

REPUBLICA ARGENTINA  
COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA



INFORME N.º 93

Solubilización de Fosfatos por  
Microorganismos del Suelo

por

Anibal H. Merzari - Sergio Flores Suarez y Alicia Godoy



BUENOS AIRES  
1963

---

SOLUBILIZACION DE FOSFATOS POR  
MICROORGANISMOS DEL SUELO

Técnica rápida para determinar cuantitativamente la solubilización de fosfato tricálcico por *Bacillus subtilis* y *Bacillus megatherium* utilizando  $P^{32}$

Aníbal H. Merzari, Sergio Flores Suárez\* y Alicia Godoy

El fósforo como elemento nutriente de primordial importancia para los vegetales, es objeto del interés permanente de gran número de investigadores.

El estudio de sus estados y transformaciones en el suelo ha dado lugar a numerosas interpretaciones que demuestran su extrema complejidad.

POCHON y de BARJAC (1) han consignado la importancia de los procesos de fosforilación en reacciones enzimáticas.

E.J. RUSSELL (2) hace notar que en el suelo y bajo condiciones naturales, son los microorganismos los que actúan principalmente como agentes de defosforilación de los compuestos orgánicos, liberando así aniones utilizables por el vegetal.

Los estudios sobre mineralización del fósforo orgánico por los microorganismos se inician a comienzos del siglo a través de los trabajos de J. STOKLASA (3) quién demuestra la transformación del mismo en ortofosfatos. Posteriormente F.C. GERRETTSEN (4), R.I. PIKOVSKAIA (5), R.A. MENKINA (6), G. PICCI (7), A. SEN y N.B. PAUL (8 y 9), JOAN I. SPERBER (10), A. ROCHE (11), A. ROCHE y H. de BARJAC (12), J. SOBIESZCZANSKI (13), A. TARDIEUX y A. ROCHE (14) comunican una serie de experiencias en donde resalta la importancia de los microorganismos solubilizadores de fósforo orgánico e inorgánico. Por parte de algunos de ellos se aislan cepas de alta capacidad de solubilización y como resultado de los trabajos de laboratorio se suceden experiencias en macetas y a campo. Es así que en 1956, ARAO ITANO y YAN-SHENG KAN (15) demuestran que inoculando trigo con *B. megatherium* var. *phosphaticum* se produce un aumento en el rendimiento de la cosecha.

\* Maestro en Ciencia, becario mexicano del O.I.E.A.

En Rusia se ha aprovechado la propiedad de estos microorganismos para su utilización práctica como inoculantes de semillas, bajo el nombre de Fosfobacterin. Similares experiencias realizadas en el Indian Agricultural Research Institute demuestran que en el caso del trigo, se han registrado a campo, aumentos en el rendimiento del orden del 10 - 25% (16).

El interés que el tema reviste para la agronomía argentina y la de Latinoamérica, en lo que hace a la necesidad de una provisión abundante de fósforo asimilable en sus suelos, y el conocimiento personal por parte de uno de nosotros, de los trabajos realizados en la India con resultados alentadores, nos movieron a la iniciación de experiencias preliminares con la inclusión del uso de métodos radioisotópicos que facilitaron el estudio.

Una de las primeras dificultades a resolver era simplificar en lo posible la técnica de la determinación de la cantidad de fósforo solubilizado por acción bacteriana en una primera etapa que consiste en individualizar las especies o cepas más convenientes a esos efectos al estado de cultivo puro.

Como resultado de lo que antecede se planearon las siguientes experiencias.

**Técnica rápida para determinar cuantitativamente la solubilización de fosfato tricálcico por *Bacillus subtilis* y *Bacillus megatherium* utilizando  $P^{32}$**

La cantidad usualmente determinada en estudios con "trazadores" es la denominada actividad específica, la que de acuerdo con WAHL y BONNER (17) es la relación del número de átomos radiactivos sobre el número total de átomos isotópicos. Para comprender mejor el concepto en cuanto a la técnica aplicada, llamaremos actividad específica a la cantidad del elemento radiactivo, expresada en cuentas por minuto por unidad de peso del elemento presente, incluyendo este último a la totalidad de isotopos, sean estables o activos.

La técnica desarrollada consiste en utilizar fosfato tricálcico "marcado" con  $P^{32}$  como única fuente de fósforo en un medio mineral glucosado. En el momento del análisis se determina la actividad específica del  $(P^{32}O_4)_2Ca_3$  y el conteo de la actividad que pasa a la solución por la solubilización efectuada por las bacterias, nos pone en condiciones de despejar la única incógnita, que es la cantidad de fósforo que ha pasado en solución.

Como antecedente de lo expuesto, citaremos a C.E.L. BAMBERGER (18) quién utilizó el mismo principio para la medición de pérdidas por solubilidad y/u otras causas en la determinación

de berilio a través de su precipitación como fosfato amónico berílico.

#### MATERIAL UTILIZADO

Cepas de *B. subtilis* y *B. megatherium* facilitadas por la Cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Buenos Aires.

Fosfato tricálcico preparado según la técnica de R. WARINGTON (19) adaptándola para la marcación del compuesto con  $P^{32}$  según G.B. BARO (20).

Medio de cultivo líquido con la composición que se especifica en el trabajo de A. SEN y N.B. PAUL (9), utilizando como fuente nitrogenada sulfato de amonio.

Fotocolorímetro BAUSCH & LOMB.  
Tubo GEIGER-MULLER con ventana de mica ( $1.4 \text{ mg/cm}^2$ ).  
Escalímetro C.N.E.A.

#### EXPERIENCIAS REALIZADAS

Se preparó un medio mineral glucosado con sulfato de amonio como fuente nitrogenada. La glucosa se esterilizó aparte y se agregó al medio en la proporción conveniente en el momento de su utilización.

Se usaron Erlenmeyers de 125 cc con 30 cc de medio líquido y 0,200 g de  $(P^{32}O_4)_2Ca_3$  como única fuente fosfatada.

Por duplicado o cuadruplicado se sembró en cada uno de estos Erlenmeyers *B. subtilis* y *B. megatherium* provenientes de un cultivo fresco de 24 a 48 horas en medio líquido y se incubó a 28 - 30°C, durante 8 días. Se incubaron frascos sin inocular como testigos y para determinar la solubilidad del fosfato.

A los 8 días el contenido de cada uno de los frascos se llevó a volumen en matraz de 50 o 100 cc y luego se centrifugó a 2.500 r.p.m. durante 25 minutos, filtrándose con posterioridad el sobrenadante si se observa alguna fina suspensión, lo que suele ocurrir en el caso del *B. subtilis*. Del líquido límpido así obtenido se tomaron partes alícuotas para la determinación de actividad y a los efectos comparativos de fósforo total por fotocolorimetría.

En el día de la determinación y con el fin de no efectuar correcciones por decaimiento, se disolvieron entre 15 y 20 mg del fosfato tricálcico "marcado" utilizado, en 5 cc de ácido

clorhídrico 1:1 y se completó a volumen de 200 cc con agua destilada con el fin de determinar la actividad específica.

La determinación por contaje de la cantidad de fósforo solubilizado es muy simple de realizar conociendo la actividad específica de la sustancia "marcada". Para ello bastará multiplicar el número de cuentas por minuto totales por el factor que resulta de dividir la cantidad en mg del fosfato radiactivo disuelta en la solución original por el número de cuentas de dicha solución. Restando de los guarismos obtenidos en los frascos inoculados la cantidad determinada en los testigos tendremos la cantidad de fosfato tricálcico que ha pasado a la solución por la acción microbiana.

#### RESULTADOS OBTENIDOS

Cuadro 1.

Comparación de la técnica por contaje con el método fotocolorimétrico. Resultados expresados en mg de  $(PO_4)_2Ca_3$  solubilizados.

Bacillus subtilis		Bacillus megatherium		Testigos	
Contaje	Fotocolor.	Contaje	Fotocolor.	Contaje	Fotocolor.
la. Exper.	la. Exper.	la. Exper.	la. Exper.	la. Exper.	la. Exper.
21,23	21,59	14,70	15,11	9,82	10,73
23,03	23,13	24,32	25,59	8,74	9,00
2a. Exper.	2a. Exper.	2a. Exper.	2a. Exper.	2a. Exper.	2a. Exper.
12,99	13,46	7,63	8,47	6,77	7,49
15,30	17,14	14,77	17,14	6,80	7,34
3a. Exper.	3a. Exper.	3a. Exper.	3a. Exper.	3a. Exper.	3a. Exper.
23,78	22,46	19,53	19,97	11,62	11,44
23,15	21,42	24,12	24,13	15,63	15,18
18,41	17,89	19,46	19,97	-----	-----
20,79	21,00	24,51	22,88	-----	-----

#### CONCLUSIONES

- a) En la determinación de la capacidad de solubilización de fosfato tricálcico por *B. subtilis* y *B. megatherium* cultivados en un medio mineral glucosado es posible

simplificar el análisis del producto solubilizado partiendo de  $(P^{32}O_4)_2Ca_3$ . Utilizando la presente técnica la determinación se reduce a un conteo de la actividad que ha pasado al medio líquido relacionándola con la actividad específica del compuesto "marcado".

- b) Las determinaciones son semejantes a las efectuadas por el método fotocolorimétrico.
- c) La técnica propuesta dada su rapidez y simplicidad posibilita incrementar el número de muestras en ensayo.
- d) Es obvio recalcar la mayor sensibilidad de la técnica desarrollada.
- e) Podría aplicarse a otras sustancias.

#### RESUMEN

Partiendo del concepto de actividad específica, los autores desarrollan una técnica rápida y sencilla para la determinación cuantitativa de fósforo solubilizado por *B. subtilis* y *B. megatherium* a partir de fosfato tricálcico "marcado" con  $P^{32}$  efectuando, luego de un período de incubación de 8 días, el conteo de la actividad que pasa al medio líquido. Relacionando dicho conteo con la actividad específica de la sustancia radiactiva utilizada obtienen la cantidad de fósforo que ha pasado en solución.

#### SUMMARY

In this paper the authors develop a rapid and simple technique for the quantitative determination of solubilized phosphorus by *B. subtilis* and *B. megatherium* from tricalcic phosphate.

Using tricalcic phosphate labelled with  $P^{32}$ , after a period of 8 days they measure the activity in the liquid medium and this result is related with the specific activity of the radioactive substance to obtain the amount of phosphorus brought into solution.

---

Agradecemos muy especialmente al Doctor GREGORIO G. BARO las indicaciones para el presente trabajo, como asimismo a la Doctora JOSEFINA RODRIGUEZ y al Ingeniero Agrónomo SANTOS SO-RIANO y personal de su cátedra.

## BIBLIOGRAFIA

1. POCHON J. y de BARJAC H. *Traité de Microbiologie des sols*. Ed. Dunod, París. (1958).
2. RUSSELL E.J. *Soils Conditions and Plant Growth*. 8th. Ed. (1950).
3. STOKLASA J. *Centr. Bakt. Parasitenk.* 29, 385-519 (1911).
4. GERRETSEN F.C. *Plant and Soil* I (1), (1948).
5. PIKOVSKAIA R.I. *Soils and Fertilizers*, 12, 347 (1949).
6. MENKINA R.A. *Soils and Fertilizers*, 14, 135 (1951).
7. PICCI G. *Ann. Fac. di Agraria*, 15, 187 (1952).
8. SEN A. y PAUL N.B. *Current Science*, 26, 222 (1957).
9. SEN A. y PAUL N.B. *Indian J. Agric. Sci.* XXVII, Part I (1958).
10. SPERBER Joan I. *Australian J. Agric. Res.* 9, (6) (1958).
11. ROCHE A. *Ann. Inst. Pasteur*, 96, (5) (1959).
12. ROCHE A. y de BARJAC H. *Ann. Inst. Pasteur*, 96, (6)(1959).
13. SOBIESZCZANSKI J. *Chemical Abstracts*, 57, (6) (1962).
14. TARDIEUX A. y ROCHE A. *Ann. Inst. Pasteur*, 103, (2)(1962).
15. ITANO, ARAO y Yan-SHENG KAN. Citado por POCHON y de BARJAC.
16. VISSA, HUDHA SMT. *The Farmer*, Sept. 1961, Bombay (India).
17. WAHL y BONNER. *Radioactivity Applied to Chemistry* (1951).
18. BAMBERGER C.E.L. Tesis, Fac. Cienc. Exact. Nat. Bs. Aires (1958).
19. MELLO J.W. *Inorganic and theoretical chemistry*, Longmans, Green and Co. (1952).
20. BARO G.B. Comunicación personal.