

UN CONSTITUYENTE ORGANICO UTIL DE LOS SUELOS

LA CREATININA

POR

O. SCHREINER, EDM. C. SHOREY, M. X. SULLIVAN

Y

J. J. SKINNER

TRADUCCIÓN DE

ALEJANDRO BOTTO

Ingeniero Agrónomo, profesor de la Universidad Nacional de La Plata

La "Oficina de los suelos" del Departamento de Agricultura de Washington, dirigido por M. Whitney y secundado por un gran número de especialistas, se ha entregado desde hace algunos años á importantes investigaciones científicas, concernientes á la agrología y la química de los suelos (1).

De esas investigaciones, las más interesantes son sin duda, las relativas al estudio y rol de las materias orgánicas constituyentes, y sus relaciones con la fertilidad y esterilidad de los suelos.

Ellas han permitido comprobar que las materias orgánicas en sus incesantes y profundas transformaciones, dan origen á numerosísimos compuestos de variada naturaleza, compuestos que ciertamente tienen acciones directas sobre las

(1) Los resultados de esas investigaciones han sido publicados en los boletines números 47, 53, 56, 70, 73, 74, 80, 86, 87, 88, 89 y 90, de dicha oficina.

plantas, ya como nocivos algunos, ó como benéficos la mayoría.

Entre estos últimos compuestos, se encuentra el que á continuación insertamos, la *creatinina*, constituyente frecuente y normal de los suelos, cuyo estudio metódico en lo referente al origen, composición química, existencia é influencias sobre la vegetación, ha sido realizado por los señores O. Schreiner, Ed. C. Shorey, M. X. Sullivan y J. J. Skinner, cuatro de los especialistas á que nos referíamos anteriormente.

Se trata de un compuesto azoado, comparable en tenor y frecuencia en los suelos, á los nitratos, siendo como estos, directamente útil, como han permitido comprobarlo las experiencias realizadas, para el desarrollo vegetal. En efecto, estableciendo como han hecho dichos autores, una serie de cultivos en soluciones nutritivas conteniendo solamente sales de potasa y fosfatos, y otra que contiene las mismas sales minerales pero á la cual se le agrega $\frac{50}{1,000,000}$ de creatinina, se observa en esta última serie, un aumento sorprendente de vegetación, comparable á la que se produce en las soluciones nutritivas completas, donde la materia azoada está representada por los nitratos. En presencia de estos últimos, los efectos completamentarios del crecimiento influenciado por la creatinina, no son tan marcados, pues aunque la producción vegetal es muy elevada, las plantas no utilizan muy bien á los nitratos, es decir, las plantas absorben de preferencia parte de creatinina que emplean en la constitución de sus tejidos, y por consiguiente tienen menos necesidad de nitratos.

En resumen, citando las conclusiones á que llegan estos autores, podemos agregar: que la creatinina tiene un valor nutritivo por lo menos igual á la de los nitratos; que su cantidad en los suelos es comparable á la de estos, y que ella puede reemplazarlos en sus acciones sobre el crecimiento vegetal.

Estas conclusiones, que no hay duda transforman por completo las ideas antiguas sobre la materia orgánica de

los suelos, proyectando nueva luz sobre los cambios bioquímicos que se producen y que encaran á la vez, bajo una nueva faz los problemas complejos del suelo, nos han inducido llevar á cabo la presente traducción.

A. B.

I.

Inportancia de los constituyentes útiles del suelo

FOR

OSWALD SCHREINER

Encargado de las investigaciones sobre la fertilidad

Un cierto número de publicaciones de este Laboratorio relativas á la naturaleza y á las propiedades de la materia orgánica de los suelos, han sido ya difundidas. El estudio profundo de este tema, sobre el cual la literatura química y agrícola contiene tan pocos trabajos precisos, fué emprendido á continuación del descubrimiento en los suelos poco productivos, de principios extractivos nocivos, que se supuso fueran de naturaleza orgánica más que mineral.

Un estudio de los compuestos orgánicos susceptibles de encontrarse en los suelos, ha demostrado que algunos de estos, producen efectos reales en el crecimiento de las plantas, mientras que el examen profundo de la materia orgánica de los suelos poco productivos, ha permitido llegar al descubrimiento de varios elementos nocivos.

Los detalles de estas investigaciones, lo mismo que la molestia que estas substancias ocasionan á la vegetación interviniendo en el proceso normal de la vida de las plantas, han sido publicados en los primeros boletines.

Todos esos factores demuestran la utilidad que reporta el conocimiento más preciso del más importante y sin embargo del menos conocido de los constituyentes del suelo,

la materia orgánica ó humus. Una investigación sobre la naturaleza de estos constituyentes, ha sido hecha en el Laboratorio, y ya se han obtenido un gran número de informaciones precisas.

Hasta aquí, no existían métodos de análisis y ningún constituyente orgánico definido del suelo no había sido aislado. Las investigaciones han permitido aislar definitivamente, identificar y clasificar más de veinticinco constituyentes orgánicos del suelo. Los cuerpos aislados hasta hoy, varían desde el simple compuesto que contiene carbono é hidrógeno, hasta los compuestos complejos que contienen carbono, hidrógeno, oxígeno, ázoe y fósforo. Hay compuestos que existen en las plantas vivas, otros que se originan en la descomposición de la proteína, de las grasas, de los ácidos nucleicos, de los hidratos de carbono y otras sustancias vegetales ó animales, resultantes de oxidaciones ó de reducciones químicas, ó de intervenciones de hongos, de bacterias, de protozoarios y otros agentes biológicos que actúan en los suelos.

Según la naturaleza de los agentes que intervienen en la descomposición de los detritus animales y vegetales, los resultados serán diferentes. En ciertas condiciones, habrá formación de constituyentes normales y útiles. La parte esencial del estudio de la materia orgánica de los suelos, es determinar las propiedades de estos constituyentes particulares y de sus efectos en los suelos con relación á la vida de los vegetales.

La experimentación es actualmente difícil, dado la falta de material y á causa de las dificultades con que se tropieza para obtener grandes cantidades de los elementos en cuestión. De aquí se deduce que la determinación de los efectos de estos elementos aislados sobre los vegetales, no haya sido practicable.

En una monografía precedente, el estudio de uno de estos constituyentes ha sido llevado lo más lejos posible.

En este boletín, se estudiará la presencia en los suelos de un elemento realmente útil á la vegetación.

Este elemento es un compuesto azoado, la *creatinina*.

El método de separación, la identificación y el estudio de las propiedades de este elemento, serán hechas en el primer capítulo. Su acción sobre los granos y las plantas y especialmente el hecho que puede encontrarse en los suelos y en las aguas donde crecen los vegetales, será expuesta en el segundo capítulo; el efecto de este compuesto sobre la vegetación y su aptitud de proporcionar directamente el ázoe á las plantas, será objeto de estudio en el tercer capítulo.

Los tres hechos demostrados por estas investigaciones son de importancia capital para la fertilidad de los suelos.

La materia orgánica del suelo ha sido considerada en agricultura como que tiene casi exclusivamente un efecto indirecto, es decir como si fuera puramente una fuente de elementos utilizables como el fósforo y el ázoe.

Las presentes investigaciones, demuestran que los constituyentes particulares del suelo tienen por si mismo efectos marcados sobre el crecimiento de los vegetales, siendo estos efectos ya nocivos ó exitantes.

Los elementos azoados parecen ser tan favorables á la vegetación como los nitratos naturales, y aun capaces de reemplazarlos, de suerte que en presencia de dichos elementos, la cantidad de nitratos absorbida disminuye.

La cantidad de los elementos azoados de referencia que se encuentran ordinariamente en los suelos cultivados, es comparable con la cantidad de nitratos. La *creatinina* es uno de los componentes de una larga serie de elementos orgánicos del suelo en vías de transformación azoada ó fosforada, y las observaciones que se hacen aquí encontrarían probablemente su aplicación para muchos otros elementos del suelo.

Los abonos de gran utilidad en las circunstancias normales, son los de origen orgánico. La presencia en el estiércol de establo bien consumido y en los abonos verdes de compuestos directamente utilizables como la *creatinina*, nos va á explicar de una manera interesante el porqué los estiércoles son más útiles en términos generales que lo que son, en cantidades iguales, los fertilizantes de forma mineral pura.

En el uso agrícola del ázoe, el principal fin es de convertir á este en nitratos, mediante procedimientos químicos y biológicos, operación que está muy lejos de ser simple, sobre todo por procedimientos químicos.

Las presentes investigaciones son muy sugestivas por el hecho que, para los usos agrícolas, puede no ser necesario convertir todo el ázoe en nitratos, pero si se convirtiera solamente el ázoe de las materias azoadas mal gastado en las industrias, en compuestos de la naturaleza de los estudiados en este folleto, utilizaría la agricultura grandes cantidades de ázoe que hoy pierde, por la dificultad material de transformarlos en nitratos.

Este punto no hay duda será abjeto de futuras investigaciones.

En el presente folleto nos contentaremos con demostrar, que uno de los compuestos azoados, la *creatinina*, existe en los suelos, en los estiércoles y en muchas plantas y granos, mientras que hasta hoy solo se le había encontrado en los productos de origen animal; que es un compuesto útil á la vegetación y que posiblemente pueda reemplazar á los nitratos.

II.

Aislamiento de la creatinina de los suelos

POR

EDMUNDO C. SHOREY

Encargado de las investigaciones de la fertilidad

DESCUBRIMIENTO EN LOS SUELOS

En la serie de investigaciones sobre la naturaleza de los constituyentes orgánicos del suelo, un compuesto orgánico cristalino ha sido aislado é identificado como el compuesto *creatinina*.

Las reacciones indicadoras de la presencia de este compuesto, fueron observadas en la solución de una cierta

cantidad de materia orgánica del suelo, obtenida de la manera siguiente:

Se trata el suelo por una solución de soda al 2 % durante una media hora y se agrega enseguida un ligero exceso de ácido acético. La solución ácida se filtra y se neutraliza por medio de soda; se agrega una solución de acetato de plomo y se separa por filtración el precipitado que se forma. Se agrega al filtrado amoníaco, que produce una nueva precipitación, se filtra, se lava el precipitado, luego se le descompone por el ácido sulfhídrico. El filtrado libre del sulfuro de plomo, se concentra á un pequeño volumen y da entonces las reacciones coloreadas de Jaffé, de Weyl, de Salkowski, indicadas para la creatinina.

Llevando más lejos las investigaciones, se ha encontrado que si al filtrado que proviene del acetato de plomo neutro se le vuelve alcalino con soda en lugar de amoníaco, en el precipitado que resulta descompuesto como se ha indicado, filtrado y concentrado, las reacciones de coloración son más fuertes, indicando esto una completa precipitación de la creatinina.

Por la manera como se conduce la creatinina cuando se le trata por el acetato de plomo en solución alcalina, se deduce que ni uno ni otro de los métodos de precipitación indicados no dan toda la creatinina presente, y que para aislar este compuesto, es necesario recurrir á otros métodos.

METODO DE EXTRACCION DE LA CREATININA DEL SUELO

EXTRACCION POR LOS ALCALIS

El método que permite aislar la creatinina del suelo, indicado más arriba, consiste en aplicar á los extractos alcalinos del suelo, un método recomendado por Balke para la separación de las bases purínicas y utilizado con ese objeto en este laboratorio.

Este método está basado en el hecho que, en la precipitación del óxido de cobre del licor de Fehling por un

cuerpo reductor, las bases purínicas y algunos compuestos próximos se combinan con el óxido de cobre y se encuentran en el precipitado.

La creatinina se conduce de la misma manera, tal como lo ha hecho observar Masche.

El método empleado para aislar la creatinina fué aplicado de la manera siguiente:

Un extracto alcalino del suelo se obtuvo dejando en contacto, poco tiempo, una parte de suelo con una solución de soda al 2 %, después neutralizado exactamente por ácido acético ó sulfúrico y filtrado. Se lleva el filtrado neutro á ebullición, se agrega un poco de dextrosa y luego una solución de Fehling en ligero exceso. El precipitado formado se separa por filtración, se lava y se descompone por el ácido sulfhídrico. Se filtra; al filtrado separado del sulfuro de cobre formado, se concentra á pequeño volumen á presión reducida y se le agrega una pequeña cantidad de una solución concentrada de cloruro de zinc y un poco de acetato de sodio. Se abandona el todo por varios días. Al cabo de algunas horas los cristales comienzan á formarse y al llegar á las cuarenta y ocho horas, se observa que tienen la apariencia característica del cloruro de zinc y de creatinina.

Se separan las aguas madres de los cristales por filtración ó, cuando estos últimos son muy numerosos, colocando el todo en una superficie porosa. Después de la separación, se les lava con un poco de agua fría, después se les pone en suspensión en agua y se les hace hervir con hidróxido de plomo recientemente precipitado; se filtra y el filtrado se concentra á un pequeño volumen. Al cabo de poco tiempo, los cristales se forman y tienen todas las apariencias, la solubilidad y las reacciones coloreadas de la creatinina.

EXTRACCION POR EL ALCOHOL

Utilizando otra porción de la misma tierra que nos ha permitido obtener la creatinina por el método precedente, se la puede igualmente extraer por el método alcohólico.

Se agota con alcohol á 95 grados, en el aparato Soxhlet, durante 7 horas, 100 gramos de tierra seca al aire. Se elimina por evaporación el alcohol del extracto coloreado que se obtiene, y se agrega agua para mantener el volumen constante. La solución acuosa se filtra para separar las materias resinosas y grasas, evaporándose luego hasta pequeño volumen bajo presión reducida.

La solución concentrada da todas las reacciones coloreadas de la creatinina, y después de un tratamiento por el cloruro de zinc, da al cabo de dos días de reposo, los cristales característicos de cloruro de zinc y de creatinina.

EXTRACCION POR EL AGUA

De otra porción del mismo suelo se puede obtener la creatinina mediante simple extracción por el agua.

Se agotan 5 kilogramos de suelo con agua destilada fría, hasta que se obtengan 8 litros de extracto. Este extracto se avapora hasta obtener 100 centímetros cúbicos más ó menos y luego se filtra para separar las materias insolubilizadas.

La solución obtenida da todas las reacciones coloreadas de la creatinina, y un tratamiento con cloruro de zinc, produce como en los casos anteriores, los cristales característicos de esta sal y la creatinina.

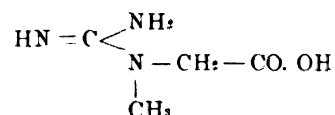
QUIMICA DE LA CREATININA

PROPIEDADES

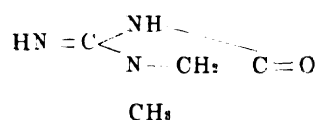
La creatinina se encuentra normalmente en la orina humana y se la ha señalado en muchos líquidos y tejidos, en su mayor parte de de origen animal: orina de perro, carne de ciertos pescados, músculos de mamíferos, extracto de carne, extracto de crustáceos y en los productos de ciertas bacteríaceas.

Su presencia en las plantas como lo demostramos en otro capítulo de esta monografía, no fué antes observada; solamente hace poco tiempo fué indicada como el resultado de la vida de las bacteriáceas.

La creatinina es el anhídrido de la *creatina* ó ácido metil-guanidil-acético.



y por consiguiente su fórmula de constitución es la siguiente:



La creatinina es fácilmente transformada en creatina por la acción del calor ó de los ácidos, ó como Folin y Denis lo han recientemente demostrado, calentándola bajo presión con su agua de cristalización.

La creatinina es algo soluble en agua fría y alcohol, insoluble en el éter, fácilmente soluble en agua caliente. Cristaliza en el sistema manoclínico ó prismático en su agua de cristalización, cuando se deja enfriar una solución saturada en caliente.

Una solución saturada en frío da grandes cristales conteniendo dos moléculas de agua.

Da sales cristalinas con muchos ácidos minerales y sales dobles con algunas sales igualmente minerales. La sal doble con cloruro de zinc y ácido clorhídrico $(\text{C}_4\text{H}_7\text{ON}_5 \cdot \text{HCl})_2 \text{ZnCl}_2$, es fácilmente soluble en agua y en alcohol; pero si á una solución de esta sal se le agrega suficientemente acetato de soda para neutralizar el ácido clorhídrico, la sal $(\text{C}_4\text{H}_7\text{ON}_5)_2 \text{ZnCl}_2$ que se forma, siendo poco soluble en el agua, se precipita.

La forma cristalina de esta sal es característica; cristaliza en finas agujas reunidas en copos erizados, ó cuando

es pura y en grande cantidad, en cristales del sistema monoclinico. Es casi insoluble en el alcohol y se la emplea para la preparaci3n de la creatinina. Cuando se obtiene esta forma cristalina, se tiene la prueba evidente de la presencia de la creatinina.

REACCIONES COLOREADAS

Las soluciones acuosas de creatinina dan un cierto n3mero de reacciones coloreadas, que se han utilizado para probar la presencia de este compuesto en algunos l3quidos, como por ejemplo en la orina.

REACCION DE JAFFE

Si 3 una soluci3n de creatinina se le alcaliniza por la soda ca3stica y se le agregan algunas gotas de una soluci3n de 3cido p3crico, se ve aparecer una coloraci3n roja. Esta coloraci3n, que es semejante 3 la de una soluci3n concentrada de bicromato de potasio, se vuelve naranjada por diluci3n.

Un m3todo colorim3trico cuantitativo para dosar la creatinina, est3 basado en esta reacci3n; ha sido descripto por Folin y casi universalmente adoptado para el dosage de este compuesto en la orina. En este caso la ausencia de otros compuestos que pueden dar una coloraci3n semejante 3 la que produce la creatinina, 3 una coloraci3n que la enmascare, puede ser naturalmente afirmada.

En la orina, el 3nico compuesto que tiene este inconveniente, es la acetona, la que por otra parte, puede ser f3cilmente determinada.

Pero en las soluciones 3 extractos que contienen la materia org3nica del suelo, la presencia de otros compuestos que pueden simular 3 turbar la coloraci3n de la creatinina, es posible; la determinaci3n de estos compuestos es dif3cil 3 causa de la falta de m3todos eficaces.

El ácido levulínico y el furfurool dan los dos la reacción de Jaffé, pero sin embargo, no ha sido aún demostrado la presencia de estos en los suelos. Se tienen solamente algunas indicaciones del primero, y el último puede encontrarse ó formarse fácilmente durante la preparación del extracto del suelo.

ENSAYO DE WEYL

Una solución acuosa de creatinina, á la cual se le agrega una pequeña cantidad de nitroprusiato de sodio, da, cuando se le adiciona soda caústica, un color rojo que vira al amarillo.

En este ensayo, como en la reacción de Jaffé, la presencia de ciertos cuerpos pueden intervenir dando un color, enmascarando el ensayo ó dando un color semejante.

El ácido levulínico da, en las condiciones de este ensayo, una coloración semejante á la que proporciona la creatinina, y entre otros ensayos, se ha utilizado este, para establecer la presencia del ácido levulínico en los productos de la descomposición de los ácidos nucleicos.

El furfurool y los productos resultantes de la acción de un ácido sobre las materias que producen pentosanas mediante el calor, dan una coloración semejante, aunque, en ningún caso, el virage del rojo al amarillo, no es tan pronunciado como con la creatinina.

El color rojo sombra que dan los sulfuros en presencia del nitro-prusiato de sodio y soda caústica, enmascara el color que produce la creatinina, y como este ha sido indicado para la reacción de Jaffé, es probable que existan en los extractos del suelo compuestos desconocidos que dan coloraciones semejantes á la que produce la creatinina, ó que la enmascaran.

REACCION DE SALKOWSKI

Si á la solución amarilla resultante del ensayo ó reacción de Weyl, se le acidula por el ácido acético y se le

calienta, la solución se vuelve verde, azul, y si es muy concentrada (en creatinina), se precipita en azul de Prusia.

El ácido levulínico y el furfurool, dan el color azul final y el precipitado, pero en el caso del ácido levulínico, la solución acidulada por el ácido acético, es púrpura antes del calentamiento.

Los reactivos solos dan el color azul final y el precipitado si se calienta la solución antes de acidularla.

Dado pues que los extractos ó soluciones del suelo contienen compuestos conocidos que dan reacciones coloreadas semejantes á las que produce la creatinina, y además, puesto que es probable la existencia de otros compuestos desconocidos, es evidente que los resultados obtenidos por las reacciones coloreadas usuales, consideradas como reveladoras de la presencia de la creatinina, no pueden ser admitidas como pruebas concluyentes de la presencia de este compuesto en los suelos considerados.

METODO DE IDENTIFICACION

Cuando se ha obtenido indicaciones sobre la presencia de la creatinina por algunas de las reacciones coloreadas precedentemente descritas. se puede confirmar su presencia por la preparación del cloruro de zinc y de creatinina $(C_4H_7ON_3)_2ZnCl_2$.

Esta sal, casi insoluble en el alcohol y difícilmente soluble en el agua, se forma cuando las soluciones concentradas de creatinina y de cloruro de zinc, se mezclan en ausencia de ácidos minerales libres. Ordinariamente, se satisface esta condición por la adición de una pequeña cantidad de acetato de sodio.

Cuando se trata de esta manera una buena cantidad de creatinina, se obtiene inmediatamente precipitación; pero si se trata de pequeñas cantidades, la precipitación no comienza sino después de algunas horas y no es completa sinó al cabo de varios días.

Los cristales de esta sal son de forma característica,

aunque estas formas se modifican sea por la concentración de la solución, sea por la presencia de otros cuerpos, sea por otras condiciones que le hacen aparecer de diversos tamaños.

Un estudio de la forma y de su crecimiento cuando los cristales aparecen por primera vez, y de la forma revestida después de recristalización, permite adquirir enseguida una gran familiaridad con la apariencia característica de este compuesto, que puede ser así identificado fácilmente.

De una manera general, aparecen en finas agujas reunidas formando esfera. En otras condiciones, su primer aspecto puede ser en forma estrellada que, más tarde adquiere la forma de un manojó de finas agujas á superficies erizadas. Si la cristalización es lenta, los cristales se presentan de buen tamaño. En otras condiciones aún, las agujas finas se reúnen en forma de abanico y más generalmente en esfera. Esta última forma es la única adquirida por este compuesto puro, cuando se enfría rápidamente una solución concentrada.

Cuando se tiene una cantidad suficiente de cloruro de zinc y de creatinina pura, su identificación por el método de preparación, de solubilidad y forma cristalina, puede ser confirmada por el análisis químico, aunque esto no es esencial una vez que se ha familiarizado con las facetas de presentación y el aspecto de este compuesto tan característico.

Una preparación de cloruro de zinc y de creatinina, obtenida partiendo de un agotamiento alcalino del suelo de la manera indicada, purificada por recristalización, secada en una placa porosa y luego en un desecador, proporciona en óxido de zinc y en ázoe, determinados de la manera siguiente: ogr. 36 de cloruro de zinc y de creatinina se ponen á digerir con una cierta cantidad de ácido sulfúrico y un poco de sulfato de potasio según el método de Kjeldhal, modificado por Guming para el dosage del ázoe total.

La solución resultante se alcaliniza por medio de la soda y se destila en presencia de ácido titulado siguiendo el

método clásico. Después del desplazamiento del amoníaco por destilación, la solución se acidula por ácido acético y se precipita en ella el zinc por el hidrógeno sulfurado. El sulfuro de zinc se filtra y se lava; precipitado y filtro, se tratan por ácido nítrico, se secan y luego se calcinan cuidadosamente. El sulfuro se transforma en óxido. En resumen el análisis proporciona los siguientes resultados.

	ENCONTRADO	CALCULADO PARA $(C_4H_7ON_3)_2ZnCl_2$
N	23.22	23.16
ZnO	22.31	22.45

La formación de creatinina libre por ebullición del cloruro de zinc y creatinina con hidróxido de plomo de la manera descrita, su cristalización, las observaciones concernientes á forma cristalina, su solubilidad y sus reacciones coloreadas, pueden dar una seguridad más afirmativa de identificación de este compuesto.

El aspecto de los cristales de la creatinina en superficies monoclinicas ó en prismas, no es base suficientemente característica para fundar su identificación.

EXISTENCIA DE LA CREATININA EN LOS SUELOS

Se trata ahora de saber si el aislamiento ó extracción de la creatinina por los métodos descriptos, indican ó prueba la presencia de la creatinina á este estado en el suelo. Planteando esta cuestión y comparando al caso de otros compuestos orgánicos del suelo, se llega á la conclusión que los compuestos en cuestión, pueden existir en el suelo tal cuales, y basándose en el hecho que del conocimiento de su comportamiento y orígenes se tiene, se permite afirmar que no pueden ser formados por ninguno de los tratamientos á los cuales el suelo ó los extratos del suelo son sometidos.

En el caso de la creatinina, la cuestión es compleja, en primer lugar porque nada es conocido de una manera

cierta en lo que concierne á sus orígenes, es decir que la molécula compleja de que deriva si hay una, no ha sido encontrada, y en segundo lugar, por el hecho ya mencionado que la creatinina, es fácilmente transformada en creatina y recíprocamente, según las condiciones del medio.

En consecuencia y solamente de estas condiciones generales, parecería que la creatinina, aislada por los métodos que implican el empleo del calor y de reactivos químicos, debe derivar de la *creatina* ó de algunos cuerpos más complejos, que la abandonan fácilmente. Estudios detallados de los métodos utilizados, dejan entrever la posibilidad de hacer derivar enteramente la creatinina de la creatina.

Folin ha demostrado que la transformación de la creatina en creatinina y recíprocamente, siendo relativamente fácil, no es tanto como lo han asegurado muchos investigadores.

Todas las operaciones de los métodos empleados, á excepción de la concentración final, tienden á cambiar la creatinina en creatina, más bien que hacer lo inverso.

La extracción alcalina con el licor de Fehling, producirá sin duda este cambio, de suerte que la creatinina finalmente obtenida es la que ha resistido á este tratamiento.

La concentración final á baja temperatura de la solución acuosa, puede formar un poco de creatinina proveniente de la creatina, pero investigaciones realizadas han demostrado que esta transformación es débil y no comprende nunca la totalidad de la creatinina, sí es que se produce.

Tratando estas soluciones á la ebullición con un ácido durante muchas horas, se obtiene un ligero aumento en la intensidad de las reacciones coloreadas de creatinina. En otros términos, la pequeña cantidad de la creatinina presente, puesta en evidencia por este método, está fuera de proporción con la que queda después de evaporación bajo presión reducida, si la creatina sola se encontraba en la solución primitiva.

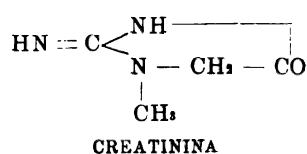
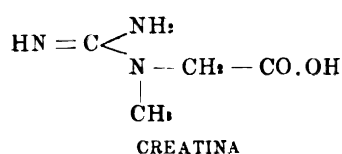
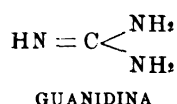
La cuestión de la posibilidad de obtener la creatinina, durante el tratamiento, de algunos compuestos más com-

plejos y fácilmente descomponibles, no puede ser resuelta desgraciadamente, hasta que alguna información definitiva en lo que concierne á uno de esos cuerpos, sea admisible.

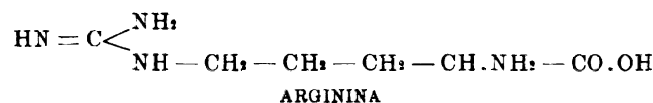
RELACIONES DE LA CREATININA CON OTROS COMPUESTOS (1)

Es oportuno considerar, con la concepción de los orígenes posibles de la creatinina, las relaciones de su fórmula de constitución con la de otros compuestos.

La creatinina, como ha sido establecido, es el anhidrido de la creatina ó ácido guanidine-metil-acético, y las fórmulas de la creatina, de la guanidina y de la creatinina son las siguientes:



La arginina, compuesto que se encuentra en los vegetales y en los animales, y que ha sido encontrado en los suelos, es el ácido guanidine-amino-valerianico normal, y su fórmula de constitución es la siguiente:

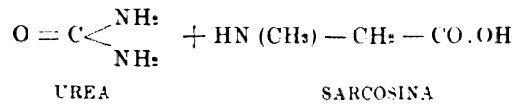
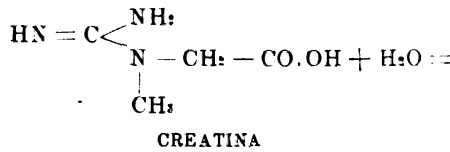
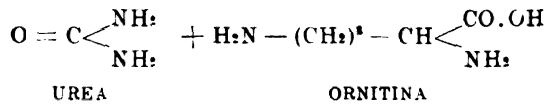
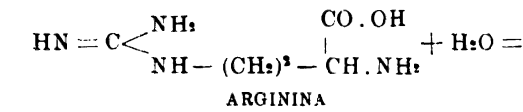


La guanidina, ha sido encontrada en las plantas y en las autodigestiones de ciertos organismos animales; el parentesco que existe evidentemente entre este compuesto simple y la arginina, cuerpo más complejo, y entre estos dos

(1) CH. A. KOSSEL, «L'état actuel de la chimie des corps albuminoïdes», *Revue générale des Sciences*. 30 de mai 1902.

cuerpos y la creatinina, es interesante y sugiere la idea de una comunidad de origen.

El parentesco estrecho entre la arginina y la creatina, y por consiguiente con la creatinina, se pone en evidencia por el modo de comportarse cuando se le calienta con hidrato de bario. En estas condiciones, la arginina se descompone en úrea y ornitina, mientras que la creatina da úrea y sarcosina ó metil-glicocola.



Este mismo parentesco se pone en evidencia en la síntesis de los dos compuestos. La creatina ha sido obtenida sintéticamente por la unión de la cianamida y de la sarcosina, y la síntesis de la arginina se obtiene por la acción de la cianamida sobre la ornitina.

**RELACION ENTRE LA CREATININA
Y LOS OTROS CONSTITUYENTES ORGANICOS DEL SUELO**

De los dos compuestos que acabamos de mencionar como que tienen relación con la fórmula de constitución de la creatinina, la arginina sola ha sido encontrada raras veces en los suelos y esto, en pequeñas cantidades. Por otra

parte, la arginina es un producto constante en la descomposición de la proteína, y aunque pueda existir en las materias orgánicas agregadas al suelo, es evidente que desaparece enseguida.

La guanidina también, aunque su existencia ha sido comprobada en los vegetales, no parece ser un constituyente ordinario del suelo, y apesar de numerosas investigaciones sobre gran número de tierras, no ha sido aún hallada. Las bases purínicas tienen relación con la guanidina, y por consiguiente, con la creatinina; es interesante hacer notar que la guanina, única base purínica que se presenta comunmente y que, hasta el presente, no ha sido aislada de los suelos, da por oxidación la guanidina. La guanina, es sin embargo un constituyente de un fertilizante orgánico, el guano. Las relaciones posibles entre la creatinina y el grupo de las bases purínicas son, en el estado actual de nuestros conocimientos, puramente especulativas, aunque dignas de interés.

Las mismas relaciones entre la creatinina y los cuerpos más complejos hallados en los suelos ó agregados por medio de residuos ó vegetales muertos, son aún más oscuras. Sin embargo, algunas observaciones hechas en este orden de ideas, son dignas de ser retenidas. Los ácidos nucleicos, de composición desconocida, han sido encontrados en varios suelos. El ácido nucleico del suelo y el ácido nucleico de las levaduras preparadas por Merck, han dado los dos, reacciones coloreadas de la creatinina después de calentamiento ó aún después de una ligera elevación de temperatura, en presencia de ácido clorhídrico diluido. Se ha conseguido preparar cristales de cloruro de zinc y creatinina tratando una solución de ácido nucleico de las levaduras.

Sin embargo, se ha hecho notar que después de lavado el ácido nucleico con una solución fría de ácido clorhídrico, este no tiene la propiedad de producir creatinina por calentamiento con el dicho ácido clorhídrico diluido, mientras que el agua de lavage da, después de calentamiento, las reacciones de la creatinina.

La explicación, que permite saber si hay preexistencia de un poco de creatina en el ácido nucleico, ó si la creatinina se separa del ácido nucleico ó de alguna combinación más compleja, nos es desconocida.

La fitina ó anhídrido del ácido oximetileno-di-fosfórico, compuesto orgánico que se encuentra en los granos de muchas plantas y que debiera por consiguiente encontrarse en los suelos, no ha sido hasta hoy aislado de ninguna tierra. Pero se ha observado que una preparación grosera de fitina de afrecho de trigo, da, después de calentamiento con ácido clorhídrico, una solución que reproduce las reacciones coloreadas de la creatinina, y se han preparado con esta solución, los cristales de cloruro de zinc y de creatinina.

Precipitando la fitina de la manera ordinaria, por precipitaciones sucesivas al estado de sal de bario, no conserva esta propiedad.

PRESENCIA DE LA CREATININA EN EL ESTIERCOL

La creatinina ha sido hallada á la vez en el estiércol de establo y en los guisantes trepadores frescos, utilizados como abonos verdes. Una muestra de estiércol de establo bien podrido fué agotado por el agua, dejándose abandonada á sí mismo la solución hasta cesación de fermentación. La creatinina fué aislada de este agotamiento por precipitación por medio del licor de Fehling, de la misma manera que en los extractos acuosos del suelo. Como resultados, se obtienen las reacciones coloreadas y los cristales de cloruro de zinc y de creatinina.

Por otra parte, los guisantes ó garbanzos trepadores frescos, triturados, agotados por el alcohol, evaporada la solución y mantenido el volumen constante con agua destilada; si á esa solución previa filtración para separar las materias insolubilizadas y tratamiento por el licor de Fehling, se le agrega cloruro de zinc, se obtiene la formación de los cristales característicos de cloruro de zinc y creatinina;

igualmente se puede y se ha llegado al mismo resultado por tratamiento directo de la solución acuosa y concentrada por el cloruro.

DOSAGE DE LA CREATININA DE LOS SUELOS

Hasta aquí, el trabajo realizado para la determinación cuantitativa de la creatinina en los suelos no es sino preliminar, y por lo tanto no se puede indicar de una manera siquiera aproximada la cantidad existente; solo se sabe que ella es pequeña y que posiblemente es una porción de la materia orgánica del suelo.

Sin embargo, se han establecido los hechos siguientes, que conciernen á esta cuestión. Ordinariamente, se llega á establecer su identidad, mediante el agotamiento de 100 gramos de tierra por alcohol; pero para llegar al mismo resultado por el tratamiento acuoso, es necesario varios kilogramos de tierra.

Además, la extracción alcohólica no es un método recomendable para la determinación cuantitativa, como lo muestra la experiencia siguiente:

Una centena de gramos de tierra se agotan por el alcohol hasta que el último líquido de agotamiento no dé las reacciones de la creatinina; ahora bien, se agregan al suelo 10 miligramos de creatinina y se procede á un nuevo agotamiento por el alcohol; en el extracto obtenido se dosa colorimétricamente la creatinina. Después de 14 horas de extracción continua, no da sino $\frac{3}{10}$ de milígramo de creatinina y un segundo agotamiento de siete horas proporciona una cantidad indosable. La coloración no es más fuerte ni más manifiesta después del calentamiento de los extractos con ácido clorhídrico, lo que demuestra que la creatinina no ha sido extraída ni cambiada en creatina.

Dado pues que los agotamientos acuosos y alcohólicos no son utilizables como base de método, se ha recurrido á los agotamientos alcalinos. Estos no dejan de presentar también sus inconvenientes. La extracción completa de la

materia orgánica del suelo con los álcalis diluidos, es lenta y exige un gran volumen de solución. Además, las soluciones resultantes se colorean en negro, y el empleo de una reacción colorimétrica no es posible, á menos que se le elimine la coloración y se concentre la solución. Es posible que por medio de la extracción alcalina y la precipitación de la creatinina de la solución por el licor de Fehling, ó por otro medio, que se llegue á un método definitivo de determinación de éste compuesto en los suelos, pero hasta aquí estas tentativas no han dado resultados satisfactorios.

La cantidad de creatinina encontrada en los suelos, por uno de los métodos ensayados, aunque débil y representando solamente una pequeña parte de la materia orgánica del suelo, no es despreciable; ella es del orden de los millonésimos y de cantidad generalmente igual y algunas veces superior á la cantidad de nitratos normalmente presentes.

DISTRIBUCION DE LA CREATININA EN LOS SUELOS

El primer trabajo sobre la extracción de la creatinina del suelo fué hecho con una muestra de las tierras cenagosas de Volusia.

La muestra fué tomada en un campo muy cultivado, y que desde hacía muchos años daba cosechas muy pobres. Dado los informes obtenidos, este campo no recibió jamás abonos comerciales ni estiércol.

Desde que se estableció que el compuesto aislado de las tierras de Volusia era la creatinina, un gran número de muestras fueron examinadas para verificar la presencia de este compuesto.

Por comparación, muchos suelos han sido estudiados y en todos, las reacciones coloreadas dadas por los extractos, han revelado la presencia de la creatinina.

El cloruro de zinc y de creatinina obtenido además de

las reacciones coloreadas, se ha conseguido de los suelos siguientes:

TIERRA DE PENSILVANIA DE FRANKSTOWN

La muestra fué tomada en un campo que había sido cultivado durante treinta años, pero colocado en barbecho desde hacía tres; en los cultivos posteriores los rendimientos fueron aún muy pobres.

TIERRA ARCILLOSA DE CLARKSVILLE EN KENTUCKY

La muestra fué tomada en un campo donde las cosechas eran espléndidas y donde el suelo respondía bien á las aplicaciones del estiércol.

TIERRA ARCILLOSA DE DUNKIRK DE NEW-YORK

Se habían obtenido buenas cosechas en este campo.

De estas observaciones, se deduce la posibilidad de que la creatinina sea un constituyente de los suelos y que por lo tanto su presencia es normal en ellos.

Por otra parte, el hecho de que los suelos examinados, han sido todos cultivados por lo menos durante algunos años, no hay razón alguna en teoría, para llegar á la conclusión de que los suelos vírgenes difieran de los cultivados, salvo sin duda en lo que se refiere á la cantidad.

RESUMEN

En este capítulo se ha descrito el método de separación de un compuesto orgánico cristalino; este compuesto contiene ázoe y se le ha identificado con la *creatinina*.

Se han pasado en revista los distintos métodos que pueden utilizarse para aislar este cuerpo de los suelos; se han discutido los métodos de identificación y se ha estudiado la química de la creatinina.

Se han examinado las relaciones de la creatinina con los otros compuestos orgánicos; se han hecho algunas observaciones en lo que concierne á las relaciones posibles entre la creatinina y los otros constituyentes orgánicos del suelo.

Se ha establecido la presencia de la creatinina en los fertilizantes orgánicos así como también en el estiércol de establo, y en los abonos verdes que se agregan al suelo en la práctica agrícola; se ha demostrado que la creatinina existe en los suelos en cuya constitución difieren totalmente los unos de los otros.

Se ha observado, en fin, que si la cantidad de creatinina es pequeña, no es ella despreciable, siendo comparable en cantidad y variabilidad, á la de los nitratos que normalmente contienen los suelos.

III.

Origen de la creatinina en los suelos

POR

M. X. SULLIVAN

Encargado de las investigaciones sobre la fertilidad

Los resultados de las experiencias que proporcionan alguna luz sobre la cuestión del origen de la creatinina en los suelos, serán tratados en este capítulo. La faz particular de la cuestión estudiada, es la presencia de la creatinina en las plantas, y por consiguiente en los detritus vegetales y su pasaje al suelo sea por desagregación, sea por desgarramiento de las células, sea aún como el resultado de los cambios de las plantas.

Los otros orígenes posibles de este constituyente del suelo, tales como su introducción por los excrementos de animales ó por el estiércol, ó su formación por los microorganismos, no serán discutidos aquí.

A excepción del caso en que se encuentre en muy pequeña cantidad, la creatinina da un cierto número de reacciones coloreadas. Estas reacciones son: la reacción Jaffé, de color rojo, con el ácido tri-nitro-fenol y algunas gotas de soda. Con un exceso de álcali ó acidulando, se degrada esa coloración. La reacción Weyl, de color rubí, cuando se le agrega algunas gotas de solución de nitro prusiato de sodio y soda cáustica hasta alcalinidad. El color rojo vira pronto al amarillo. La reacción de Salkowski, de coloración azul verdoso, que se obtiene por adición de ácido acético y calentamiento de la solución amarilla del ensayo de Weyl. El color azul verdoso se transforma en una coloración azul ó en un precipitado azul de Prusia.

El resultado negativo de estas reacciones coloreadas son una prueba evidente de la ausencia de la creatinina ó de su presencia al estado de trozas solamente. Pero, por otra parte, la presencia de estas reacciones coloreadas, no son sino una probabilidad de la existencia de la creatinina, sobre todo en el caso de extractos de suelos ó de plantas, puesto que otras sustancias producen dichas reacciones. Sin embargo, cuando las sustancias que pueden dar esas reacciones no existen en las soluciones, como en el caso de la orina, por ejemplo, estas reacciones son la prueba indirecta de la presencia de la creatinina, y la reacción de Jaffé es de uso corriente, como lo son el ensayo cuantitativo de Folín y otros.

La sal doble de zinc y de creatinina es una prueba importante de la presencia de este compuesto. Se la obtiene en inmejorables condiciones cuando el cloruro de zinc y el acetato de sodio son agregados á una solución alcohólica y neutra ó casi neutra de creatinina. El acetato de sodio debe agregarse en cantidad suficiente como para neutralizar los ácidos minerales que pueden existir, pues la sal doble característica no se forma en presencia de ácidos minerales diluidos.

Aunque la literatura, concerniente á la química biológica del organismo animal, esta bien provista de estudios sobre la creatina y la creatinina, no se ha buscado nunca,

en ningún grado, la presencia posible de estas substancias fuera de los productos animales.

Sin embargo, Zinno ha probado que los cultivos de ciertos bacterios en medio salado y peptonizado, daba las reacciones de Weyl, de Salkowski y de Jaffé, características de la creatinina, y ha podido aislarla al estado de sal doble con el cloruro de zinc.

Ultimamente Antonoff, fiándose simplemente de la reacción de Weyl, señala la formación de creatinina por numerosos bacterios cultivados en medio salado y peptonizado.

Pero antes de la presente publicación, la creatinina no había sido señalada en las materias vegetales, aunque muchas veces se le había encontrado en la carne de los animales herbívoros.

En las presentes experiencias, los fundamentos para comprobación de la creatinina, serán las reacciones de Jaffé y de Salkowski; la formación característica de sal doble de creatinina y de cloruro de zinc; la reformación de la creatinina partiendo de la sal doble por ebullición con el hidróxido de plomo y cuya solución resultante, da las reacciones coloreadas de la creatinina.

LA CREATININA EN LOS SUELOS CULTIVADOS

Cuando los extractos acuosos concentrados y los agotamientos con agua glicerinada de una tierra de invernáculo, donde recientemente se han cultivado plantas, se llevan á la ebullición en presencia del licor de Fehling, hay más ó menos reducción de cobre y formación de un precipitado blanco verdoso. Los caracteres del precipitado sugieren la idea de la presencia de bases purínicas y de creatinina en los extractos. Se deduce entonces el gran interés que hay en determinar cual de los dos extractos, acuosos y glicerinados, contienen estos compuestos, y si existe una verdadera relación entrè la cantidad de dichos compuestos y el crecimiento de las cosechas. En lo que concierne á las

bases purínicas, se puede decir de paso que, por medios apropiados, se demuestra su presencia en los extractos. El interés principal está sin embargo en la creatinina, y es persiguiendo este interés que hicimos los extractos acuosos y glicerinados de suelos de invernáculo.

TIERRA CRASA ARCILLOSA DE ARLINGTON

Una muestra de la tierra de Arlington, en la cual se ha cultivado durante cuatro años garbanzos trepadores, fué sembrada con trigo en macetas de hilo metálico parafinado, y mantenidas en el invernáculo durante tres semanas.

Desarrolladas las plantas, se cortaron sus tallos cerca del suelo. Las tierras de las macetas fueron mezcladas y tamizadas en un tamiz á mallas de $\frac{1}{8}$ de pulgada. Para obtener el extracto acuoso, se agotan 3 kilogramos de tierra, con 6 litros de agua durante 24 horas, agitando frecuentemente, sobre todo al principio. Para obtener el extracto glicerinado, se tratan 3 kilogramos de suelo por 1.200 centímetros cúbicos de glicerina pura durante 12 horas, después se agregan 4.800 centímetros cúbicos de agua. Se agita y se deja en reposo durante doce horas. La glicerina no da por sí misma las reacciones coloreadas de la creatinina.

Se filtra el extracto acuoso en filtro de papel y se concentran 2.500 centímetros cúbicos á un pequeño volumen. Después de un cierto tiempo, se forma un ligero precipitado.

El filtrado, concentrado á 20 centímetros cúbicos, da las reacciones de Jaffé y de Salkowski para la creatinina. Lo mismo, concentrando el extracto glicerinado á un pequeño volumen, se obtienen las reacciones coloreadas de la creatinina, pero más pronunciadas.

El extracto glicerinado, resultado de la concentración de 2.500 centímetros cúbicos de la solución original, era de aspecto siruposo á causa de la glicerina. Este extracto fué llevado á la ebullición en presencia del licor de Fehling y de la mixtura filtrada; este precipitado fué puesto en suspensión en el agua y librado del cobre por el hidrógeno sulfurado. El filtrado, separado del sulfuro de cobre, fué

concentrado lo más posible en el baño-maría (contenía aún un poco de glicerina). A la solución concentrada, se le agrega cloruro de zinc y acetato de sodio; se formó un precipitado blanco. A las 24 horas, aparecieron las rosetas incoloras de cloruro de zinc y de creatinina.

ARCILLA DE DUNKIRCK

Aproximadamente 8 kilogramos de tierra de Dunkirck en la cual y bajo vidriera, durante tres semanas se cultivó trigo, fueron agotados durante 20 horas por una solución de 6 litros de agua glicerinada al 20 0/0. El líquido que sobrenadaba fué decantado, el suelo prensado por medio de un trapo y las soluciones mezcladas fueron filtradas. El filtrado concentrado á un pequeño volumen da bien pronunciada, la reacción de Jaffé para la creatinina. Por el mismo procedimiento que el empleado en el caso precedente de las tierras de Arlington, la presencia de la creatina se demuestra por la formación del cloruro doble de este compuesto.

ALUVIONES DE DUTCHESS

En los extractos acuosos y glicerinados de la tierra de Dutchess, la creatinina fué puesta en evidencia siempre de la misma manera, por medio de la sal doble de cloruro de zinc y de creatinina. Los cristales de sal doble de las tierras de Arlington, de Dunkirck y de Dutchess, fueron llevados separadamente á la ebullición con hidróxido de plomo recientemente preparado. Los filtrados concentrados á pequeño volumen dieron todas las reacciones de Jaffé y de Salkowski.

Qué cantidad de creatinina de la que existe en este pequeño volumen se encuentra en los agotamientos originales? No lo sabemos, pues durante la concentración, puede formarse un poco á espensas de la creatinina si ella existe.

La creatinina fué así encontrada en el extracto glicerinado de la tierra de Arlington, procedente del campo. A

juzgar por la cantidad de sal doble de zinc y creatinina obtenida por medio de los extractos glicerinado de la tierra de Arlington cultivada é inculca, (tratados en idénticas condiciones en lo que concierne á la concentración, la precipitación por el licor de Fehling, la liberación del cobre por el hidrógeno sulfurado, la concentración del filtrado y la adición de cloruro de zinc y de acetato de sodio), el extracto del suelo cultivado y guardado en un invernáculo tres semanas, contenía más creatinina que el extracto del mismo suelo no cultivado, empleado como control.

La proporción más elevada de creatinina en el suelo cultivado, puede tener origen en una mayor actividad de los micro-organismos sobre los detritus vegetales y sobre la materia orgánica del suelo, ó directamente en el crecimiento de la planta.

PRESENCIA DE LA CREATININA EN EL AGUA DONDE SE HAN DESARROLLADO PLANTAS

Puesto que se ha encontrado creatinina en los extractos del suelo en el que había vegetado trigo durante tres semanas, es posible que ella pueda existir en el agua donde se haga vegetar la misma semilla.

En efecto, se pusieron á remojar granos de trigo durante cinco horas y enseguida fueron colocados con un poco de agua en una terrina esmaltada para que germinacen. Cuando estas semillas mostraron la plúmula, fueron colocadas en un disco de aluminio perforado flotando en el agua mediante cuatro tubos de vidrio cerrados. Al cabo de dos días, se cambió el agua. Se hizo esta misma operación 6 veces; se obtuvo de esta manera doce litros de solución que fueron concentrados en el baño de arena á 300 centímetros cúbicos. A la solución concentrada se le agregaron algunos centímetros cúbicos de ácido clorhídrico concentrado y un litro de alcohol.

Al cabo de un poco de tiempo apareció un precipitado coposo. Este precipitado da una hermosa reacción de pen-

tosanas con la orcina y ácido clorhídrico, una ligera reacción de santina y contiene ácido fosfórico y probablemente ácido nucleico.

El filtrado de este precipitado fué concentrado á 25 centímetros cúbicos y sometido á ensayo, para la creatinina, por medio del ácido trinitro-fenol y soda caústica. Se puede decir que muchos compuestos como el ácido levulínico, la tirosina, los azúcares con 5 átomo de carbono, el ácido gálico, etc., que pueden encontrarse en los extractos de las plantas, dan coloración roja con dicho ácido y la soda. Esta coloración roja, viva al amarillo por la adición de ácido acético, de suerte que esta reacción fué tomada, de buena fé, como indicadora simplemente de la posible presencia de la creatinina en el agua donde habían vegetado algunas semillas.

La solución alcohólica que acusa acción positiva de la creatinina, lo mismo que en las soluciones tipo, fué neutralizada, evaporada á seco y tratada en estas condiciones por el alcohol absoluto hirviendo y filtrada.

El filtrado fué llevado á sequedad, tomado nuevamente por el alcohol y desecado, operación que se repitió varias veces. El residuo final, ligeramente siruposo, fué tratado con el cloruro de zinc y el acetato de sodio á la manera usual y llevado á un desecador. Al cabo de algunos días, las estrellas, los hacecillos radiados de agujas y las rose-tas de cloruro de zinc y de creatinina, aparecieron. Para hacer una prueba más concluyente, la masa compuesta por los cristales fué llevada á la ebullición con hidróxido de plomo recientemente preparado, luego filtrada. El filtrado concentrado á un pequeño volumen, da la reacción de Jaffé para la creatinina y la reacción de Salkowski, con formación del azul de Prusia.

La solución original no acidulada, da lo mismo las reacciones de Jaffé y de Salkowski para la creatinina. La cantidad de este compuesto existente en la solución acuosa era muy pequeña.

Las semillas que se desarrollaron ó vegetaron en agua, tenían solamente las raíces en contacto con ella; esa agua

fué sometida á las reacciones para investigar la creatinina. En efecto, se cambiaba cada dos días, efectuándose esta operación durante diez días. Cada muestra se concentró en seguida de recogidas y todas las muestras fueron mezcladas y evaporadas hasta pequeño volumen en un desecador al vacío. La solución, concentrada, fué ligeramente acidulada con ácido clorhídrico y tratada por 4 ó 5 veces su volumen de alcohol á 95°. El ligero y coposo precipitado que se formó, fué separado por filtración.

El filtrado fué concentrado de nuevo en un aparato al vacío á un pequeño volumen, y da entonces, resultados positivos en las reacciones de Jaffé y de Salkowski para la creatinina.

La solución fué de nuevo llevada á sequedad, á la temperatura ambiente y al baño-maría. El residuo seco fué nuevamente tomado, lo mejor posible, con 50 centímetros cúbicos, más ó menos, de alcohol absoluto y la solución alcohólica, evaporada á sequedad. El residuo fué otra vez tratado por el alcohol é igualmente evaporado á sequedad; este procedimiento fué repetido hasta que aparece un residuo insoluble por desecación. Finalmente, la solución alcohólica fría, fué concentrada á un pequeño volumen, y mediante el cloruro de zinc y el acetato de sodio agregado en forma habitual, se obtuvo en pocos días, las rosetas y las estrellas típicas de sal doble de cloruro de zinc y de creatinina.

En consecuencia, la creatinina, ó algún generador de la creatinina, tal como la creatina, debe encontrarse en el agua en la cual han crecido las raíces.

Que la mayor parte de la creatinina, algunas veces por lo menos, no se encuentra tal cual en el agua de cultivo, está demostrado por el hecho que si el agua sin acidular se concentra á un pequeño volumen en el vacío ó á una temperatura comprendida entre los 50 y 60 grados, la reacción de Jaffé no es muy nítida y algunas veces negativa. Por el calentamiento al baño-maría, sobre todo en presencia del ácido clorhídrico diluido, la creatina ó algún cuerpo generador se cambia en creatinina.

Debe atribuirse la presencia de la creatina ó de la creatinina en el medio que han vegetado las plantas, á la acción de micro-organismos sobre las células desagregadas de las raíces, ó á la ósmosis directa de la raíz intacta? Esta es una cuestión muy difícil de resolver definitivamente.

La experiencia siguiente, demuestra sin embargo, que la creatinina y la creatina pueden pasar á través de las raíces en el crecimiento normal de las plantas.

CREATININA EN EL AGUA QUE HA ESTADO EN CONTACTO O REMOJADO SEMILLAS

Un kilogramo de trigo fué colocado en un frasco con dos litros de agua destilada y conservado durante cinco días en un sitio fresco cuya temperatura era de 5 á 6 grados centígrados.

El líquido, cuyo volumen era de 1.500 centímetros cúbicos, fué separado de los granos que se mostraban inflados, pero sin germinar. En el líquido se encontraban una mezcla de substancias orgánicas, entre las cuales un poco de creatinina como lo demuestra la prueba siguiente:

500 centímetros cúbicos de la solución ligeramente turbia y amarillenta, separada de los granos, fueron concentrados en el baño-maria. A la solución concentrada, que tomó coloración morena, se le agregó algunos centímetros cúbicos de ácido clorhídrico y varios volúmenes de alcohol á 95 grados. Se formó un ligero precipitado coposo que se separó por filtración. El filtrado fué concentrado en el baño-maria y neutralizado con una solución diluída de soda, dando así las reacciones coloreadas de Jaffé y de Salkowski para la creatinina. La solución fué abandonada al aire libre hasta desecación. El residuo seco, tratado por el agua fué igualmente tratado por el acetato de plomo. El filtrado fué librado del plomo y llevado á sequedad en el baño-maria. El residuo fué tratado por el alcohol absoluto y la solución alcohólica evaporada á sequedad. Este procedi-

miento del alcohol y evaporación, se repitió hasta que el residuo seco resultó soluble totalmente en el alcohol absoluto. El residuo siruposo fué tratado por cloruro de zinc y acetato de sodio y colocado en un desecador. Al cabo de una semana, los cristales de cloruro de zinc y de creatinina hicieron su aparición en la mixtura morena y siruposa. Después de ebullición con el hidróxido de plomo y filtración, la solución concentrada da una buena reacción de Jaffé. La solución, obtenida después de evaporación á seco, nuevamente tomada por el alcohol absoluto, concentración y adición de cloruro de zinc y acetato de sodio, da las rosetas típicas de cloruro de zinc y de creatinina.

La creatinina puede provenir, en las semillas no germinadas, tanto de la creatinina existente, como de la creatinina ó de algún cuerpo generador que se transforma fácilmente en creatinina.

LA CREATININA EN LOS VEGETALES

TRIGO VERDE

Aproximadamente 5.000 tallos de trigo de 9 á 11 días, fueron triturados y agotados durante varios días con alcohol hirviendo. El alcohol caliente, decantado y separado de la pulpa, por presión, fué puesto á enfriar. La solución filtrada á través de un papel, fué concentrada á un pequeño volumen en un aparato al vacío. La solución filtrada de nuevo, fué adicionada de acetato de plomo para precipitar la materia colorante. El filtrado convenientemente decolorado, fué separado del plomo en exceso por medio del hidrógeno sulfurado, y el sulfuro formado, por una filtración. El filtrado, concentrado á un pequeño volumen, da la reacción de Jaffé; la coloración obtenida se degrada por adición de un exceso de álcali y por acidificación. En consecuencia, se le agregó á la solución, cloruro de zinc y acetato de sodio. Al cabo de varios días, el cloruro doble de zinc y de creatinina, apareció en la masa en forma de estrellas,

hexágonos dentados, hacecillos de agujas y rosetas. Tratado con hidróxido de plomo como en los casos anteriores, se obtiene una solución que da las reacciones de Jaffé y Salkowski para la creatinina.

GRANOS DE TRIGO

Una libra de granos de trigo fué triturada y agotada por agua fría; la solución turbia, concentrada y filtrada para separar el precipitado formado á la ebullición. Varios volúmenes de alcohol á 95 grados fueron agregados á la solución que fué enseguida filtrada. El alcohol fué eliminado por destilación y el residuo nuevamente concentrado. Este líquido, que daba la reacción de Jaffe para la creatinina, fué llevado casi á sequedad en el baño de arena y tratado en seguida por un pequeño volumen de alcohol á 95 grados. La solución alcohólica fué evaporada á seco y el procedimiento de volver á tratar por el alcohol y evaporación fué repetido varias veces. Finalmente, al jarabe ligeramente moreno, soluble en alcohol frío, se le agregó cloruro de zinc y acetato de sodio. Los cristales típicos de sal doble (cloruro de zinc y de creatinina), se formaron al cabo de algunos días en el desecador. Por adición de agua á la masa, se disuelve una gran parte y se decanta. El cloruro de zinc y de creatinina dejado, se manifiesta por desecación en el desecador, al estado de estrellas y rosetas incoloras.

La sal doble indicada, fué también obtenida utilizando el extracto alcohólico directo de los granos de trigo triturados. Dichos granos fueron triturados y agotados durante varias horas en un aparato de Soxhlet. El extracto alcohólico caliente fué llevado á sequedad, nuevamente tomado por agua, filtrado y concentrado casi á seco. El residuo fué tratado con alcohol absoluto y la porción soluble en el alcohol, después de haber sido evaporada casi á sequedad, fué tratada por el cloruro de zinc y el acetato de sodio. En pocos días, las estrellas, las rosetas y los hexágonos fueron aparentes al microscopio.

AFRECHO DE TRIGO

El salvado de trigo fué fácilmente agotado en un aparato de Soxhlet con alcohol á 95 grados. El extracto da la reacción de Jaffé para la creatinina. El alcohol fué evaporado y el residuo vuelto á tratar por el agua fría, fué filtrado. El líquido filtrado fué tratado por el acetato de plomo que precipita la materia colorante, etc., después filtrado de nuevo. La solución es sometida á la acción del hidrógeno sulfurado que precipita al plomo en exceso; una filtración permite separarlo. La solución incolora que se obtiene se lleva á sequedad al baño-maría. El residuo tratado por el alcohol absoluto, evaporado, etc., hasta que fué soluble totalmente en dicho alcohol, La adición de cloruro de zinc y acetato de sodio da las rosetas de cloruro doble.

La experiencia fué repetida empleando mayor cantidad de afrecho. La masa siruposa conteniendo cloruro de zinc y creatinina, fué colocada sobre una superficie porosa y tratada por alcohol y agua hasta perfecto blanqueo. El residuo de la placa porosa fué disuelto en agua caliente y la solución filtrada. El filtrado fué llevado á sequedad en el baño-maría, en cápsula tapada. Al residuo pesado, se le agrega ácido nítrico y se lleva primero á sequedad y luego se calienta en llama libre hasta eliminación total del ácido nítrico. El residuo se pesa nuevamente. La primera pesada da 22.6 % de ZnO. Después de calcinación, el peso se reduce á 21.8 y se mantiene prácticamente constante. Al cloruro de zinc y de creatinina le corresponden 22.4 % de ZnO.

PAJA DE TRIGO

En el extracto alcohólico de la paja de trigo, no se ha determinado la creatinina por el método del cloruro doble. Sin embargo, si los extractos, después de haber sido separados de la materia colorante por el acetato de plomo y el plomo por el hidrógeno sulfurado, son ligeramente aci-

dulados y llevados á la ebullición, se obtiene un hermoso conjunto de cristales de cloruro de zinc y de creatinina. Aparentemente la creatinina, no preexiste en la paja de trigo, mientras sí, la creatina ú otro cuerpo generador.

PROTEINA DEL TRIGO

Un extracto acuoso de granos de trigo sometido á ebullición, forma un pesado precipitado. Este precipitado, que da las reacciones coloreadas de la proteina, fué lavado con agua, con ácido clorhídrico diluido y con alcohol, hasta que los lavages, después de neutralización y concentración no da más las reacciones de la creatinina con ácido nítrico y soda. La materia proteica fué en seguida llevada á ebullición durante 30 minutos, con ácido clorhídrico al 3 %. Del filtrado neutralizado y concentrado, tomado por el alcohol absoluto, se obtiene una solución que da la reacción de Jaffé y también los cristales de cloruro de zinc y de creatinina, después del tratamiento del cloruro de zinc y del acetato de sodio. Puesto que los lavages de la materia protéica dan también creatinina después del calentamiento con ácido clorhídrico, la proteína contiene indudablemente este compuesto.

Apesar de que hay alguna posibilidad de que tanto la creatinina como la creatina puedan ser derivados de la molécula protéica ó de compuestos azoados menos complejos, sus orígenes en el tejido vegetal es aun una cuestión no resuelta.

Cualquiera que sea el origen de la creatinina, ella existe en los granos y en los tallos del trigo, y pasa en más ó menos cantidad, al agua donde se hace germinar las semillas ó vegetar las plantas.

GRANOS DE CENTENO

Cierta cantidad de granos de centeno triturados en polvo grosero fueron agotados en caliente con alcohol á 95 grados. Después del enfriamiento la solución fué filtrada. El

filtrado claro da una buena reacción de Jaffé. En consecuencia, fué concentrado á un pequeño volumen y tratado por el cloruro de zinc y el acetato de sodio. La sal doble de creatinina y de zinc se forma rápidamente en la mixtura.

GRANOS DE TREBOL Y DE ALFALFA

Los extractos alcohólicos de trébol y de alfalfa dan una fuerte reacción coloreada de la creatinina con el ensayo de Jaffé. Al extracto alcohólico, turbio por enfriamiento, se le agregó agua, y se eliminó el alcohol al baño-maría. Al extracto acuoso, se le agregó acetato de plomo hasta precipitación completa. Después de filtración, el plomo en exceso fué eliminado por el hidrógeno sulfurado y la solución, filtrada y evaporada á sequedad al baño-maría. El residuo fué tratado por una pequeña cantidad de alcohol á 95 grados y filtrado. La solución alcohólica fué desecada y el residuo tratado por alcohol absoluto. Finalmente, la parte soluble en el alcohol absoluto fué concentrado y tratado por el cloruro de zinc y el acetato de sodio, de la manera habitual. El cloruro doble de zinc y de creatinina se forma en los dos casos, es decir, en el extracto de trébol y en el de alfalfa.

GARBANZO TREPADOR

La creatinina fué encontrada de la misma manera en el extracto alcohólico de estas plantas nuevas y maduras, como ha sido demostrado en párrafos que anteceden.

PAPAS

Las papas fueron trituradas á una pulpa fina que fué agotada con un litro de alcohol hirviendo. El extracto resultante, fué evaporado á seco y tomado luego por agua fría. La solución acuosa fué tratada por el acetato de plo-

mo y filtrada; el filtrado, privado del plomo, fué concentrado á un pequeño volumen, dando en los ensayos, las reacciones positivas de Jaffé y de Salkowski para la creatinina. La solución fué llevada á seco y el residuo tratado de nuevo por el alcohol absoluto. La solución alcohólica, concentrada á algunos centímetros cúbicos, fué adicionada de cloruro de zinc y de acetado de sodio. Al cabo de tres ó cuatro días, los cristales de sal doble (cloruro de zinc y de creatinina), aparecieron en la mixtura.

RESUMEN

De dos muestras de un mismo suelo, cultivado é inculto, uno al lado de otro, en un mismo invernáculo, la muestra del cultivado da una mayor proporción de creatinina.

Parece que el aumento de la cantidad de creatinina está en relación, en alguna forma, con la vegetación de la planta. La creatinina fué también encontrada en el agua en la cual habían vegetado tallos de trigo. La presencia de la creatinina en las plantas no había sido precedentemente señalada: en plantas variadas fué ensayada la investigación de la creatinina y su presencia definitivamente asegurada. Fué encontrada en los granos, en los tallos de los trigos, en el centeno, en el trébol, en la alfalfa, en los garbanzos trepadores y en las papas. Si como ha sido sugerido por varios investigadores, la creatinina se encuentra en el animal como resultado de la digestión de la albúmina, entonces es aceptable pensar que la creatinina puede prácticamente encontrarse en todas las plantas.

En la materia vegetal, la creatinina y la creatina existen en pequeñas cantidades.

Aunque la cantidad presente de estos compuestos sea pequeña, es digna de atención, puesto que, por la descomposición de las plantas y por la desagregación de las células, ó aún por ósmosis, la creatinina y la creatina pasan al agua y al suelo, en el cual ejercen efectos sobre el crecimiento subsiguiente de las plantas.

La creatinina parece persistir durante un tiempo considerable en el suelo y poder realmente aumentar por acumulación. Puesto que las dos, la creatinina y la creatina, tienen un efecto favorable sobre la vegetación, su presencia, en las plantas y en el medio donde las plantas crecen, puede dar un apoyo considerable á la fertilidad del suelo.

IV.

Efectos de la creatinina sobre el crecimiento y la absorción

POR

J. J. SKINNER

Encargado de las investigaciones sobre la fertilidad

En el primer capítulo de este folleto, se han relatado los resultados de una investigación concerniente á la presencia en los suelos de un compuesto orgánico azoado, la creatinina. En el segundo capítulo, se ha demostrado su presencia en las plantas y en los suelos de donde se han sacado éstas. El presente capítulo, resúme una série de experiencias sobre la influencia de la creatinina en las cosechas. Los resultados de estas investigaciones, demostrando los efectos de la creatinina, proporcionan mucha luz en lo relativo á la acción de los abonos orgánicos en los suelos y sobre la influencia de la materia orgánica en la productividad.

MÉTODOS EMPLEADOS

Para estudiar los efectos de la creatinina sobre las cosechas, los tallos de trigo fueron cultivados en agua, conteniendo sales fertilizantes ordinarias, fosfatos ácido de calcio, nitrato de sodio y sulfato de potasa. Algunos de

estos cultivos contenían fosfato ácido de calcio solo, otros nitrato de sodio solo y otros también solamente sulfato de potasio. Algunas soluciones contenían los tres elementos constitutivos en proporciones variadas. La concentración de todas las soluciones fué de $\frac{80}{1.000.000}$ de elementos fertilizantes (Ph_2O_5 , NH_3 y K_2O). En los cultivos que contenían solamente una sal fertilizante, por ejemplo fosfato ácido de calcio, la concentración fué de $\frac{80}{1.000.000}$ de Ph_2O_5 . En el caso de dos sales presentes, por ejemplo fosfato ácido de calcio y nitrato de sodio, la concentración fué de $\frac{80}{1.000.000}$ de $\text{Ph}_2\text{O}_5 + \text{NH}_3$. En el caso de las tres sales fertilizantes presentes, la concentración fué de $\frac{80}{1.000.000}$ de $\text{Ph}_2\text{O}_5 + \text{NH}_3 + \text{K}_2\text{O}$. La proporción de estos constituyentes variaba regularmente de 10 por 100 de la cantidad total de los elementos fertilizantes presentes de un cultivo á otro y en sentido inverso. En todo, había 66 cultivos en soluciones nutritivas diferentes.

Dos series de cultivos se prepararon: la primera serie fué adicionada simplemente de sales nutritivas, y una serie semejante fué adicionada de $\frac{50}{1.000.000}$ de creatinina por cultivo, además de las sales nutritivas.

Estas soluciones nutritivas estaban contenidas en frascos de boca ancha de 250 centímetros cúbicos, y 10 tallos de trigos vegetaban en cada frasco, según los métodos indicados en el Boletín número 70 de la Oficina de suelos.

Dichas soluciones se cambiaban cada tres días, efectuándose cuatro cambios durante el curso de las experiencias. En estas soluciones se determinaban inmediatamente después de cada cambio, la cantidad de nitratos existentes. Los fosfatos y la potasa se determinaron en las soluciones compuestas de los cuatro cambios reunidos.

Las observaciones sobre el desarrollo de las plantas fueron hechas durante la experiencia, anotándose el peso de las plantas verdes cuya edad era de doce días.

EFFECTO DE LA CREATININA SOBRE EL CRECIMIENTO

Dos series de cultivos compuestos de sales fertilizantes, fosfato ácido de calcio, nitrato de sodio, sulfato de potasio, en proporciones variables, empleadas solas ó en combinaciones de 2 y 3, fueron cultivados en ellas del 3 al 15 de Marzo, pequeñas plantas de trigo. A una serie de cultivos se le agregaron solamente sales nutritivas. A la segunda serie se le agregó $\frac{50}{1.000.000}$ de creatinina á cada cultivo. Cada tres días, las soluciones eran cambiadas y analizadas.

Al cabo de algunos días de vegetación, se pudo observar que los cultivos cuyas soluciones contenían creatinina, estaban mejor desarrollados; tenían hojas más grandes, raíces más largas y mejor ramificadas.

El crecimiento total, hecho en las 66 culturas de sales nutritivas sin creatinina, designadas como culturas normales ó de control, fué de 166 gr. 7, contra 181, gr. 2, en el caso de las 66 culturas con $\frac{50}{1.000.000}$ de creatinina. Reduciendo los cultivos normales á 100, los cultivos con creatinina llegan á 109, ó sea un beneficio de 9 por 100 para un término medio de 66 cultivos.

Los efectos fueron más pronunciados en las soluciones que no contenían ázoe y en aquellas con débiles proporciones de este elemento.

CRECIMIENTO EN SOLUCIÓN SIN NITRATO Y CON Y SIN CREATININA

El cuadro I demuestra el crecimiento de dos series de cultivos compuestos de mezclas de fosfato y de potasa, variando regularmente de 10 por 100 de la cantidad total y en sentido inverso de un cultivo á otro; no contenía nitratos la solución, siendo su concentración de $\frac{80}{1.000.000}$ de $\text{Ph}\cdot\text{O}_5 + \text{K}_2\text{O}$ en cada cultivo.

La primera serie fué adicionada de $\frac{50}{1\,000.000}$ de creatinina, y en la cuarta columna, se da el peso de los cultivos verdes sin creatinina.

EFFECTO DE LA CREATININA EN EL CRECIMIENTO
EN SOLUCIONES SIN NITRATO

CUADRO I.

Núms.	Elementos fertilizantes en la solución de cultura			Peso de los cultivos verdes	
	Ph ₂ O ₅ p. 1 millón	NH ₃ p. 1 millón	K ₂ O p. 1 millón	Sin creatinina	Con creatinina
				gramos	gramos
1	0	0	80	1.400	1.576
2	8	0	72	1.470	2.200
3	16	0	64	1.950	2.100
4	24	0	56	1.527	2.000
5	32	0	48	1.490	2.200
6	40	0	40	1.558	2.408
7	48	0	32	1.795	2.328
8	56	0	24	1.540	2.400
9	64	0	16	1.444	2.220
10	72	0	8	1.400	2.100
11	80	0	0	1.100	1.150

Resulta de estas cifras, que la creatinina ha provocado un crecimiento considerable. Esto se verifica en cada uno de los 11 cultivos. Por ejemplo, en el cultivo número 3, que tenía $\frac{16}{1.000.000}$ de fosfato y $\frac{64}{1.000.000}$ de potasa, el crecimiento sin creatinina fué de 1 gr. 950, y, con $\frac{50}{1.000.000}$ de creatinina se eleva á 2 gr. 100. El cultivo numero 6, compuesto por partes iguales de fosfato y de potasa, dió

1 gr. 558, peso en verde, sin creatinina, y 2 gr. 408 con presencia de dicho compuesto azoado en la solución. En el cultivo número 9, compuesto de $\frac{64}{1.000.000}$ de fosfato y de $\frac{16}{1.000.000}$ de potasa, el crecimiento fué de 1 gr. 444 sin creatinina y de 2 gr. 220 con creatinina.

El crecimiento total de los 11 cultivos sin creatinina, compuesto por una solución de fosfato y de potasio, fué de 16 gr. 674 contra 22 gr. 682 para los cultivos con creatinina. Es un beneficio de 36 p. 100 para estos últimos.

Por otra parte, el título de las soluciones era el siguiente:

La núm. 1 estaba compuesta de potasa solamente $\frac{80}{1.000.000}$
la núm. 2 de $\frac{72}{1.000.000}$ de potasa y $\frac{8}{1.000.000}$ de fosfato; la
número 3 de $\frac{64}{1.000.000}$ de potasa y $\frac{16}{1.000.000}$ de fosfato; la
número 4 de $\frac{56}{1.000.000}$ de potasa y $\frac{24}{1.000.000}$ de fosfato; la
número 5 de $\frac{48}{1.000.000}$ de potasa y $\frac{32}{1.000.000}$ de fosfato; la
número 6 de $\frac{40}{1.000.000}$ de potasa y $\frac{40}{1.000.000}$ de fosfato; la
número 7 de $\frac{32}{1.000.000}$ de potasa y $\frac{48}{1.000.000}$ de fosfato; la
número 8 de $\frac{24}{1.000.000}$ de potasa y $\frac{56}{1.000.000}$ de fosfato; la
número 9 de $\frac{16}{1.000.000}$ de potasa y $\frac{64}{1.000.000}$ de fosfato; la
núm. 10 de $\frac{8}{1.000.000}$ de potasa y $\frac{72}{1.000.000}$ de fosfato; la
número 11 está compuesta solamente de fosfato $\frac{80}{1.000.000}$

Las plantas, en cada solución de cultivo, conteniendo creatinina, cualquiera que sea la proporción de potasa y de fosfato, son más grandes que las que crecieron en soluciones semejantes en lo que respecta á los componentes minerales, pero sin creatinina. El aumento de desarrollo es igualmente notable, tanto en las raíces como en los tallos. En cada caso, los tallos son más grandes y más gruesos, las raíces más largas y mejor desarrolladas.

LA CREATININA EN SOLUCIONES DE CULTIVO CONTENIENDO
 $\frac{8}{1.000.000}$ DE NH_3 EN FORMA DE NITRATO

Puesto que la creatinina es muy útil en las soluciones nutritivas que no contienen nitratos, es digno de observar sus efectos en cultivos que contienen pequeñísimas cantidades de nitratos. El cuadro II da los resultados de los efectos de la creatinina sobre el crecimiento en soluciones de cultivo compuestas de equivalentes de $\frac{8}{1.000.000}$ de amoníaco, bajo la forma de nitratos, y de cantidades variables de fosfatos y de potasa, siendo la concentración total de cada solución igual á $\frac{80}{1.000.000}$ de $\text{Ph}_2\text{O}_5 + \text{K}_2\text{O} + \text{NH}_3$.

EFFECTOS DE LA CREATININA EN LAS SOLUCIONES NUTRITIVAS
 CONTENIENDO $\frac{8}{1.000.000}$ DE NH_3 EN FORMA DE NITRATO

CUADRO II.

Núms.	Elementos fertilizantes en la solución de cultura			Peso de los cultivos verdes	
	Ph_2O_5 p. 1 millón	NH_3 p. 1 millón	K_2O p. 1 millón	Sin creatinina	Con creatinina
				gramos	gramos
1	0	8	72	1.820	2.190
2	8	8	64	2.470	3.100
3	16	8	56	2.748	3.250
4	24	8	48	2.907	3.420
5	32	8	40	2.670	3.450
6	40	8	32	2.928	3.258
7	48	8	24	2.526	3.340
8	56	8	16	2.600	3.000
9	64	8	8	2.048	2.359
10	72	8	0	1.354	1.750

Considerando las cifras de las columnas 2 y 3, se ve que, cualesquiera que sean las proporciones respectivas de Ph_2O_5 y NH_3 , el crecimiento con la creatinina, indicado en la última columna, es más grande que el de las plantas de la quinta columna que no contenían creatinina. Sin embargo, la diferencia no es tan grande como en las soluciones que no contienen absolutamente nada de nitratos como las presentadas en el cuadro I. El peso total de los cultivos verdes que vegetaron en la mezcla fertilizante conteniendo $\frac{8}{1.000.000}$ de amoníaco sin creatinina, fué de 24 gr. 071, contra 28 gr. 117 para los cultivos con creatinina, ó sea un aumento de 17 p. 100. En los cultivos sin nitratos, la creatinina produjo un aumento de 36 p. 100.

INFLUENCIA DE LA CREATININA EN LAS SOLUCIONES QUE CONTIENEN
MAYORES CANTIDADES DE NITRATOS

Hemos visto que la creatinina es un elemento ventajoso en los cultivos que no contienen nitratos. En este grupo de cultivos en soluciones compuestas por mezclas de fosfatos y de potasa en diferentes proporciones, la creatinina aumenta el crecimiento en un 36 %. Hemos visto también, que el efecto útil de la creatinina no fué tan notable en los cultivos que contienen una pequeña cantidad de ázoe. El efecto fué solamente de 17 % en el grupo de cultivo cuyas soluciones contenían fosfatos y potasa y $\frac{8}{1.000.000}$ de amoníaco bajo forma de nitrato.

En el cuadro III damos el resultado del crecimiento en soluciones con y sin creatinina, compuesta por mezcla de fosfatos, potasa y nitratos. La proporción de fosfatos y de potasa variaba en las diferentes soluciones, pero cada una de ellas tenía $\frac{16}{1.000.000}$ de amoníaco bajo la forma de nitrato. Los pesos de los cultivos verdes con creatinina, indicados en la última columna del cuadro, son en algo más elevados que los indicados en la cuarta columna para los

cultivos de control. El peso en verde total de los cultivos sin creatinina fué de 25 gr. 516, contra 27 gr. 573 para los con creatinina, ó sea un aumento de 8 p. 100.

EFFECTOS DE LA CREATININA EN SOLUCIONES QUE CONTIENEN
 $\frac{16}{1.000.000}$ DE NH_3 BAJO FORMA DE NITRATO

CUADRO III

Núms.	Elementos fertilizantes en las soluciones nutritivas			Peso de los cultivos verdes	
	Ph_2O_5 p. 1 millón	NH_3 p. 1 millón	K_2O p. 1 millón	Sin creatinina	Con creatinina
				gramos	gramos
1	0	16	64	2.200	2.570
2	8	16	56	3.200	3.720
3	16	16	48	3.400	3.500
4	24	16	40	3.097	3.702
5	32	16	32	3.250	3.250
6	40	16	24	3.228	3.300
7	48	16	16	2.975	3.240
8	56	16	8	2.626	2.551
9	64	16	0	1.440	1.740

En otros cultivos cuya solución nutritiva estaba compuesta por tres elementos fertilizantes, Ph_2O_5 , K_2O , y NH_3 , conteniendo de este último $\frac{24}{1.000.000}$ bajo la forma de nitrato, la creatinina provoca un aumento de crecimiento representado por un 2 %. Sus efectos, en las mezclas fertilizantes que tienen más de $\frac{24}{1.000.000}$ de amoníaco igualmente bajo la forma de nitratos, son inciertos. En algunos casos, hay un ligero aumento en el crecimiento, y en otros un pequeño déficit. Sin embargo, en todos los casos, con grandes cantidades de nitratos, el crecimiento es práctica-

mente el mismo tanto en las soluciones normales como en las que contienen creatinina.

Antes de llevar más lejos la discusión de los efectos de la creatinina, es necesario demostrar los efectos que los nitratos tienen en el crecimiento de las plantas, en las mezclas de los dos elementos fertilizantes, fosfato y potasa. En un trabajo precedentemente publicado, se ha demostrado que el mejor crecimiento se produce en las soluciones normales cuando los tres elementos fertilizantes P_2O_5 , K_2O y NH_3 , están presentes y aún mejor en las soluciones nutritivas que contienen cantidades aproximadamente iguales de NH_3 y K_2O y una pequeña cantidad de P_2O_5 , más ó menos $\frac{16}{1.000.000}$. El crecimiento en las soluciones que contienen los tres elementos constituyentes, es mucho mayor que en las soluciones que contienen solamente dos de dichos elementos. Este hecho es evidentemente notable cuando los nitratos no están en la combinación.

En las comparaciones del crecimiento medio de un cierto número de cultivos en soluciones mezclas de fosfatos, de potasa, ($\frac{80}{1.000.000}$ de $\text{P}_2\text{O}_5 + \text{K}_2\text{O}$) da 1 gr. contra 3 gr. 155 en el crecimiento medio de soluciones compuestas de una mezcla de los dos cuerpos con una adición de $\frac{8}{1.000.000}$ de amoníaco bajo forma de nitratos, á igualdad de concentración de los elementos nutritivos en la misma. En una segunda experiencia conducida de manera semejante, pero en fecha posterior, el crecimiento medio, en las soluciones nutritivas compuestas por mezclas de fosfatos y de potasa, fué de 0 gr. 878, y el crecimiento medio, en los cultivos que contenían los tres elementos ($\frac{8}{1.000.000}$ eran de amoníaco), fué de 2 gr. 107.

En la experiencia presente, el crecimiento de las plantas, en las soluciones normales compuestas de proporciones variables de fosfatos y de potasa, comparado con el crecimiento en las mezclas de estos dos elementos con $\frac{8}{1.000.000}$ de amoníaco, está indicado en el siguiente cuadro número IV.

CRECIMIENTO EN SOLUCIONES COMPUESTAS DE MIXTURAS
 FERTILIZANTE SIN NITRATOS Y CON $\frac{8}{1.000.000}$ DE NH_3 , EN FORMA
 DE NITRATOS; SIN CREATININA

CUADRO IV.

Núms.	Elementos fertilizantes en la solución nutritiva			Peso de los cultivos verdes	
	P_2O_5 p. 1 millón	K_2O p. 1 millón	NH_3 p. 1 millón	Sin ázoe	Con ázoe
				gramos	gramos
1	0	80	0	1.400	—
2	0	72	8	—	1.820
3	8	72	0	1.470	—
4	8	64	8	—	2.470
5	16	64	0	1.950	—
6	16	56	8	—	2.748
7	24	56	0	1.517	—
8	24	48	8	—	2.907
9	32	48	0	1.490	—
10	32	40	8	—	2.670
11	40	40	0	1.558	—
12	40	32	8	—	2.928
13	48	32	0	1.795	—
14	48	24	8	—	2.526
15	56	24	0	1.540	—
16	56	16	8	—	2.600
17	64	16	0	1.444	—
18	64	8	8	—	2.048
19	72	8	0	1.400	—
20	72	0	8	—	1.354
21	80	0	0	1.100	—

El desarrollo del cultivo en la solución número 11, por ejemplo, compuesta por $\frac{40}{1.000.000}$ de Ph_2O_5 y $\frac{40}{1.000.000}$ de K_2O , es de 1 gr. 558, contra 2 gr. 670 para el cultivo número 10, que tiene $\frac{32}{1.000.000}$ de Ph_2O_5 , $\frac{40}{1.000.000}$ de K_2O y $\frac{8}{1.000.000}$ de NH_3 , ó 2 gr. 928 para el cultivo número 12 que tenía $\frac{40}{1.000.000}$ de Ph_2O_5 , $\frac{32}{1.000.000}$ de K_2O y $\frac{8}{1.000.000}$ de NH_3 .

Estudiando detenidamente las cifras de este cuadro, se ve que el crecimiento, en las mezclas de fosfato y de potasa, es más pequeño que en el de las soluciones compuestas por la mezcla de los tres elementos, conteniendo $\frac{8}{1.000.000}$ de NH_3 bajo forma de nitrato. El crecimiento medio de los cultivos sin nitratos es de 1 gr. 516, contra 2 gr. 407 para los que contienen $\frac{8}{1.000.000}$ de NH_3 en la mezcla fertilizante. Llevando el crecimiento de los cultivos sin nitrato á 100, el crecimiento relativo de los cultivos con nitrato se eleva á 159, ó sea un excedente de 59 por 100.

El cuadro V, indica los pesos de los cultivos verdes con creatinina en la solución nutritiva; son semejantes á los resultados discutidos y comentados más arriba para las soluciones normales. Con $\frac{50}{1.000.000}$ de creatinina en la solución, cultivos que no contienen nitratos, producen crecimientos más hermosos que los cultivos correspondientes sin creatinina, indicados en el cuadro IV. La diferencia entre las dos últimas columnas no es tan marcada en el caso de la creatinina como en la serie normal. Por ejemplo, el cultivo número 11 que contiene $\frac{40}{1.000.000}$ de fosfato y otro tanto de potasa da 2 gr. 408, peso verde, contra 2 gr. 450 para el cultivo número 10, que tiene $\frac{32}{1.000.000}$ de fosfato, $\frac{40}{1.000.000}$ de potasa y $\frac{8}{1.000.000}$ de amoníaco, bajo forma de nitrato, y 3 gr. 258 para el cultivo número 12, que contiene $\frac{40}{1.000.000}$ de fosfato, $\frac{32}{1.000.000}$ de potasa, y

CRECIMIENTO EN LAS SOLUCIONES NUTRITIVAS COMPUESTAS
 POR MEZCLAS FERTILIZANTES SIN NITRATO Y CON $\frac{8}{1,000,000}$ DE NH_3
 EN FORMA DE NITRATO CON CREATININA

CUADRO V.

Núms.	Elementos fertilizantes en la solución nutritiva			Peso de los cultivos verdes	
	Ph_2O_5 p. 1 millón	NH_3 p. 1 millón	K_2O p. 1 millón	Sin ázoe	Con ázoe
				gramos	gramos
1	0	0	80	1.576	—
2	0	8	72	—	2.190
3	8	0	72	2.200	—
4	8	8	64	—	3.100
5	16	0	64	2.100	—
6	16	8	56	—	3.250
7	24	0	56	2.000	—
8	24	8	48	—	3.420
9	32	0	48	2.200	—
10	32	8	40	—	2.450
11	40	0	40	2.408	—
12	40	8	32	—	3.258
13	48	0	32	2.328	—
14	48	8	24	—	3.340
15	56	0	24	2.400	—
16	56	8	16	—	3.000
17	64	0	16	2.220	—
18	64	8	8	—	2.359
19	72	0	8	2.100	—
20	72	8	0	—	1.750
21	80	0	0	1.150	—

$\frac{8}{1.000.000}$ de amoníaco, en forma de nitrato. El crecimiento medio de los cultivos sin nitrato es de 2 gr. 062 contra 2 gr. 812 para cada cultivo que tiene $\frac{8}{1.000.000}$ de NH_3 en forma nítrica en la mezcla fertilizante. Si se lleva el desarrollo de los cultivos sin nitrato á 100, el crecimiento con nitrato en el medio fertilizante se eleva á 136, ó sea un beneficio de 36 %.

En la serie de cultivos testigos sin creatinina, indicada en el cuadro IV, el crecimiento relativo, en las soluciones con ázoe fué de 59 % más elevado que en las soluciones nutritivas que no contenían ázoe. En las soluciones con creatinina, hubo solamente una diferencia de 36 % entre el desarrollo de los cultivos nitrados y no nitrados. Este hecho puede indicar que la creatinina reemplaza eficazmente á los nitratos en el desarrollo de la planta.

Las plantas de las soluciones sin nitrato tienen los tallos más pequeños y las raíces mediocrementemente desarrolladas, mientras que las plantas nitradas tienen tallos grandes y raíces ramificadas. La série C, de cultivos con creatinina sin nitrato, comparada á la série D, de cultivos con creatinina y nitrato, demuestra que esta diferencia no es tan grande como en el caso de los cultivos normales con y sin nitrato.

El efecto de la creatinina en los cultivos que no contienen nitrato es bien manifiesto si se compara la série B y la serie C. La serie A, comparada á la serie D, demuestra que la creatinina no produce un efecto adicional elevado cuando el ázoe bajo forma de nitrato se encuentra en la solución nutritiva.

INFLUENCIA DE LA CREATININA EN LA ABSORCION DE LAS SALES FERTILIZANTES

La discusión precedente ha demostrado claramente la influencia de la creatinina en el desarrollo, y sus efectos en las soluciones nutritivas que no contenían nitrato. Falta

ahora estudiar los efectos de la creatinina en el desplazamiento de las sales nutritivas en las soluciones, durante el desarrollo de la planta.

Hemos indicado oportunamente, que las diferencias de concentración producidas por el desarrollo de las plantas en las soluciones nutritivas, fueron determinadas haciendo un dosage de los nitratos inmediatamente después de haber retirado las soluciones de cultivo, cosa que se hacía cada tres días; los fosfatos y la potasa fueron determinados en las mezclas de los cuatro días. En esta forma, se hace posible la comparación de los resultados obtenidos en condiciones normales indicadas, sin creatinina y con una adición de $\frac{50}{1.000.000}$ de este compuesto orgánico-azoado en la solución.

La suma total de $\text{P}_2\text{O}_5 + \text{NH}_3 + \text{K}_2\text{O}$, desalojada por el crecimiento de las plantas de las soluciones que contenían estos tres elementos, fué de 1.684 miligramos en las condiciones normales, y de 1.584 miligramos, en la serie que contenía creatinina. Estas cifras demuestran que el total de las sales nutritivas desalojadas, es ligeramente inferior en el caso de la creatinina, aunque el peso, en este caso, fué de 9 % más elevado que en la serie normal.

El examen de los resultados por separados de los tres constituyentes, indicados mas abajo, demuestran que la absorción del fosfato y de la potasa, fué ligeramente más grande que la normal, como lo exige un desarrollo más grande, mientras que la cantidad de nitratos desalojada es considerablemente menor que en la serie normal.

FOSFATO

El fosfato, de las soluciones, fué determinado por el método descrito en la página 59 del boletín número 70 del *Bur. of soils*. La cantidad de fosfato en P_2O_5 , desalojada por las plantas en la totalidad de las soluciones durante las experiencias, fué de 364 miligramos para las solucio-

nes normales, y de 383 miligramos para los cultivos con creatinina, ó sea una diferencia de 19 miligramos en favor de los cultivos con creatinina.

POTASIO

El potasio fué determinado en la mezcla de los cuatro cambios de solución, siguiendo un método indicado en otro Boletín. La cantidad de potasio en K_2O , desalojada por las plantas en la totalidad de las soluciones, fué de 760 miligramos en el caso de los cultivos normales, y de 778 miligramos para los cultivos con creatinina. Como para los fosfatos, el cultivo con creatinina desaloja un poco más de potasio que el cultivo normal. Hay una diferencia de 18 miligramos en favor de la serie con creatinina.

NITRATOS

En las soluciones fueron determinados los nitratos al fin de cada periodo de tres días, por un método análogo al indicado en el boletín número 70 del *Bur. of soils*. La cantidad total de ázoe en NH_4 , desalojada de la totalidad de las soluciones durante el curso de las experiencias, fué de 560 miligramos para los cultivos normales, y de 423 miligramos para los cultivos con creatinina. Estos últimos, aunque tenían un desarrollo más grande, emplearon 137 miligramos menos.

EFFECTOS DE LA CREATINA SOBRE EL CRECIMIENTO

Se han practicado algunas experiencias en soluciones nutritivas, empleando creatina en igualdad de condiciones que las realizadas con creatinina. La creatina está en relación íntima químicamente con la creatinina. Probablemente como lo hemos tratado en los capítulos anteriores, las dos se encuentran en los suelos, en el estiércol y en las cosechas verdes.

La acción de la creatina fué determinada en el crecimiento de los trigos en soluciones nutritivas de fosfato ácido de calcio, de nitrato de sodio y de sulfato de potasio, en forma semejante y con métodos iguales á los indicados en este capítulo. La concentración de estas soluciones fué de $\frac{80}{1.000.000}$ de $\text{Ph}_2\text{O}_4 + \text{NH}_3 + \text{K}_2\text{O}$. Las plantas vegetaron del 22 de Abril al 4 de Mayo. Las plantas verdes fueron pesadas al final de la experiencia. Las soluciones de cultivo se cambiaron diariamente y en ellas se dosaron los nitratos, los fosfatos y la potasa.

Al cabo de varios días de vegetación se hizo evidente que el efecto de la creatina era semejante al de la creatinina. Las hojas eran más grandes y mejor desarrolladas que en los cultivos de control, las raíces más largas y ramificadas.

Las plantas crecidas en las soluciones con creatina, fosfato de cal y potasa, sin ázoe, fueron mucho más grandes que las de los cultivos semejantes pero sin creatina.

Como en los casos de la creatinina, cuando una pequeña cantidad de nitrato está presente en la solución nutritiva, el efecto de la creatina no es tan marcado, y, en presencia de mayores cantidades de nitratos, la creatina no tiene ningún efecto adicional.

Los pesos totales de los 66 cultivos verdes, conteniendo sales fertilizantes solas, es decir la serie normal, fué de 174 gr. 400, contra 186 gr. 800 para los 66 cultivos que tenían en la solución $\frac{50}{1.000.000}$ de creatina. Esto representa un excedente de 8 % sobre las soluciones normales.

El cuadro VI demuestra el efecto de la creatina en el desarrollo de las plantas cuyas soluciones nutritivas contenían cantidades variables de fosfatos y de potasa, pero sin nitrato, siendo la cantidad de elementos fertilizantes en cada solución de $\frac{80}{1.000.000}$. Del examen del cuadro, se deduce que el desarrollo de los cultivos con creatina, indicados en la última columna, es considerablemente más grande que el desarrollo de los cultivos sin creatina, indi-

cados en la quinta columna. El cultivo núm. 3, que tenía $\frac{16}{1.000.000}$ de Ph_2O_5 y $\frac{64}{1.000.000}$ de K_2O , produjo 2 gr. 130, peso en verde, con creatina, y 1 gr. 558 sin creatina. El cultivo núm. 6, que tenía cantidades iguales de Ph_2O_5 y K_2O , produjo 2 gr. 400 con creatina y 1 gr. 500 sin ella.

EFFECTO DE LA CREATINA EN EL DESARROLLO EN SOLUCIONES QUE NO CONTIENEN NITRATOS

CUADRO VI.

Núms.	Elementos fertilizantes en la solución nutritiva			Peso de los cultivos verdes	
	Ph_2O_5 p. 1 millón	NH_3 p. 1 millón	K_2O p. 1 millón	Sin creatina	Con creatina
				gramos	gramos
1	0	0	80	1.329	1.709
2	8	0	72	1.420	1.948
3	16	0	64	1.558	2.130
4	24	0	56	1.579	2.370
5	32	0	48	1.528	2.470
6	40	0	40	1.500	2.400
7	48	0	32	1.670	2.270
8	56	0	24	1.628	2.420
9	64	0	16	1.600	2.450
10	72	0	8	1.428	2.070
11	80	0	0	0.978	1.090

El cultivo núm. 9, que tenía $\frac{64}{1.000.000}$ de Ph_2O_5 y $\frac{16}{1.000.000}$ de K_2O , produjo 2 gr. 450 con creatina y 1 gr. 600 sin creatina. El peso verde total de los cultivos con creatina fué de 23 gr. 300, contra 16 gr. 200 para los que no tenían este compuesto, ó sea un excedente de 44 p. 100.

En el cuadro VII á continuación, se indican los pesos de las plantas verdes desarrolladas en soluciones con y sin creatina, conteniendo $\frac{8}{1.000.000}$ de NH_3 bajo forma de nitrato y con cantidades variables de Ph_2O_5 y de K_2O , siendo siempre la concentración de $\frac{80}{1.000.000}$ de $Ph_2O_5 + NH_3 + K_2O$. Estas cifras demuestran que los cultivos con creatina indicados en la última columna, han proporcionado mayor rendimiento que los cultivos sin creatina indicados en la V columna.

EFECTO DE LA CREATINA EN LAS SOLUCIONES NUTRITIVAS
QUE CONTIENEN $\frac{8}{1.000.000}$ DE NH_3 EN FORMA DE NITRATO

CUADRO VII.

Núms.	Elementos fertilizantes en la solución nutritiva			Peso de los cultivos verdes	
	Ph_2O_5 p. 1 millón	NH_3 p. 1 millón	K_2O p. 1 millón	Sin creatina	Con creatina
				gramos	gramos
1	0	8	72	2.299	2.459
2	8	8	64	2.940	3.200
3	16	8	56	2.700	3.350
4	24	8	48	2.920	3.400
5	32	8	40	3.050	3.070
6	40	8	32	3.150	3.309
7	48	8	24	3.220	3.350
8	56	8	16	2.500	2.854
9	64	8	8	2.222	2.800
10	72	8	0	1.400	1.600

Pero la diferencia no es tan grande como en los cultivos sin nitrato, indicados en el cuadro VI. El desarrollo total de los cultivos sin creatina fué de 26 gr. 400, contra 29 gr.

400 para los cultivos con creatina, ó sea un excedente de solo 11 % para estos últimos. La diferencia era de 44 % en favor de los cultivos ó soluciones con creatina y que no contenían nitratos.

El desarrollo, en las soluciones que contenían cantidades variables de fosfato y de potasa y $\frac{16}{1.000.000}$ de NH_3 en formato de nitrato, fué solamente de 3 por 100 más elevado con la creatina que sin este compuesto. En las soluciones que contenían $\frac{24}{1.000.000}$ de NH_3 , igualmente en forma de nitrato, el beneficio en el crecimiento con la creatina fué de 6 %, y en las soluciones conteniendo $\frac{32}{1.000.000}$ de NH_3 como nitrato el crecimiento llegó á 4 % más, En las soluciones que contenían proporciones mayores de nitrato, la creatina no produjo ningún efecto adicional. De esto se puede deducir que el efecto de la creatina como reemplazante del efecto de los nitratos en la producción, es muy semejante al de la creatina.

Es también interesante hacer notar el efecto de la creatina en la absorción de las sales fertilizantes por las plantas, y la similitud entre la acción de la creatina y la creatinina en este orden de cosas.

Se podría recordar que, en los cultivos con creatinina, el desalojo de fosfato y de potasa es ligeramente más elevado que en los cultivos normales, pero que es menor la cantidad de nitratos que desaparece en el caso de las soluciones con creatinina, que en los normales.

En la experiencia con creatina, el desplazamiento total de P_2O_5 , NH_3 , K_2O en las soluciones de control, fué de 1.978 miligramos 3, contra 1.854 miligramos 5, para las soluciones con creatina. Las soluciones de control desalojaron 471 miligramos de fosfato en P_2O_5 , y la solución de creatina 474 miligramos 4. En el caso de la potasa, la solución de control desaloja 769 miligramos 4 de K_2O , contra 767, miligramos 4 para las soluciones con creatina.

La desaparición de nitrato, fué mucho menor en el caso de la creatina que en las soluciones de control. Estas úl-

timas desalojaron 737 miligramos 7, contra 612, miligramos 7 para las soluciones con creatina, ó sea una diferencia de 125 miligramos.

La influencia de la creatina, considerando el desplazamiento de Ph^2O^5 , NH^3 , K^2O , es muy semejante al de la creatinina, y aparece nuevamente el hecho de que esta substancia, lo mismo que la creatinina, puede reemplazar á los nitratos en sus defectos en el crecimiento de las plantas.

RESUMEN

La creatinina y la creatina, producen efectos útiles en la vegetación. Las plantas que vegetan en soluciones nutritivas conteniendo solamente fosfato y potasa, adquieren gran desarrollo cuando se les agrega creatinina y creatina.

Cuando esas soluciones contienen grandes cantidades de nitratos, la creatinina y la creatina, no producen efectos apreciables en la vegetación.

Las plantas que crecen en las soluciones nutritivas, ricas ó pobres en nitrato, absorberán menor cantidad de este cuerpo cuando la creatinina ó la creatina están presentes, aunque el desplazamiento de la potasa y del fosfato sean prácticamente el mismo.

Es aceptable en todo caso, que la creatinina y la creatina pueden reemplazar el efecto de los nitratos en la vegetación de las plantas.