

PRESENCIA DE AZOTOBACTER CHROOCOCCUM EN SUELOS DE RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Presence of *Azotobacter chroococcum* in soils of Rio Grande do Sul, Brazil

Manuel J. Amor Asunción (*)

RESUMEN

En 4 muestras de suelos de Rio Grande do Sul se efectuó la determinación cuantitativa de *Azotobacter*, en cajas de sílica-gel, utilizando varios métodos, pero no se consiguió desarrollo del germen.

En cambio se obtuvo desarrollo, con los mismos métodos de análisis microbiológicos, cuando se realizó previamente un cultivo de enriquecimiento con las muestras de tierra.

Se discuten los resultados y se dan las conclusiones.

SUMMARY

In four soil samples of Rio Grande do Sul quantitative *Azotobacter* determinations were made in Petri dishes with silica-gel, utilizing various methods but germ development was not obtained.

Germ development was obtained with the same methods of microbiological analysis, when a previous enrichment culture was applied to the soil samples.

A discussion of the results and the conclusions are given.

INTRODUÇÃO

Habiendo sido designado por la enseñanza de la materia Microbiología del Suelo, por la Universidad Federal de Santa Maria, en el Curso de Pos Graduación de Biodinámica y Productividad del Suelo tuve ocasión de recolectar varias muestras de tierras de diversos lugares del Estado de Rio Grande do Sul que se necesitaban para la enseñanza correspondiente a la determinación cuantitativa de *Azotobacter* en suelos y al aislamiento de esa especie.

Los estudios previos revelaron que con los métodos clásicos de WINOGRADSKY (6) no era posible obtener el desarrollo, en medio sólido de sílica-gel, del germen buscado, aun sembrando cantidades relativamente elevadas de tierra, como por ejemplo 200 mg por caja.

No obstante, en un ensayo efectuado sobre determinación de deficiencias minerales en el suelo empleando el conocido método de la tierra empastada de WINOGRADSKY (5), en una sola muestra de tierra y únicamente en la placa a la que se le había agregado fósforo y calcio, se logro obtener el desarrollo de dos pequeñas colonias de *Azotobacter chroococcum*.

(*) Professor Adjunto de Microbiologia Geral y del Suelo en la Facultad de Agronomía y Veterinária de la Universidad de Buenos Aires; Professor Visitante no Curso de Pós-Graduação em Biodinâmica e Produtividade do Solo da Universidade Federal de Santa Maria.

Estos resultados indicaban que el *A. chroococcum* se hallaba por lo menos en un suelo, lo que indujo a efectuar un cultivo de enriquecimiento de 4 muestras de tierras, antes de proceder al aislamiento del germen en cuestión.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de suelos utilizadas

Cuadro n.º 1

N.º de la muestra	Procedencia	Características
1	Camobi (U.F.S.M.)	Suelo al lado de um estercolero (estiércol vacuno)
2	Camobi (U.F.S.M.)	Suelo con estiércol de gallina
3	Julio de Castilhos	Quinta
4	Faxinal do Soturno	Cultivo de trigo

Se trata de suelos de reacción ácida y pobres en bases.

CULTIVO DE ENRIQUECIMIENTO

El cultivo de enriquecimiento se realizó por incubado de la tierra según el método de SORIANO et alii (4). El modus operandi fue el siguiente: a 100 g. de tierra secada al aire tamizada por tamiz con agujeros de 1 mm de diámetro, se agregó 5 g. de almidón soluble de maíz, 2 g. de carbonato de calcio en polvo y una solución de sales minerales en un volumen equivalente al 100% de la capacidad de retención de agua del respectivo suelo. Luego se mezclaron perfectamente todas las sustancias.

Se hizo un duplicado de cada incubado, pero con una cantidad de solución mineral mayor que al volumen anterior se le agregó otro fijo de 10 ml para tener en este caso un grado anaerobiosis más elevado.

La composición de la solución mineral se indica a continuación:

PO ₄ H ₂ K	5g
SO ₄ Mg, 7H ₂ O	2,5 g
Cl Na	2,5 g
Fedta ** (2mg Fe/ml)	5 ml
Solución de sales menores	5 ml
Agua destilada — hasta	1.000 ml

(**) El Fedta se preparó quelatando sulfato ferroso con ácido etilendiaminotetracético (sal disódica).

La constitución de la solución de sales menores se indica a continuación:

SO ₄ Li	0,01 g
SO ₄ Cu. 5H ₂ O	0,02 g
BO ₃ H ₃	0,22 g
Cl ₂ Sn. H ₂ O	0,11 g
Cl ₂ Zn	0,02 g
Cl ₂ Mn. 4H ₂ O	0,14 g
Cl ₂ Ni	0,02 g
SO ₄ Co. 7H ₂ O	0,02 g
IK	0,01 g
BrK	0,01 g
MoO ₄ Na ₂ . 2H ₂ O	0,01 g
Agua destilada a	360 ml

La solución mineral se ajustó a pH7 con hidróxido de potasio 0,1N y se empleó en el tratamiento del incubado de los suelos en una dilución 15 veces menor efectuada con agua destilada.

El suelo tratado fué colocado en Erlenmeyers de 250 ml cubiertos con un papel de estaño. Diariamente se reponía la pérdida de agua.

Las muestras incubadas 7 días a 28°C y después se hicieron las determinaciones microbiológicas.

DETERMINACIONES EFECTUADAS

a) Con muestras de suelos sin incubar.

Determinación cuantitativa de *Azotobacter* por el método de WINODRASKY (6) empleando cajas de silica-gel con dos formas de siembra una sembrando 50 granitos de tierra de 2 mm de diámetro aproximadamente por caja y la otra sembrando 200 mg de tierra tamizada por caja.

Determinación cuantitativa de *Azotobacter* por el método de AMOR ASUNCIÓN (1) modificado por SORIANO (3) con el objeto de uniformar el método de la capa delgada ("capita") de silica-gel para diversos grupos funcionales de microorganismos del suelo. En este caso se sembró suspensión de suelo dispersado, según MOLINA y SPAINI (2) a razón de 25 mg por caja.

b) Con muestras de suelos incubados.

Se efectuaron las mismas determinaciones del punto a).

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y se promediaron los resultados.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos figuran en los cuadros n.ºs 2 y 3.

Cuadro n.º 2 — Determinación cuantitativa de *Azotobacter* suelos sin incubar

Muestra de suelo n.º	Método Winogradsky % de granos positivos	n.º p/grama	Método A. Asunción — Soriano N.º por grama
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0

Cuadro n.º 3

Determinación cuantitativa de *Azotobacter* suelos incubados

Muestra de suelo n.º	Volumen de solución mineral agregada en el incubado	Método Winogradsky n.º por gramo	Método A. Asunción — Soriano n.º por gramo
1	100% de la retención	2.000 (+)	15.000 (+)
1	Iden — 10 ml	2.000 (+)	15.000 (+)
2	100% de la retención	340	15.000 (+)
2	Iden — 10 ml	260	15.000 (+)
3	100% de la retención	120	820
3	Iden — 10 ml	80	560
4	100% de la retención	440	15.000 (+)
4	Iden — 10 ml	270	15.000 (+)

(+) Las colonias, confluentes, cubrían toda la superficie de la caja y por esa razón no pudo contarse con exactitud.

DISCUSION

Los resultados obtenidos (Cuadro 2 y 3) demuestran que el cultivo de enriquecimiento efectuado produjo, en todos los casos, el desarrollo de *A. chroococcum* que luego fué revelado perfectamente por sembra directa, en cajas de silica-gel, de las tierras incubadas.

Por consiguiente el cultivo de enriquecimiento usado puede ser de utilidad para determinar la presencia de *Azotobacter* en suelos de Rio Grande do Sul, cuando fracasen los análisis microbiológicos efectuados sin previo enriquecimiento.

Por otra parte, los resultados obtenidos indican que los suelos analizados tienen una cantidad de *Azotobacter* muy baja, por lo que sería conveniente determinar que factores, en estos suelos, son los responsables de es escaso contenido.

CONSIDERACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se establecen las siguientes consideraciones:

1.º En los suelos de Rio Grande del Sur examinados existe una cantidad de *Azotobacter* muy baja que no es revelable por los métodos comunes de determinación cuantitativa empleando cajas de silicagel.

2.º Es posible obtener el desarrollo de *Azotobacter chroococcum* con los citados métodos comunes, si previamente se realiza con las muestras de suelo un cultivo de enriquecimiento apropiado.

3.º Si lo establecido en los puntos 1.º y 2.º se confirmara en general para los suelos de Rio Grande do Sul, se cree conveniente investigar cuales son los factores responsables del pobre desarrollo del *Azotobacter* en los mismos, lo que daría la posibilidad de hallar, para estos suelos, métodos adecuados de manejo cuyo fin sería aumentar en ellos el poder fijador de nitrógeno atmosférico y lograr así una mayor producción agropecuaria.

COLABORACIÓN

Se deja constancia de la colaboración prestada por la Ing. Agr. MARTA CUSATO, Ayudante 1.º de la Catedra Microbiología General y del Suelo de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires, que colabora en la enseñanza de la Microbiología del Suelo, en la Universidad Federal de Santa Maria (RS) Brasil en el Curso de Biodinámica y Productividad del Suelo.

AGRADECIMENTOS

Se agradece la ayuda prestada por los alumnos del Curso de Post-Graduación en Biodinámica y Productividad del Suelo de la Universidad Federal de Santa Maria, quienes realizaron parte de los análisis microbiológicos.

BIBLOGRADIA CITADA

- 1 — AMOR ASUNCIÓN, M. J. — Determinación de *Azotobacter* en cajas de silicogel sin secado, *Ciencia y Investigación*, 21: 368-370, 1965.

- 2 — MOLINA, J. S. y SPAINI, L. S. — Aplicación del método de dispersión de Bouyoucos al cálculo de las bacterias del suelo. **Rev. Arg. de Agron.**, 13: 181-190, 1946.
- 3 — SORIANO, S. — Método para la determinación cuantitativa de microorganismos del suelo — Actas. Ier. Coloquio Latinoamericano de Biología del Suelo (Bahia Blanca). Centro Coop. Cient. UNESCO para América Latina, I Monografías: 641-650, Montevideo, 1966.
- 4 — SORIANO, S., AMOR ASUNCIÓN, M. J. y DELLEPIANE, E. — Diagnóstico de deficiencias de nutrientes en el suelo por um método microbiológico. **Rev. Fac. de Agr. y Veterinaria**, 18: 65-68, 1970.
- 5 — WINOGRADSKY, S. — Sur la application agronomique d'une éprouve microbiologique, **C.A.Ac. Sciences**, 161, 1928.
- 6 — ——— — Analyse microbiologique du sol. Principes d'une nouvelle méthode, **Ann. Inst. Pasteur**, 48, 1932.

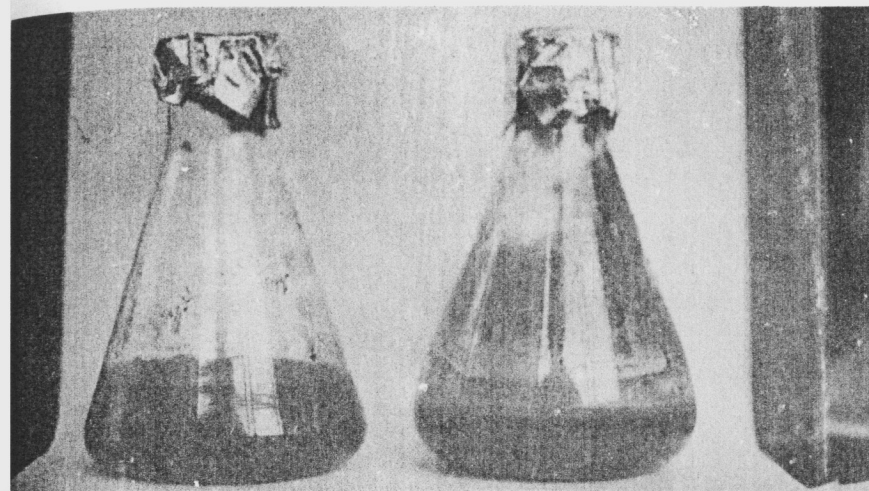


Fig. n.º 1 — Frascos Erlenmeyers com solos incubados para enriquecê-los em *Azotobacter chroococcum*.

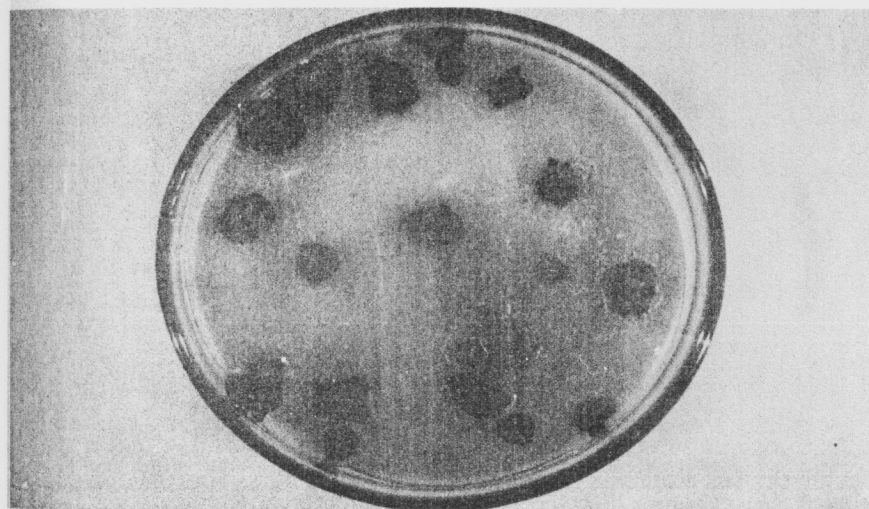
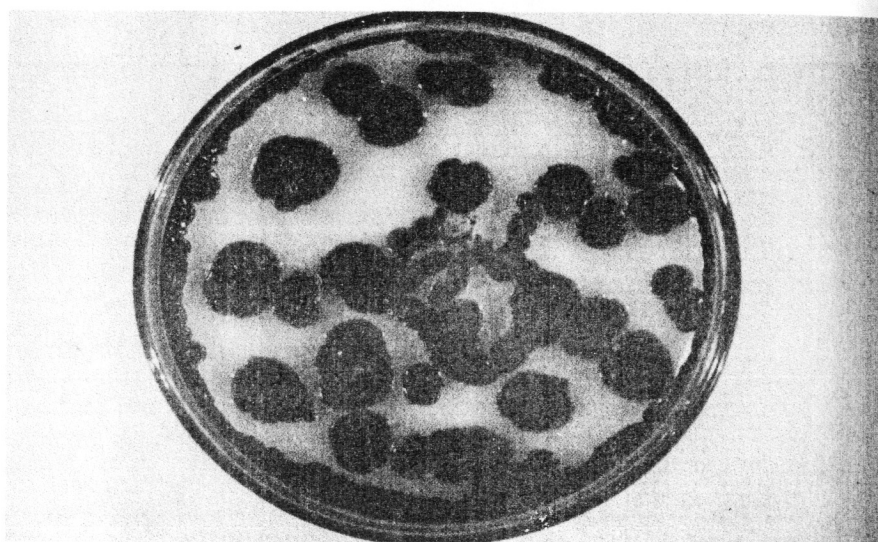
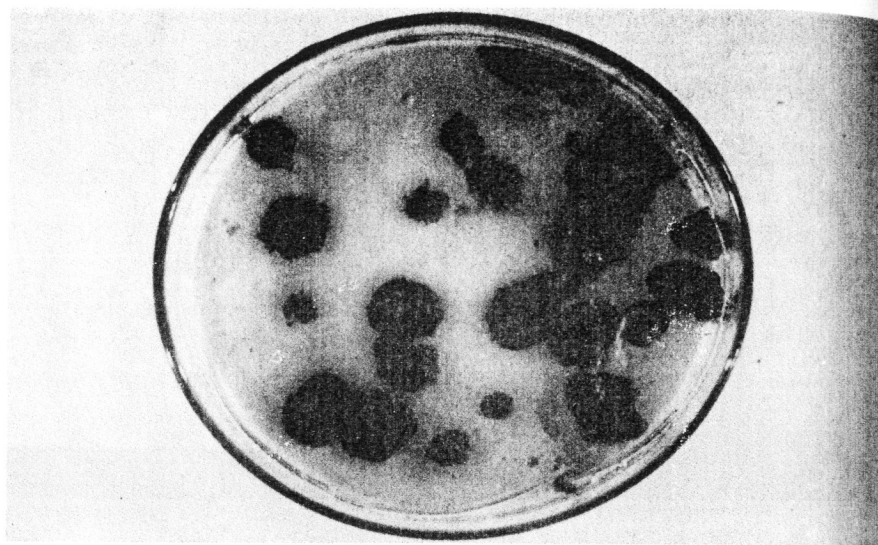
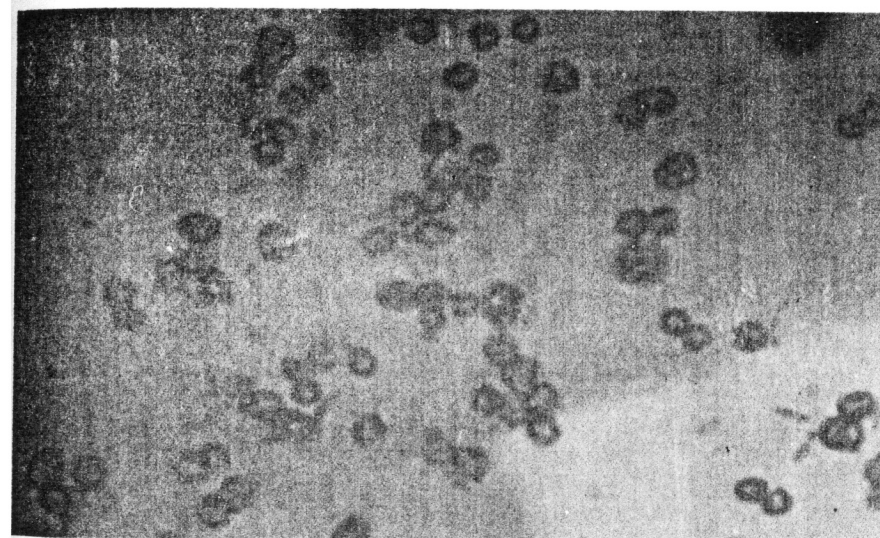
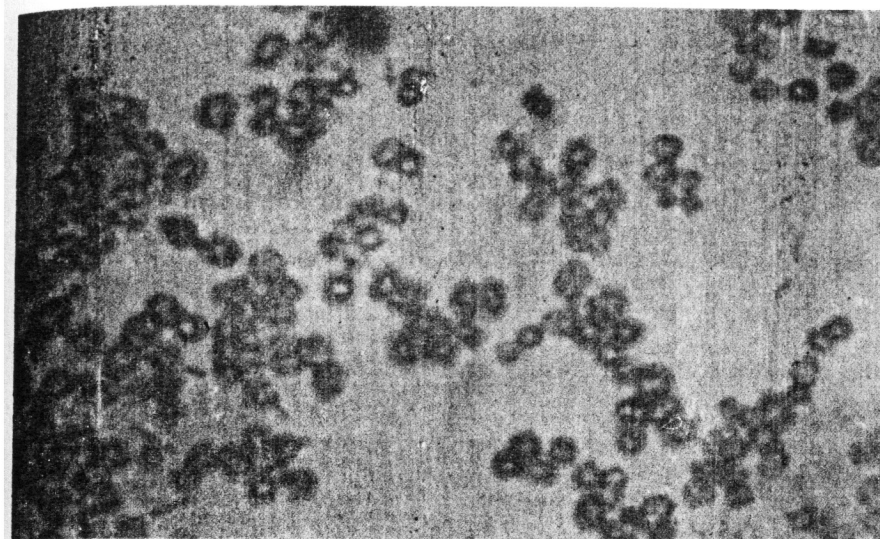


Fig. n.º 2 — Colônias de *Azotobacter chroococcum* desenvolvidas em placas de sílica-gel (Método WINOGRADSKY). Semeadura: solo incubado.



Figs. n.ºs 3 e 4 — Colônias de *Azotobacter chroococcum* desenvolvidas em placas de sílica-gel (Método de camada delgada de A. ASUNCIÓN — SORIANO). Semeadura; suspensão de solo incubado.



Figs. n.ºs. 5 e 6 — Culturas impuras de *Azotobacter chroococcum* provenientes de colônias desenvolvidas em placas de sílicagel. (1000 x) Coloração: eritrosina fenicada.