

NUTRIENTES EN EL SUELO

Análisis y perspectivas mediante el AZOTOBACTER *

Federico Emiliani
Cátedra de Microbiología
EAVE, Univ. Nac. Litoral
Rdo. P. L. Kreder 2805
3080 Esperanza (Sta. Fe)
Argentina

RESUMEN

El autor recomienda experimentar un método bacteriológico para estimar la presencia, abundancia y distribución de algunos nutrientes en el suelo. Sugiere probarlo en gran escala, en diversas situaciones ecológicas y en los diferentes niveles de experimentación (laboratoristas, extensionistas, productores y estudiantes) para luego poder extraer conclusiones referentes a su validez y saber a qué nivel aconsejarlo como práctica habitual.

Esta propuesta surge a raíz de que, si bien es un método conocido desde hace más de 50 años, aún no se le han estudiado todas las posibilidades con la amplitud y meticulosidad debida en los suelos de nuestro país. Los resultados obtenidos hasta ahora en diversas partes del mundo son contradictorios; esto se lo atribuye principalmente a la carencia de un método normalizado y a la falta de una delimitación ecológica de sus posibilidades.

Para que tal recomendación pueda llevarse a la práctica, el autor detalla una técnica de laboratorio, señalando variantes propuestas por diversos autores (que se deberán confrontar entre sí), como así también una serie de sugerencias para adaptar esa técnica a las condiciones de campo (cuya correspondencia con la anterior también se deberá demostrar). Asimismo, incluye técnicas y bibliografía sobre muestreo para facilitar su conocimiento, para los que no son especialistas en el tema.

Esencialmente, esta monografía posibilita la amplia difusión de tales ensayos bacteriológicos (en los diferentes niveles de capacitación) consistiendo, en ésto su objetivo.

* Monografía presentada en la Reunión de Comunicaciones de Divulgación Científica de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral, el 29 octubre 1977.

SUMMARY

Nutrients in soil: Analysis and perspectives by Azotobacter

The author recommends to experiment with a bacteriologic method to estimate the presence, abundance, and distribution of some soil nutrients. The method should be tested in large scale applications, in diverse ecologic situations and in different levels of experimentation (by laboratories, extension specialists, farmers and students) thus obtaining conclusions regarding its validity as a widespread practice.

Although the method has been known for more than 50 years, several applications must be explored for Argentine soils. The results obtained in diverse parts of the world are contradictory. This has been attributed to the lack of a standardized methodology and the absence of known ecologic limits.

To implement the method, the author describes a laboratory technique, analysing several variations proposed by other authors, as well as a series of modifications to adapt the technique to field conditions. Further, he includes the techniques and references on sampling to ease the subject for the nonspecialists.

The monograph seeks the wide distribution of these bacteria essays among readers with varying degree of expertise in microbiology.

INTRODUCCION

Es muy difícil, por no decir imposible, determinar con plena seguridad los nutrientes en el suelo en relación con las necesidades de los cultivos. Sin embargo, es posible una aproximación a ello y desde que J. Liebig, en 1840, definió su teoría sobre la nutrición mineral, los investigadores han concedido mucha importancia a la elaboración o modificación de técnicas para estimar las deficiencias o carencias que puede presentar el terreno en relación con lo antedicho.

Surgieron así variados métodos de análisis del suelo (químicos y biológicos - ensayos en macetas), análisis químico de vegetales (generalmente las hojas y recomendados especialmente para frutales - 4), inyecciones y pulverizaciones en la planta (también para frutales - 47), diagnóstico visual (síntomas externos con que las plantas manifiestan deficiencias o carencias) y las experiencias a campo (iniciadas también durante el siglo pasado en la renombrada Estación Experimental de Rothamsted). A este conjunto de métodos se incorporaron, desde hace más de 50 años, los métodos microbiológicos.

Actualmente se reconoce (35, 38, 47) que el diagnóstico más seguro se obtiene con la combinación de un grupo de métodos, seleccionados según el problema particular que se plantea. A pesar de la conclusión recién apuntada, aún para muchos técnicos los ensayos con especies vegetales en el campo parecen ser las pruebas más aceptables para medir la dotación de nutrientes en el suelo: todas las otras pruebas deben ser comparadas o correlacionadas con esos ensayos. Sin embargo (75), el ensayo con vegetales en el campo no es una medida constante o reproducible ni, necesariamente, una medida intrínseca del contenido de nutrientes en el suelo. Los resultados varían según las estaciones, según las plantas y pueden ser modificados por otros factores además de la disponibilidad de nutrientes. En cambio, los ensayos con microorganismos llevados a cabo bajo condiciones constantes y controladas, son reproducibles y fácilmente comparables. La falta de correlación entre los ensayos con vegetales superiores, sujetos al azar tal como hemos señalado, no es necesariamente un reflejo de su valor para la estimación de la disponibilidad intrínseca de los nutrientes, cualesquiera que sean los cultivos que se desarrollen. Pero la aplicación de los resultados (de los micro-bioensayos, de los análisis químicos o de cualquier otra prueba) depende de la interpretación de aquéllos en relación con una condición ecológica regional (clima, manejo, sanidad vegetal, etc.) y con un cultivo de especie y potencial genético determinado (variedad o línea híbrida); según Barberis (7) este grado de perfeccionamiento en la calibración de métodos, por el momento no pasa de ser un anhelo en nuestro país.

Los microorganismos

Desde hace mucho tiempo se sabe que existe una nítida influencia de los nutrientes sobre los microorganismos y que algunos de ellos tienen exigencias nutritivas semejantes a los vegetales superiores (45, 67).

Al hongo microscópico *Aspergillus niger* (figura N° 1, B) se lo ha utilizado (45, 46, 49, 69, 77) para la estimación de fósforo (en adelante: P) potasio (en adelante: K) y zinc. También los mohos *Cunninghamella blakesleana* o *C. elegans* (fig. 1 - A) son sensibles a las deficiencias de P (1, 48), calcio (Ca), molibdeno (Mo) y manganeso (77). Tchan (75) propuso el uso de microorganismos fotosintéticos: una mezcla indefinida de algas, en especial para las deficiencias de nitrógeno. Con objetivos similares también se idearon métodos empleando bacterias nitrificantes (72) y bacterias del género *Corynebacterium* (en 75). Sin embargo, el microbio que más se ha utilizado en los ensayos (en adelante: "test") sobre el nivel de nutrientes ha sido la bacteria *Azotobacter chroococcum* (fig. 1 - C) principalmente para la estimación de P, Ca (2, 10, 24, 59, 61) y sus posibles combinaciones (77), Allen (1) lo aconseja solamente para P y K (y P + K) y Wieringa (81) lo utilizó, además, para Mo.

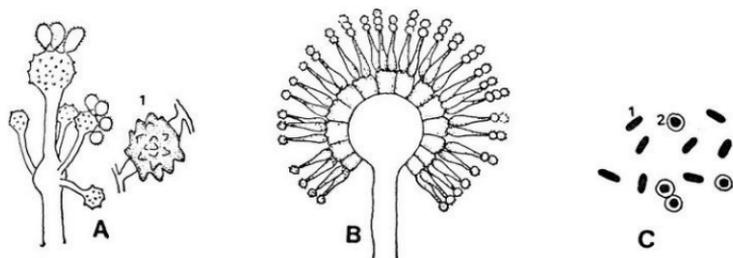


Figura N° 1 — Algunos microorganismos utilizados para el diagnóstico de la concentración de nutrientes en muestras de suelo. A = *Cunninghamella* (1: zigospora), B = *Aspergillus* y C = *Azotobacter* (1: células activas, 2: formas inactivas).

Todavía no está todo dicho.

En nuestro país, si bien fue motivo de numerosos trabajos (principalmente por parte de investigadores de la Facultad de Agronomía de Buenos Aires - ver, p. ej., la bibliografía citada por Molina - 53), aún no se han publicado —tal como lo advirtiera Halperin (29) hace unos 10 años— trabajos en los que se hayan establecido una correlación entre los resultados del "test" del *Azotobacter* con los resultados de los análisis de diferentes tipos de suelos y con los rendimientos de los diferentes cultivos en esos mismos suelos.

Por su parte, en 1971, Emiliani y Priano (18) encontraron, en el análisis periódico de un suelo cultivado, que el "test" resultaba negativo cuando el contenido de P asimilable (expresado como P_2O_5 , soluble en ác. cítrico 2 %) disminuida a 14 mg % (o menos). Posteriormente, Priano y Martínez-Lauría (63) analizando 62 muestras provenientes de diferentes localidades de la provincia de Santa Fe, hallaron una concentración de P (como P_2O_5) va-

riable entre 5 y 687 mg%, resultando el "test" negativo cuando ese elemento oscilaba entre 5 y 15 mg%. Es interesante señalar que estas observaciones concuerda con las realizadas por Guedes (28) en muestras extraídas en todas las regiones agrícolas del país para analizar la distribución del *Azotobacter*: la frecuencia de su hallazgo se triplicaba en suelos con un contenido de P (como P_2O_5) superior a 15 mg%.

Hace ya diez años que Lundberg (44) había estimado que el uso de tal microorganismo permitía apreciar las posibilidades de aumentar los rendimientos, pues verificó que la reacción de esa bacteria a los agregados de P correspondían a los observados en leguminosas fertilizandas. Por otra parte, Emiliani y Priano (17) habían comprobado que las cantidades mínimas de Ca para hacer visible por lo menos a una colonia de *Azotobacter* (proveyéndole de todos los demás nutrientes) eran semejantes a las que utilizaron en un ensayo de enclado (62) para aumentar el 100% del rendimiento de la alfalfa.

Pero, tal como se afirmara críticamente (29), todos los resultados que se han dado a conocer no pueden considerarse en un pie de igualdad pues el método no ha sido normalizado: en general no se ha trabajado con cepas estándar, dado que se utilizaron aislamientos efectuados al azar, —existen líneas con diferentes requerimientos— o, peor aún, frecuentemente se han empleado cepas de *Azotobacter* sin conocer la especie; algo similar señalaba Tchan (76) en su revisión crítica de diversos trabajos de autores de nuestro país.

ANÁLISIS

Solamente como un ejemplo -guía hemos detallado una técnica de laboratorio y luego una serie de sugerencias prácticas para experimentarla en condiciones de campo. Pero, antes de todo, hemos creído conveniente detallar cómo obtener una muestra para realizarle los análisis propuestos. Esta última reseña está destinada, obviamente, para los que no tienen una formación agronómica o la tienen en forma incompleta (estudiantes, productores, biólogos, bioquímicos, etc.), pero a quienes también está destinada la presente monografía.

Es conveniente recordar que el análisis de las muestras de suelo será el origen de la fuente de información sobre la relativa disponibilidad de nutrientes para los vegetales. Pero solamente cuando el análisis se calibra con la productividad y *cuando las muestras de suelo se obtienen adecuadamente*, los resultados podrán ser valiosos argumentos sobre los cuales se pueden sustentar decisiones de manejo sobre fertilizantes o sobre la fertilidad del suelo.

Debido seguramente a la importancia del tema, existe una extensa bibliografía al respecto, para un variado nivel de comprensión, parte de la cual citamos en el ítem correspondiente (3, 8, 13, 16, 21, 26, 31 - 43, 55 - 58, 66, 73, 77, 80). Es también necesario tener presente que el método de muestreo depende

del objetivo perseguido; así por ejemplo para las necesidades de calcio recomendamos leer las observaciones de Voss (78), para nitrógeno las señaladas por Nelson y otros autores (12, 19, 56). También existen técnicas especiales para el muestreo de suelos salinos y sódicos (65), para suelos regados en surcos (9), etc.

Muestreo

Las unidades de muestreo

En primer lugar se realiza una inspección general del campo o de la granja y se elabora un mapa de la propiedad, dividida en *unidades de muestreo* sobre la base de las características de los suelos y su manejo (figura nº 2). Para nuestros objetivos de muestreo, cada suelo puede diferenciarse de otro según la textura, color y pendiente y de acuerdo a las diferencias visibles como ser: distinto desarrollo de los vegetales cultivados, manchones salinos, lugares anegados o erosionados, diferentes cultivos, etc. y también de acuerdo a los tratamientos dados, en el pasado, tanto al suelo como a los residuos de las cosechas (áreas fertilizadas, encaladas, incorporación de rastrojos, etc.). Es necesario muestrear separadamente (o evitar si no interesan) las áreas pequeñas no representativas (a lo largo de alambrados, de caminos, cerca de tanques australianos, inmediaciones de edificios, árboles, lugares donde estuvieron apilados residuos o parvas de heno, etc.) o, como ya señalamos, sometidas a un tratamiento distinto al de la generalidad, aunque pertenezcan al mismo tipo de suelo.

El muestreo tradicional

La muestra representativa de cada unidad de muestreo (que por lo general puede abarcar una superficie de 2 a 10 hectáreas), debe haberse compuesto por 10 a 30 submuestras tomadas al azar (cada 15 - 20 pasos, p. ej.) siguiendo una trayectoria indefinida en línea quebrada (en zig-zag). Los campos que han sido fertilizados en forma intensiva requieren un mayor número de submuestras debido a la variabilidad de los métodos de aplicación y a la extracción de nutrientes por parte de los vegetales; estos dos factores dan, por resultado, diferentes cantidades de nutrientes residuales entre una parcela y otra.

Si los vegetales están sembrados en hileras o los fertilizantes fueron aplicados en franjas, las muestras se toman en el camino que separa las hileras o franjas; lógicamente después de pasar el arado de discos, p. ej., ya será muy difícil discernir dónde estaban los surcos, invalidando los resultados de los análisis obtenidos con tal muestreo: en este caso, el número de submuestras necesario, para obtener una razonable desviación estandar, se elevaría de tal forma que tornaría el trabajo impracticable.

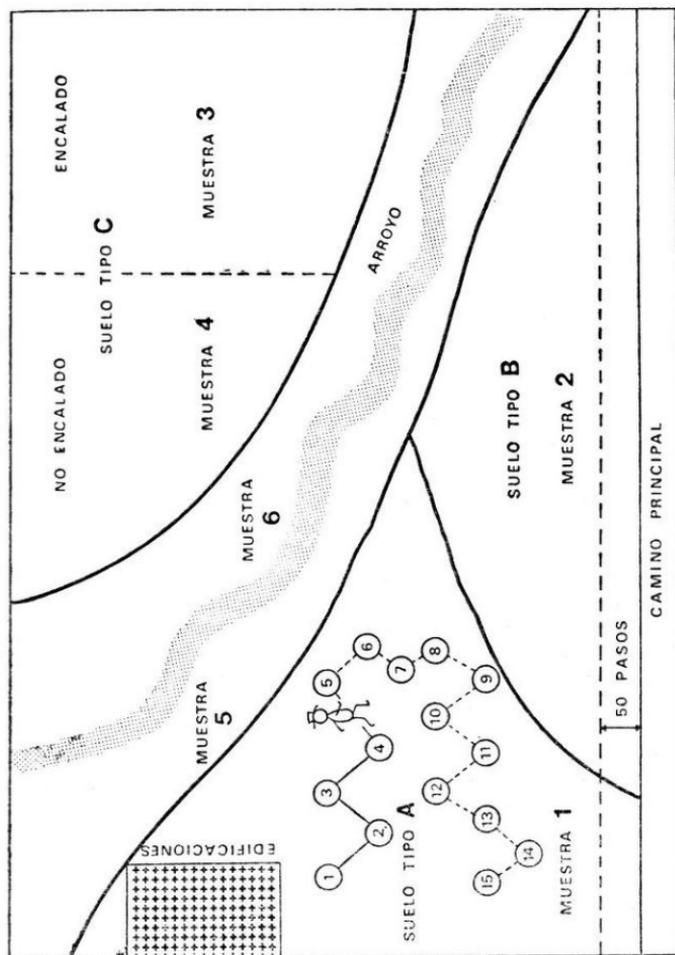


Figura nº 2 — División del campo en unidades de muestreo según las características de los suelos y a su manejo (De: 73, 74).

El muestreo intensivo

Para apreciar la heterogeneidad en la distribución de los nutrientes se ha aconsejado (14) el denominado "muestreo intensivo". Si solamente se practicara el muestreo tradicional (detallado anteriormente), es decir la extracción

de un número de submuestras al azar, esto proveerá un buen promedio de las condiciones nutritivas del suelo, pero conocer la condición promedio de un área que no es homogénea desde el punto de vista de los nutrientes es de poco valor, puesto que el análisis proveerá resultados promedios que llevarán a fertilizar en dosis bajas algunas zonas y en dosis altas, otras. Para evitar tal cosa se recomienda tomar sistemáticamente muestras múltiples basándose sobre un modelo de parrilla. Este muestreo múltiple además de estimar los niveles de nutrientes, provee una medida de heterogeneidad mostrando la distribución de los nutrientes en el área de muestreo.

Este muestreo implica, de acuerdo con una parrilla cuadrada con puntos de muestreo separados entre sí por 30.5 m., unas 22 muestras por cada 2 hectáreas; cada una de esas muestras está constituida por el contenido de 5 barrenos tubulares extraídos dentro de un círculo de unos 2 metros de diámetro.

Es necesario señalar que el muestreo intensivo no necesita repetirse; una vez delimitadas las áreas con una concentración uniforme de nutrientes (o corregidas las zonas deficientes), los muestreos posteriores se pueden realizar según el método tradicional de las muestras compuestas (recolectadas a intervalos periódicos en la rotación de las cosechas) lo que será suficiente para controlar las fluctuaciones estacionales de los nutrientes en el suelo.

Utensilios y profundidad de muestreo

Las muestras se deben obtener con herramientas bien limpias. Puede utilizarse una pala (común o jardinera) o el barreno de tubo.

Un instrumento de muestreo requiere dos condiciones importantes: 1º) que se tome una capa uniforme desde la superficie hasta la profundidad de inserción del instrumento y 2º) que se obtenga el mismo volumen de suelo de cada área. En general, los barrenos de tubo cumplen muy bien estas dos condiciones en suelos húmedos. En los secos, duros y pedregosos, no dan resultados satisfactorios.

Cuando se usan palas, primero es necesario limpiar la superficie del suelo de hojarasca y luego se inserta la pala hasta la profundidad de arado (entre 15 - 20 cm); se descarta la primera palada de tierra y se limpia el agujero de eventuales terrones. Luego, se corta una tajada de unos 3 cm de grueso por el costado del agujero. Se retira y retiene sobre la pala, se descartan las partes laterales guardando la central.

Cuando se usan barrenos, también se limpia la superficie y se empuja el tubo hasta unos 15 cm. No se debe inclinar el tubo cuando se lo está enterrando, para prevenir torceduras. Luego, se tira de él con un movimiento en línea recta: el tubo retendrá al suelo; los primeros 15 cm se separan y guardan.

La profundidad de muestreo está más bien determinada por la textura del suelo, prácticas de riego, los cultivos a sembrar y los nutrientes cuyo nivel interesan. Por ejemplo, en suelos arenoso con intenso riego y fertilización nitrogenada, es necesario pasar el metro de profundidad. Una vez obtenida la

muestra se la divide cada 15 - 20 cm y se van embolsando aparte los segmentos provenientes de diferentes profundidades. Generalmente es conveniente sacar muestras del subsuelo (especialmente cuando se encuentran cultivos de raíces profundas), para lo cual deberá emplearse muestreadores especiales (p. ej., ver 22, 23), pero, se bien se admite que las plantas obtienen nutrientes procedentes de debajo de la capa arada, existe muy poca información para interpretar los análisis de las muestras del subsuelo.

Las submuestras se colocan en un balde limpio, se mezclan y se llena hasta la mitad una bolsa de plástico identificada con un número. Es necesario evitar que la muestra se deseeque, por lo tanto no se usan envases de papel o cartón. Se sujeta la bolsa justo por arriba del nivel de la tierra y, con ambas manos, se aprietan los costados de la bolsa para evacuar el aire. Se enrolla la parte superior hasta el nivel de la muestra y se la cierra de tal forma que no se desenrolle.

La muestra debe llegar al laboratorio antes de que transcurran 12 h desde que se la obtuvo; si esto no fuera posible, se colocan las muestras en un refrigerador, congelador o en una conservadora con una mezcla de hielo y sal gruesa.

Se anotan y sitúan, en el mapa del establecimiento, los puntos de muestreo (las referencias deben corresponder a los números de las bolsas) y los rendimientos obtenidos en las últimas cosechas.

Cuándo realizar el muestreo

Si bien se puede realizar en cualquier momento, lógicamente depende del principal objetivo del muestreo. Para realizar correlaciones con los cultivos se deben recolectar muestras antes, durante las principales etapas de desarrollo del vegetal y después de la cosecha, teniendo bien presente los demás factores que condicionan la productividad (lluvias, plagas, etc.). Otras recomendaciones pueden consultarse en el texto de Tisdale (77).

El "test" del Azotobacter en el laboratorio

Inmediatamente después de extraída, se determina el porcentaje de humedad de la muestra (en por ciento de suelo seco) y se separa una parte para realizar el "test" y otra para las otras determinaciones (microbiológicas, químicas, físicas y fisicoquímicas).

Lo primera parte de la muestra se deja secar al aire, se pulveriza en un mortero o molino haciéndola pasar primero por un tamiz de 6 mm de luz y, luego, por uno de 1 o de 2 mm. Posteriormente se pesan cantidades suficientes para llenar hasta el borde, una serie de cuatro o de seis cajas de Petri (en adelante: cápsulas); la cantidad varía según su capacidad, por lo tanto las cantidades que se citan a continuación se podrán tomar solamente como un ejemplo:

Pesar, cuatro veces, 100 g de tierra y colocarlos en un vaso de precipitado. Agregar, a cada uno, el 1 % de manitol (o "manita") y mezclar bien. Hacer una suspensión con el desarrollo de una cepa de *A. chroococcum* (en agar-manitol estría) de 24-48 h de incubación, con unos 10 ml de solución fisiológica salina (0.85 % Cl Na) estéril y diluir ésta a 100 ml con otra solución salina estéril. Usar 2 ml de esta última para el agregado a las cápsulas, conjuntamente con el agua destilada (ver "preparación de cápsulas"). Una forma más práctica para hacer lo expuesto es la utilización directa de cepas liofilizadas.

Preparación de las cápsulas

Cápsula nº 1, la cápsula testigo

Agregar lentamente agua destilada estéril desde una pipeta o bureta graduada, mezclando constantemente con una espátula el contenido del vaso de precipitado hasta que la tierra se sature de agua, que tome la consistencia de la arcilla para modelar.

Si no se trabaja con recipientes de vidrio, la muestra debe consolidarse golpeando el recipiente sobre la mesa de trabajo. Al saturarse la pasta, brilla por reflexión de la luz, fluye ligeramente si se inclina el recipiente y la pasta se desliza fácilmente de la espátula, excepto en el caso de suelos con alto contenido de arcilla. La pasta no debe acumular agua en la superficie, perder su brillo o endurecerse durante un reposo de una hora. Si ha perdido el brillo o se ha endurecido, es necesario mezclar nuevamente agregando agua.

Anotar la cantidad de agua que ha necesitado para esta operación (sumándole también el volumen del inóculo) pues todas las demás cápsulas deberán tener el mismo contenido de agua.

Transferir la masa obtenida a una cápsula, presionando y alisando la superficie pero dejándola ligeramente convexa (como la yema del pulgar) con la espátula o un portaobjetos, ambos humedecidos con agua destilada.

Cápsula nº 2, para apreciar deficiencias en fósforo (P).

Agregar 10 ml de la solución de fosfato disódico, $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, al 6 % (lo que es equivalente a 0.05 g P = 0.1 g P_2O_5) y suficiente agua destilada hasta igualar la cantidad vertida en la cápsula testigo, descontando estos 10 ml. Mezclar bien, verter en la cápsula y moldear. Previamente, al igual que a todas las cápsulas, se le debe haber agregado la misma cantidad de inóculo y fuente de carbono que las mencionadas anteriormente.

Cápsula nº 3, para apreciar deficiencias de calcio (Ca).

Se diferencia de las anteriores por el nutriente añadido: 2 g de carbonato de calcio, CO_3Ca (equivalente a 0.8 g Ca); lo demás es lo común a todos los tratamientos: agregado de manitol, agua destilada, inóculo, mezclado, vertido y moldeado.

Cápsula nº 4, para apreciar deficiencias de P + Ca.

En el cuarto recipiente agregar las cantidades de fosfato y de carbonato mencionados para las cápsulas nº 2 y 3, realizando el procedimiento común a todas.

Más cápsulas

Si se supone una deficiencia de potasio (K), preparar una quinta cápsula con el agregado de 10 ml de una solución al 3 % de sulfato de potasio, SO_4K_2 (equivalente a 0.134 g K = 0.161 g K_2O). La combinación P + K se logra agregando, a un sexto recipiente, 10 ml de una solución al 3 % de PO_4HK_2 (equivalente a 0.134 g K + 0.05 g P) y, por último, si interesa K + Ca y P + K + Ca combinar lo expuesto para el quinto tratamiento, con el tercero y el sexto con el tercero, respectivamente.

Incubación de las cápsulas

Colocar, sin su tapa, dentro de otra mayor —ésta con tapa y con algodón sobresaturado de agua (rodeando a la pequeña)— para mantener la humedad durante el período de incubación. Además, colocar un papel absorbente entre la tapa grande y su fondo para que el agua de condensación no gotee sobre la superficie de la cápsula con tierra moldeada y dificulte la observación posterior de las colonias típicas.

Luego llevarlas a una incubadora a 28-30°C; al cabo de 48-72 h (se pueden hacer observaciones diarias hasta los seis días de incubación, como máximo) se estudia la superficie de las cápsulas (ver "Interpretación de los resultados") y se anotan los resultados obtenidos.

No todos están de acuerdo con lo expuesto

No todos los autores concuerdan con los agregados señalados anteriormente; la mayor parte de ellos, por ejemplo, emplean 50 g de muestra por tratamiento; Halperin (29) emplea, como fuente de carbono el 3 % de almidón + 1 % de manitol + 1 % de glucosa; como fuente de P emplea una mezcla de fosfato mono y disódico (al 0,25 %), para K agrega SO_4K_2 hasta alcanzar una concentración del 0,25 %, lo mismo para el PO_4HK_2 . Por su parte,

Pochon (60) aconseja el 0,5 % de esas mismas sales y, como fuente de carbono, el 1 % de piruvato de sodio. Otros creen más conveniente utilizar sacarosa (0,4 %) o almidón soluble (1, 61, 67) o glucosa (24, 59, 61). Sasson —(68) una de las mejores investigaciones sobre consumo de azúcares— luego de experimentar diversas fuentes de carbono sugiere el uso de glucosa, fructosa, manitol, sacarosa, dextrina o inulina *pero no* el almidón ni el piruvato de sodio.

Mishustin (en Parkison *et al.*, 58) sugiere el 5 % de mantiol y el 0,1 % de PO_4HK_2 . Sackett y Stewart (67) prefieren el almidón soluble debido a que se reduce grandemente la formación de protuberancias (sobre la superficie) y su rotura, como así también el desarrollo de hongos; además las colonias quedan mejor definidas, reteniendo su individualidad por más tiempo, presentando una menor tendencia a extenderse y unirse formando una película gelatinosa continua sobre la superficie de toda la cápsula. Sin embargo, los mismos autores admiten que —a veces— esta fuente de carbono falla.

De la amplísima literatura que trata este tema (lo reseñado es sólo una pequeña muestra) resulta entonces muy probable que una fuente de carbono sea más adecuada que otra; de todas maneras nosotros creemos que lo más conveniente para el “test” es emplear la misma fuente de carbono que la utilizada para desarrollarlo en cultivo puro (antes de añadirlo a la cápsula). Para nosotros, el empleo de los demás azúcares serían más bien de interés para lograr el desarrollo espontáneo de esa bacteria cuando se trate de averiguar su presencia o ausencia o para los primeros pasos del aislamiento.

Gainey *et al.* (25), además de sugerir el uso de glucosa (2 %) o almidón (2 %), agrega 3 ml de la suspensión de *Azotobacter* por cada 100 g de muestra y además: 5 % de CO_3Ca ; 0,3 g de $\text{PO}_4\text{HK}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 0,24 g SO_4K_2 ; 0,46 g de $\text{PO}_4\text{H Na}_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$. Sugiere la variante práctica de preparar y pesar todo junto lo que va en común y luego repartir.

Con respecto a la cantidad de inóculo, ésta varía, según los autores entre 1 a 3 ml; se debe tener cuidado, empero, de no usar demasiado pues las bacterias podrían formar una película continua sobre la superficie de la cápsula en vez de formar colonias aisladas, complicando la interpretación del “test” (67).

Allen (1) le agrega solamente CO_3Ca en cantidad necesaria y suficiente para elevar el pH de la muestra hasta 6,8-7,0. Sackett y Stewart (67), en cambio, sugieren de que si el pH es inferior a 6,8 agregar el 10 % de ese mismo compuesto. Esto provee un gran exceso pero no tiene efectos dañinos para el *Azotobacter*, aun si se le agrega tanto como sería el 33 %.

Los mismos autores (1, 67) también recomiendan de que, si fuera necesario (suelos muy arcillosos), agregar cuarzo (arena muy pura, lavada) a razón de una parte por cada 5-10 partes de suelo. Si el suelo fuera, en cambio, muy arenoso, agregar la cantidad suficiente de caolín para lograr una buena textura.

Halversen y Hoge (30) y Molina y Sauberán (54) introdujeron una serie de variantes; por su extensión remitimos al lector a esas publicaciones.

Interpretación de los resultados

Al cabo del período de incubación, sobre la superficie de las muestras pueden aparecer manchas blancas, de consistencia mucosa. Después de unas 72 h, estas colonias se vuelven de color pardo oscuro a negro, pigmento típico de *A. chroococcum* (50) y pueden permanecer aisladas o confluir e invadir la totalidad de la superficie disponible.

A veces, la superficie puede presentar algunas elevaciones (como chichones); esto es debido a la presencia de microorganismos anaerobios (generalmente *Clostridium* spp.) que al producir gases hinchan la tierra en diferente

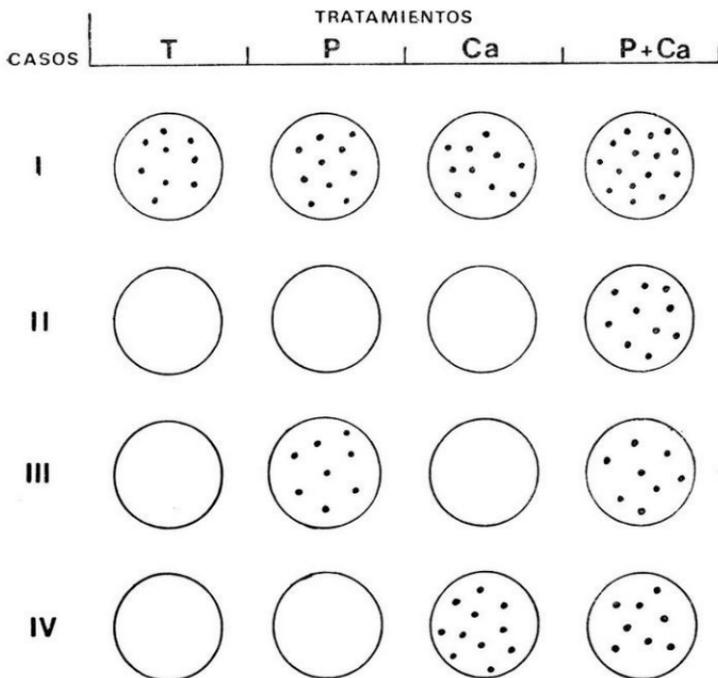


Figura nº 3 - Resultados típicos del "test" del *Azotobacter*: I caso = suelo no deficiente, II = suelo deficiente en P y Ca, III = deficiente en P y IV, en Ca. Abreviaturas: T = testigo, P = agregado de fósforo, Ca = de calcio, Ca + P = de calcio y de fósforo. Las pequeñas manchas negras representan colonias de *Azotobacter* sobre la superficie de la tierra moldeada en la cápsula (círculos).

grado, según la magnitud de su desarrollo (52); otras veces se puede notar como una pelusa blanca: son colonias de hongos microscópicos.

La interpretación del "test" del *Azotobacter* es bastante sencilla: tomemos como ejemplo los casos ilustrados en la figura nº 3: en el primero, las colonias aparecen en todas las cápsulas, cualesquiera sea el agregado de nutrientes, incluyendo al testigo (T), sin ninguno. Se concluye que el suelo no es deficiente. Si sólo aparecen colonias en la cápsula en la que se añadió Ca + P significa que el suelo es deficiente en ambos nutrientes (fig. 3, caso II). Si las colonias aparecen solamente en la cápsula con agregado de P y en la P + Ca, significa que el suelo solamente es deficiente en P. Análogamente, si esas colonias se desarrollan únicamente en la que se le puso Ca y en la de Ca + P, se interpreta que el suelo es deficiente en Ca.

Algunos autores (29, 30) clasifican el desarrollo del *Azotobacter* de negativo (-) o nulo (o) cuando no lo hay y positivo (++++) cuando lo presenta muy bueno, con los valores intermedios detallados en el cuadro nº 1.

Cuadro nº 1. — Notación del desarrollo de colonias. Las fracciones se refieren a la extensión ocupada; a la derecha, la simbología correspondiente:

0	-
> 0 ≤ 1/4	+
> 1/4 ≤ 2/4	++
> 2/4 ≤ 3/4	+++
> 3/4 ≤ 4/4	++++

Las deficiencias parciales

Cuando solamente existe una deficiencia parcial, esto estará indicado por la reducción del número y del tamaño de las colonias, dependiendo su magnitud del grado de deficiencia (67).

Por ejemplo (figura nº 4), a veces el agregado sólo permite el desarrollo de algunas colonias, en cambio añadiendo Ca + P se permite cubrir toda la superficie de la cápsula: la muestra es deficiente en Ca y ligeramente deficiente en P. Análogamente si agregando P se desarrollan algunas colonias, en un número inferior al tratamiento que lleva P + Ca, el suelo es ligeramente deficiente en Ca y deficiente en P. Finalmente, si hay desarrollo en las cápsulas con Ca y en la que se agregó P, pero en ambas el desarrollo es inferior a la que lleva P + Ca, se interpreta como que la deficiencia en P y en Ca es pequeña. Una explicación gráfica de estas interpretaciones se lo ha tratado de hacer en la figura nº 5.

Supresión del desarrollo por exceso de nutrientes

Según lo encontrado por algunos autores (67), a veces cuando los suelos están bien provistos en P y/o en K, las cápsulas con esos mismos agregados

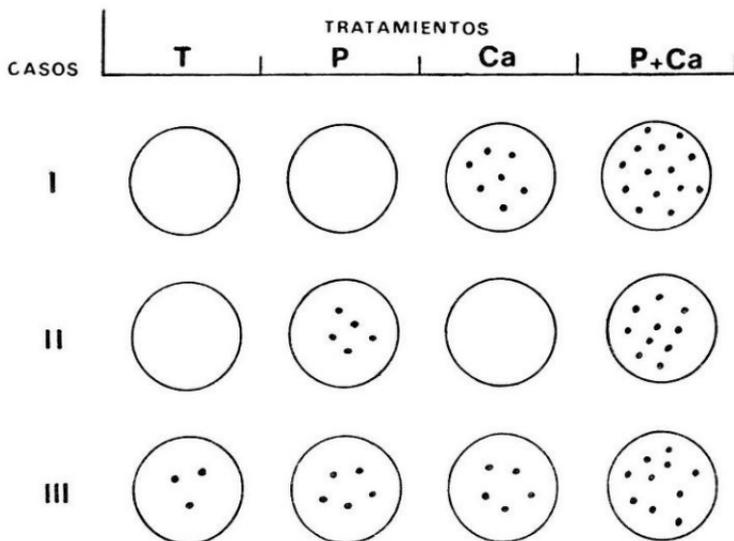


Figura nº 4 - Las deficiencias parciales. I = deficiente en calcio y ligeramente deficiente en fósforo, II = deficiente en fósforo y ligeramente deficiente en calcio, III = ligeramente deficiente en fósforo y calcio. *Abreviaturas:* ver figura anterior.

pueden producir la total o parcial supresión del desarrollo de *Azotobacter*, es decir que las cápsulas testigo, o las que no tienen el nutriente en exceso, dan un mejor resultado (ver figura nº 6).

La dosis mínimas

Con respecto a las dosis de fertilizantes y encalados utilizados en el campo, tenemos indicios (17) que éstas se correlacionan mejor con las dosis mínimas agregadas a las cápsulas en cantidades necesarias y suficientes para obtener aunque sea una sola colonia (de otra forma, si se extrapolara a kg/ha las dosis empleadas rutinariamente para obtener un exuberante desarrollo de colonias, estas dosis resultarían exorbitantes).

El "test" del *Azotobacter* hecho en el campo

El ensayo propuesto para evaluar el método en condiciones de laboratorio, también puede ser realizado por el mismo productor en su propio esta-

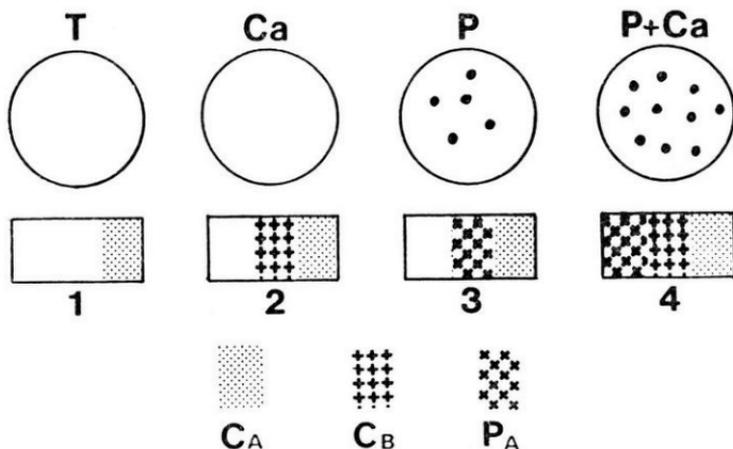


Figura nº 5 – Explicación gráfica de una de los resultados de deficiencias parciales. En T-1 no se desarrollan por la falta de P; en Ca-2 no se desarrollan por la misma razón, aunque tengan todo el calcio necesario (se le ha agregado, CB); en P-3 se desarrollan con el agregado de fósforo (PA) y con el calcio preexistente (CA), pero relativamente pocas, pues le falta el agregado de más calcio (CB) para un desarrollo más amplio o de un mayor número de colonias. En P + Ca-4 se desarrollan muy bien, pues tienen todos los nutrientes en cantidades suficientes (CA y PA). Conclusión: suelo ligeramente deficiente en calcio y deficiente en fósforo.

blecimiento, asesorado por el extensionista, si ambos tienen entusiasmo e ingenio para vencer las primeras dificultades.

La estufa (6, 15, 71).

Uno de los materiales más importantes (y el más costoso), cuando las temperaturas ambiente son inferiores a los 25°C, es la estufa, necesaria para incubar las muestras de tierra con los diferentes tratamientos. Sin embargo, uno mismo puede construirla con madera (de cajón de frutas, planchas de madera aglomerada, etc.) o chapas en desuso, pudiendo revestir su interior con planchas de "tergopol" (figura nº 7). La fuente de calor puede provenir de dos lámparas eléctricas independientes de 25 W cada una, colocadas en la parte inferior del cajón y separadas del resto del ambiente mediante una plancha de hojalata, a fin de tratar de que el calor se difunda en forma más uniforme. En la parte superior se colocan guías para las rejillas, sobre las cuales se ubicará el material a incubar. Si bien estas rejillas se pueden hacer con un entramado de alambre, es suficiente recortar varillas (de metal o madera) y fijarlas

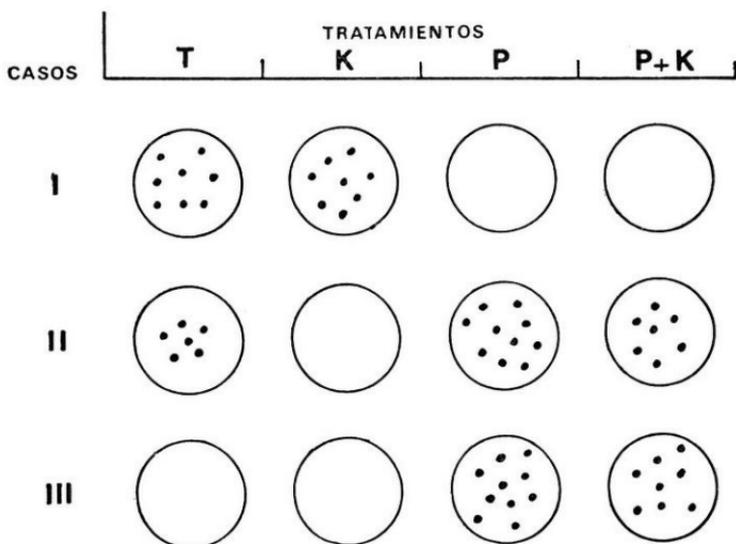


Figura nº 6 – Supresión del desarrollo por exceso de nutrientes. I caso = suelo no deficiente en P ni en K, supresión por exceso de P; II = suelo ligeramente deficiente en P, no deficiente en K, supresión por exceso de K; III = suelo deficiente en P, no deficiente en K, supresión por exceso de K. *Abreviaturas:* K = potasio, para las demás ver figura 3.

sobre las guías con muescas (para asegurar de que no se deslicen) o en agujeros practicados en las paredes de la estufa. Los espacios máximos entre las varillas estarán dados por el diámetro de los recipientes que se utilicen como cámaras húmedas.

Si se carece de energía eléctrica, el calor puede suministrarse mediante una lámpara a querosén colocada a un costado de la caja o en el medio, separándola del resto por una plancha vertical de hojalata. La parte superior de la lámpara debe sobresalir a través de un agujero practicado en la parte superior de la estufa, a fin de dar salida a los gases de la combustión.

Se debe tratar de que la temperatura se mantenga alrededor de los 28-30°C (como mínimo 24 y como máximo 34). Para esto se deberá incorporar un termómetro por la parte superior, de tal forma que el bulbo permanezca en el centro del interior de la estufa. El techo de ésta deberá tener aberturas regulables para que, cerrándolas o abriéndolas más o menos, se pueda regular la temperatura de su interior, la que también se podrá modificar encendiendo o apagando una o más lámparas.

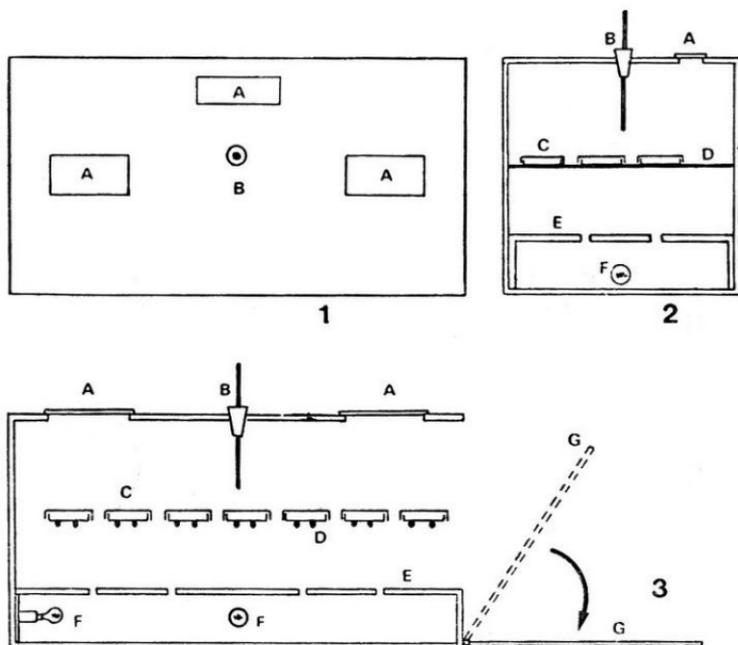


Figura nº 7 – Esquema de una incubadora para realizar el “test” del *Azotobacter* en forma simplificada, por el productor en su propio establecimiento. 1 = vista de la parte superior con aberturas correderizas (A) y orificio para el termómetro (B), 2 = vista de frente de un corte vertical, C: cámaras húmedas, D: varillas de sustentación, E: chapa metálica para difusión del calor, F: lámpara eléctrica; 3 = vista de un corte lateral, G: puerta abatible.

Los demás utensilios

La muestra secada al aire se puede pulverizar, envuelta por una lona, mediante un martillo y utilizar recipientes de hojalata (p. ej., de envases de tomates de 380 g), en vez de vasos de precipitado.

A fin de evitar la compra de una balanza para pesar las muestras de suelo o de las sales, se pueden calibrar diferentes recipientes, como los que se usan habitualmente en la cocina para medir harina, azúcar, etc. Para medir volúmenes de las soluciones o del agua destilada (que podrá ser agua de lluvia hervida) se podrán emplear jeringas del tipo descartable (después de haberle dado el primer uso) o frascos goteros calibrados. En vez de utilizar cápsulas

de vidrio se pueden utilizar tapas de frascos de boca ancha (si bien ahora también se pueden conseguir cápsulas de plástico desechables a precios muy inferiores a las de vidrio) pero también uno mismo se las puede hacer con madera, revestida con papel aluminio o plástico. Como cámaras húmedas se pueden emplear recipientes de hojalata de mayor capacidad (como las de dulce de batata de 700 g). Estas deberán estar tapadas por otra mayor o bien con una hoja de papel aluminio o plástico ajustada a los bordes con una cinta autoadhesiva; esa misma hoja deberá estar revestida en su interior por otra absorbente (papel de diario, p. ej.).

Producción de *Azotobacter* en gran escala

Los más engorrosos para el productor será proveerse de las drogas y, principalmente, de cepas puras para los ensayos. Es necesario obviar tal dificultad; los laboratorios oficiales o privados podrían suministrarlas como pastillas liofilizadas. Para asegurar su uniformidad, se debería iniciar la producción en gran escala de cepas perfectamente identificadas; en consecuencia, se lograría una importante simplificación y estandarización del método.

Control del método en condiciones de campo

Debido a la gran diversidad de material casero que se puede emplear, el extensionista deberá previamente comprobar mediante sencillos ensayos comparativos, que los elementos caseros disponibles dan, a los fines de la interpretación, los mismos resultados de los que se obtienen con los aparatos y con el material de laboratorio descrito anteriormente. Este control es necesario pues, hasta ahora, no se lo ha realizado en un número suficiente como para evaluar las técnicas propuestas para realizarlas en el campo.

PERSPECTIVAS

Podría ser útil probar la validez del "test" del *Azotobacter* para: (a) emplearlo como uno de los índices de heterogeneidad del suelo en los muestreos intensivos; (b) estimación cualitativa de algunos nutrientes; (c) estimación cuantitativa de las dosis correctivas en función de cultivos (ver tópico: "Las dosis mínimas").

Si bien el punto (b) es muy conocido, es la primera vez que se sugieren los puntos (a) y (c) en la literatura mundial.

Es muy probable que algunos cultivos (remolacha azucarera, maíz -67-, leguminosas en general y posiblemente otros) guarden una aceptable relación con los resultados del "test", pero no hemos podido concretar más las aplicaciones posibles del método en función -al menos- de las variables ecológicas más

importantes, debido a la gran diversidad de detalles técnicos utilizados, al empleo de cepas de características desconocidas y por haber realizado estos bioensayos generalmente en desconexión con una evaluación precisa del ambiente.

A raíz de esta falta de conocimientos (originada también por la escasez de Bioedafólogos en nuestro país) queda evidenciado un amplísimo campo abierto a la experimentación de un método al cual, si bien se le conoce desde hace más de 50 años, aún no se le han estudiado todas sus posibilidades con la amplitud, meticulosidad ni con el entusiasmo que se merece.

Concretamente, para iniciar ordenadamente un estudio sobre el particular sugerimos:

1) Realizar una revisión crítica *experimental* de las múltiples variables técnicas propuestas por los diferentes autores y las que puedan surgir del criterio personal del investigador. Nosotros sugerimos elegir aquellas técnicas que resulten más sensibles a las deficiencias de nutrientes, con respecto a las necesidades conocidas de los cultivos. Por ejemplo, se demostró (11) que un suelo con menos de 10 ppm de P (22.7 ppm P_2O_5) es conveniente fertilizarlo si se desea obtener incrementos en los cultivos de maíz bajo riego, por lo tanto una técnica bacteriológica que no acuse deficiencias a ese nivel, se la debería desechar.

2) Una vez aceptada, aunque sea en forma provisoria, la técnica estándar, incluirla dentro del grupo de los métodos de diagnóstico (ver "Introducción") y evaluarla en suelos identificados en nuestra zona (por ejemplo, para suelos deficientes se podrán elegir los del albardón costero *no fertilizados*) y relacionarla con la respuesta de cultivos en esos mismos suelos. De esta segunda etapa se obtendrá el valor relativo del método microbiológico con respecto a los otros, en relación a un suelo y a un cultivo determinado. Luego, según los resultados, se podrá hacer un ajuste a las técnicas bacteriológicas y/o a su interpretación. Por ejemplo, se ha encontrado *Azotobacter* en suelos salinos (50,51), por lo tanto es muy posible que en algunos de ellos el "test" dé resultados positivos a pesar de que, para los cultivos, esos suelos resulten estériles (51). Pero por ello no se debe desechar al "test", pues hay que tener presente que éste no mide la fertilidad, sino que solamente estimaría nutrientes (presencia, abundancia, distribución).

3) Probar *en el laboratorio* la técnica sugerida para realizar en condiciones de campo (por el extensionista o productor), es decir simplificada de tal forma de poder llegar a los mismos resultados sin los instrumentos de laboratorio y sin perder reproductibilidad. Llegar a esta comprobación puede ser útil en el caso de que, p. ej., al productor (o a su asesor) le interese saber cuáles son los potreros mejor provistos en nutrientes para implantar en éstos los cultivos más exigentes (P. ej. (38), el cultivo de alfalfa para heno extrae del suelo aproximadamente el doble de K que el maíz para ensilado y el de papa), reservando los potreros menos provistos de nutrientes para los cultivos menos exigentes (p. ej., en relación a aquellos recién mencionados, con respecto al K y *si se dejan en el suelo los residuos de las cosechas*, éstos son: trigo, remolacha azucarera, ha-

bas y maíz para grano; siendo los suelos destinados a cultivos para pastoreo los que menos se empobrecen en ese elemento (38). Para el objetivo señalado los otros métodos pueden llevarle al productor demasiado tiempo (parcelas experimentales, ensayos en macetas 70,77) o tener un costo tal (análisis químico de suelos o de vegetales) que no lo realizaría con la frecuencia deseada, sea en el tiempo como en el espacio.

4) Si los resultados obtenidos en las etapas anteriores son alentadores, será necesario confirmarlos mediante experiencias análogas pero multiplicadas. Es decir que será necesario difundir, en carácter experimental, la técnica estándar entre laboratoristas (de escuelas y facultades agronómicas, INTA, M. A. y G, etc.) extensionistas, productores y estudiantes. De los resultados que se obtengan de esta última aproximación se podrán extraer conclusiones más amplias y definitivas con respecto a la validez del "test" como uno de los elementos diagnóstico de la fertilidad del suelo y saber a qué nivel de capacidad técnica es recomendable como práctica habitual.

Mientras no se cumplan estas etapas, no se puede pretender más que juicios cualitativos, señalando teóricas deficiencias o excesos o, a lo más, fijar algunos rangos o escalas diferenciales (al igual de lo que señalara Barberis (7) para los análisis químicos de suelos).

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi profundo agradecimiento a José L. Panigatti (Estación Experimental Agropecuaria de Rafaela, INTA), a José A. Weber (Dirección Gral. de Suelos y Aguas, M. A. y G. de Sta. Fe) y a Jorge A. de Orellana y Lázaro J. Priano (Facultad de Agronomía y Veterinaria de Esperanza, UNL) por la lectura crítica del manuscrito, pues gracias a sus correcciones, sugerencias y observaciones pude mejorar sustancialmente el texto original.

BIBLIOGRAFIA

1. ALLEN, O. N. - 1957. Experiment in soil bacteriology. *Burgess*, Minnesota (118 p.).
2. AMOR ASUNCIÓN, M. J.; M. CUSATO y G. FRONTERA. - 1977. Determinación de carencias del suelo por la prueba del *Azotobacter* (p. 12). En: 7º Congreso de Microbiología, Resúmenes, *Asoc. Arg. de Microbiología*, Bs. As. (293 p.).
3. ANÓNIMO. - 1967. Soil sample information sheet for horticulture crops. (Coop. Ext. Service, FG 351). *Iowa State Univ.*, Iowa (2 p.).
4. ARCHIBALD, J. A. - 1966. Orchard soil management (Pub. nº 457). *Ontario Dep. Agric. and Food*, Ontario (46 p.).
5. ARNAUDI, C. - 1948. Elementi di Microbiologia Generale ed applicata alle fermentazioni. *Ambrosiana*, Milano (810 p.).

6. BACHMAN, A. O.; A. BEGUET; A. FESQUET; L. GIUSTI; A. HERNÁIZ; E. MARTÍNEZ FONTES; H. E. ROCA; A. SORIANO; L. VIGNES y P. ZANUR. - 1967. Curso Latinoamericano de Biología: Guía de trabajos prácticos de laboratorio. CONICET (Dpto. Enseñanza de las Ciencias), Horco Molle (140 p.).
7. BARBERIS, L. A. - 1971. Diagnóstico de la fertilidad de los suelos (p.: 31-72). En: Seminario de fertilidad y fertilizantes, 2-3/XII/70. (Soc. Cient. Arg. y Fac. de Agr. y Vet., Eds.), Bs. As. 106 p.).
8. CLINE, M. G. - 1944. Principles of soil sampling. *Soil Sci.*, 58: 275 - 288.
9. CHAPMAN, H. D. y P. F. PRATT. - 1973. Métodos de análisis para suelos, plantas y agua. *Trillas*, México (196 p.).
10. DOMMERMÈS, Y. F. y F. MANGENOT. - 1970. Ecologie microbienne du sol. *Masson*, París (798 p.).
11. DOW, A. I. - 1972. Soil fertility management of irrigated corn (Ext. Bul. 642). *Wash. Agr. Exp. Sta.*, Washington (12 p.).
12. DOW, A. I.; D. W. JAMES y C. E. NELSON. - 1969. Interpretation of soil test nitrogen for irrigated crops (E. M. 3076). *Wash. Coop. Ext. Serv.*, Washington.
13. DOW, A. I.; D. W. JAMES y T. S. RUSSEL. - 1973. Soil variability in Central Washington and sampling for soil fertility tests (Bul. n° 788). *Wash. Agr. Exp. Sta.*, Washington (9 p.).
14. DOW, A. I. y D. W. JAMES. - 1973. Intensive soil sampling (Bul. n° 781). *Wash. Agr. Exp. St.*, Washington (8 p.).
15. EMILIANI, F.; G. L. CHOCHRÓN y M. A. MARTÍNEZ-LAURÍA. - 1970. Le test de l'Azotobacter fait par le fermier. *Agrochimica*, 14 (5-6):434-436.
16. EMILIANI, F. A. y M. A. MARTÍNEZ-LAURÍA. - 1967. Toma de muestras para el análisis biológico de suelos. *Fac. de Edafología, Univ. Católica Sta. Fe* (3 p.).
17. EMILIANI, F. y L. J. J. PRIANO. - 1969. Observaciones inéditas.
18. EMILIANI, F. y L. J. J. PRIANO. - 1971. Biodinámica de los suelos cultivados. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, 8 (3) : 491-502.
19. FAGIOLI, M. - 1978. Determinación de nitratos en suelos de la región semiárida pampeana: Variabilidad de las muestras y profundidad de muestreo (Bol. Div. Téc. n° 15). *INTA - Est. Exp. Reg. Agrop. de Anguil*, La Pampa (4 p.).
20. FORMISANO, M. - 1956. Guida allo studio tecnico della microbiologia agraria ed industriale. *Edagricole*, Bologna (194 p.).
21. FORSYTHE, W. M. 1970. Importancia de la variabilidad de las propiedades del suelo para evaluarlas en su manejo. *Turrialba*, 20 (4) : 445-451.
22. FRANCHELLI, R. A. - 1964. Nuevo instrumental para extracción de muestras de suelos. *RIA (serie 3, Clima y Suelo)*, 1 (8) : 159 - 165.
23. FRANCHELLI, R. A. - 1966. Calador profundo de suelo y subsuelo, manual y portátil. *RIA*, 3 (2) : 17-23.
24. FRIONI, L. y PASTOR, C. A. - 1976. Microbiología del suelo (Guía de trabajos prácticos). *Fac. de Agr. y Vet., Univ. Nac. de Río Cuarto*, Río Cuarto (55 p.).
25. GAINNEY, P. L.; T. H. L°84 y W. A. MILLER. - 1953. Basic bacteriology laboratory manual. *Burgess, Minneapolis* (82 p.).

26. GARDNER, B. R. - 1964. Soil and petiole analyses. (Folder nº 97). *Univ. of California, Coop. Ext. Serv.*, California (12 p.).
27. GREENE, R. A. - 1932. The applicability of the *Azotobacter* (plaque) method for determining the fertility requirements of Arizona soil. *Soil Sci.*, 34 (2) : 83-93.
28. GUEDES, O. J. - 1957. Difusión del *Azotobacter* en los suelos cultivados. *RIA*, 11 (3) : 247 - 258.
29. HALPERÍN, L. - 1969. Determinación de carencias de P,K y Ca mediante *Azotobacter chroococcum* B. en suelos de la pampa húmeda (p.: 163-167). En: *Actas 5ª Reunión Arg. de la Ciencia del Suelo (soc. Arg. Cienc. del Suelo, Ed.)*, Santa Fe (752 p.).
30. HALVERSEN, W. V. y W. C. HOGE. - 1945. The *Azotobacter* plaque test as applied to the determination of phosphate deficiency in Idaho soils. *J. Am. Soc. Agron.*, 34 (6) : 503 - 512.
31. HAMMOND, L. C. y W. L. PRITCHETT y V. CHEW. - 1958. Soil sampling in relation to soil heterogeneity. *Proc. Soil Sci. Soc. Amer.*, 22 : 548 - 552.
32. HEEG, T. J. - 1965. Help yourself to a soil test (Pub. nº 181). *Ontario Dep. of Agriculture*, Toronto (14 p.).
33. HODGSON, J. M. - 1978. Soil sampling and soil description (Monograph on Soil Survey), *Oxford Univ. Press*, Oxford (140 p.).
34. HOOKER, M. L.; G. A. PETERSON y D. H. SANDER. - 1976. Soil samples: how many do you need? *Farm, Ranch and Home Quarterly*, 23 (2) - 8-11.
35. IGNATIEFF, V. y H. J. PAGE. - 1962. El uso eficaz de los fertilizantes. (Colección FAO, Estudios Agrop. nº 43), FAO, Roma (380 p.).
36. JACOB, W. C. y A. KLUTE. - 1956. Sampling soils for physical and chemical properties. *Proc. Soil Sci. Soc. Amer.*, 20 - 170-172.
37. JACKSON, M. L. - 1970. (2ª Ed.). Análisis químico de suelos. *Omega*, Barcelona (664 p.).
38. JAMES, D. W.; W. H. WEAVER y R. L. REEDER. - 1968. Soil test index of plant-available potassium and the effects of cropping and fertilization in Central Washington irrigated soils (Bull. nº 697). *Wash. State Univ.*, Washington (12 p.).
39. JAMES, D. W. y A. I. DOW. - 1972. Source and degree of soil variation in the field: The problem of sampling for the soil tests and estimation of soil fertility status (Bull nº 749). *Wash. Agr. Res.*, Washington (12 p.).
40. JONES, D. W. y A. I. DOW. - 1972. Source and degree of soil variation in the field: the problem of sampling for soil tests and estimating soil fertility status. (Bull nº 749). *Wash. Agr. Exp. Sta.*, Washington (12 p.).
41. KEOGH, J. L. y R. MAPLES. - 1968. Sampling rice soils to determine the need for lime. *Arkansas Farm Research*, 17 (6) : 2.
42. KUNKL, R.; C. D. MOODIE; T. S. RUSSEL y N. HOLETAD. - 1971. Soil heterogeneity and potato fertilizer recommendations. *Amer. Potato Jour.*, 48 : 163-173.
43. LEO, M. W. M. - 1963. Heterogeneity of soil of agricultural land in relation to soil sampling. *Agr. and Food Chem.*, 11 : 432-434.
44. LUNDBERG, A. - 1968. Fertilización fosfatada en la cuenca del Salado. *Dinámica Rural*, (1) : 60-61.
45. MARQUES-GOMES, M. R. - 1967. Nota sobre a determinação do K assimilável dos solos pelo método microbiológico do *Aspergillus inger* em confronto com métodos químicos. *Agronomia Lusitana*, 27 : 127-134.

46. MARQUES-GOMES, M. R. - 1967. Nota sobre a determinação do P assimilável dos solos pelo método microbiológico do *Aspergillus niger* em confronto com métodos químicos. *Agronomia Lusitana*, 27 : 185 - 190.
47. MARTÍNEZ-ZAPORTA, M. - 1964. Fruticultura. *Inst. Nac. Inv. Agr.*, Madrid (1.004 p.).
48. MEHLICH, A. - 1939. Growth of *Cunninghamella blakesleeana* as influenced by forms of nitrogen and phosphorus under varying conditions. *Soil Sci.*, 48 : 121-133.
49. MEHLICH, A.; E. TRUOG y E. B. FRED. - 1933. The *Aspergillus niger* method of measuring available potassium in soil. *Soil Sci.*, 35 : 259-279.
50. MISHUSTIN, E. N. y V. K. SHILNIKOVA. - 1969. The biological fixation of atmospheric nitrogen by free-living bacteria (p.: 65-124). En: "Soil Biology: Reviews of Research", UNESCO, París (240 p.).
51. MOLINA, J. S. - 1965. Fuentes de carbono utilizadas por el *Azotobacter* en suelos alcalinos (p.: 81-82). En: *Progresos en Biología del Suelo*, Actas del Primer Coloquio Latinoamericano de Biología del Suelo (E. H. Rapoport, Ed.). *Centro de Coop. Cient. de la UNESCO para América Latina*, Bahía Blanca (716 p.).
52. MOLINA, J. - 1967. Acidificación de suelos alcalinos por ácidos orgánicos. *Tranqueras abiertas* (60) : 29-34.
53. MOLINA, J. - 1969. La placa de tierra moldeada y sus posibilidades en el análisis de suelos (p.: 168-172). En: "Actas 5ª Reunión Arg. de la Ciencia del Suelo (*Soc. Arg. Cienc. del Suelo*, Ed.), Santa Fe (752 p.).
54. MOLINA, J. y C. SAUBERÁN. - 1954. Una modificación al método de las placas de tierra moldeada. *Ciencia e Investigación*, 10 : 418-420.
55. MONSALVO, M. J. - 1966. Cómo tomar muestras de suelo. (Circ. ext. n° 22). INTA (*Centro Reg. Pampeano*), La Pampa (4 p.).
56. NELSON, C. E.; R. E. EARLY y A. MORTENSON. - 1965. Nitrogen fertilization of corn in relation to soil nitrate nitrogen (Circ. n° 453). *Wash. Agr. Exp. Sta.*, Washington.
57. PETERSON, R. G. y L. D. CALVIN. - 1965. Sampling. En: "Methods of soil analysis". (Black, C. A. - Ed.). *Amer. Soc. of Agron.* (Agronomy n° 9), Madison.
58. PARKINSON, D.; T. R. GRAY y S. T. WILLIAMS. - 1971. Methods for studying the ecology of soil microorganisms. IBP Handbook n° 19. *Blackwell Sci. Pub.*, Oxford (118 p.).
59. POCHON, J. - 1954. Manuel technique d'analyse microbiologique du sol. *Masson*, París (124 p.).
60. POCHON, J. y P. TARDIEUX. - 1962. Technique d'analyse en microbiologie du sol. *La Tourelle*, St. Mandé (112 p.).
61. POCOHON, J. y Y. TCHAN. - 1948. Présis de microbiologie du sol. *Masson*, París (224 p.).
62. PRIANO, L. J.; J. A. de ORELLANA; F. EMILIANI; T. GUTIÉRREZ; C. COPES y R. BRANDI. - 1969. Ensayo de encalado sobre alfalfa en un suelo de Angel Gallardo (p.: 635-638). En: "Actas 5ª Reunión Arg. de la Ciencia del Suelo. *Soc. Arg. Cienc. del Suelo*, Santa Fe (752 p.).
63. PRIANO, L. J. y M. A. MARTÍNEZ-LAURÍA. - 1971. Comunicaciones personales.
64. QUIJANO, C. - 1969. Utilización de la placa de tierra moldeada de Winogradsky para evaluar la disponibilidad de nutrientes en suelos de Corrientes (p.: 184-188). En: "Actas 5ª Reunión Arg. de la Ciencia del Suelo". *Soc. Arg. Cienc. del Suelo*, Santa Fe (752 p.).

65. RICHARDS, L. A. (Editor). - 1964. Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y só-dicos (3ª edición). *Instituto Nac. de Inv. Agríc.*, México (174 p.).
66. RIGNEY, J. A. y J. F. REED. - 1945. Some factors affecting the accuracy of soil sam-pling. *Proc. Soil Sci. Soc. Amer.*, 10 - 257-259.
67. SACKETT, W. G. y L. C. STEWART. - 1931. A bacteriological method for determining soil deficiencies by the use of the soil plaque (Bull. nº 375). *Colorado Exp. Sta.*, Co-lorado (36 p.).
68. SASSON, A. - 1967. Recherches ecophysiologiques sur la flore bacterienne de sols de regions arides du Maroc. *Travaux de l'Institut Scientifique Cherifien et de la Fac. des Sciences; Serie Botanique et Biol. vegetale nº 30*, Rabat (232 p.).
69. SCHALCHA, E. y O. BENTJERODT. - 1969. Determinación microbiológica de fósforo y de cinc en suelos "trumaos". *Agricultura Técnica* (Chile), 29 (1) : 23-28.
70. SCHENKEL, G. - 1971. Evaluación de la fertilidad del suelo mediante la producción de materia seca en ensayos de macetas. *Turrialba*, 21 (3) : 253 - 262.
71. SÍVORI, O. V. - 1968. Caja microbiológica de campaña. *Tranqueras Abiertas*, 6 (70/71): 43 - 45.
72. SORIANO, S. - 1971. Fundamentos, metodología y aplicaciones de la microbiología del suelo (p.: 59-79). En: "Acto de recepción del Académico de Número Ing. Agr. Santos Soriano". *Academia Nac. de Agr. y Vet.*, 25 (8) : 49-79.
73. STALLINGS, J. H. - 1962. El suelo, su uso y mejoramiento. *CECSA*, México (480 p.).
74. STRITZEL, J. A. - 1963. Take a good soil sample (Pamphlet nº 287, Rev.). *Iowa State Univ., Coop. Ext. Service*, Iowa (6 p.).
75. TCHAN, Y. T. - 1959. Study of soil algae, III: Bioassay of soil fertility by algae. *Plant and Soil*, 10 (3) : 220-233.
76. TCHAN, Y. T. - 1968. Importance of systematics of *Azotobacter* in the study of its eco-logy (p.: 115-124). En: 9th. Int. Congress of Soil Science Transactions, vol. 2, paper nº 12.
77. TISDALE, S. L. y W. L. NELSON. - 1970. Fertilidad de los suelos y fertilizantes. *Montaner y Simón*, Barcelona (762 p.).
78. VOSS, R. D.; J. J. HANWAY y J. T. PESEK. - 1965. A new approach to liming acid soils (Pamphlet 315). *Iowa St. Univ. of Sci. and Tech., Coop. Ext. Serv.*, Iowa (12 p.).
79. WALKER, R. H. y J. L. SULLIVAN. - 1929. The spontaneous culture method for studying the nonsymbiotic nitrogen-fixing bacteria in the soil. *Proc. Iowa Aca. Sci.*, 36: 35-61.
80. WELCH, C. D.; J. H. VALENTINE y R. L. MCCLUNG. - s/ fecha. - Test your soil for profits (L-265). *Texas Agroc. Ext. Serv.*, Texas (8 p.).
81. WIERINGA, K. T. - 1957. The descriptive chart of the biological examination of the soil. *Pedologie*, 7: 79-88.
82. WINOGRADSKY, S. - 1925. Etudes sur la microbiologie du sol, II: Sur les microbes fixa-teurs de l'azote. *Ann. Int. Pasteur* 40: 455-520.