

ARS PHARMACEUTICA

REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

Tomo XVII - Núm. 4

1976

Consejo de Redacción

Director:

Prof. Dr. D. Jesús Cabo Torres

Director Ejecutivo:

Prof. Dr. D. José Luis Valverde

Vocales:

Prof. Dr. D. Alberto Ramos
Cormenzana

Prof. Dr. D. Fermín Sánchez
de Medina Contreras

Prof. Dr. D. Antonio Cerezo
Galán

Prof. Dra. María A. López

Secretario de Redacción:

Prof. Dr. D. Luis Bravo Díaz

Redacción y Administración:

Facultad de Farmacia,
Granada - España.

Dep. Legal, GR: núm. 17-1960

Imprime:

Gráficas del Sur, S. A.
Boquerón, 6
Granada 1976.
1.000 ejemplares

Sumario

PAG.

TRABAJOS ORIGINALES DE LA FACULTAD

- Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. Por F. Ruiz Berraquero, Ana M.^a Baya y A. Ramos Cormenzana 399
- Potencial Redox en suelos de la zona de Cabo de Gata (Almería). Por García Trenado, J. G.; Aguilar, J.; García Navarro, A. y Delgado M. ... 407
- Disgregación/disolución de comprimidos como factores condicionantes de su actividad terapéutica. II. Comprimidos de Prednisolona. Por J. Sánchez-Morcillo, A. Cerezo y J. M.^a Suñé 437
- Bibliografía 455

TRABAJOS ORIGINALES DE LA FACULTAD

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia.
Universidad de Granada

ESTABLECIMIENTO DE INDICES PARA EL ESTUDIO DE LA SOLUBILIZACION DE FOSFATOS POR BACTERIAS DEL SUELO

F. RUIZ BERRAQUERO, ANA M.^a BAYA * y A. RAMOS CORMENZANA

Desde las primeras inv mostró que determinadas bacterias del suelo tenían actividad solubilizadora de fosfatos y son numerosísimos los trabajos encaminados a la búsqueda de microorganismos con esta actividad y a la utilización de los mismos para mejorar la fertilidad de los suelos.

Según ALEXANDER (1), de un 10 a un 50 por ciento de las bacterias aisladas del suelo son capaces de solubilizar fosfatos cálcicos. Son eficaces en la transformación, bacterias gram negativas y Gram positivas

ROCHE (11), y también muchos hongos, RAMOS, CALLAO, CARVALHO (8). Estas bacterias y hongos crecen en medios con fosfatos bi y tricálcicos, apatito o materiales insolubles parecidos, como única fuente de fosfato. Los microorganismos, no solamente asimilan el elemento, sino que también hacen soluble una parte importante, liberando cantidades en exceso de su propia demanda nutricional.

El uso de los inóculos de fosfobacterias ha sido muy discutido por los diversos investigadores y en numerosos trabajos se exponen las ventajas y desventajas de su aplicación, YUNG (14), MENKINA (6), PISEMSKAYA y KOCHUNOVA (7), AZCON (2).

Parece ser que se obtenían grandes ventajas si los microorganismos adicionados fueran autóctonos. De ahí, el resultado tan diferente a que dan lugar la aplicación de idénticos fertilizantes a distintos tipos de suelo. Mientras que la utilización de un fertilizante

* Actualmente en el Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Valparaiso (Chile).

obtenido a partir de cepas microbianas locales no daría lugar a un desequilibrio tan drástico.

En este sentido parece interesante establecer criterios de selección, así como técnicas sencillas que permitan elegir con facilidad aquellas bacterias que en un determinado suelo reúnan las condiciones más adecuadas para formar parte del fertilizante.

En el presente trabajo pretendemos establecer unos índices de solubilización y así poder estudiar las relaciones existentes entre la intensidad y el tiempo en que el efecto solubilizador se hace presente con microorganismos Gram negativos y Gram positivos aislados de diferentes suelos.

MATERIAL Y METODOS

Se han utilizado muestras de suelos naturales y cultivados de las provincias de Barcelona y Alicante.

El medio empleado para el aislamiento de solubilizadores es un medio empobrecido al que se añade como fuente de fosfato, fosfato bicálcico insoluble: glucosa 20 g.; cloruro amónico 7 g.; sulfato magnésico 0,5 g.; fosfato bicálcico 2 g.; agar 11 g.; H₂O c.s.p. 1.000 ml.; pH 7,5.

En este medio, las colonias constituidas por bacterias solubilizadoras de fosfato bicálcico determinan la formación de un halo transparente fácilmente observable al contrastar con la opacidad del medio.

Se realizó un primer aislamiento de solubilizadores al final del tercer día de incubación. A estos microorganismos se les ha denominado solubilizadores

se realizaron observaciones diarias hasta un plazo de 15 días. Las colonias que presentan halo de solubilización a partir del tercer día son consideradas como solubilizadores tardíos (ST). Los microorganismos pertenecientes a colonias que pasados quince días no presentan halo de solubilización visible se estiman como no solubilizadores (NS).

La elección del tercer día para separar dos categorías de solubilizadores obedece a que en las experiencias realizadas, la mayoría de los microorganismos que pasados los tres primeros días no presentan halo visible, tardan varios días más en presentarlo.

Para estimar la capacidad de solubilización de los microorganismos aislados se procede a sembrarlos en el mismo medio mediante

asa y masivamente en series de 5 a 6 por placa y dispuestos circularmente. Se incuban a 30°C.

A los tres días de sembrados se determina la capacidad de solubilización de los SP que son los correspondientes a las colonias que presentan halo visible en este período de incubación (i.s.) que viene dado por la relación entre el diámetro del halo producido al tercer día y el de la colonia correspondiente medido en milímetros:

$$\text{i.s.} = \frac{\text{Ø del halo (mm)}}{\text{Ø de la colonia (mm)}}$$

De acuerdo con los índices de solubilización, se han establecido tres categorías de S.P. para estimar su poder solubilizador:

- a) SP con índice de solubilización bajo (i.s.b.) $\text{i.s.} < 2$.
- b) SP con índice de solubilización medio (i.s.m.) $2 \leq \text{i.s.} < 4$.
- c) SP con índice de solubilización elevado (i.s.e.) $\text{i.s.} \geq 4$.

Para los ST (solubilizadores tardíos) se determina el i.s. *al tercer día de la aparición del halo de solubilización* y de acuerdo a los mismos valores. El valor del i.s. para este grupo es más limitado, ya que la aparición de la solubilización puede acontecer en tiempos diferentes para los distintos solubilizadores.

En un intento de garantizar la diversidad de las cepas utilizadas se aislaron solo aquellos microorganismos que aparecían con distinta morfología en cada muestra de suelo. (Se realizaron pruebas morfológicas y bioquímicas).

En la elección de métodos estadísticos adecuados se han utilizado los tratados de DOWNIE (4) y VIEDMA (12).

RESULTADOS

En la Tabla 1 y gráficas se exponen los resultados obtenidos tras realizar las determinaciones de la capacidad de solubilización siguiendo los criterios anteriormente expuestos. En cada uno de los grupos se indican los porcentajes de Gram positivos y Gram negativos.

TABLA 1.—Distribución de los microorganismos de acuerdo con la intensidad de la solubilización y tiempo empleado en producirla

	N.º de microorganismos	i.s.b.		i.s.m.		i.s.e.		
		n.º	%	n.º	%	n.º	%	
Solubilizadores precoces (SP)	Gram (+)	23	22	53,65	1	4,34	0	0,00
	Gram (—)	50	19	46,34	22	95,65	9	100,00
	Total	73	41	56,16	23	31,50	9	12,32
Solubilizadores tardíos (ST)	Gram (+)	18	12	80,00	6	54,54	0	0,00
	Gram (—)	16	3	20,00	5	45,45	8	100,00
	Total	34	15	44,11	11	32,35	8	23,52
Total 107		56	52,33	34	31,77	17	15,88	

Claves utilizadas en tablas y gráficas:

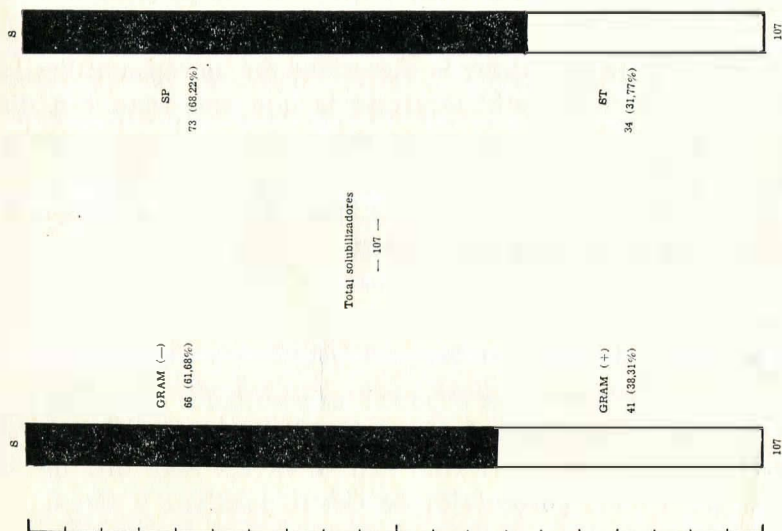
ST: Solubilizadores tardíos

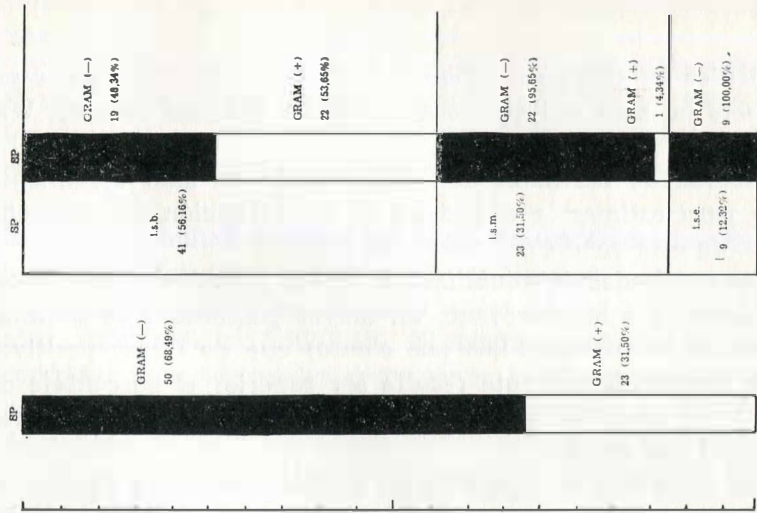
SP: Solubilizadores precoces

i.s.b.: índice de solubilización bajo

i.s.m.: índice de solubilización medio

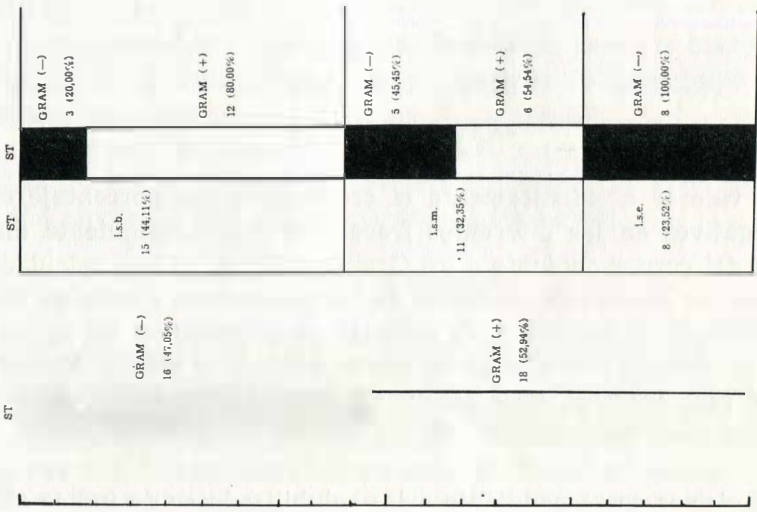
i.s.e.: índice de solubilización elevado





73

Gráfica 2



34

Gráfica 3

DISCUSION

La técnica en placa para detectar y aislar microorganismos solubilizadores ha sido utilizada con éxito por diversos autores, WEBLEY (13).

La medida de los halos de solubilización ha sido igualmente empleada para estimar la capacidad de solubilización de una cepa bacteriana de esta condición, JOHNSTON (1952).

1.—Los resultados de solubilización (tabla 1, gráfica 1), nos muestran, de acuerdo a lo observado, un mayor porcentaje de solubilizadores Gram negativos (61,68 por ciento) que de Gram positivos (38,31 por ciento). Igualmente resulta ser superior el porcentaje de solubilizadores precoces (68,22 por ciento) que el de solubilizadores tardíos (31,77 por ciento).

Hemos calculado el intervalo de estimación del parámetro de cada población binomial con un nivel de confianza del 95 por ciento, de acuerdo con la fórmula basada en el teorema de Moivre para muestras grandes y parámetro no próximos ni a cero ni a uno que es el caso que nos ocupa. Estos intervalos resultan ser por la fracción de Gram negativos (0,59-0,77), lo que confirma los resultados con el nivel de confianza del 95 por ciento empleado.

2.—Los datos confirman igualmente el hecho observado de que el número de bacterias Gram positivas decrece, aumentando el de Gram negativas a medida que consideramos niveles de solubilización más elevados.

	i.s.b.	i.s.m.	i.s.e.
% G +	53,65	4,34	0
% G —	46,34	95,65	100

Para valorar estadísticamente el crecimiento del porcentaje de Gram negativos en las diferentes fracciones y la consiguiente disminución del correspondiente a los Gram positivos, se han calculado igualmente los límites de confianza de los parámetros normales. Como en este caso, el tamaño de la muestra no es grande y los valores de p se aproximan a 0 y 1, no se puede utilizar la misma fórmula que en el caso anterior. Para resolver este problema hay deducidas expresiones analíticas exactas de los límites de confianza de P a partir de la distribución F de Snedecor. Puesto que el número de micrororganismos correspondiente a los solubilizadores de índice ele-

vado es muy bajo, los asimilamos a los de índice medio considerando únicamente dos niveles de solubilización.

Los intervalos resultan ser para los solubilizadores precoces Gram negativos de índice de solubilización bajo (0,30-0,62) y para los de índice medio y elevado (0,79-0,99). Se observa el desplazamiento de los límites de confianza de las bacterias Gram negativas al pasar de la primera fracción (i.s.b.) a la segunda (i.s.m. o i.s.e.), lo que nos indica que con un nivel de confianza del 95 por ciento la primera fracción es menor que la segunda.

Aplicados idénticos cálculos a los Gram positivos los valores son: (0,35-0,69) y (0,001-0,16). El desplazamiento de los límites de confianza en este caso es decreciente, lo que nos indica que con el nivel de confianza del 95 por ciento la fracción de microorganismos de índices medio y elevado es menor que la de índice bajo.

A resultados semejantes se llega si se realizan las mismas comprobaciones en los solubilizadores tardíos.

3.—El porcentaje de bacterias Gram negativas que son solubilizadores precoces (68,49 por ciento), es menor que el correspondiente a los solubilizadores tardíos (57,04 por ciento), al contrario que ocurre en los Gram positivos (31,50-52,94 por ciento).

Para contrastar si estas diferencias de porcentajes observadas (creciente en un caso y decreciente en otro) son significativas a un nivel de significación α , siendo los tamaños de la muestra pequeños y distintos, y por tanto $\sigma_{P_1}^2 / \sigma_{P_2}^2$ existe un método en el que se calcula un estadígrafo de prueba que sigue la distribución de la "t" de Student

En este caso se ha realizado el cálculo para las bacterias Gram negativas. Si la diferencia de porcentajes de este grupo es significativa, también lo será para las Gram positivas.

Los valores obtenidos son $t=2,122$ y $t=1,670$; como quiera que $2,122 > 1,670$ la diferencia resulta significativa al nivel de significación empleado 0,05 (95 por ciento de confianza).

RESUMEN

Se ha determinado la capacidad de solubilización de fosfato inorgánico de bacterias del suelo que poseen esta condición. Se establecen diferentes grupos atendiendo de una parte a la intensidad solubilizadora de las bacterias (mediante unos índices de solubilización) y de otra al tiempo empleado en producirla. Posteriormente se estudian las relaciones existentes entre ambos aspectos: capacidad solubilizadora y tiempo de solubilización y entre éstos y la Gram positividad y negatividad de las bac-

terias. El objeto de estas relaciones es contribuir a establecer criterios de selección que pueden ayudar en la elección de cepas solubilizadoras. Se ha realizado igualmente un cuidadoso análisis estadístico de los resultados.

SUMMARY

The ability to dissolve inorganic phosphate by soil bacteria was determined in these kind of organisms. Different groups were established according to the intensity of the solving action using a proposed solubilization parameters, and with time required to produce it. A study of the posible correction among the ability to dissolve phosphate, the time used and the Gram stain was made. The purpose of the work was to contribute in the criteria of selection of the dissolving phosphate strains.

A carefully statistical analysis of the results was also made.

RESUME

On a déterminé la capacité de solubilization du phosphate inorganique des bacteries du sol qui posèdent cette condition. On peut etablir des différent groupes ayant compte d'un coté l'intensité solubilizatrice des bacteries (avec des indices de solubilization) et d'autre le temps employé en la produire. Postérieurement s'estudient les relations qui existent entre les deux et la Gram positivité et negativité des bacteries. L'objet de ces relations c'est de contribuer à stabilir des criteriums de selection qui nous aident à l'election de souches solubilizatrices. On a réalisé également un complet analyse statistique des résultats.

BIBLIOGRAFIA

1. ALEXANDER, M. "Introduction to soil microbiology". Willey and Sons Inc. London (1967).
2. AZCON, R. Tesis Doctoral. Universidad de Granada (1972).
3. AZCON, R., BAREA, J. M., CALLAO, V. Cuad. C. Biol. 2, 23-30 (1972).
4. DOWNIE, N. M. y HEATH, R. W. "Métodos estadísticos aplicados". Ediciones del Castillo. Madrid (1971).
5. JOHNSTON, H. New Zealand J. Sci. and Tech. B-33, 436-46 (1952).
6. MENKINA, R. A. Udobrenik-i-Urozhal, 1, 25-28 (1956).
7. PISEMSKAYA, V. A. y KOCHONOVA, T. A. Bull. nauch Tekh. Inform. Staprovol, nauch-issled. Inst. Sel. Khoz. 1, 52-4 (1956).
8. RAMOS, A., CALLAO, V. y CARVALHO de P.C.T. Microbiol. Esp. 21, 23-37 (1968).
9. SACKETT, W. C., PATTEN, A. I. y BROWN, C. W. Zbl. Bekt. abt. 2, 28, 688 (1908).
10. SPEREER, J. I. Austral. J. Agric. res. 9, 778-82 (1958).
11. TARDIEUX-ROCHE, A. Theses Faculte des Sciences. Univ. Paris (1966).
12. VIEDMA, J. A. Métodos estadísticos. Ediciones del Castillo. Madrid (1972).
13. WEBLEY, D. M. 7th. Intern. Congress of soil Science. Madisson-Wise. USA 657-663 (1966).
14. YUNG, L. A. Zomledelic, 2, 62-70 (1954).