencia del cual no desarrolla, al menos, Azotobacter chroococcum (Greaves y Anderson). También ejercen favorable acción, las sales de hierro, de aluminio, de manganeso y todos los otros elementos que integran

el grupo de los elementos oligodinámicos.

Ultimamente, se ha prestado particular atención al molibdeno, elemento necesario para el desarrollo del *Azotobacter* (Borthels). Krzemieniewski y Kovats consideran que el molibdeno ejerce, efectivamente, una acción activante y sinérgica con el hierro, hecho también corroborado por Burk y colaboradores.

Y considerando estos últimos trabajos, se ha ensayado la influencia que, en el proceso de fijación aerobia del nitrógeno molecular atmosférico, ejercen distintas dosis de molibdeno y de tungsteno.

Con tal propósito se prepararon placas de gel silíceo en cajas de Petri de 20 cm de diámetro.

Como medio nutritivo se utilizaron, para cada placa, 20 ml de una solución constituida por:

K_2HPO_4	0.25 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.15 g
NaCl	0.15 g
$Fe_2(SO_4)_3$	trazas
$MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	trazas
H ₂ O destilada	100.00 ml

a los que se agregaron 0.5 g de carbonato de calcio y 2 g de manitol.

También se prepararon soluciones de molibdato de sodio al 0.21 por mil y de tungstato de sodio al 0.15 por mil, para obtener así, concentraciones de 0.1 mg de molibdeno por mili-

litro y de 0.1 mg de tungsteno por mililitro, respectivamente

Estos dos elementos fueron incorporados a los medios nutritivos de acuerdo al cuadro que se detalla más adelante.

Las placas así preparadas, se inocularon con 1 g de tierra fina homogeneizada y se llevaron a estufa a 30°C durante 10 días. Después de este lapso se procedió a determinar el contenido en nitrógeno de todas las placas.

Otras dos placas preparadas en la misma forma, sin agregado de molibdeno ni de tungsteno, no fueron incubadas y se dosó directamente en ellas, la cantidad de nitrógeno contenido.

Los dosajes de nitrógeno se realizaron según el método de Kjeldahl. Para cada determinación se utilizaron 20 ml de ácido sulfúrico, 3 g de sulfato de cobre y 7 g de sulfato de potasio. El amoníaco destilado se recogió en 20 ml de ácido sulfúrico 0.1 N y el exceso se tituló con hidróxido de sodio 0.1 N, utilizando heliantina como indicador.

Los resultados obtenidos se expresan en el cuadro siguiente, deducción hecha del nitrógeno contenido en la tierra inoculada (9.83 mg de nitrógeno, como promedio de las dos placas testigo analizadas).

NUMERO DE ORDEN	PLACA + SOL. NUTRITIVA + 1 g de TIERRA, CON AGREGADO DE	MILIGRAMOS DE N ₂ FIJADOS		
		1a. determ.	2a. determ.	Promedio
1	--	7.44	8.12	7.78
2	1 ppm Mo	8.82	7.71	8.26
3	10 ppm Mo	10.21	10.75	10.48

NUMERO DE ORDEN	PLACA - SOL. NUTRITIVA - 1 g de TIERRA, CON AGREGADO DE	MILIGRAMOS DE N ₂ FIJADOS		
		1a. determ.	2a. determ.	Prome dio
4	50 ppm Mo	9.68	9.54	9.61
5	100 ppm Mo	9.52	9.67	9.59
6	1 ppm W	7.37	8.32	7.84
7	10 ppm W	8.19	8.07	8.13
8	50 ppm W	8.12	7.81	7.96
9	100 ppm W	8.46	7.98	8.22
10	0.5 ppm Mo - 0.5 ppm W	8.10	8.28	8.19
11	5 ppm Mo - 5 ppm W	9.62	10.21	9.91
12	50 ppm Mo - 50 ppm W	9.74	9.32	9.53

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten deducir las siguientes conclusiones:

1. De los métodos de cultivo y aislamiento ensayados, antiguos y modernos, no se ha observado una deficiencia tan grande como para desear los primeros, pues siguiendo una adecuada técnica, permiten lograr buenos resultados.

2. De las 45 muestras de tierra ensayadas para el aislamiento de especies de Azotobacter, 35 de ellas evidenciaron contener este microorganismo, cuyo estudio morfológico y fisiológico permitió identificar una forma de Azotobacter chroococcum en casi la totalidad de los casos, ya que de una sola muestra logró aislarse a Azotobacter agile. De lo que se deduce que en el 75.55 % de las muestras estudiadas pudo ponerse de manifiesto la presencia de Azotobacter chroococcum y tan sólo en el 2.22 % se logró aislar a Azotobacter agile, mientras que en ningún caso pudo evidenciarse la presencia de Azotobacter indicum.

3. La adición de 10 ppm de molibdeno a la tierra ensayada, permitió el aumento de la fijación de nitrógeno en un 34.70 %. La adición de 5 ppm de molibdeno más 5 ppm de tungsteno a la tierra ensayada, permitió un aumento de 27.37 % de

nitrógeno fijado. De lo que se deduce que la dosis óptima de molibdeno en la tierra sería, aproximadamente, de 10 ppm, pudiendo ser reemplazado en parte por el tungsteno, favoreciendo en esta forma la fijación del nitrógeno molecular atmosférico por los Azotobacter.

RESUMEN

El género *Azotobacter* agrupa varias especies de microorganismos aerobios capaces de fijar el nitrógeno molecular atmosférico.

Beijerinck, en 1901, descubrió la existencia de estos gérmenes, aislándolos de suelos y aguas del canal de Delft.

En el presente trabajo se citan, en breve reseña histórica, los investigadores que han profundizado en este tema describiendo nuevas especies aisladas de distintos suelos, como asimismo, las diversas opiniones vertidas respecto a las especies que merecen ser consideradas.

En el siguiente capítulo se describen distintas especies de *Azotobacter*, su metabolismo carbonado y nitrogenado y las influencias que sobre ellos ejercen los factores físicos y químicos.

A continuación, ilustrando con algunas fotografías, se detallan los métodos y técnicas ensayados para el aislamiento de gérmenes del grupo *Azotobacter*, utilizando medios líquidos y solidificados y también medios naturales y placas de gel síliceo.

En capítulo aparte, se puntualizan, en un cuadro, las especies de *Azotobacter* identificadas en 35 de las 45 muestras de tierra del país examinadas, detallando los medios nutritivos utilizados y el estudio de los caracteres morfológicos, tintoriales y fisiológicos efectuado, citando los métodos de

coloración empleados.

También se ensayaron distintas dosis de molibdeno y de tungsteno, estudiando su influencia en el proceso de fijación aerobia del nitrógeno molecular atmosférico.

Y, por último, se enumeran las conclusiones deducidas de los resultados obtenidos con las experiencias realizadas en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, O.N., 1950. "Experiments in Soil Bacteriology". Burgess Publishing Co., Minnesota.
- BEIJERINCK, M.W., 1901. Cent.f.Bakt., II Abt., t.7, p.561-582
- BEIJERINCK, M.W. y VAN DELDEN, A., 1902. Cent.f.Bakt., II Abt. t.9, p.3.
- BERGEY, D.H., 1934. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 4a.edición. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- BONAZZI, A., 1921. J.Bact., t.6, p.351-369.
- BREED, R.S., MURRAY, E.G.D. y PARKER HITCHENS, A., 1948. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 6a.edición. Bailliere, Tindall & Cox., London.
- BURDON, K. L., 1946. J.Bact., t.52, p.665-678.
- BURK, D., 1930. J.Phys.Chem., t.34, p.1174-1194
- BURK, D., 1934. Ergebnisse der Enzymforschung, t.3, p.23-56.
- BURA, D. y HORNER, K., 1936. Soil Sci., t.41, p.88-122.
- BURRIS, R.H., 1942. J.Biol.Chem., t.143, p.509-517.
- COMMITTEE ON BACTERIOLOGICAL TECHNIC OF THE SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS, "Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria". Biotech Publications. Geneva, New York
- DE' ROSSI, G., 1927. "Microbiologia Agraria e Tecnica". Unione Tipografico-Editrice Torinese, Torino.
- FOGG, G.E., 1947. Endeavour, v.6, N°24, p.172-175.
- FRED, E.B. y DAVENPORT, A., 1918. J.Agric.Res., t.14, p.317.
- FRED, E.B. y WAKSMAN, S.A., 1928. "Laboratory Manual of General Microbiology", la.edición. Mc Graw-Hill Book Company, Inc., New York.
- GAINNEY, F.L., 1918. J.Agric.Res., t.14, p.265.
- GALLEGO Y QUERO, F., 1949. "Bacterios del Suelo". Inst.Forestal de Invest.y Exp.del Minist.de Agricultura, Madrid.

- GREAVES, J.E., 1935. J.Bact., t.30, p.143-148.
- GREENE, 1935. Soil Sei., t.39, p.327.
- KAUFFMANN, J., 1950. Ann.Inst.Pasteur, t.78, p.670-674.
- KLUYVER, A.J. y VAN DEN BOUT, M.T., 1936. Arch.f.Mikrobiol., t.7, p.261.
- KLUYVER, A.J. y VAN REENEN, W.J., 1933. Arch.f.Mikrobiol., t.4, p.280-300.
- KOSTYTSCHEN, S. y SCHELOUMOWA, A., 1931. Ztschr.f.Phys.Chem., Bd.198, p.105.
- LIPMAN, J.G., 1903. New Jersey Agr.Exp.Sta.Rept., t.24, p.217-285.
- LIPMAN, J.G., 1904. New Jersey Agr.Exp.Sta.Rept., t.25, p.237-289.
- LIPMAN, J.G., 1909. Science, t.29, p.941.
- LIPMAN, C.B. y BURGESS, P.S., 1915. Cent.f.Bakt., II Abt., t.44, p.504.
- LÖHNIS, E. y SMITH, N.R., 1923. J.Agric.Res., t.23, p.401.
- LÖHNIS, E. y WESTERMANN, T., 1909. Cent.f.Bakt., II Abt., t.22, p.234-254.
- MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 1929. "A System of Bacteriology in relation to Medicine", v.3, p.103-104. Majesty's Stationery Office, London.
- OMELIANSKY, W.L. y SSEWEROWA, O.P., 1911. Cent.f.Bakt., II Abt t.22, p.643.
- POCHON, J. y TCHAN, Y.T., 1948. "Précis de Microbiologie du Sol". Masson et Cie., éditeurs. Paris.
- SMITH, N.R., 1935. J.Bact., t.30, p.323-328.
- SORIANO, S., 1941. Rev.Inst.Bact.(D.N.H.), t.10, N°2, p.55.
- SORIANO, S., 1949. "Apuntes de Microbiología Agrícola". Centro de Estudiantes de Agronomía, Buenos Aires.
- STARKBY, R.L. y DE, P.R., 1939. Soil Sei., t.47, p.329-343.
- VERONA, O., 1947. "Elementi di Microbiologia Pedologica". L. Macri Editore, Firenze.
- VIRTANEN, A., 1936. Report of Proc.Second Int.Congr.of Microbiology, p.268-271.

- VIRTANEN, A. y VON HAUSEN, S., 1935. J.Agr.Science, t.25, p. 278-289.
- WILSON, P.W. y KNIGHT, S.G., 1949. "Experiments in Bacterial Physiology". Burgess Publishing Co., Minnesota.
- WINOGRADSKY, S., 1893. Comp.Rend.Acad.Sci., t.116, p.1385-1388.
- WINOGRADSKY, S., 1894. Comp.Rend.Acad.Sci., t.118, p.353-355.
- WINOGRADSKY, S., 1895. Arch.Sc.Biol., t.3, p.298-352.
- WINOGRADSKY, S., 1902. Cent.f.Bakt., II Abt., t.9, p.43-54.
- WINOGRADSKY, S., 1925. Compt.Rend.Acad.Sci., t.189.
- WINOGRADSKY, S., 1925. Ann.Inst.Pasteur, t.39, p.399-354.
- WINOGRADSKY, S., 1926. Compt.Rend.Acad.Sci., t.182.
- WINOGRADSKY, S., 1926. Ann.Inst.Pasteur, t.40, p.455-520.
- WINOGRADSKY, S., 1928. Ann.Inst.Pasteur, t.42, p.36.
- WINOGRADSKY, S., 1930. Compt.Rend.Acad.Sci., t.190, p.661-665
- WINOGRADSKY, S., 1930. C.R.Acad.Agronomique, t.16.
- WINOGRADSKY, S., 1932. Ann.Inst.Pasteur, t.48, p.269.
- WINOGRADSKY, S., 1936. Compt.Rend.Acad.Sci., t.203, p.10.
- WINOGRADSKY, S., 1937. Soil Sci., t.43, p.327-349.
- WINOGRADSKY, S., 1938. Cent.f.Bakt., II Abt., t.97, p.399-413
- WINOGRADSKY, S., 1938. Ann.Inst.Pasteur, t.60, p.351-400.
- WINOGRADSKY, S., 1939. Compt.Rend.Acad.Sci., t.209, p.616.

Anna! Skujsh