

06.62.07

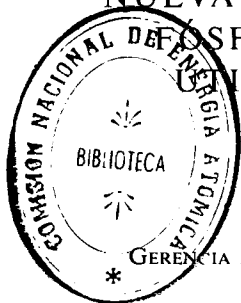
ARCHIVO PUBLICACIONES	
Nº 1	AÑO 1962

NUEVA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE
FÓSFORO LÁBIL EN SUELOS (VALOR "L")
UTILIZANDO *AZOTOBACTER* EN CULTIVO
ESPONTANEO

A. H. MERZARI, R. A. GHELFI Y E. O. BRENZONI
LABORATORIO DE FERTILIDAD Y NUTRICIÓN VEGETAL,
GERENCIA DE ENERGÍA, COMISIÓN NACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA, BUENOS AIRES,
ARGENTINA

Reprinted from
"RADIOISOTOPES IN SOIL-PLANT NUTRITION STUDIES"

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY
VIENNA 1962



NUEVA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE FOSFORO LÁBIL EN SUELOS (VALOR "L") UTILIZANDO *AZOTOBACTER* EN CULTIVO ESPONTANEO*

A. H. MERZARI, R. A. GHELFI Y E. O. BRENZONI

LABORATORIO DE FERTILIDAD Y NUTRICIÓN VEGETAL,

GERENCIA DE ENERGÍA, COMISIÓN NACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA, BUENOS AIRES,

ARGENTINA

Abstract — Résumé — Аннотация — Resumen

A new technique for the determination of labile phosphorus in soils ("L" values) using *Azotobacter* naturally present in the soil. Micro-organisms offer a well-known method of detecting the presence of certain elements in the soil.

This biological method gives results comparable to those yielded by chemical and spectrographic methods, and its sensitivity is very useful in the assessment of micro-elements.

In agronomy, and specifically with regard to the soil-plant relationship, bioradioisotope methods have led to techniques through which the labile phosphorus in the soil can be determined by using plants and P^{32} .

It was thanks to a reference on the Portuguese exhibit at the "Radioisotopes in Agriculture" exhibition in Vienna in 1960 that the authors first heard of using micro-organisms instead of plants, *Aspergillus niger* being used to determine the labile potassium content of soils.

The reference led the authors to try a similar method for determining the labile phosphorus content of soils. They used *Azotobacter* instead of plants in view of its sensitivity to phosphorus and the ease with which it can produce natural colonies on plates of moulded soil provided with an adequate carbon source.

Winogradsky's precept was also kept in mind, that is, to be sufficiently precise to justify standard use, the microbiological test—as all experiments, in field or test-tube, with higher plants—must be direct, i. e. be based on cultivation in the soil to be investigated.

The new technique consists in determining the "L", or Larsen value, the higher plants (in this case barley—*Hordeum vulgare*) being replaced by *Azotobacter* naturally present in the soil.

Two microcuries of $KH_2P^{32}O_4$ are added to 50 g of air-dried and sieved soil, with enough distilled water to make a mouldable paste. This paste is transferred to a 10-cm-diam. petri dish and left for 48 h to allow isotopic exchange. Filter papers are then placed on the soil, four or five drops of ethyl alcohol are added, and the petri dishes are left at 28—30°C. The *Azotobacter* develops on the filter paper and is collected after 48 h. This is ashed, dissolved in 1:1 HCl and brought to volume. Aliquots are used for counting and in the photocolorimetric determination of the phosphorus content. The "L" value formula is applied in order to obtain the final results.

The authors conclude that, with this new technique, the labile phosphorus content of a soil and its characteristics with respect to this nutrient from an agricultural point of view, can be established.

It also has the following advantages over the plant method:

- 1) The experiment takes less time—5 d for *Azotobacter* collected after 48 h as compared with 30 d for plants harvested after 21 d;

* Trabajo realizado en el Laboratorio de Aplicaciones Agrícolas, Gerencia de Energía, Comisión Nacional de Energía Atómica, Argentina.

- (2) The seed phosphorus factor—considered a major source of error in the plant method—is eliminated;
- (3) The number of trials can easily be increased;
- (4) Simplification of the procedures prior to the determination and elimination of factors of error.

Nouvelle méthode de détermination du phosphore labile dans les sois (valeur de «L») par l'emploi d'*Azotobacter* en culture spontanée. L'emploi des micro-organismes pour la détermination de certains éléments dans le sol est fort répandu.

Ces méthodes biologiques sont comparables, quant à leurs résultats, aux méthodes chimiques et spectrographiques; étant donné leur grande sensibilité, elles sont très utiles pour l'évaluation des microéléments.

En agronomie — plus particulièrement en phytopédologie — l'adoption des méthodes biologiques associées à l'emploi des radioisotopes a permis l'application de techniques permettant de déterminer le phosphore labile du sol au moyen de plantes et de ^{32}P .

Les auteurs n'ont trouvé mention de l'emploi des micro-organismes à la place des plantes que dans une notice concernant la participation du Portugal à l'exposition «Les radioisotopes dans l'agriculture», qui a eu lieu à Vienne en 1960; on y expliquait que des chercheurs portugais avaient utilisé *Aspergillus niger* pour déterminer la teneur des sols en potassium labile.

Cette indication a incité les auteurs à faire une expérience analogue pour établir la quantité de phosphore labile contenue dans les sols; ils ont utilisé l'*Azotobacter* à la place des plantes, étant donné la sensibilité de ce micro-organisme à l'égard du phosphore et son aptitude à produire des cultures spontanées sur des plaques de terre plastique comportant une source de carbone appropriée.

Les auteurs se sont également inspirés des concepts de Winogradsky, selon lesquels «l'épreuve microbiologique ne pourra prétendre au degré d'exactitude nécessaire pour être employée couramment que si elle est faite directement, c'est-à-dire fondée sur la culture dans le sol étudié, et pratiquée — comme toute expérience portant sur les végétaux supérieurs — en pot ou en champ».

La nouvelle méthode consiste à déterminer la valeur de «L», en valeur de Larsen, en remplaçant les plantes supérieures (en l'occurrence *Hordeum vulgare*) par l'*Azotobacter* en culture spontanée.

On prend 50 g de sol séché à l'air et tamisé, auquel on ajoute 2 μC de $^{32}\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ et de l'eau distillée en quantité suffisante pour former une pâte plastique. Cette pâte est insérée dans une boîte de Petri, de 10 cm de diamètre; on l'y laisse pendant 48 heures pour permettre l'échange isotopique. Ensuite, on place sur le sol ainsi préparé deux papiers filtres ainsi qu'un troisième dont le dessus a été mouillé; on y verse 4 à 5 gouttes d'alcool éthylique et on procède à l'incubation à une température de 28 à 30° C. L'*Azotobacter* qui se développe à la surface du papier est recueilli au bout de 48 heures. On le réduit en cendres que l'on dissout dans une quantité égale de HCl, puis on étend la solution de manière à l'amener au volume désiré. Des parties aliquotes sont utilisées pour le comptage et la détermination du phosphore par photocolorimétrie. On applique enfin la formule donnant la valeur de «L» pour obtenir les résultats définitifs.

D'après les auteurs, cette nouvelle méthode permet de déterminer la teneur d'un sol en phosphore labile et de caractériser ce sol, du point de vue agricole, par rapport à cet élément nutritif.

Comparée à la méthode fondée sur l'emploi de plantes, la nouvelle méthode présente les avantages suivants:

1. Durée moindre de l'expérience: 5 jours avec l'*Azotobacter*, qui est recueilli au bout de 48 heures, contre 30 jours avec des plantes recueillies après 21 jours.
2. Elimination du phosphore dans la semence, ce facteur étant considéré comme l'une des principales sources d'erreur de la méthode fondée sur l'emploi de plantes.
3. Possibilité de répéter l'expérience à volonté.
4. Simplification des stades préalables à la détermination proprement dite et, de ce fait, élimination de sources d'erreur.

Новый метод определения неустойчивого фосфора в почвах (величина „L“) путем использования азотобактерии дикорастущего растения. Весьма распространено использование микроорганизмов для определения некоторых элементов в почве.

Эти биологические методы по своим результатам сравнимы с химическими и спектрографическими методами; будучи более чувствительными, эти методы очень полезны для оценки микроэлементов.

В агрономии, особенно в том, что касается отношений между почвой и растением, биологические методы с использованием радиоизотопов, дали возможность применять методики, позволяющие определять неустойчивый фосфор в почве с помощью растений и P-32.

Авторы нашли упоминание об использовании микроорганизмов вместо растений только в заметке, касающейся участия Португалии в выставке „Радиоизотопы в сельском хозяйстве“, которая состоялась в Вене в 1960 году. В ней объяснялось, что португальские исследователи использовали *Aspergillus niger* для определения содержания неустойчивого калия в почвах.

Эти данные побудили авторов к проведению аналогичного опыта для того, чтобы установить количество неустойчивого фосфора, содержащегося в почвах. Они использовали азотобактерии вместо растений, учитывая его чувствительность в отношении фосфора и его способность образовывать естественные колонии на пластинках из пластической земли, содержащей источник соответствующего углерода.

Авторы руководствовались также концепциями Виноградского, согласно которым „микробиологический опыт может достигнуть степени точности, необходимой для быстрого использования, только в том случае, если он проводится непосредственно, т.е. проводится на растении, выращенном на изучаемой почве и практикуемый, как всякий опыт, над высшими растениями, в горшке или в поле“.

Новый метод заключается в определении значения „L“ или величины Ларсена путем замены высших растений (в данном случае *Hordeum vulgaris*) азотобактерином дикорастущего растения.

Берут 50 г высушенной на воздухе и просеянной земли, куда добавляют 2 микрокури $P^{32}O_4 H_2K$ и дистиллированную воду в количестве, достаточном для образования пластической массы. Эта масса помещается в чашку Петри, диаметром в 10 см, где ее оставляют в течение 48 часов для того, чтобы произошел изотопный обмен. Затем размещают на подготовленной таким образом почве три листа фильтровальной бумаги, причем третий лист смочен сверху; сюда капают 4—5 капель этилового спирта и инкубируют при температуре 28—30°C. Азотобактерии, который развивается на поверхности бумаги, собирают по прошествии 48 часов, превращают его в пепел и растворяют в равном количестве HCl, а затем разбавляют этот раствор таким образом, чтобы довести его до желаемого объема. Две аликвотные части используются для подсчета и определения фосфора путем фотоколориметрии. Наконец, по формуле для значения „L“ подсчитывают окончательные результаты.

По мнению авторов, этот новый метод дает возможность установить содержание неустойчивого фосфора в почве и дать характеристику этой почве с точки зрения сельского хозяйства относительно этого питательного элемента.

Новый метод, по сравнению с методом, основанным на использовании растений, имеет следующие преимущества:

1. Меньшая продолжительность опыта: 5 дней с азотобактерином, который собирается по истечении 48 часов против 30 дней с растениями, собираемыми после 21 дня.
2. Удаление фосфора из семян считается одним из главных источников погрешности метода, основанного на использовании растений.
3. Возможность, при желании, повторения опыта.
4. Упрощение предварительных стадий при самом определении и, поэтому, исключение источника ошибок.

Nueva técnica para la determinación de fósforo lábil en suelos (valor “L”) utilizando *Azotobacter* en cultivo espontáneo. La utilización de microorganismos para la determinación de ciertos elementos en el suelo es ampliamente conocida. Los resultados de estos métodos biológicos son comparables con los métodos químicos y espectrográficos y su sensibilidad los ha hecho muy útiles para la valoración de microelementos.

En Agronomía, y específicamente en lo atinente a la relación suelo-planta, la adopción de métodos biorradioisotópicos ha dado lugar a técnicas que permiten determinar el fósforo lábil del suelo mediante la utilización de plantas y P^{32} . El uso de microorganismos en reemplazo de las plantas, sólo ha podido ser comprobado por los autores mediante una noticia referente a lo expuesto por Portugal en la Exposición "Radioisótopos en Agricultura", realizada en Viena en 1960, según la cual se utiliza *Aspergillus niger* para determinar potasio lábil en suelos.

El conocimiento de este hecho indujo a los autores a tentar algo similar con respecto a la determinación de fósforo lábil en suelos utilizando *Azotobacter* en reemplazo de las plantas, teniendo en cuenta la sensibilidad de este microorganismo en cuanto al fósforo y su facilidad para producir cultivos espontáneos sobre placas de tierra moldeada provistas de una adecuada fuente carbonada.

Relacionado con esto se han tenido en cuenta los conceptos de Winogradsky de que "para que la prueba microbiológica pueda pretender un grado de exactitud suficiente para su empleo corriente, deberá ser necesariamente directa, es decir, basada sobre el cultivo en la tierra que se ensaya; a la manera de toda experiencia con vegetales superiores, en maceta o a campo".

La nueva técnica consiste en determinar el valor "L", conocido como valor de Larsen, reemplazando a las plantas superiores, en este caso cebada (*Hordeum vulgare*), por *Azotobacter* en cultivo espontáneo.

Se parte de 50 g de suelo secado al aire y tamizado al que se agregan 2 μ c de $P^{32}O_4H_2K$ y agua destilada en cantidad suficiente para hacer una pasta moldeable. Dicha pasta se transfiere a una caja de Petri de 10 cm de diámetro y se deja 48 horas para el intercambio isotópico. Luego se colocan sobre el suelo dos papeles de filtro y otro humedecido en la tapa, más 4 ó 5 gotas de alcohol etílico y se incuba a 28°—30°C. El *Azotobacter* se desarrolla en la superficie del papel y es cosechado a las 48 horas. Se incinera, se disuelve con HCl 1:1 y se lleva a volumen. Partes alicuotas se utilizan para el conteo y la determinación de fósforo fotocolorimétricamente. Finalmente se aplica la fórmula de valor "L" para la obtención de los resultados definitivos.

Los autores concluyen que la nueva técnica permite la determinación de fósforo lábil de un suelo y su caracterización respecto a este nutriente desde el punto de vista agrícola. Presenta además las siguientes ventajas con respecto al método con plantas:

1. Menor duración de la experiencia: 5 días para el *Azotobacter* cosechado a las 48 horas contra 30 días para el caso de plantas cosechadas a los 21 días.
2. Eliminación del factor fósforo de las semillas considerado como una de las mayores fuentes de error del método con plantas.
3. Facilidad para aumentar el número de repeticiones.
4. Simplificación de los pasos previos a la determinación y, por ende, eliminación de factores de error.

La utilización de microorganismos para la determinación de ciertos elementos en el suelo es ampliamente conocida. Los resultados de estos métodos biológicos son comparables con los de los métodos químicos y espectrográficos y a ello se agrega su mayor sensibilidad, lo que los ha hecho muy útiles respecto a la presencia y valoración de microelementos.

O. G. BENTLEY *et al.* [1] utilizaron *Lactobacillus arabinosus* para dosar manganeso; E. G. MULDER [2] determinó cobre, zinc, magnesio y molibdeno utilizando *Aspergillus niger*; P. MANIL [3] y P. MANIL *et al.* [4] dosan fósforo por medio del *A. niger*; J. KAUFFMANN [5] usa *Corynebacterium auranticum* con el mismo objeto y N. E. MICHOUSTINE [6] *Azotobacter chroococcum*, *Aspergillus oryzae* y *Cunninghamella* sp.

Con el desarrollo de la ciencia atómica y las posibilidades que presentan la utilización de los radioisótopos, los métodos químicos tradicionales también sufrieron modificaciones mediante la adaptación de elementos radiactivos a las prácticas analíticas.

En Agronomía, y específicamente en lo atinente a la relación suelo-planta, la adopción de métodos biorradioisotópicos implica un enfoque más racional de los problemas

a dilucidar y en ese sentido, las determinaciones de fósforo lábil mediante la utilización de plantas y ^{32}P han aportado elementos de investigación importantes.

En este nuevo campo que se abre a la inquietud de los investigadores en materias agronómicas, la utilización de microorganismos en reemplazo de las plantas, sólo ha podido ser comprobada por los autores a través de un trabajo portugués en el cual se utiliza *Aspergillus niger* para determinar potasio lábil en suelos [7].

El conocimiento de ese hecho nos indujo a tentar algo similar con respecto a la determinación de fósforo lábil en suelos utilizando *Azotobacter* en reemplazo de las plantas.

"La sensibilidad de los *Azotobacter* a la presencia, ausencia o a dosis insuficientes de ciertos elementos minerales en los medios de cultivo (o en el suelo) es tan grande, que podemos servirnos de estos microorganismos como test de diversas carencias". (POCHON y DE BARJAC [8]). Entre estos elementos el fósforo es de gran importancia en su metabolismo y está relacionado directamente con su capacidad de fijación del nitrógeno atmosférico. Según los autores antes citados, se ha podido calcular que para fijar 5 mg de nitrógeno el *Azotobacter* debe metabolizar 1 mg de fósforo.

Otro hecho que nos indujo a utilizar el *Azotobacter* sobre otras especies de microorganismos también utilizadas en análisis biológicos de fósforo, reside en la facilidad con que este microorganismo puede producir cultivos espontáneos sobre placas de tierra moldeada, cuando se lo provee de una adecuada fuente carbonada. (WINOGRADSKY [9].) La reproducción del *Azotobacter* se realiza en este caso en condiciones que se asemejan mucho a las naturales.

Este aspecto nos interesaba sobre todo, ya que de esta manera lo único que reemplazábamos en el método de las plantas de cebada para determinar el valor "L" o valor de Larsen con respecto al fósforo lábil, era el ente biológico, permaneciendo igual el sustrato. Además, y coincidiendo con Winogradsky, "para que la prueba microbiológica pueda pretender un grado de exactitud suficiente para su empleo corriente, deberá ser necesariamente directa, es decir, basada sobre el cultivo en la tierra que se ensaya; a la manera de toda experiencia con vegetales superiores, en maceta o a campo".

En relación con los cultivos espontáneos, deberán tenerse en cuenta las observaciones de Winogradsky y la relación que la falta de desarrollo puede tener no con la carencia de fósforo sino de otros macroelementos de gran importancia agrícola como el calcio y el potasio.

1. Experiencias realizadas

Determinación del valor "L" (fósforo lábil) utilizando plantas de cebada y ^{32}P en forma de $^{32}\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$. Se ha seguido la técnica descrita por R. A. GHELFI y E. O. BREZONI [10].

*Determinación del valor "L" (fósforo lábil) utilizando *Azotobacter* en cultivo espontáneo en reemplazo de la cebada.* El método consiste en determinar el valor "L", conocido como valor de Larsen, reemplazando las plantas superiores, en nuestro caso cebada (*Hordeum vulgaris*), por *Azotobacter* sp. en cultivo espontáneo.

Modo de operar. Se pesan exactamente 50 g del suelo en estudio, previamente secado al aire y tamizado por malla de 2 mm y se mezclan con agua destilada en la proporción conveniente para hacer una pasta moldeable (es preferible un ligero exceso de humedad, lo que permitirá una mejor distribución del suelo en la caja de Petri, exceso que desaparecerá

durante las 48 horas del intercambio isotópico, por evaporación). En el agua utilizada o separadamente al suelo pesado, se agrega una cantidad medida de una solución de $^{32}\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ que estará proporcionada a la actividad de la solución original, al volumen total del agua a agregar y a la actividad que deseamos en cada una de las cajas. Nuestra experiencia nos permite considerar conveniente partir de una solución radiactiva que contenga $2\text{ }\mu\text{c}$ por ml agregándose 1 ml de esta solución por caja de Petri.

La mezcla de suelo, agua y solución radiactiva se hace en cápsulas de porcelana de 10 cm de diámetro previamente taradas y luego se transporta a las cajas de Petri tratando de incorporar la mayor parte del material. Para el amasado y el transporte se utilizan espátulas de acero inoxidable. Lo que queda en las cápsulas se deja secar al aire y luego se restará del total de 50 g para obtener el peso definitivo del suelo por cada caja.

Se dejan las cajas en reposo durante 48 horas para permitir el intercambio isotópico, pero a las 24 horas es conveniente colocar en la tapa de la caja de Petri un papel de filtro embebido en agua destilada para prevenir un exceso de evaporación.

Cumplidas las 48 horas se coloca sobre el suelo de las cajas un disco de papel de filtro Schleicher y Schull N° 589², banda blanca, que cubra toda la superficie ocupada por el suelo asentándolo con un rastrillo de acero inoxidable. Sobre este primer papel se superpone un segundo, de menor diámetro para impedir se contamine con suelo de los bordes; este papel debe ser de grano fino, recomendándose el Schleicher y Schull N° 589³, banda azul. Si es necesario se vuelve a humedecer el papel de filtro de la tapa de la caja y se agregan sobre el mismo 4 ó 5 gotas de alcohol etílico de 96° como fuente carbonada para el *Azotobacter*. Las cajas se colocan a partir de este momento en estufa a 28°—30°C y se cosechan a las 48 horas.

La cosecha del *Azotobacter* se efectúa de la manera siguiente: con una pinza se toma el disco de papel de filtro de menor diámetro y se lo extrae totalmente. Sobre éste tendremos el desarrollo microbiano sin contaminación de suelo del cual lo separa el primer papel. El conjunto de papel y microorganismos se seca a estufa de 75°—80°C durante 2 h y luego se calcina en mufla a 500°C hasta cenizas blancas. Es conveniente iniciar la calcinación con 200° durante 2 h para luego subir a 500° durante un tiempo similar.

Las cenizas, una vez enfriadas, se tratan con 1 ml de agua destilada y 1 ml de ácido clorhídrico 1:1, calentando suavemente, y si es necesario con algunas gotas de ácido nítrico concentrado y agua oxigenada al 50%. Luego se lleva a volumen en matraz de 25 ml, se centrifuga si se nota alguna suspensión de material, y se toman 10 ml del sobrenadante para el conteo de ^{32}P y entre 5 y 7 ml para la determinación de fósforo fotocolorimétricamente. Por lo general, y si se ha seguido bien la marcha detallada, la centrifugación no es necesaria.

Posteriormente, y en base a las determinaciones anteriores, se halla el valor "L" de acuerdo con la fórmula:

$$L = \frac{Y_f \times X_p}{Y_p} - X_f$$

Donde

Y_p = Contenido de ^{32}P en el *Azotobacter* cosechado

X_p = Contenido total de P del *Azotobacter*

Y_f = ^{32}P agregado al suelo

X_f = ^{31}P agregado al suelo

L = Valor de Larsen

2. Resultados obtenidos

Véanse los Cuadros I, II y III.

3. Discusión

Desde el punto de vista agronómico, la determinación del fósforo lábil de un suelo dado reviste mucha importancia, si consideramos la implicancia de dicho elemento en el proceso fotosintético, el metabolismo celular, transporte de energía en el vegetal, formación y desdoblamiento de sustancias hidrocarbonadas, etc.

CUADRO I

COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE VALOR "L" UTILIZANDO CEBADA Y AZOTOBACTER

Repetición N°	<i>Azotobacter</i> 48 hs. mg P/50 g de suelo	Cebada 21 días 10 plantas mg P/500 g de suelo
1	5,73	48,65
2	5,69	51,28
3	5,97	51,90
4	5,05	47,00
5	5,29	54,03
6	—	56,29
7	—	50,36
8	—	47,22
Promedio	5,55	50,84

Suelo N° 1. Suelo agrícola de Pergamino (Provincia de Buenos Aires). Buen contenido de materia orgánica, franco-limo-arcilloso. pH = 7,85. Horizonte A.

CUADRO II

COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE VALOR "L" UTILIZANDO CEBADA Y AZOTOBACTER

Repetición N°	<i>Azotobacter</i> 48 hs. mg P/50 g de suelo	Cebada 18 días 4 plantas mg P/500 g de suelo
1	2,98	41,22
2	3,33	35,06
3	3,19	38,70
4	2,87	39,21
5	3,94	—
6	3,70	—
Promedio	3,33	38,55

Suelo N° 2. Proveniente de San Martín (Provincia de Buenos Aires). Bien provisto de materia orgánica. Suelo franco-limo-arcilloso. pH = 7,0. Horizonte A.

CUADRO III

COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE VALOR "L" UTILIZANDO CEBADA Y *AZOTOBACTER*

Repetición N°	<i>Azotobacter</i> 48 hs.	Cebada 28 días
	mg P/50 g de suelo	5 plantas mg P/500 g de suelo
1	0,57	5,622
2	1,00	6,750
3	1,13	6,466
4	1,24	7,526
5	0,84	—
6	1,28	
Promedio	1,01	6,591

Suelo N° 3. Proveniente de La Banda (Provincia de Santiago del Estero). Suelo agrícola de zona de regadío. Franco-arcilloso. pH = 8,8. Horizonte A.

El llamado fósforo "asimilable", determinado por métodos químicos no representa, a la luz de los conocimientos actuales, a la totalidad del fósforo disponible por el vegetal, puesto que junto a los compuestos puramente químicos encontramos fósforo sorbido en los complejos coloidales.

Este fósforo sorbido asume dos aspectos: uno en forma desplazable o intercambiable, y otro en forma fija, que entra a formar parte de la estructura cristalina de los minerales de arcilla.

De acuerdo con L. NIJENSOHN [11] el conjunto de iones PO_4 aparece integrando dos grupos: el sujeto a la agitación termodinámica y el realmente inmóvil. Según este autor, los iones PO_4 sujetos a la agitación termodinámica tienen tendencia a difundirse o expandirse. Esta tendencia se caracteriza en cada caso particular por el *potencial electroquímico*.

Cuando el sistema se halla en equilibrio este potencial es igual en todos sus puntos. En caso de ruptura del mismo, el conjunto reacciona para restablecer la uniformidad del potencial. Por ejemplo, este equilibrio se rompe como resultado de la absorción radicular. Los iones que participan en el restablecimiento del equilibrio son los llamados *activos*.

Es importante en este caso determinar la cantidad de iones PO_4 que participan y la velocidad con que se llega al nuevo equilibrio. La velocidad está en relación con el grado de movilidad de los iones, el que depende de su potencial químico.

La aplicación de técnicas de análisis por dilución isotópica para la determinación de fósforo lábil en suelos utilizando plantas es bien conocida, gracias a los trabajos de LARSEN [12], SCOTT RUSSELL *et al.* [13], FRIED y DEAN [14] y en nuestro país R. A. GHELFI y E. O. BRENZONI.

Brevemente las mismas consisten en el agregado al suelo de fósforo radiactivo (^{32}P), sembrar sobre este suelo la planta y comparar luego las actividades específicas del fósforo en el suelo y en la planta.

Hecha la siguiente relación:

$$\frac{{}^{32}\text{P en la planta}}{{}^{31}\text{P en la planta}} = \frac{{}^{32}\text{P agregado al suelo}}{{}^{31}\text{P del suelo}}$$

se puede despejar ${}^{31}\text{P}$ del suelo, que es la única incógnita, pues los otros valores son medibles directamente.

El reemplazo, en nuestro caso, de las plantas superiores (cebada) por *Azotobacter* sp. en cultivo espontáneo, está basado en la gran sensibilidad de este microorganismo con respecto al fósforo y en su necesidad de este nutriente que es similar a la de las plantas.

La técnica desarrollada ofrece algunas ventajas como es la eliminación de un importante factor de error en la determinación con plantas, que es el fósforo de las semillas. También deja un amplio campo a la iniciación de estudios de desorción, modificando los tiempos de cosecha.

Para la realización de las experiencias se han elegido tres suelos, de alto, medio y bajo contenido de fósforo lábil. Del análisis de los resultados podemos concluir que en los casos considerados la nueva técnica propuesta permite, a través de la determinación del valor "L" utilizando *Azotobacter* en cultivo espontáneo, tener una visión amplia sobre la disponibilidad de fósforo en un suelo.

Los resultados obtenidos nos dicen también que la mayor diferencia se observa, con respecto al método de las plantas, en el caso extremo (Suelo N° 3). Consideramos que esto podría ser explicado por producirse una más rápida desorción a través del desarrollo de *Azotobacter* a lo que se podría agregar, dado el tipo de suelo ensayado, la influencia, en el caso de las plantas, de la especie utilizada.

4. Conclusiones

1° La nueva técnica objeto del presente trabajo permite la determinación del fósforo lábil de un suelo y su caracterización general respecto a este nutriente.

2° Presenta además las siguientes ventajas con respecto al método con plantas:

- a) Menor duración de la experiencia; 5 días para el *Azotobacter* cosechado a las 48 horas contra 30 días para el caso de plantas cosechadas a los 21 días.
- b) Eliminación del factor fósforo de las semillas, considerado como una de las mayores fuentes de error del método con plantas.
- c) Facilidad para aumentar el número de repeticiones
- d) Simplificación de los pasos previos a la determinación y por ende, eliminación de factores de error.
- e) Eliminación del riego.
- f) Eliminación de la mezcla de suelo con arena.

REFERENCIAS

- [1] BENTLEY, O. G. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **170** (1947) 343.
- [2] MULDER, E. G., *Atti VI Congr. Intern. Microb.*, Roma **6** s.18 (1953) 293.
- [3] MANIL, P., *Arch. Intern. Physiol.* **61** (1953) 265.
- [4] MANIL, P. *et al.*, *Bull. Inst. agron. Gembloux* **24** (1956) 143.
- [5] KAUFFMANN, J., *Ann. Inst. Pasteur* **85** (1953) 247.
- [6] MICHOUSTINE, N. E., Citado en [8].
- [7] TEIXEIRA de VASCONCELOS, Laura R. Tesis inédita.

- [8] POCHON, J. y DE BARJAC, H., "Traité de Microbiologie des sols", Ed. Dunod, Paris (1958).
- [9] WINOGRADSKY, S., "Microbiologie du sol-Problèmes et Methodes", Ed. Masson et Cie., Paris (1949).
- [10] GHELFI, R. A. y BREZNONI, E. O., *Rev. Ing. agron.*, Buenos Aires, diciem. (1961).
- [11] NIJENSOHN, L., Actas de la Primera Reunión Arg. de la Cienc. del suelo, Buenos Aires (1960).
- [12] LARSEN, S., *Plant & Soil*, IV 1 (1952).
- [13] SCOTT RUSSELL, R. *et al.*, Actas Conf. int. util. EAFP, XII (Ginebra, 1955) 115.
- [14] FRIED, M. y DEAN, L. A., *Soil Sci.* 73 (1952) 263.

DISCUSSION

L. Dean: It would appear that the filter paper absorbed the water or soil solution from the soil and that the *Azotobacter* absorbed the phosphorus in turn from this filter paper. In other words, the *Azotobacter* is not directly in contact with the soil.

A. H. Merzari: We considered this problem and did an experiment in which the papers were placed on the soil without the addition of alcohol, so as to prevent the development of *Azotobacter*. We tested it at various temperatures, ranging from 2—3°C to 25—26°C and then determined the activity and the amount of phosphorus contained in the paper. The activity was zero and the amount of phosphorus practically negligible. The results were very different when the effect of the *Azotobacter* came into play.

C. G. Lamm: Have you tried to obtain several harvests in succession on the same soil in the same petri dish?

A. H. Merzari: Yes, we have, but the experiment was not continued because we found development of cellulolytic micro-organisms, not *Azotobacter*.

L. Mellado: For the method to be applicable to soil phosphorus, there must be a constant relation between the "L" value obtained with *Azotobacter* and the "L" value obtained with higher plants. Such a constant relation is not shown in the tables in the paper. How do you intend to overcome that difficulty?

A. H. Merzari: You will have noted that the greatest differences were found in soil No. 3. We used three soils in our experiments: No. 1 had a high content of labile phosphorus, No. 2 a medium content and No. 3 a low content. The latter, however, was also an alkaline soil (pH 8.8) and not very suitable for *Azotobacter*. I should point out that our technique is not intended to replace the method involving the use of higher plants. We merely consider that it is a rapid and simple means of obtaining a general idea of the labile phosphorus content of a particular soil.

M. Fried: Were the values which you got with *Azotobacter* compared with those obtained by the laboratory method for determining the so-called P³²-exchangeable phosphorus in the soil, where the soil is mixed with water and the specific activity of the solution is determined?

A. H. Merzari: No, we have not done this.

N. P. Datta: You state that the method has the advantage of permitting rapid determination of available phosphorus in soils. Could you tell me how the values obtained correlate with the responses of higher plants to phosphorus fertilizers under pot or field conditions?

A. H. Merzari: We have not worked with fertilized soils, but we believe that the proposed technique could be tested for use in determining the "A" value.

R. S. Mokady: Could someone restate the difference between "A" values and "L" values?

M. Fried: I shall be glad to. As I have already pointed out, the two concepts are quite different. The method by which they are determined depends on how they can best be satisfied on the basis of the knowledge now available. The underlying idea of the "A" value is that when a plant is confronted with two sources of a nutrient, it will take up nutrient from each of the sources in direct proportion to the amounts available from each source. The "L", or Larsen, value—as I understand it—is concerned with the use of the plant in determining the amount of phosphorus that will exchange in the soil at equilibrium. This amounts to using the plant as a pipette because you are sampling it under the moisture and soil conditions in which a plant actually grows rather than in artificial laboratory conditions. These are the differences in concept as I see them. I should be glad to stand corrected if others see them differently.

E. C. S. Little: Could you carry your definition further and say whether you consider that the "A" and "L" values should be the same as far as theoretical considerations are concerned?

M. Fried: I think that the most suitable time for discussing this question will be at the next session, after the presentation of the paper by Dr. Dean (p. 407) which will be concerned mainly with that problem.

Printed in Austria