

# DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

CATEDRA DE MICROBIOLOGIA

PROF. DR. VICENTE CALLAO FABREGAT

## *Estudio de la movilización microbiana de fosfatos en el suelo por percolación*

por

A. RAMOS y V. CALLAO

Ars Pharm. VIII, 11-12 (1967)

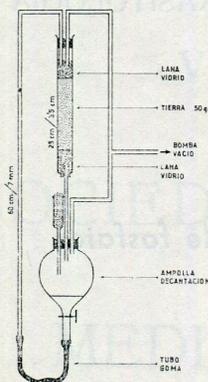
### INTRODUCCION

Podemos considerar la percolación como técnica de reciente aplicación en el estudio de los procesos metabólicos originados por los seres vivos. LEES y QUASTEL (1944) fueron los primeros en aplicar la mencionada técnica en los procesos bioquímicos que se originan en el suelo. El método fue objeto de numerosas modificaciones; y actualmente MARCHESI et al. (1965) lo utilizan en la acción de sustancias quelantes sobre la solubilización de fósforo.

Nosotros pretendemos aplicar la mencionada técnica en el estudio del metabolismo microbiano sobre los fosfatos, con la consecuente movilización de fósforo.

### MATERIAL Y METODOS

En la realización del presente trabajo hemos utilizado el percolador que se muestra en la figura, modificación del aparato utilizado por AUDUS (1946), y similar a los empleados por QUASTEL y SCHOLEFIELD (1957), y LANZANI (1966); variando únicamente la entrada de aire, que en nuestro caso se realiza por un tubo que va directamente a la ampolla de decantación. Puede que otros aparatos, como los descritos por COLLINS y SIMS (1956), y TEMPLE (1951), sean más perfectos, pero la dificultad de construcción nos llevó al presente utilizado. El aparato estuvo en funcionamiento tan solo durante dos horas diarias, para quedar interrumpido hasta el día siguiente; el motivo principal de operar en estas condiciones fue el de querer intentar igualar las condiciones del percolador con las naturales existentes en el terreno, pues normalmente no es continuo el paso



(R-129-67)

de líquido a través del suelo, mientras que el funcionamiento antes expuesto se asemeja a las condiciones de un campo de regadío o a las naturales de lluvia, aunque éstas carezcan de la periodicidad de nuestras experiencias.

Aunque el aparato pueda esterilizarse, preferimos prescindir de la misma, permitiendo por tal motivo el desarrollo y proliferación microbiana de la flora normalmente presente en el suelo. El germen de prueba fue el 66M-15 (de nuestra clasificación), que morfológicamente y fisiológicamente se corresponde con el género *Bacillus*, fue aislado del suelo y cultivado en medio de cultivo líquido de glicerofosfato como única fuente de fósforo, GREAVES y WEBLEY (1965), en el cual tuvo un desarrollo muy intenso (observación realizada por la turbidez que se produce en el medio de cultivo).

Como producto sujeto a transformación utilizamos glicerofosfato cálcico al 1 %, compuesto no soluble, y que agregamos al medio de cultivo en un volumen de 5 ml en cada inoculación. Las muestras que periódicamente íbamos analizando, disminuían el volumen del líquido circulante, por lo que eran sustituidas por extracto de suelo estéril.

La valoración de fósforo soluble se hizo colorimétricamente midiendo la intensidad de color azul que se origina en el complejo fosfomolibdico, RAMOS y CALLAO (1965).

## RESULTADOS

En la tabla 1, van expuestos los resultados, con y sin adición de glicerofosfato; y con y sin adición del germen inoculante. Las fechas subrayadas corresponden a los días en los que se agregó el glicerofosfato; apreciándose des-

TABLA 1.—LIBERACION DE FOSFORO A PARTIR DEL GLICEROFOSFATO CALCICO

Tiempo en días	En suelos sin inocular gérmenes		En suelos con el germen 66-M15	
	Con glicerofosfato	Sin	Con glicerofosfato	Sin
2	0'3	0'3	0'2	0'3
4	0'3	0'2	0'3	0'3
6	12'5	0'2	13'5	0'3
9	8'5	0'2	10'0	0'3
11	5'5	0'2	8'0	0'2
13	4'5	0'2	6'5	0'3
16	4'0	0'3	7'0	0'3
18	4'0	0'3	6'0	0'2
21	14'5	0'2	14'0	0'3
23	14'0	0'2	17'5	0'2
25	12'0	0'3	14'0	0'2
28	7'5	0'2	8'5	0'2

Los resultados van expresados en Microgramos de fósforo libre por mililitro de muestra analizada.

A los 4 y 18 días agregamos glicerofosfato cálcico (5 ml).

pués de tales adiciones un incremento en la cifra de fósforo soluble. Como testigo de que la adición de glicerofosfato no producía incremento en el contenido de fósforo-soluble, realizamos análisis de suelo recién agregado de glicerofosfato, y sin tiempo de incubación de ninguna clase, y suelo sin adicionar observando no se apreciaban diferencias.

### COMENTARIOS

Las deducciones consecuentes a los datos obtenidos se refieren en primer lugar al no incremento del contenido en fósforo labil del suelo, por la inoculación de una raza solubilizadora del glicerofosfato, puesto que los resultados obtenidos con o sin adición de inoculante son similares. Sin embargo, tanto en suelo inoculado como sin inocular se produjo una mayor proporción de fósforo soluble, después de las correspondientes adiciones de glicerofosfato. Por otro lado, el fósforo que determinamos era *fósforo completamente soluble*, no sujeto a ningún tratamiento con sustancias químicas, sino que fue analizado previa centrifugación, del líquido sobrenadante recogido en la percolación; y no el que normalmente conocemos como fósforo útil para los vegetales; el principal motivo para no determinar tal contenido en fósforo útil, fue debido muy principalmente a nuestro interés en no agregar ninguna sustancia que modificase las condiciones de aquel suelo.

Nuestra interpretación al hecho anteriormente expuesto se basa en aceptar la existencia en el suelo objeto de estudio de gérmenes solubilizadores del glicerofosfato cálcico, motivo de incremento en la cifra de fósforo soluble; el que no se produjese aumento en las experiencias con el suelo inoculado puede suponerse que se debe a una interrelación y competencia entre la flora normalmente existente en el suelo y el germen inoculado, que impediría bien la proliferación del citado microorganismo o bien la acción liberadora, por las causas que sean, de fósforo. Como sabemos esta es uno de las mayores dificultades que se presentan en la aplicación de los fertilizantes microbianos.

En realidad, lo más interesante de nuestras experiencias fue la puesta a punto de la técnica de percolación al estudio de la movilización de fosfatos y ello creemos que fue ampliamente conseguido. Como modificaciones sugeribles al aparato son la adición de un refrigerante a reflujo colocado en la parte superior del mismo, a fin de evitar las posibles pérdidas del líquido percolante por evaporación. Con el mismo fin también puede incorporarse al aparato un frasco lavador con agua colocado a la entrada de aire, para que éste sea húmedo y conseguir de esta forma una menor pérdida de agua.

En realidad las pérdidas ocasionadas puede decirse que prácticamente son nulas y aunque estableciéramos tales diferencias y operáramos en diferentes condiciones, creemos no es necesario trabajar con las citadas modificaciones, habida cuenta de que los resultados apenas son modificados. El mayor inconveniente que se nos presentó fue el de establecer una conveniente regulación de la circulación del líquido de percolación, pues al dejar el proceso en reposo durante casi 46 horas, se produce una disminución de drenaje, que dificulta el funcionamiento del aparato al día siguiente. En parte se puede solucionar con la adición al suelo problema de arena estéril, que facilita tal drenaje; sin embargo, aún en estas condiciones se dificultaba el proceso, por lo que decidimos incorporar al aparato unas gomas y llaves de tornillo en el tubo de entrada de aire, y en los tubos en los que se realizaba el vacío; de este modo solucionábamos el pequeño inconveniente; y en pocos minutos conseguíamos una regulación en el normal funcionamiento del percolador.

Por descontado, consideramos al aparato con la suficiente validez para ser empleado en el estudio del metabolismo tanto de fosfatos orgánicos, como en el estudio de la solubilización de fósforo a partir de fosfatos minerales insolubles.

No nos referimos a las ventajas del procedimiento por haber sido consideradas, en un aparato similar por QUASTEL y SHOLEFIELD (1957).

## RESUMEN

En el presente trabajo, se estudia por la técnica de percolación el posible incremento en la movilización de fósforo, por un *Bacillus* sp. que utiliza el glicerofosfato. Los resultados obtenidos en suelo inoculado y sin inocular fueron similares, sin embargo se pudo apreciar un aumento en el contenido de fósforo soluble después de la adición de glicerofosfato cálcico.

También se exponen las dificultades e inconvenientes que deben salvarse para un buen funcionamiento del método.

## BIBLIOGRAFIA

- AUDUS, L. J. (1946).—“A new soil perfusion apparatus”. *Nature*, 158, 419.
- COLLINS, F. M. and SIMS, C. M. (1956).—“A compact soil perfusion apparatus”. *Nature*, 178, 1073.
- GREAVES, M. P. and WEBLEY, D. M. (1965).—“A study of the Breakdown of Organic phosphates by Micro-organisms from the Root Region of Certain Pasture Grasses”. *J. Appl. Bact.* 28 (3), 454-65.
- LANZANI, G. A., MARCHESI, A., SEQUI, P., SALVEMINI, A. (1965).—“Azione di sostanze chelanti sulla solubilizzazione del fósforo nel terreno”. *Agrochimica*, X, 32-38.
- LEES, H. and QUASTEL, J. H. (1946).—Biochemistry of nitrification in soil. Addendum by Lees H. A soil perfusion apparatus”. *Biochem. Jour.*, 40, 812-815.
- MARCHESI, A., SEQUI, P., LANZANI, G. A. (1966).—“Azione di sostanze chelanti sulla solubilizzazione del fosforo nel terreno”. (nota II). *Agrochimica*, X, 182-189.
- QUASTEL, J. H. and SCHOLEFIELD, P. G. (1957).—“Study of soil metabolism with the perfusion technique”. In *Methods in Enzymology*, Colowick Kaplan, IV, 336-342, Academic Press, New York.
- RAMOS, A. y CALLAO, V. (1965).—“Estudio preliminar de solubilización de fosfatos por las bacterias”. *Ars. Pharm.* 5, 237-242.
- TEMPLE, K. L. (1951).—“A modified desing of the Lees soil percolation apparatus”. *Soil Science*, 71, 209-10.

Granada, Diciembre 1967.