

COMPARACION DE METODOS: ANALISIS QUIMICO Y MICROBIOLOGICO DE AZOTOBACTER. EN DETERMINACION DE FOSFORO Y POTASIO. EN SUELOS DE NICARAGUA.

Por

Francisco Barea Sandino

Tesis

Presentada a la consideración del Honorable Tribunal Examinador, como requisito parcial para obtener el Título de

INGENIERO AGRONOMO

Escuela Nacional de Agricultura y Ganadería  
Managua, Nicaragua, C.A.

COMPARACION DE METODOS: ANALISIS QUIMICO Y MICROBIOLOGICO DE AZOTOBACTER, EN DETERMINACION DE FOSFORO Y POTASIO, EN SUELOS DE NICARAGUA.

Por

Francisco Barea Sandino

Tesis

Presentada a la consideración del Honorable Tribunal Examinador, como requisito parcial para obtener el Título de

INGENIERO AGRONOMO

Escuela Nacional de Agricultura y Ganadería  
Managua, Nicaragua, C.A.

Aprobada: *Rebeca B.*  
Fecha: \_\_\_\_\_

### III

#### RECONOCIMIENTO

El autor agradece, al doctor Juan L. Eguaras y al Ingeniero Eliseo Ubeda, por los valiosos consejos con que contribuyeron al planeamiento y realización del presente trabajo. También, a los Ingenieros Noel Somarriba Barreto y César Estrada Rizo, quienes revisaron el original y, con sus sugerencias, contribuyeron a mejorar la redacción y presentación del trabajo escrito.

No es posible omitir la desinteresada colaboración de los bachilleres Petronio Argüello Sampson, Plácido Mena Bolaños y Dolores Reyes Benavente, quienes sacrificaron muchas horas de sus ratos libres, para ayudar en el trabajo de laboratorio.

Finalmente, el autor agradece a todos sus profesores, por los conocimientos básicos que le comunicaron, los cuales son indispensables para realizar un trabajo de esta naturaleza.

## IV

### DEDICATORIA

A mi madre:

Mercedes Sandino v. de Barea

A mis hermanos, en especial a:

Norma y Carlos Barea Sandino

A mi esposa:

Lily Flores de Barea

## CONTENIDO

Indice de cuadros y gráficos.....	VII
Introducción.....	I
Objetivos.....	3
Literatura Revisada.....	4
Clasificación botánica del <u>Azotobacter</u> .....	4
Descripción del género <u>Azotobacter</u> .....	4
<u>Azotobacter chroococum</u> .....	5
<u>Azotobacter agile</u> .....	5
<u>Azotobacter vitreum</u> .....	6
<u>Azotobacter beijerincky</u> .....	6
Aislamiento del <u>Azotobacter</u> .....	6
Nutrición del <u>Azotobacter</u> .....	7
Métodos usados en la determinación de nutrientes del suelo.....	8
Análisis químico de suelos.....	9
Análisis foliar.....	10
Pruebas de invernadero combinadas con el análisis de planta.....	10
Empleo de isótopos radioactivos.....	10
Pruebas biológicas.....	11
Métodos microbiológicos.....	11
Método experimental.....	14
Resultados y discusión.....	20
Conclusiones.....	23
Resumen.....	24

Bibliografía.....	31
Apéndice.....	34

## VII

### INDICE DE CUADROS Y GRAFICOS

CUADRO I	Consumo mundial de fertilizantes por regiones, entre 1937 y 1960, en millones de toneladas métricas.	Pag. No. 25
CUADRO II	Requerimientos de fertilizantes, estimados, para las metas nutricionales de 1980, en millones de toneladas métricas.....	Pag. No. 25
CUADRO III	Análisis químico de las muestras de suelo estudiadas.....	Pag. No. 26
CUADRO IV	Diagnóstico de fertilidad, de las muestras de suelo estudiadas, por medio del método de Azotobacter.	Pag. No. 27
CUADRO V	Comparación entre los resultados obtenidos con el método de análisis químico de suelos y el método de <u>Azotobacter</u> .....	Pag. No. 28
CUADRO VI	Tabla de correlación.....	Pag. No. 29
GRAFICA I	Interpretación gráfica de la correlación y regresión.....	Pag. No. 30

## I N T R O D U C C I O N

El consumo mundial de fertilizantes químicos aumenta cada año. Este incremento se debe al aumento del área agrícola tecnificada, en todos los países del mundo, principalmente, en los países desarrollados.

El incremento del consumo mundial de los fertilizantes, para un período de 22 años, fué de 17.7 millones de toneladas métricas. Se estima que para 1980, sólo los países sub-desarrollados tendrán un consumo de fertilizantes de 39.5 millones de toneladas métricas.-- Esto representa un incremento de 12.6 millones de toneladas métricas, sobre el consumo mundial de 1960.

Con el aumento de la población mundial y de las necesidades alimenticias, es muy probable que el consumo de los fertilizantes químicos sea cada vez mayor. Dada la importancia del aumento en el consumo de los fertilizantes, es imprescindible determinar las cantidades óptimas de fertilizante en el suelo, para obtener una producción rentable. Para tal fin, es necesario desarrollar una correlación entre los experimentos de campo y los métodos de análisis aplicados al suelo. (16)

Existen varios métodos de análisis de suelo, para determinar el grado o intensidad de la deficiencia de nutrientes. Estos se clasifican en: Análisis químico del suelo, Análisis de fitotejidos y Pruebas biológicas. Dentro de las pruebas biológicas se encuentran los métodos microbiológicos. De uno de éstos, el método de Azotobacter, se ocupa el presente trabajo.

Los métodos microbiológicos tienen ventajas sobre los otros métodos de análisis de suelo. En relación con el análisis químico,

se puede decir que éste extrae los nutrientes solubles a una solución determinada; en cambio con los métodos microbiológicos, se obtiene una respuesta biológica ( o sea que los nutrientes son extraídos por un organismo vivo) y resultan más baratos.

Este trabajo se realizó en los laboratorios de la Escuela Nacional de Agricultura y Ganadería de Nicaragua, durante los meses de Septiembre y Octubre de 1967; donde se hicieron determinaciones microbiológicas con el Azotobacter chroococum, en 15 muestras de suelos, recolectadas en diferentes regiones agrícolas del país. Los resultados obtenidos con el método de Azotobacter y el método de análisis químico, se sometieron al análisis estadístico de correlación. Se encontró correlación positiva entre ambos métodos, lo cual indica que el método de Azotobacter puede ser usado en el análisis de suelos, para diagnosticar la fertilidad en fósforo y potasio.

## O B J E T I V O S

Los objetivos del presente trabajo son los siguientes:

- A.- Probar el método microbiológico del Azotobacter en la determinación de fósforo y potasio en el análisis de suelos.
- B.- Comparar los resultados anteriores, con los del método de análisis químico de suelos, para determinar su correlación.

## LITERATURA REVISADA

Es necesario tener un buen conocimiento de la biología del *Azotobacter*, para poder usarlo con éxito en el diagnóstico de la fertilidad del suelo.

A manera de información general, se incluyen los siguientes datos, algunos de los cuales son indispensables para hacer un correcto uso del método.

Clasificación botánica del *Azotobacter*

Según la Sociedad Americana de Bacteriólogos, citado -- por Clark y Eguaras (3), el *Azotobacter* tiene la siguiente clasificación botánica:

ORDEN: Eubacteriales

FAMILIA: Nitrobacteriaceas

TRIBU: Azotobacterieas

GENERO: *Azotobacter*

ESPECIE TIPO: *Azotobacter chroococum*

Descripción del género *Azotobacter*

Bastones relativamente grandes, o cocos. Algunas veces tienen aspecto de levaduras. Obtienen la energía para su crecimiento, principalmente de hidratos de carbono. Móviles o no. La forma móvil presenta un penacho de flagelos en uno de sus polos. (*A. agilis*). Aerobios obligados. Germinan en forma de película

sobre la superficie del medio de cultivo. Son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico cuando se desarrollan en soluciones que contienen hidrocarbonados y no tienen nitrógeno combinado. Viven a temperaturas de 10 a 40° C, siendo el óptimo entre 28 a 35° C. Cuando desarrollan en cultivo líquido, aparece una película sobre la superficie del medio de cultivo. (2, 3, 17)

#### Azotobacter chroococum

Es un diplococo de 3 a 5 micras de diámetro; un poco alargado, provisto de 3 a 4 corpúsculos refringentes y de un cilio vibrátil al que debe su movilidad. En caldo gelatinado se obtienen colonias redondas, piriformes y un poco amarillentas. En gelosa manitada, las colonias ofrecen color blanco con una parte sombreada, siendo redondas o alargadas. No desarrolla en la patata y lo hace bastante mal, en los cultivos por picaduras. Puede tomar, fácilmente, las formas de involución, que tienen 50 micras o más. Según Prazmowsky, citado por Kayser (9), puede tomar las siguientes formas: bacilo, diplobacilo, al estado vegetativo; mono, diplo y estreptococo, al estado de germinación; a veces, la de sarcina. A menudo se ve al microorganismo, rodeado de una sustancia flemosa. Se caracteriza por la producción de pigmentos, según la edad y el medio de cultivo.

#### Azotobacter agile

Microorganismo oligonitrófilo. Diplococo muy movable.-- Algunas veces se presenta en forma de colonias de fosforescencia verde, amarillenta o rojiza. En medios pobres en nitrógeno ofrece, con el tiempo, coloración violeta oscura. Prefiere la glucosa a la

manita. Al mismo se refiere el Azotobacter vinelandie, aislado en Africa y América. (9)

Azotobacter vitreum

Afecta forma esférica, inmóvil, presentándose con aspecto vítreo en diferentes medios de cultivo. (9)

Azotobacter beijerincky

Presenta pigmento de color amarillo azufre en el período de sarcina. (9)

En todas las especies existen endosporas muy resistentes a la sequedad y soportan calentamiento de  $98^{\circ}\text{C}$ ., durante 2 a 4 minutos. Se encuentran frecuentemente en tierras bien mullidas. Esto explica cómo un suelo bien aireado, acumula nitrógeno en las capas superiores. Este nitrógeno es aprovechable, haciendo casi inapreciables, los efectos de los nitratos. (9)

Aislamiento del Azotobacter

Consiste en añadir una cantidad apropiada de elementos hidrocarbonados (por ejemplo: manitol, glucosa), al suelo húmedo. La muestra de suelo se incuba a  $30^{\circ}\text{C}$ . Las colonias aparecen después de 3 o 4 días, ligeramente elevadas sobre la superficie de la muestra. Tienen aspecto de pequeñas gotas brillantes de pocos milímetros de diámetro. Posteriormente se tornan pardas y de aspecto seco.-- Debido al enorme número de colonias que aparecen, el cultivo tiene aspecto rugoso. (2)

### Nutrición del Azotobacter

Según la clasificación de Orla-Jensen, citado por Clark y Eguaras (3), el Azotobacter es una bacteria heterotrófica oligocarbofita. Toma el nitrógeno del aire y el carbono, de sustancias orgánicas

El Azotobacter puede usar un gran número de compuestos orgánicos como fuente de energía. Entre ellos tenemos: Acidos grasos y oxiácidos; ácidos aromáticos simples como el benzoico; alcoholes livianos y pesados; mono, di y polisacáridos. No puede utilizar carbohidratos polimerizados tales como: Celulosas o gomas. (12, 17)

Necesita fosfatos, calcio o estroncio y hierro. Se desarrolla más rápido con amoníaco (o urea, que se hidroliza dando amoníaco), como fuente de nitrógeno. Desarrolla bien con nitratos, -- nitrógeno atmosférico o asparragina y, puede desarrollar algo, con otros pocos aminoácidos. Necesita vestigios de molibdeno, para alcanzar el desarrollo máximo, con fuentes de nitrógeno que no sean amoníaco o urea. La cantidad de molibdeno que necesita, depende de la fuente de nitrógeno, siendo mayor cuando lo está fijando. (12)

Azotobacter puede desarrollarse simbióticamente con los anaerobios facultativos, bajo condiciones parcialmente anaerobias, en ausencia de nitrógeno añadido, pero en presencia de nitrógeno gaseoso. (12)

Se ha postulado que puede mejorarse la economía del nitrógeno del suelo, mediante la inoculación adecuada de Azotobacter.

Esto es poco probable, debido a la competencia con la población microbiana local del suelo. (12)

### Métodos usados en la determinación de nutrientes del suelo

Para determinar las necesidades de nutrientes de un suelo, es necesario: a) Diagnosticar el problema. b) Determinar el grado de deficiencia. c) Determinar la cantidad de fertilizante necesaria para obtener una producción dada. (16)

El problema que tiene un suelo, puede ser de fertilización o de otra índole. El diagnóstico del problema, debe basarse en el minucioso estudio de las condiciones del suelo y de las plantas. (7)

Hay que tener mucho cuidado de no confundir un problema de fertilización con uno de otra especie. Otras causas, ajenas al estado de fertilidad del suelo, pueden producir síntomas iguales (por ejemplo: sequía, insectos, mal drenaje, etc.) (16)

Para determinar el grado o intensidad de la deficiencia, se han desarrollado varias técnicas de análisis de suelo. De acuerdo al sujeto principal del método usado, éstos pueden dividirse así: (5)

#### A.- SUELO

1.- Análisis químico

#### B.- PLANTA

1.- Análisis de fitotejidos

a.- Análisis foliar

b.- Pruebas de invernadero, combinadas con el análisis de planta.

- c.- Empleo de isótopos radioactivos
- 2.- Pruebas biológicas
  - a.- Experimentos de campo
  - b.- Pruebas de invernadero
  - c.- Métodos microbiológicos
    - (1) Método de Aspergillus niger van Tieghem
    - (2) Método de Cunninghamella blakeeslana
    - (3) Método de Azotobacter chroococum

### Análisis químico de suelos

En el análisis químico de suelos, se usa una solución que extrae la fracción más rápidamente soluble, de la cantidad total de nutrientes. Dicha fracción puede ser correlacionada con el comportamiento de la planta, a determinado nivel de fertilidad natural del -- suelo. (13)

En todo análisis de suelo hay que considerar que, comúnmente, sólo se analiza la parte superficial del suelo. En cambio, los cultivos toman nutrientes de lugares más o menos profundos, de acuerdo a su desarrollo radicular. (13)

El nitrógeno y el fósforo se determinan colorimétricamente, midiendo la intensidad del color desarrollado. El potasio se determina, midiendo la intensidad del color violeta que le imparte a la llama oxidante. (4, 18)

En el suelo existen nitrógeno, fósforo y potasio en estado insoluble, no disponible. Esto se relaciona con el pH del suelo. Afecta en mayor grado a los fosfatos y también al potasio. Los nitra-

tos son susceptibles de lixiviación, pero no de fijación. (15)

### Análisis foliar

El análisis foliar es más confiable que el análisis químico del suelo. Mediante él se determina la cantidad de nutrientes removida por la planta y no por una solución extractora, adicionada al suelo. Esta cantidad se determina por medio del análisis químico de las hojas. Como en el análisis químico del suelo, también se correlaciona con la respuesta a la fertilización.

Factores climáticos principalmente y otros, pueden restringir el crecimiento y variar la cantidad de nutrientes que la planta -- puede remover. Esta es una de las mayores limitaciones del método. (16)

### Pruebas de invernadero combinadas con el análisis de planta

Se han usado varias pruebas de invernadero, combinadas con el análisis de planta. Newbauer, citado por Tisdal y Nelson (14), desarrolló un método, para fósforo y potasio, usando semillas de centeno. La técnica consiste en sembrar un gran número de semillas de centeno, en una pequeña cantidad de suelo. Los nutrientes son determinados cuantitativamente, por análisis químico de las plántulas. De esa manera, se obtiene el diagnóstico en corto tiempo. Se cree que sólo un 20 a 30% del fósforo es extraído por este método.

### Empleo de isótopos radioactivos

El empleo de isótopos radioactivos, se basa en que éstos son absorbidos por la planta igual que los isótopos normales. Pos-

tos son susceptibles de lixiviación, pero no de fijación. (15)

### Análisis foliar

El análisis foliar es más confiable que el análisis químico del suelo. Mediante él se determina la cantidad de nutrientes removida por la planta y no por una solución extractora, adicionada al suelo. Esta cantidad se determina por medio del análisis químico de las hojas. Como en el análisis químico del suelo, también se correlaciona con la respuesta a la fertilización.

Factores climáticos principalmente y otros, pueden restringir el crecimiento y variar la cantidad de nutrientes que la planta -- puede remover. Esta es una de las mayores limitaciones del método. (16)

### Pruebas de invernadero combinadas con el análisis de planta

Se han usado varias pruebas de invernadero, combinadas con el análisis de planta. Newbauer, citado por Tisdal y Nelson (14), desarrolló un método, para fósforo y potasio, usando semillas de centeno. La técnica consiste en sembrar un gran número de semillas de centeno, en una pequeña cantidad de suelo. Los nutrientes son determinados cuantitativamente, por análisis químico de las plántulas. De esa manera, se obtiene el diagnóstico en corto tiempo. Se cree que sólo un 20 a 30% del fósforo es extraído por este método.

### Empleo de isótopos radioactivos

El empleo de isótopos radioactivos, se basa en que éstos son absorbidos por la planta igual que los isótopos normales. Pos-

teriormente pueden detectarse. Por medio de ellos se puede determinar qué cantidad de nutrientes extrae la planta, tanto del suelo como del fertilizante. Su uso ha sido limitado a la fertilización con fósforo. Este método puede usarse en pruebas de campo y en pruebas de invernadero. (14)

### Pruebas biológicas

En las pruebas biológicas pueden utilizarse plantas superiores (en experimentos de campo y pruebas de invernadero), hongos (método de Aspergillus niger) y bacterias (método de Azotobacter chroococum).

El método de experimentos de campo es uno de los más antiguos. La experimentación de campo es usada, principalmente, por estaciones experimentales del Estado o por empresas privadas, con respaldo financiero. Consiste en sembrar especies de plantas en parcelas representativas de cada región, y someterlas a diferentes tratamientos. Este método es el más exacto, porque incluye --- todos los factores que intervienen en el normal desarrollo del cultivo. (8)

En las pruebas de invernadero se usan plantas superiores. Pueden analizarse un mayor número de muestras, mediante el uso de pequeñas cantidades de suelo. Se puede ejercer un control absoluto de las condiciones climáticas, lo cual es una gran ventaja. (14)

### Métodos microbiológicos

Los métodos microbiológicos son más rápidos y requieren

mucho menos espacio que los métodos que utilizan plantas superiores. Se basan en la sensibilidad de ciertos microorganismos, a la ausencia de algunos elementos, en el suelo. Winogradsky, citado por Waksman (17), observó que en ausencia de ciertos minerales, ciertos microorganismos tienen un comportamiento similar al de las plantas superiores. El fósforo y el potasio insolubles están sujetos a la actividad de microorganismos, indirectamente. Los ácidos producidos por éstos, interaccionan con aquéllos, dando origen a compuestos solubles.

Mehlich y Fred (11), en Alemania, desarrollaron un método para determinar potasio, por medio del Aspergillus niger van Tieghem. El método consiste en inocular pequeñas cantidades de suelo, con A. niger; se incuban durante 4 a 5 días; se cosechan los micelios y se pesan; luego se determina químicamente el potasio extraído. Con este método se puede determinar también cobre y magnesio, mediante el análisis químico del micelio o por la observación del color de las esporas. También se ha determinado molibdeno, cobalto y manganeso.

Mehlich, citado por Allen (1), desarrolló un método para determinar fósforo por medio de Cunninghamella blakeeslana. Se basa en la sensibilidad de Cunninghamella al contenido de fósforo del medio en que se desarrolla. Consiste en inocular el organismo a una pasta preparada con el suelo e incubarlo, a temperatura ambiente, durante cuatro días y medio. El contenido de fósforo se estima por el diámetro del micelio desarrollado.

Sackett y Stewart, citados por Allen (1), desarrollaron un método para diagnosticar fósforo y potasio, por medio de -- Azotobacter chroococum. Se toman cuatro porciones iguales de suelo (50 gramos) y se les adiciona almidón de maíz (2.5 gramos). Se usa una como testigo; a otra se le adiciona fósforo; a otra, potasio; y a otra, fósforo más potasio. Se inoculan con A. chroococum. Se les adiciona agua destilada hasta lograr una pasta y, se incuban durante 3 o 4 días. El suelo se clasifica de bajo a alto en fósforo y potasio, según el crecimiento de las colonias y la respuesta obtenida en los diferentes tratamientos.

Los métodos microbiológicos para evaluar el fósforo disponible en el suelo, se basan en el paralelismo existente entre la -- síntesis celular y el consumo de fosfato. (17)

El método de Azotobacter se ha usado, a menudo, para determinar la concentración de potasio disponible en el suelo. Se encontró que el potasio disponible varía entre 2 y 30% del total, dependiendo de la fertilidad del suelo. También se usa para determinar la concentración de molibdeno en el suelo. (17)

Es necesario tomar en cuenta, que los diagnósticos de estos métodos sólo son válidos para determinadas circunstancias.

## METODO EXPERIMENTAL

Con objeto de probar el método de Azotobacter en el análisis de suelos y buscar correlación entre dicho método y el método de análisis químico, se realizó el presente trabajo en los laboratorios de la Escuela Nacional de Agricultura y Ganadería de Nicaragua.

Se usaron 15 muestras de suelo, colectadas en diferentes regiones agrícolas del país. A cada una se le aplicó el método desarrollado por Sackett y Stewart, para diagnosticar deficiencias de fósforo y potasio.

Las muestras de suelo fueron representativas de los lotes que se analizaron. En cada lote se tomaron muestras a intervalos de 50 pasos y en los primeros 15 centímetros de profundidad; luego las muestras se homogenizaron y se tomaron 2 kilogramos de tierra para su observación. Cada muestra fué pasada por un tamiz de 2 milímetros; secada al aire y luego almacenada en frasco seco de vidrio, herméticamente cerrado.

Para obtener la condición de pH ideal para el desarrollo del Azotobacter, se adicionó, a las muestras de suelo que presentaban valores de pH inferior a 6.8, la cantidad de 1 gramo de carbonato de calcio por cada 50 gramos de suelo. Si el pH es menor de 6.8, no hay desarrollo normal de colonias. El exceso de calcio no causa problemas, porque el carbonato de calcio no tiene efecto deletéreo sobre el microorganismo, aún en proporciones

de 33%. Además, el pH óptimo para el desarrollo del Azotobacter varía entre 6.8 y 8.5.

Las condiciones de textura, adecuadas para el desarrollo del microorganismo son las siguientes:

- a) Cuando el suelo es muy arcilloso, es necesario agregar 10 a 20 gramos de arena por 50 gramos de suelo. Esto se debe a que, en suelos arcillosos, el Azotobacter no aparece por causa de una mala aireación.
- b) Si el suelo es arenoso, se deben agregar 10 a 20 gramos de caolín por 50 gramos de suelo. Esto se hace para fijar el fósforo y potasio que se añade, así como para mantener la humedad de las placas. En este caso es aconsejable sustituir el almidón por sucrosa.

En nuestro caso no fué necesario hacer corrección de textura, pues no hubo muestras arcillosas o arenosas en extremo.

Para el aislamiento del Azotobacter se añadieron 2.5 gramos de almidón de maíz a 50 gramos de suelo, donde se sospechaba la presencia de Azotobacter. Luego se agregó agua destilada estéril, hasta obtener una masilla de consistencia plástica. Esta se puso en platos petri y se incubó durante 3 días, a 30°C, al cabo de los cuales aparecieron las colonias de Azotobacter. -- Con el auxilio del microscopio y por las características de las colonias en medio sólido, se identificó a este microorganismo. Después de identificado, se sembró una colonia en cada uno de 5 tubos de ensayo que contenían solución nutritiva para Azotobacter.

Se conservó en medio líquido, efectuando transferencias a nuevos medios de cultivo, cada 15 días.

La composición del medio de cultivo líquido fué la siguiente:

Manitol.....	10	gramos
Fosfato dipotásico.....	0.5	"
Sulfato de magnesio.....	0.2	"
Cloruro de sodio.....	0.2	"
Sulfato de manganeso.....		Trazas
Cloruro férrico.....		"
Agua destilada.....	1000	cc.

Cuando se desea medio sólido, basta agregar 15 gramos de agar, por litro de agua destilada. (1)

Como puede observarse, en la composición del medio de cultivo no están incluídas sustancias proteicas, debido a que el Azotobacter toma el nitrógeno del aire. Solamente necesita un material energético, que en este caso es el manitol. A esto obedece su clasificación como bacteria heterotrófica oligocarbofita.

### Preparación de placas

Se usaron 4 platos de petri para cada muestra de suelo. A cada uno de los platos se le puso 50 gramos de suelo tamizado y seco al aire y, 2.5 gramos de almidón de maíz y se mezclaron bien. Uno de los platos se dejó como testigo; a otro se le adicionó fósforo; a otro, potasio; y, al cuarto plato, fósforo más potasio.

### Testigo o placa de control

A los 50 gramos de suelo se les adicionó agua destilada estéril, lentamente, con una pipeta graduada. Se agitó constantemente hasta obtener una masilla de consistencia plástica, anotando la cantidad de agua usada. Como en algunos suelos el microorganismo no está presente, es necesario adicionar, mezclados con el agua destilada, 2 cc de solución al 2% de cultivo de Azotobacter. Luego se alisó la superficie con una espátula, dejando una convexidad en el centro para notar mejor el desarrollo de las colonias.

### Placa adicionada de fósforo

Mezclados con el agua destilada, se agregaron 2 cc de la solución del cultivo y 5 cc de solución al 6% de fosfato disódico, correspondientes a 0.057 gramos de  $P_2O_5$ . La suma de los volúmenes de agua destilada, solución del cultivo y solución de fosfato disódico, debe ser igual al volumen de agua destilada usado por el testigo. Luego se repitió el mismo proceso que se describió en la placa de control.

### Placa adicionada de potasio

Se agregaron: agua destilada, 2cc de solución del cultivo y 5 cc de solución al 3% de sulfato de potasio, correspondientes a 0.08 gramos de  $K_2O$ . El volumen de líquido agregado, debe ser igual al volumen de agua destilada requerido por el testigo. A continuación, se prosiguió igual que en la placa anterior.

### Placa adicionada de fósforo y potasio

Se agregaron agua destilada, 2 cc de solución del cultivo y 5 cc de solución al 3% de fosfato dipotásico, correspondientes a 0.061 gramos de  $P_2O_5$  y 0.08 gramos de  $K_2O$ . Luego se siguió el procedimiento descrito en la placa testigo.

Se hace notar, que todas las placas deben llevar igual cantidad de líquido. Esto tiene por objeto, obtener iguales condiciones de humedad. Humedad diferente en cada placa, puede conducir a interpretaciones erróneas.

Una vez preparadas las placas, se pusieron en un cristizador. Este tenía papel secante húmedo, en el fondo y en la tapa, para mantener la humedad de las placas. A continuación fueron llevadas a la estufa de cultivo, donde se les mantuvo a una temperatura de  $30^{\circ}C$ , durante 3 días.

Después de tres días de incubación se midió el diámetro de las colonias y se anotó. También fué anotado el diagnóstico de fertilidad de cada muestra.

### Interpretación de resultados

El criterio seguido para la interpretación de los resultados, según el desarrollo experimentado por las colonias en las placas, fué el siguiente:

- a) Si sólo hay respuesta en las placas adicionadas de fósforo y, de fósforo más potasio, el suelo se clasifica DEFICIENTE EN FOSFORO
- b) Si sólo hay respuesta en las placas que tienen potasio y, fósforo más potasio; el suelo se clasifica DEFICIENTE EN POTASIO
- c) Si hay respuesta, solamente en la placa que tiene fósforo más potasio; se dice que hay DEFICIENCIA EN FOSFORO Y POTASIO.
- d) Si hay respuesta igual en todas las placas, NO HAY DEFICIENCIA.

Para determinar el nivel de nutrientes extraídos por el microorganismo, se hicieron en el testigo las siguientes observaciones:

BAJO: Numerosas, pocas o ninguna colonia. Muy pequeñas, del tamaño de la cabeza de un afiler.

MEDIO: Numerosas o pocas colonias, de regular tamaño.

ALTO: Numerosas o pocas colonias, de gran tamaño.

Los resultados fueron sometidos al análisis estadístico de correlación, en comparación con los resultados del método de análisis químico.

## RESULTADOS Y DISCUSION

El cuadro III presenta los resultados del análisis químico de las 15 muestras de suelo estudiadas. El análisis fué realizado en el Departamento de Química de la Estación Experimental Agropecuaria "La Calera", del Ministerio de Agricultura y Ganadería. Se usó como solución extractora, HCl 0.05 N en  $H_2SO_4$  0.025 N. En este método se usa la siguiente clasificación:

Clasificación	Nivel de P asimilable	Nivel de K asimilable
Bajo	0 a 20 ppm	0 a 200 ppm
Medio	20 a 50 ppm	200 a 500 ppm
Alto	Más de 50 ppm	Más de 500 ppm

Se observó un crecimiento vigoroso de las colonias desde las 48 horas, en los suelos A, C, D, E, G, I, N, y O. En el suelo H no hubo crecimiento. En los restantes suelos, las colonias aparecieron hasta las 72 horas.

El cuadro IV presenta el diagnóstico de fertilidad, por medio del método de Azotobacter, de las muestras de suelo estudiadas.

En el cuadro V notamos que hubo diferencia solamente en los diagnósticos de cuatro suelos (A, F, I, O). Esto se debe a que esos suelos están situados en los límites de clasificación del método de análisis químico y, por tanto, no difieren mucho en su

contenido de nutrientes. A causa de esto, la respuesta del microorganismo es más o menos igual en ellos. Comparando en el cuadro III, el suelo A con 50 ppm de fósforo asimilable y clasificado alto, y el suelo C con 45 ppm de fósforo asimilable y clasificado medio, podemos observar que difieren en 5 ppm de fósforo asimilable, lo cual no fué suficiente para producir una respuesta diferente. Por esta razón existe diferencia entre el diagnóstico del método de análisis químico y el diagnóstico del método de Azotobacter, en los suelos A, F, I, O. De esto se deduce que el método químico es más exacto.

En el suelo H no hubo crecimiento de colonias, debido, al bajo contenido de P y K asimilable y a la textura del suelo.

En el apéndice aparece el cálculo de los coeficientes de correlación y regresión y las pruebas de significancia, realizadas para cada uno. El cuadro VI muestra la tabla de correlación, --construída para efectuar dicho cálculo.

El coeficiente de correlación obtenido resultó significativo para una probabilidad de 0.01. Esto indica que entre ambos métodos existe correlación altamente significativa y que se puede confiar en los diagnósticos obtenidos con el método de Azotobacter.

Los coeficientes de regresión obtenidos, resultaron altamente significativos. Esto indica que los valores de X y Y, determinados con ayuda de las ecuaciones de regresión respectivas, se aproximan satisfactoriamente a los verdaderos. Dichas ecuacio-

nes dan mayor exactitud al método, pues hacen posible predecir el contenido de fósforo del suelo, por medio del diámetro de las colonias obtenidas.

La gráfica I presenta la distribución de los valores promedios de X y Y, en comparación con los valores determinados -- con las ecuaciones de regresión.

El ángulo que forman entre sí las dos rectas de regresión es de  $0^{\circ} 5'58''$ . Esto es otro indicio de que la correlación es significativa, porque a medida que el ángulo se acerca a  $0^{\circ}$ , mayor es la correlación.

La confianza de la correlación enunciada resulta limitada por el reducido número de las muestras estudiadas. Pruebas posteriores, con mayor número de muestras, pueden servir para confirmar la veracidad de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

## C O N C L U S I O N E S

En base al análisis estadístico de los resultados, se llegó a las siguientes conclusiones:

- A.- Se encontró correlación positiva, entre el método de Azotobacter y el método de análisis químico de suelos usado en la Estación Experimental Agropecuaria, "La Calera", que usa como solución extractora: HCl 0.05N en  $H_2SO_4$  0.025N.
- B.- El método de Azotobacter puede usarse en el análisis de suelos, para determinación de fósforo y potasio.
- C.- El contenido de fósforo asimilable se puede calcular, usando el diámetro de las colonias de Azotobacter, por medio de la siguiente ecuación de regresión:

$$Y = 92.9945X - 8.22$$

Y: Fósforo asimilable en ppm

X: Diámetro de las colonias de Azotobacter en milímetros.

- D.- Se sugiere hacer una modificación a la interpretación de resultados, del método original. Consiste en medir el diámetro de las colonias de la placa testigo y hacer la clasificación en base al siguiente cuadro:

<u>Nivel asimilable de nutrientes</u>	<u>Diámetro de colonias en mm.</u>
Bajo	0.0 a 0.4
Medio	0.4 a 0.6
Alto	Mayor de 0.6

## R E S U M E N

El presente trabajo se efectuó con el objeto de correlacionar el método de análisis químico de suelos, del Ministerio de Agricultura y Ganadería, con el método de Azotobacter, propuesto por Sackett y Stewart, para la determinación de fósforo y potasio asimilable. Se usaron 15 suelos de diferentes regiones agrícolas de Nicaragua. A cada uno se le analizó químicamente y se le aplicó el método microbiológico de Azotobacter. Se midió el diámetro de las colonias de las placas testigo para correlacionarlo con el contenido de fósforo y potasio del suelo.

Después de comparar ambos métodos, se encontró correlación positiva, significativa para una probabilidad de 0.01. Esto indica que el método de Azotobacter puede ser usado en el análisis de suelos, para la determinación de fósforo y potasio.

El desarrollo de las colonias fué proporcional al contenido de nutrientes del suelo. Se determinó que, según el diámetro de las colonias de la placa testigo, los suelos pueden clasificarse en:

BAJO:	Cuando las colonias tienen un diámetro de 0.0 a 0.4 mm
MEDIO:	" " " " " " " " 0.4 a 0.6 mm
ALTO:	" " " " " " " " mayor de 0.6 mm

La ecuación de regresión, para calcular el contenido de fósforo del suelo en base al diámetro de las colonias es:

$$y = 92.9945 X - 8.22$$

## CUADRO III

ANALISIS QUIMICO DE LAS MUESTRAS  
DE SUELO ESTUDIADAS

Muestra	pH	Fósforo asimilable	Potasio asimilable	Textura
A	7.5	Alto (50 ppm)	Alto (2000 ppm)	Franco limoso
B	6.3	Bajo (14 ppm)	Alto (1950 ppm)	Franco Arcilloso
C	6.9	Medio (45 ppm)	Alto (1180 ppm)	Franco limoso
D	7.3	Alto (97 ppm)	Alto (2000 ppm)	Franco limoso
E	7.1	Alto (100 ppm)	Alto (1100 ppm)	Franco arenoso.
F	7.0	Bajo (1 ppm)	Medio (250 ppm)	Franco arenoso.
G	7.3	Alto (51 ppm)	Alto (1180 ppm)	Franco
H	6.0	Bajo (1 ppm)	Bajo (110 ppm)	Arcilloso
I	6.6	Medio (33 ppm)	Medio (310 ppm)	Franco
J	7.1	Bajo (12 ppm)	Alto (760 ppm)	Arcilloso Arenoso.
K	7.9	Bajo (18 ppm)	Alto (950 ppm)	Franco Arcilloso
L	6.7	Bajo (1 ppm)	Alto (1200 ppm)	Franco limoso
M	6.4	Bajo (3 ppm)	Alto (550 ppm)	Franco
N	6.8	Alto (100 ppm)	Alto (1410 ppm)	Franco Arenoso.
O	6.5	Alto (90 ppm)	Alto (650 ppm)	Franco Arcilloso.

## CUADRO IV

DIAGNOSTICO DE FERTILIDAD, DE LAS MUESTRAS DE  
SUELO ESTUDIADAS,  
POR MEDIO DEL METODO DE AZOTOBACTER

Muestra	Fósforo Asimilable	Potasio Asimilable	Diámetro de Colonias en Milímetros
A	Medio	Alto	0.50
B	Bajo	Alto	0.25
C	Medio	Alto	0.50
D	Alto	Alto	1.10
E	Alto	Alto	1.25
F	Bajo	Bajo	0.25
G	Alto	Alto	0.70
H	Bajo	Bajo	0.00
I	Alto	Alto	0.70
J	Bajo	Alto	0.30
K	Bajo	Alto	0.25
L	Bajo	Alto	0.20
M	Bajo	Alto	0.30
N	Alto	Alto	1.00
O	Medio	Alto	0.60

## CUADRO V

COMPARACION ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS  
CON EL METODO DE ANALISIS QUIMICO DE SUELOS Y  
EL METODO DE AZOTOBACTER

Muestra	Análisis químico		Análisis bacteriológico	
	Fósforo asimilable	Potasio asimilable	Fósforo asimilable	Potasio asimil.
A	Alto	Alto	Medio	Alto
B	Bajo	Alto	Bajo	Alto
C	Medio	Alto	Medio	Alto
D	Alto	Alto	Alto	Alto
E	Alto	Alto	Alto	Alto
F	Bajo	Medio	Bajo	Bajo
G	Alto	Alto	Alto	Alto
H	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
I	Medio	Medio	Alto	Alto
J	Bajo	Alto	Bajo	Alto
K	Bajo	Alto	Bajo	Alto
L	Bajo	Alto	Bajo	Alto
M	Bajo	Alto	Bajo	Alto
N	Alto	Alto	Alto	Alto
O	Alto	Alto	Medio	Alto

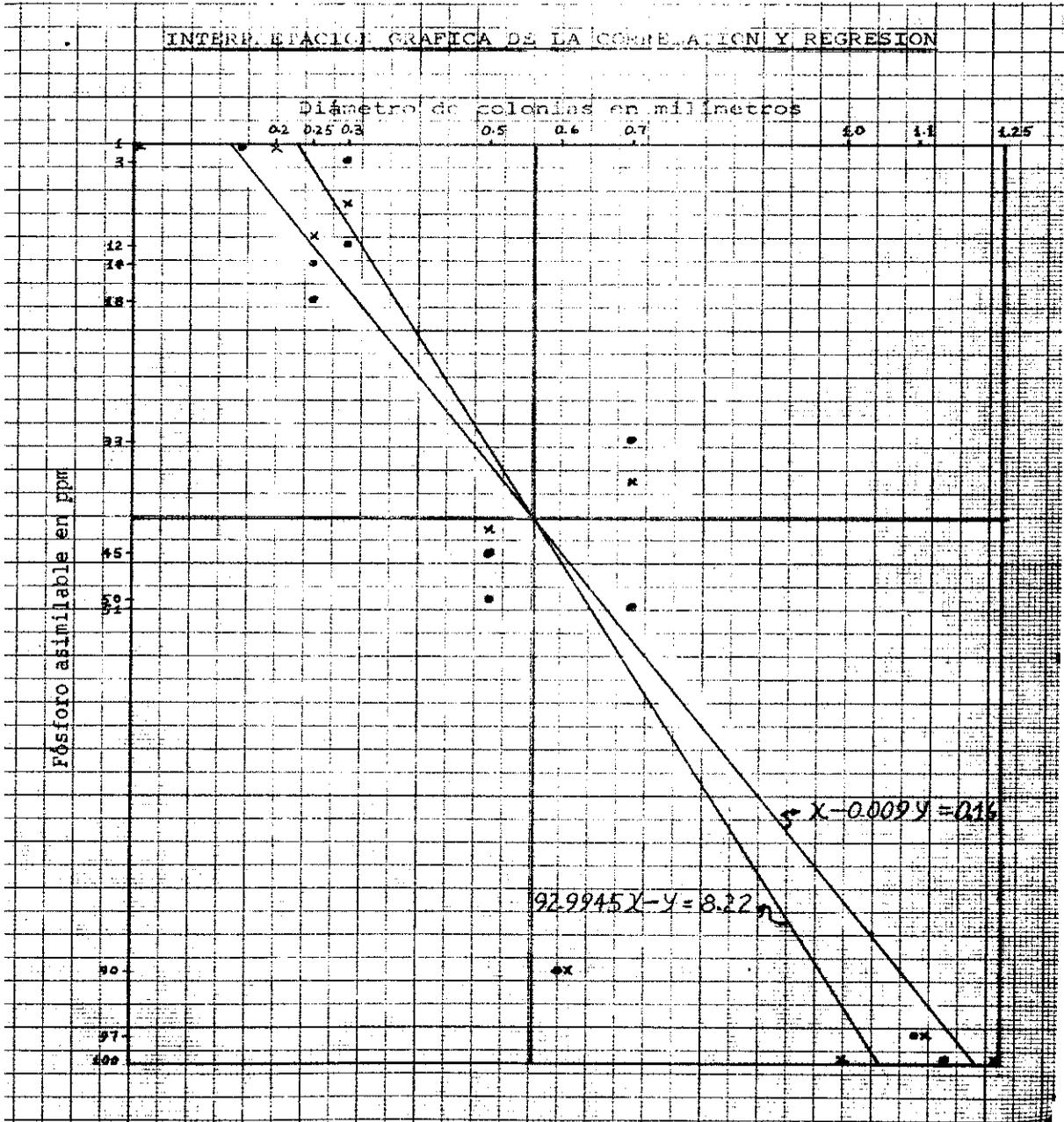
CUADRO VI  
TABLA DE CORRELACION

Diámetro de colonias en milímetros

	0.00	0.2	0.25	0.3	0.5	0.6	0.7	1.0	1.1	1.25	fy	dy	fydy	fyd <sup>2</sup>	$\sum(\sum fxd)dy$
1	1	1	1								3	-44	-132	5808	59.40
3				1							1	-42	-42	1764	12.60
12				1							1	-33	-33	1639	9.90
14			1								1	-31	-31	961	10.85
18			1								1	-27	-27	729	9.45
33							1				1	-12	-12	144	-1.20
45					1						1	0	0	0	0.00
50					1						1	5	5	25	-0.50
51							1				1	6	6	36	0.00
90						1					1	45	45	2025	0.00
97									1		1	52	52	2704	20.00
100								1		1	2	55	110	6050	57.75
$\sum fx$	1	1	3	2	2	1	2	1	1	1	15	-26	-59	21335	184.85
$\sum dx$	-0.60	-0.40	-0.35	-0.30	-0.10	0.00	0.10	0.40	0.50	0.65	-0.10				
$\sum fxd$	-0.60	-0.40	-1.05	-0.60	-0.20	0.00	0.20	0.40	0.50	0.65	-1.10				
$\sum fxd^2$	0.36	0.16	0.3675	0.18	0.02	0.00	0.02	0.16	0.25	0.4225	1.9420				
$\sum (fydy)dx$	26.40	17.60	35.70	22.50	-0.50	0.00	-0.60	22.00	26.00	35.75	184.85				

Fósforo asimilable en ppm.

# INTERACCION GRAFICA DE LA CORRELACION Y LA REGRESION



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- ALLEN, O.N. Experiments in Soil Bacteriology. Burgess Publishing Co., 1953. 127 p.
- 2.- BURGESS, A. Introducción a la Microbiología del suelo. Andrés Suárez y Suárez (traductor). Zaragoza, Acribia, 1960. 199 p.
- 3.- CLARK, L. y EGUARAS, JUAN L. Curso de Microbiología. Nicaragua. Escuela Nacional de Agricultura y Ganadería. 1966. 243 p. (mimeografiado).
- 4.- COLORIMETRIC DETERMINATION OF NONMETALS. Boltz, D.F. (Editor). Interscience Publishing Inc., 1958. 384 p.
- 5.- FERTILIZACION DEL Algodón en Nicaragua. El Algodón (Nicaragua) No. 12: 5, 42, 44, 45. 1967.
- 6.- FITTS, J.W. Using Soil Test to Predict a Probable Response from Fertilizer Application. Better Crops with Plant Food. 39(3): 17-20, 40-41. 1955.
- 7.- JACOB, A. y VON UEXKULL, H. Fertilization Internationale. Amsteedam, Handelmaatschappij voor Meststoffen N.V., 1961. 626 p.

- 8.- JENNY, H., VLAMIS, J. and MARTIN, W.E.  
Greenhouse Assay of Fertility of California Soil. *Hilgardia*. 20:1-8. 1950.
- 9.- KAYSER, EDMUNDO. *Microbiología Agrícola*. Traducción española de la 4o. ed. francesa. Barcelona, Salvat, 1931. Tomo II, 359 p.
- 10.- LOMA, J.L. DE LA. *Experimentación Agrícola*. México, UTHEA, 1955. 430 p.
- 11.- MEHLICH, A. and FRED, E.B. The Aspergillus niger Method of Measuring Available Potassium in Soil. *Soil Science*. 35: 259-279. 1943
- 12.- RUSSELL, E. JHON Y RUSSELL, E. WALTER.  
Las condiciones del Suelo y el Desarrollo de las Plantas. Gaspar González y González (traductor de la 8o. ed. inglesa). Madrid, Aguilar, 1959. pp 367, 368, 371.
- 13.- SAIZ DEL RIO, J.F. y BORNEMISZA, E. *Análisis Químico de Suelos. Método de Laboratorio para Diagnósis de Fertilidad*. Turrialba, IICA, 1961 107 p.
- 14.- TISDALE, S.L. and NELSON, W.L. *Soil Fertility and Fertilizer*. Mc. Millan Co., 1956. 430 p.

- 15.- THOMPSON, L.M. Soil and Soil Fertility. New York, Mc. Graw Hill, 1957. 451 p.
- 16.- US DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Yearbook of Agriculture 1957; seeds. Washington, D.C., 1957. 784 p.
- 17.- WAKSMAN, SELMAN A. Soil Microbiology. New York, Willey, 1952. 356 p.
- 18.- ZUNIGA ARANA, NOEL. Estudio de la Respuesta al Potasio, usando ASPERGILLUS NIGER VAN TIEGHEM en Varios Euelos de Nicaragua. Tesis. Managua, Nicaragua, Escuela Nacional de Agricultura y Ganadería, 1964. 40 p. (Mimeografiada).

A P E N D I C E

## CALCULO DEL COEFICIENTE DE CORRELACION

Si se traza, en la "tabla de correlación" (cuadro VI), una línea horizontal por el valor medio de las partes por millón de fósforo asimilable (ppm), y una línea vertical por el valor medio de los diámetros de colonias, la intersección de ambas líneas dividirá a la tabla en cuatro cuadrantes. Por ejemplo:

2	3
1	4

Observando la tabla (cuadro VI), se nota que la mayor parte de los individuos caen en casillas comprendidas en los cuadrantes 2 y 4. Esto significa que entre las dos series de valores estudiadas, existe una correlación positiva. O sea, que la intensidad de los dos caracteres en estudio, aumenta o disminuye al mismo tiempo.

Para calcular el valor del Coeficiente de correlación se usó la siguiente fórmula:

$$r = \frac{\sum (d'x \cdot d'y) - \frac{\sum d'x \cdot \sum d'y}{n}}{\sqrt{\left[ \sum (d'x)^2 - \frac{(\sum d'x)^2}{n} \right] \left[ \sum (d'y)^2 - \frac{(\sum d'y)^2}{n} \right]}}$$

Donde: d'x: Desviaciones con respecto a la media arbitraria Gx

d'y: " " " " " " "

n: Número de pares de valores en estudio.

Las media aritméticas son:

Mx: 0.53 y My: 41.07

Se usaron como media arbitrarias:

Gx: 0.6 y Gy: 45

$$r = \frac{184.85 - \frac{(-59)(-1.10)}{15}}{\sqrt{\left[1.942 - \frac{(-1.10)^2}{15}\right] \left[21,335 - \frac{(-59)^2}{15}\right]}}$$

$$r = 0.91$$

El cálculo de la significancia de r se obtuvo por medio de la siguiente fórmula:

$$t = \frac{r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

$$t = \frac{0.91 \sqrt{15-2}}{\sqrt{1-0.8281}}$$

$$t = 7.9902$$

En la "tabla de t", el valor de t para una probabilidad de 0.01 con 13 grados de libertad es de 3.012

Como:  $t$  calculado  $>$   $t$  tabulado

r: Muy significativo

## CALCULO DE LOS COEFICIENTES DE REGRESION

Para el cálculo de los coeficientes de regresión se usaron las siguientes fórmulas:

$$b_{yx} = \frac{\sum(d'x \cdot d'y) - \frac{\sum d'x \cdot \sum d'y}{n}}{\sum(d'x)^2 - \frac{(\sum d'x)^2}{n}}$$

$$b_{xy} = \frac{\sum(d'x \cdot d'y) - \frac{\sum d'x \cdot \sum d'y}{n}}{\sum(d'y)^2 - \frac{(\sum d'y)^2}{n}}$$

Donde: d'x: Desviaciones con respecto a la media arbitraria Gx

d'y: " " " " " " " Gy

n: Pares de valores en estudio.

$$b_{yx} = \frac{184.85 - \frac{(-59)(-1.10)}{15}}{1.942 - \frac{(-1.10)^2}{15}}$$

$$b_{yx} = 92.9945$$

$$b_{xy} = \frac{184.85 - \frac{(-59)(-1.10)}{15}}{21.335 - \frac{(-59)^2}{15}}$$

$$b_{xy} = 0.009$$

Las ecuaciones de las rectas de regresión, referidas a los ejes de coordenadas originales, se calcularon así:

$$X = Mx + b_{xy} (Y - My)$$

$$Y = My + b_{yx} (X - Mx)$$



X: Valor calculado para la variable dependiente por medio de la ecuación de regresión.

Y: Valor calculado para la variable independiente por medio de la ecuación de regresión.

x: Promedio de los valores realmente observados para cada valor de "y".

y: Promedio de los valores realmente observados para cada valor de "x".

$$t_{yx} = \sqrt{\frac{8,647.98 \times 13 \times 1.585}{2,834.4915}}$$

$$t_{yx} = 7.92$$

$$t_{xy} = \sqrt{\frac{0.00081 \times 13 \times 16,438}{0.70996}}$$

$$t_{xy} = 4.93$$

En la "tabla de t", el valor de t para una probabilidad de 0.01 con 13 grados de libertad, es de 3.012.

Como:

$$t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabulado}}$$

byx y bxy: Muy significativo