

TRABAJOS DE COLABORACION

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, FACULTAD DE CIENCIAS
BARCELONA

“CRITERIOS DE SELECCION DE FOSFOBACTERIAS”

por

R. RAMOS-CORMENZANA (*)

Ars Pharm. XI, 449 (1970).

INTRODUCCION:

De acuerdo con la terminología utilizada en la URSS (3), se entiende por *fosforobacterina* un preparado bacteriano formado por esporas de *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*, tales preparados se expenden a escala industrial, y se utilizan como inoculantes del suelo, para coadyuvar a la acción de los fertilizantes minerales. Nosotros hacemos extensivo este concepto de fosforobacterinas a todos los gérmenes que intervienen en la movilización del fósforo y que por tal motivo pueden tener una aplicación, al menos teórica, más o menos directa en la mejora del rendimiento agrícola; no obstante para evitar duplicidades empleamos en el presente trabajo la terminología de “fosfobacterias” a los gérmenes anteriormente citados.

Los criterios de Selección ideados teóricamente son tres:

- 1) Fácil manejabilidad del microorganismo
- 2) Manifiesto poder de solubilización de fosfatos
- 3) Beneficio inmediato para el vegetal

En el presente trabajo analizaremos los dos primeros criterios.

MATERIAL Y METODOS:

Los microorganismos objeto de estudio fueron aislados, en suelos en los que posteriormente se piensa realizar su inoculación, pues con ellos no deberán existir problemas de adaptabilidad. La numeración corresponde a un orden particular de nuestra colección.

Los medios de cultivo que hemos empleado fueron los siguientes:

ME-1 (usado en el aislamiento), composición (P/V). Extracto de levadura (0'1 %); glucosa (3 %); glicerofosfato cálcico (CGP) (2 %); agar (1'5 %); agua dest. 100 ml. Precauciones, preparar por separado el CGP y la glucosa, añadirlos al medio de cultivo estérilmente, pH final del medio 7'3.

(*) Parte del trabajo realizado con una beca de la Fundación Juan March.

Este medio puede igualmente prepararse con fosfato dicálcico (DCP). El medio ME-1, también se utilizó para la conservación de las cepas, y para la determinación del tamaño de halo de solubilización.

Para determinar la capacidad de actuación sobre el glicerofosfato, se utilizó el medio basal B de LOCHHEAD y CHASE (1), con glicerofosfato sódico como única fuente de fósforo.

Finalmente para la evaluación de la selección de fosfobacterias, se acudió a dos procedimientos: A. determinación de la solubilización de CGP; y B. determinación del P liberado.

A. La determinación de la solubilización del CGP, se hizo por un procedimiento original, practicándose medidas de absorción (en un Spectrochem) a 630 $m\mu$, previa agitación de un cultivo bacteriano en el medio ME-1, y del mismo cultivo en el medio ME-1, con glicerofosfato sódico (NaGP) en vez del CGP. La diferencia de lecturas nos orienta sobre la solubilización de forma cuantitativa. (Esta medida de la solubilización intentamos realizarla por otros procedimientos: a) efectuando las lecturas del cultivo con y sin sedimentación: primero utilizando diferentes medios de cultivo y determinando la solubilización por medio de dos lecturas una previa agitación del medio y posteriormente otra, después de dejar que se sedimente el CGP no solubilizado. Y un segundo método en el que b) realizando dos medidas: una previa centrifugación del cultivo a 1.000 revol./min. efectuándose la lectura del sobrenadante; y una segunda lectura sin centrifugar. Como es natural la diferencia entre ambas lecturas nos señalará la turbidez del glicerofosfato que aún permanece en el medio. Sin embargo, ambos procedimientos fueron menos precisos que el primero señalado).

B. Valoración del P liberado, se realizó por colorimetría, basándose en el color azul que se forma con el complejo fosfomolibdico (2), tal y como se ha efectuado en anteriores trabajos.

TABLA 1.—CRITERIOS PRIMARIOS DE SELECCION. PERSISTENCIA EN LOS MEDIOS DE CULTIVO A LOS 4 Y 8 MESES DE EFECTUADA LA SIEMBRA

Tipo microbiano	N.º total de aislados		% seleccionados
	Crecimiento con halo de solubil. 4 meses	después de 8 meses	
Psicrófilos	6	6	100
Mesófilos	72	61	69,4
Termófilos	6	5	50
Total	84	72	72,6

TABLA 2.—CRITERIOS SECUNDARIOS DE SELECCION. HALO DE SOLUBILIZACION (relación tamaño de halo solubilizador/tamaño de la colonia) en medios con CGP y DCP.

Halo solubilizador (relación)	N.º de microorganismos contabilizados				CGP
	Psicrófilos	Mesófilos	Termófilos	Total	
0'00 - 1'00	2	13	0	15	En medio con CGP
1'01 - 1'50	1	26	2	29	
1'51 - 2'00	1	9	1	11	
2'01 - 2'50	2	1	0	3	
2'51 - 3'00	0	0	0	0	
Superior a 3	0	1	0	1	
0'00 - 1'00	2	19	0	21	En medio con DCP
1'01 - 1'50	1	21	2	24	
1'51 - 2'00	1	6	1	8	
2'01 - 2'50	2	2	0	4	
2'51 - 3'00	1	1	0	1	
Superior a 3	0	1	0	1	

TABLA 3.—CRITERIOS SECUNDARIOS DE SELECCION. Desarrollo en el medio de Lochhead y Chase (1). Lecturas turbidimétricas. (620 m μ , a los 8 días)

Lectura	N.º de microorganismos contabilizados			
	Psicrófilos	Mesófilos	Termófilos	Total
0'00 - 0'10	5	15	3	23
0'11 - 0'20	1	3	0	4
0'21 - 0'30	0	8	0	0
0'31 - 0'40	0	11	0	11
0'41 - 0'50	0	6	0	6
Superior a 0'5	0	3	0	3
++	0	4	0	4

TABLA 4.—EVALUACION DE LA SELECCION DE FOSFOBACTERIAS (respecto a la movilización de fosfatos en medio con CGP)

A. Por diferencia de turbidez en medios CGP menos NaGP					B. Por la determinación del P liberado				
Lectura (valor mínimo)	N.º Seleccionados	%	N.º Seleccionados		P liberado (µg/ml)	N.º Seleccionados	%	N.º NO Seleccionados	
2'5	0	0	7	12'9	0'0- 1'0	0	0	14	25'9
2'5-2'0	0	0	37	68'5	1'1- 5'0	0	0	27	50'0
1'9-1'5	0	0	6	11'1	5'1-10'0	0	0	9	16'7
1'4-1'0	1	20	4	7'4	10'1-15'0	1	20	3	5'5
0'9-0'5	1	20	0	0'0	15'1-20'0	0	0	0	0'0
0'4	3	60	0	0'0	20'1-30'0	1	20	0	0'0
					30'0	3	60	0	0'0

RESULTADOS

En la Tabla 1 se indica la cifra de gérmenes aislados de acuerdo con su persistencia en los medios de cultivo que responde a una fácil manejabilidad (criterio primario).

En las Tablas 2 y 3 se exponen los criterios secundarios referidos a la capacidad de desarrollo en el medio de Lochhed and Chase, con glicerofosfato sódico como única fuente de fósforo, y a la relación entre el tamaño de halo y el tamaño de la colonia consideramos como seleccionables aquellos que se desarrollaron en el medio de Lochhed y Chase con una turbidez superior a 0,30 (lectura de 620 mµ); y aquellos otros cuya relación, tamaño de halo, tamaño de la colonia era superior a 1,5. En total se seleccionaron 69 microorganismos de acuerdo con los criterios primarios. En relación con los criterios secundarios se seleccionaron 24 por su actuación sobre el NaGP, 11 por el tamaño de solubilización en CGP, y 10 por su halo de solubilización en DCP, coincidieron como seleccionables en estos criterios tan sólo 5 microorganismos clasificados provisionalmente como sigue: 3 *Pseudomonas* sp, 1 *Bacillus* sp y 1 *Corynebacterium*.

Finalmente en la Tabla 4 se expone una evaluación de la movilización de fósforo por estos microorganismos a partir del CGP para lo que se realiza un estudio con los gérmenes Seleccionados y con los NO seleccionados.

COMENTARIOS Y DISCUSION

Quizás la primera pregunta sea el porqué de esta selección. La explicación la tenemos en la posible finalidad del empleo de estos microorganismos como inoculantes del suelo. Creemos oportuno el establecer unos criterios que "a priori" nos excluyan algunos de los gérmenes solubilizadores, los que lógicamente sean de menor utilidad. Precisamente por este motivo hemos pretendido realizar una fuerte selección y tener la certeza, de que esta se ha verificado. Puede que de todos los criterios el que menos nos satisface sea el criterio primario, pues aceptamos la posibilidad de que exista algún microorganismo con gran capacidad para movilizar los fosfatos, pero que sea difícil de conservar, en este caso puede potencialmente considerarse capaz de ser utilizado en inoculaciones del suelo.

Se han aislado tres diferentes grupos microbianos, termófilos, psicrofilos y mesófilos. De acuerdo con los criterios expuestos tan sólo ha sido posible seleccionar microorganismos dentro de los mesófilos. La explicación puede ser algo clara para los psicrofilos, considerando (tal como se han realizado las experiencias) que su metabolismo es más lento, pero esta explicación no sirve para los termófilos. En realidad, para nuestros campos de cultivo tienen más importancia los mesófilos de ahí el interés de esta selección, aunque es conveniente señalar que quizás deberían establecerse unos criterios aparte para otros grupos: de todas formas debemos pensar en la posibilidad de que esto no sea del todo factible, en cuyo caso los criterios ensayados serían igualmente válidos para uno u otro tipo microbiano.

Por lo que se refiere, a los criterios secundarios, conviene señalar que aunque ha sido muy discutido el que el tamaño de halo de solubilización sea o no significativo en la movilización del fósforo pues es un hecho indudable que existen microorganismos capaces de movilizar fosfatos y que sin embargo se desarrollan en los medios de cultivo sin halo aparente, también es cierto que todos los que producen halo de solubilización liberan P, lo que nos da una señal inequívoca de su acción; como por otra parte lo que se pretende no es encontrar movilizadores sino los mejores movilizadores se comprenderá el que se utilice este criterio. Además se ha utilizado acción directa sobre el NaGP, como criterio secundario considerando que la intervención positiva en ambos medios debe ser interpretada como significativa en la movilización de fosfatos.

La explicación de porqué hemos utilizado estos criterios, y no por ej. los que en la Tabla 4 se exponen como criterios de evaluación, es sencilla. Los procedimientos allí indicados de valorar el fósforo solubilizado (o liberado) son más incómodos que el realizar una medida directa del halo de solubilización en relación con el tamaño de la colonia, o que una medida directa de la turbidez en el medio con NaGP como única fuente de fósforo. De esta forma por medio de unas técnicas sencillas tendremos la posibilidad de seleccionar fosfobacterias con vistas a su posterior empleo.

En realidad una de las mayores dificultades que nos encontraremos será la standarización de los criterios terciarios, basados en la acción directa de estos microorganismos sobre el vegetal. Creemos que será en aquel momento cuando tengamos el total convencimiento que la selección fue efectiva. Sin embargo, bioquímicamente creemos que en principio los presentes resultados son significa-

tivos, según se deduce de la Tabla 4, lo que demuestra que el planteamiento de selección, aunque quizás excesivamente riguroso haya sido correcto.

RESUMEN

Se exponen unos criterios para la selección de fosfobacterias. Estos criterios están basados en la fácil manejabilidad del cultivo, en la solubilización del fosfato dicálcico y del glicerofosfato cálcico en placa; y en la utilización del glicerofosfato sódico como única fuente de fósforo. Evaluandos los gérmenes seleccionados de acuerdo con la cantidad de fósforo liberado en los medios de cultivo, los resultados pueden considerar satisfactorios.

SUMMARY

On exposed criteria for phosphobacteria selection. These criteria are base on managing of the cultures on dicalcium phosphate and calcium glycerophosphate plate solubilization and on the use of sodium glycerophosphate as the exclusive source of phosphorous. The evaluation of the selected microorganisms according to phosphorous release on culture media was satisfactory.

BIBLIOGRAFIA

- (1) LOCHHEAD, A. G. and CHASE, F. I.: "Qualitative studies of soil microorganisms. V. Nutritional requeriments of the predominante bacterial flora". *Soil. Sci.*, 55, 185 (1943).
- (2) RAMOS, A. y CALLAO, V.: "Estudio preliminar de la solubilización de fosfatos por las bacterias". *Ars Pharm.*, 7, 251 (1966).
- (3) MISHUSTIN, E. H.: "Fosforobacterin y su efectividad". *Microbiología (en ruso)*, 36, 65 (1967).