

**Estudio de la acción de una nueva forma de fosfobacterina
(comprimidos *Bacillus megatherium*) sobre el
glicerofosfato cálcico**

por

A. Ramos, J. Oliver y V. Callao

Desde 1950 se ha ido extendiendo la denominación de fosfobacterin o fosfobacterina, a una mezcla de esporas de *Bacillus megatherium* con caolín, en una riqueza aproximada de siete billones de esporas por gramo. Se ha discutido su acción efectiva como inoculante del suelo, con resultados altamente satisfactorios en algunos casos, y antirentables en otros.

Pretendemos, en una serie de trabajos, estudiar las ventajas que podrían deducirse de nuevas formas de preparación de las fosfobacterinas.

MATERIAL Y METODOS

Preparación de los comprimidos:
Hemos realizado siembras de una estirpe de *Bacillus megatherium* (amablemente enviada por Soulides D. A., del U. S. D. A.) en un medio (similar al utilizado por OP Den KAMP J. A. F. et al 1965) para producción de esporas:

Peptona	10 g
Extracto levadura	10 g
Cloruro Sódico.	5 g
Fosfato potásico	0,4 g
Almidón.	4 g
Agua.	1.000 ml

El PH final del medio se ajustó a 7'2, esterilizando al autoclave a 115.° C, durante media hora.

La recogida de esporas se hizo a las 48 horas de realizada la siembra por centrifugación de los cultivos, eliminando los sobrenadantes. El sedimento se mantuvo un día en desecación para eliminación de agua.

Para realizar la compresión debe partirse de un granulado base compuesto a base de:

I Almidón	700 p.
Lactosa	300 p.
II Engrudo de almidón c. s.	

Mezclar y humedectar I, con canti-

dad suficiente de II, granular y secar a 35° C. A continuación se mezcla el peso de esporas (0.320 g) con el granulado base (28 g). Y adicionar, para facilitar la disgregación del comprimido en el suelo:

Bicarbonato	21 g.
Tartárico.	10 g.

Una vez mezclados los anteriores compuestos proceder a comprimir, (previa adición de c. s. de talco-estearato magnésico como lubricante) por medio de una compresión directa. (Es aconsejable realizar una sola compresión).

Recuento del número de esporas por comprimido: Los comprimidos fueron previamente desintegrados y diluidos, por la técnica de las diluciones seriadas a 1/10, hasta la dilución un millón. Partes alicuotas de las correspondientes se sembraron en medio de cultivo líquido de glicerofosfato cálcico (GREAVES M. y WEBLEY D. M., 1965). El utilizar tal medio de cultivo como única fuente de fósforo, es con el fin de evitar el desarrollo de posibles contaminantes.

La lectura del crecimiento, se realiza a los 4 días de efectuada la siembra observando la turbidez de los cultivos. (Nota: normalmente en los primeros tubos esta lectura es difícil realizarla, debido a la opacidad que normalmente tienen debido a los ingredientes del comprimido. Por esta circunstancia debe realizarse la lectura a los 4 días,

y así permitir un desarrollo evidente de los microorganismos).

Ensayo de la capacidad de auto-disgregación del comprimido: (Nota: esta prueba resulta imprescindible realizarla, pues los comprimidos previos que preparamos, resultaron ineficaces por su escasa disgregación en el terreno del suelo). En seis probetas sin fondo, conteniendo 100 g de tierra, se colocan los comprimidos, en la superficie e interior del suelo. Cada día se efectuaron lavados (que actuaban a modo de riego) recogiendo el líquido de lavado en el que se investigaba la presencia de *Bacillus megatherium*.

Acción solubilizadora de la fosfobacterina: Se realiza por medida de la liberación de fósforo a partir del glicerofosfato cálcico, realizándose las experiencias en tubos y matraces, en los que se operó en tres condiciones diferentes que consideramos clasificadas de la siguiente forma:

A.—ausencia de humedad (sin adición de agua)

B.—presencia de humedad normal (agregar 1 ml)

C.—Exceso de humedad (agregar 2 ml).

El glicerofosfato cálcico iba en la proporción del 1%; en todos los experimentos se emplearon dos comprimidos de fosfobacterina.

La valoración del fósforo liberado se realizó midiendo el color azul que

se origina al formarse el complejo fosfo-molibdico (JACKSON, 1958).

La extracción del fósforo soluble, se realizó con agua (a) y con sol. 0'1 N de CINH_4 (b) que no tiene acción extractiva sobre el fósforo perteneciente al glicerofosfato cálcico y en cambio facilita el paso del fósforo mineralizado adherido al terreno. En las experiencias realizadas en tubos solo operamos de acuerdo con la forma (b).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la realización del presente trabajo, están expuestos en las tablas que se indican. La Tabla I corresponde al recuento del número de esporas existentes en cada comprimido; examinamos 20 comprimidos escogidos al azar. Como el peso de 10 comprimidos es de 0'21 gr, podemos decir con toda seguridad, que el número de esporas, por gramo es superior a 5×10^8 , y con un 90% de probabilidad superior a los 5×10^{10} esporas por gramo. En ninguno de los casos examinados, el resultado fue inferior a los 10^4 gérmenes por comprimido.

Por lo que se refiere a la autodisgregación del comprimido, la aparición de *Bacillus megatherium* en las aguas de los lavados o regados correspondientes ocurrió normalmente entre los 1 a los 3 días; casi en todos los casos se pudieron aislar a las 24 horas; para facilitarnos el análisis realizamos estas experiencias con tierra esteril. Sin embargo la disgregación total del compri-

mido no se realizó hasta pasados los dos meses; quedando en bastantes casos restos del mismo, aunque la disgregación en el agua fuera muy rápida.

Tabla I. Determinación del número de gérmenes por comprimido:

Dilución	N.º de casos con desarrollo
10^{-1}	20
10^{-2}	20
10^{-3}	20
10^{-4}	20
10^{-5}	18
10^{-6}	19

Tabla II. Acción sobre el glicerofosfato cálcico (experiencias de matraces):

Tiempo (semanas)		Fósforo liberado		
		D	N	E
1	a)	5,5	12,5	9
	b)	17,5	22	17
2	a)	15	20	35,5
	b)	11	62,5	158
3	a)	12,5	21	18
	b)	23,5	41	25
Testigos a)		4	5	4
(4 semana) b)		19,5	19,5	18

D = defecto de humedad.

N = Humedad en condiciones consideradas como normales.

E = Exceso de humedad.

a) = Extracción del fósforo libre por agua.

b) = Extracción del fósforo libre con 0'1 N de ClH.

Nota: Los resultados van expresados en microgramos de fósforo por gramo de suelo.

* * *

Tabla III Acción sobre el glicerofosfato cálcico (experiencia en tubos)

Tiempo (semanas)	Fósforo liberado (experiencias)						Vm	
	1	2	3	4	5	6		
1	D	38,5	33	26	33,5	27	31	31,5
	N	62	55,5	55	44	69,5	57	57
	E	104,5	93,5	81	101	79	90	91,5
	Testigo.
2	D	28,5	37	31	30,5	33	41	33,5
	N	135	115	212	237	194	169	177
	E	93	87	94	93	81	56	84
	Testigo
3	D	51,5	49,5	47	46,5	41,5	45	47
	N	287	227	254	237,5	228,5	219	240
	E	236	228	214	211	219	204	217
	Testigo
4	D	48	33	37	36	66	52	47
	N	132	102,5	98	114,5	100,5	97,5	107,5
	E	141	172	63 (?)	148	154	162	140
	Testigo

D = defecto de humedad; N = Humedad considerada normal

E = Exceso.

Vm = valor medio del total de experiencias realizadas.

Nota.—Los resultados van expresados en microgramos de fósforo por gramo de suelo.

COMENTARIOS

Nuestro método se basa en uno anteriormente expuesto por WEBLEY (1962) que consistía en introducir comprimidos de diferentes sustancias, para determinar por este procedimiento la flora existente en un determinado tipo de suelo. Nosotros lo modificamos en un aspecto totalmente distinto, al preparar comprimidos de gérmenes (esporas), que introducíamos en el suelo con la finalidad de estudiar de forma mucho más cómoda los diferentes procesos bioquímicos que pueden originar.

El número de gérmenes por comprimido, fue en todos los casos (incluso cuando la cifra no fuera excesivamente elevada) adecuado para tales experimentos y los resultados confirman lo que decimos (tabla I).

Elegimos el glicerofosfato cálcico como elemento de trabajo, porque junto con el bajo costo del producto, es uno de los compuestos sobre los que actúa el *Bacillus megatherium* liberando fósforo mineral. De esta manera podemos evidenciar, en cualquier momento, la actividad de los microorganismos existentes en tales comprimidos.

Al preparar los comprimidos nos encontramos con varias dificultades; una de las mismas fue la compresión; con el fin de darle una mayor consistencia al comprimido es frecuente el realizar una doble o triple compresión que cuando se realizan pueden disminuir el n.º de gérmenes presentes por

comprimido. Procuramos tener precaución en tal suceso, por lo que únicamente realizamos una compresión sencilla. Con anterioridad una de las tandas de comprimidos que preparamos tuvo que ser desechada, por no haber desarrollado microbiano a partir de los comprimidos, lo que presumiblemente produjo la muerte de los gérmenes.

Otra de las dificultades que se nos planteó fue debida al escaso poder de disgregación del comprimido al agregarlo al suelo; ya que base imprescindible de su acción debe ser su capacidad de autodisgregación en el terreno. Bien es verdad que a lo largo del tiempo cualquier clase de comprimidos son susceptibles de disgregación, pero tales hechos van normalmente ligados a la flora microbiana existente en el suelo, así como a los factores físico-químicos que afectan al mismo. Los comprimidos que preparamos de acuerdo con la forma especificada en la metodología, fueron capaces de disgregarse en suelos estériles, regados con agua destilada esteril, y aproximadamente al cabo de unos dos meses; el término que empleamos como aproximadamente se debe a la dificultad que existe en darse perfecta cuenta de cuando se produjo la disgregación total. En agua los comprimidos se disgregaban a los pocos minutos debido al compuesto efervescente que facilita el proceso; sin embargo cuando el comprimido se colocaba sobre el terreno, pese a que añadiéramos un volumen suficiente de agua destilada esteril, no se producía tal disgregación lo

que atribuimos a interferencias físico-químicas normalmente existentes en el suelo.

Una de las ventajas más interesantes en la posible aplicación de tales comprimidos se basa en el hecho de su conservación, aunque en realidad este aspecto está bajo comprobación, que presumiblemente sea muy duradera; y el de su fácil manejo, así por ej.: en el estudio de determinado proceso bioquímico es más fácil tomar un comprimido para efectuar una determinada experiencia que no pesar una adecuada cantidad de fosfobacterina en polvo para realizar la misma experiencia. La posible contaminación se evitaría con un simple flameado de la superficie del comprimido, y como es factible el estandarizar la cifra de gérmenes por comprimido estaríamos en condiciones de operar en iguales circunstancias en cada experiencia. También une a las ventajas antes señaladas, la posibilidad de realizar un estudio conjunto de la acción de la fosfobacterina, y el tipo determinado del flora existente en aquel suelo variando en cada caso la composición de los comprimidos a utilizar.

Como inconvenientes principales debemos resaltar la posibilidad de que los comprimidos no sean totalmente puros, ya que no esterilizamos el material con el que preparamos tales formas; ahora bien el número de gérmenes que entran a formar parte del comprimido siempre estará constituido en una proporción más elevada por los gérmenes que nos interesan, siendo despreciable la cifra de los que podríamos

considerar como contaminantes. Por otro lado como una de las miras más importantes en la preparación de estos comprimidos se hace con idea de aplicación sobre el terreno, recordamos la no esterilidad del suelo, donde lógicamente deben de producirse casos de competencia microbiana, por tal circunstancia lo realmente interesante debe ser la presencia de *Bacillus megatherium*.

Respecto a la acción positiva de la fosfobacterina sobre el glicerofosfato cálcico, se pudo apreciar una acción manifiesta de las esporas de *Bacillus megatherium*. Esta acción se vió favorecida por la presencia de humedad, lo que atribuimos por una parte a la mayor facilidad de disgregación de los comprimidos, y otra al desarrollo microbiano que como sabemos se facilita con la presencia de agua en el medio ambiente; siendo hecho destacable que en ausencia de la misma, prácticamente no se produjo liberación de fósforo—. Por lo que se refiere a la proporción de fósforo libre, creemos que es lo suficientemente elevada, teniendo en cuenta que el mecanismo de la solubilización es directa, o sea utilización del glicerofosfato con la correspondiente liberación de fósforo; es interesante este aspecto, ya que no necesita el germen más compuesto que este para la liberación de fósforo.

Por otro lado la preparación de los mencionados comprimidos es de muy fácil consecución, por lo que se hace asequible su preparación.

RESUMEN

Se prepara una nueva forma de fosfobacterina, por medio de una compresión de esporas de *Bacillus megaterium*. Se discuten los pormenores de su preparación, y posible utilización de tales comprimidos, bien bajo el punto de vista teórico o práctico. Resaltándose, la acción eficaz de los mismos frente al glicerofosfato cálcico.

SUMMARY

A new form of phosphobacterin was prepared, by compressing of *Bacillus megatherium* endospores. The authors discussed preparation and its possible theoretical and practical application. A released of phosphorus was observed from calcium glicerophosphate.

* * *

BIBLIOGRAFIA

JACKSON M. L. (1958) «Soil Chemical Analysis» cap. VII, Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs. N. J.

GREAVES M., WEBLEY D. M. (1965) «A study of the breakdow of organic phosphates by Microorganisms from the root region of certain pasture grasses» J. appl. Bact. 28 454.

OP DEN KAMP. J. A. F., HOUTSMULLER U. M. T., y VAN DEENEN L. L. M. (1965) «On the phospholipids of *Bacillus megaterium*» Biochim. Biophys. Acta, 106, 438.

WEBLEY D. M. (1962) «A technique for investigating localized microbial development in soils», Nature, 194, 364.

OREJAS Y MAILLO, S. A.

Sucursal:

Cádiz, 12

Santander

*

Central:

Viaducto Marquina, 6 y 8

Oviedo

*

Delegación:

Martín Heros, 65

Madrid-8

*

Material para laboratorios

Aparatos Científicos

Reactivos

**Instalación completa de laboratorios
Industriales, Clínicos y de Enseñanza**