

Determinación microbiológica de fósforo y de cinc en suelos "trumaos"¹

Eduardo Schalscha B.² y Olivia Bentjerodt³

INTRODUCCION

Junto a diversos métodos químicos y físico-químicos de determinación de elementos "disponibles" en suelos, se recomiendan también métodos de tipo biológico como el crecimiento de plantas, ya sea en condiciones de invernadero o de campo. Además, se han propuesto una serie de métodos de tipo microbiológico (1), (4), (7), (8), (9) para estos mismos fines. La ventaja de este último tipo de procedimiento radicaría en el hecho que un microorganismo adecuado pudiera asimilar de un suelo un nutriente dado, en proporciones similares al utilizado por las plantas, semejando en esta forma el proceso básico de solubilización y absorción de ellos. Por otra parte los métodos microbiológicos tendrían la ventaja de ser más rápidos que los de crecimiento de plantas, pudiéndose obtener informaciones entre los 5 a 8 días.

En el presente trabajo se han efectuado determinaciones de cinc y de fósforo "disponible" en suelos derivados de cenizas volcánicas, utilizando para ello cepas de hongos aisladas de diversos suelos del mismo origen. De estas cepas se seleccionaron algunas que responden a gradientes de concentración de estos elementos nutritivos y se las utilizó para efectuar las determinaciones analíticas microbiológicas antes citadas.

MATERIALES Y METODOS

1) Material de vidrio:

El material volumétrico empleado fue todo de clase "A". Todos los materiales de vidrio fueron sometidos a un tratamiento con NaOH y CH₃ COOH glacial (3). Después de cada empleo se lavó el mismo respectivamente con agua caliente y detergente, luego con mezcla sulfocrómica y finalmente con agua bidestilada, esterilizándose todo en autoclave.

El material de vidrio empleado debe estar exento de metales lo que se constató tratándolo con solución de ditizona en CCl₄.

2) Medios de cultivo:

a) Para la determinación de fósforo: se utilizó el medio citado por Manil et al. (6) y

para el Zn el medio descrito por Nicholas (8) y por Martens et al. (7).

Excepto la sacarosa, los demás reactivos empleados en estos medios de cultivo fueron todos de calidad pro análisis. La sacarosa fue analizada y se encontró que contenía 5 ppm. de P. No contenía cantidades detectables de Zn.

3) Características de los suelos empleados:

Suelo	Horizonte	pH	Humedad %	P total ppm	Zn total ppm
Arrayán	A	6,0	26,4	1620	196
Collipulli	A	5,3	20,8	830	378
	B	5,4	20,8	485	129
T. Temuco	A	5,4	35,7	1165	295
	B	6,5	36,3	960	510
T. Padre Las Casas	A	5,4	21,9	1380	262
	B	5,5	22,2	1600	288

4) Métodos químicos de determinación:

El P "disponible" se determinó según el método de Bray Kurtz N° 2 (4).

El P total y el Zn total fueron determinados luego de una fusión alcalina (4).

El Cinc disponible se determinó extrayendo con HCl 0,1 M (4).

El pH fue determinado en una suspensión 1 : 5 en agua, utilizando un medidor de pH Beckman (4).

Todas las determinaciones químicas se efectuaron en duplicado, informándose la media correspondiente. Los métodos microbiológicos se efectuaron todos, por lo menos, en cuadruplicado, informando la media obtenida.

5) Métodos microbiológicos:

Se incubaron en placas de Petri y en tres medios diferentes de cultivo (2), además de los suelos ya indicados, los siguientes: Santa Bárbara, Osorno, Puerto Octay y un Nadi Frutillar y se realizó un recuento microbiano en ellos. Luego se aislaron diversas cepas de hongos de cada una de estas incubaciones y se mantuvieron en medio Sabouraud. En la selección del hongo más adecuado para los fines de este trabajo, se consideraron como factores importantes: a) un máximo crecimiento, y b) la sensibilidad a los elementos en estudio. Con este fin se colocaron 50 ml de medio de cultivo en matraces de 250 ml y se agregaron en cada caso:

a) medio de cultivo para la determinación del P (6)

¹ Los datos analíticos citados en el presente trabajo forman parte de la tesis de prueba para optar a la licenciatura de Químico-Farmacéutico de la autora citada más abajo. Recepción manuscrito: 12 de Diciembre de 1968.

² Profesor de Química Analítica de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Chile.

³ Candidata a la licenciatura de Químico Farmacéutico de la Universidad de Chile.

- b) igual al anterior más 1 mg de fósforo
 c) medio de cultivo para la determinación del cinc (7)
 d) igual al anterior más 5 mg de cinc.

Y se sembró con cada uno de los hongos previamente aislados, incubándose luego durante 7 días en estos cuatro medios. Luego se filtró y se determinó el peso del micelio desarrollado, previa desecación de éste a 60°C. Un *Aspergillus niger*, cepa N° 18 aislado del suelo Arrayán, fue el que presentó las características más favorables, tanto frente al fósforo como frente al cinc (Cuadro 1) y fue la cepa que se utilizó posteriormente en todos los ensayos descritos.

En general el *Aspergillus niger* requiere para su crecimiento óptimo de: N, P, K, Mg, S y de Fe, Cu, Zn, Mn, Mo y posiblemente Ga y V (8). En ausencia de cualquiera de estos nutrientes esenciales, el crecimiento de él se retarda, lo que se refleja en una disminución

del peso micelial y en una muy baja o nula esporulación. Por otra parte ante una ausencia o deficiencia de una nutriente esencial, estando todos los demás en cantidades adecuadas, al agregar éste en forma creciente, se produce un crecimiento específico y cuantitativo sirviendo esto de base para establecer curvas de calibración del crecimiento.

Preparación del inóculo de esporas de *Aspergillus niger*

El hongo aislado se mantuvo en medio Sabouraud traspasando periódicamente las esporas para reducir el riesgo de mutación (8), a tubos conteniendo el medio ya mencionado.

Al utilizar el hongo, las esporas de éste fueron recogidas con alambres de platino y llevadas a tubos con agua bidestilada estéril, cuidando no arrastrar agar que podría producir contaminaciones químicas.

Cuadro 1 — Crecimiento y sensibilidad al fósforo y cinc, de cepas de hongos aislados de diversos suelos

Cepa N°	Suelo de origen	FOSFORO		CINC		Cepa N°	Suelo de origen	FOSFORO		CINC	
		Crecimiento	Sensibilidad	Crecimiento	Sensibilidad			Crecimiento	Sensibilidad		
1	Collipulli	+	++	+	—	25	Temuco	++	+	++	+
2	"	+	+	+	—	26	"	+	+	+	—
3	"	+++	+	+++	+	27	"	+++	++	+++	—
4	"	+	++	+	—	28	"	++	+	++	—
5	"	+	+	+	—	29	"	++	+	++	—
6	"	++	+	++	—	30	"	++	+	++	+
7	"	+	+	+	—	31	"	+	+	+	—
8	S. Bárbara	++	+	++	+	32	"	+	+	+	+
9	"	++	+	++	+	33	"	+++	++	+++	+
10	"	+++	++	+++	—	34	"	++	+	++	—
11	"	+	+	+	+	35	"	++	+	++	—
12	Frutillar	++	+	++	—	36	"	++	++	+++	—
13	"	+++	+	+++	—	37	"	++	+	++	—
14	"	+	++	++	+	38	"	++	+	++	—
15	"	++	+	++	—	39	"	+	+	+	+
16	"	++	+	++	—	40	"	++	++	+++	—
17	Arrayán	+++	+	+++	+	41	"	+	+	+	+
18	"	++++	++++	++++	++++	42	"	++	+	++	+
19	"	++	+	++	+	43	P. Octay	++	+	++	—
20	"	++	+	++	+	44	"	+	+	+	+
21	"	+	+	+	+	45	Padre				
22	"	++	+	++	—	Las Casas	++	+	++	—	
23	"	+	+	++	—	46	"	++	+	++	—
24	"	+	+	+	+	47	"	+	+	+	—
						48	"	++	++	+++	+

— : 0 mg de micelio
 + : menos de 100 mg de micelio
 ++ : entre 100 y 200 mg de micelio
 +++ : entre 200 y 500 mg de micelio
 ++++ : más de 500 mg de micelio

Determinación de fósforo

Fueron utilizadas dos técnicas descritas en la literatura (6) (8), para la determinación microbiológica de fósforo en suelos y se seleccionó luego la más adecuada para nuestros fines. Resultó ser aquella que cultiva el *Aspergillus niger* en 50 ml de solución de cultivo con cantidades conocidas y crecientes de fósforo. El inóculo consiste en 0,5 ml de suspensión de esporas que se incuban por 7 días a 28°C en forma estática. El micelio desarrollado se recoge en papel filtro y se seca a 60°C durante 24 horas y se pesa.

La otra técnica se basa en medir el diámetro de las colonias cuyo cuadrado sería proporcional a la cantidad de fósforo presente y fue descartado por ser en nuestro caso menos sensible, de más difícil manejo y de menor reproducibilidad que la anterior.

Para la selección del medio de cultivo más adecuado se ensayaron los dos medios que se describen, agregándose a cada uno de ellos cantidades crecientes de fósforo, desde 0,1 hasta 1,5 mg de él por cada 50 ml de solución.

Medio Nº 1

Sacarosa	50,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0 g
Mg SO ₄ x 7H ₂ O	0,6 g
CaCl ₂	0,2 g
Zn SO ₄ x 7H ₂ O	2,0 mg
FeCl ₃ x 6H ₂ O	20,0 mg
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,6 mg
Na ₂ MoO ₄ x 5H ₂ O	0,5 mg
MnSO ₄ x 2H ₂ O	0,3 mg
Co(NO ₃) ₂ x 6H ₂ O	0,1 mg
Agua bidestilada c. s. p.	1 litro

Medio Nº 2

Sacarosa	100,0 g
Acido cítrico	10,0 g
Citrato de sodio	13,4 g
Sulfato de amonio	6,0 g
CaCl ₂	0,2 g
K ₂ SO ₄	0,2 g
FeCl ₃ x 6H ₂ O	20,0 mg
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	2,0 mg
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,6 mg
NaSO ₄ x 2H ₂ O	0,5 mg
MnSO ₄ x 2H ₂ O	0,3 mg
Co(NO ₃) ₂ x 6H ₂ O	0,1 mg
Agua bidestilada c. s. p.	1 litro

Los resultados obtenidos para la determinación del fósforo se encuentran en la Figura 1 y en base a ellos se seleccionó por su mayor sensibilidad el medio Nº 2.

Análisis microbiológico de fósforo en suelos

Utilizando el método en base al peso de micelio seco, se procedió a pesar cantidades fluctuantes de suelo en una escala que va de 0,25 g a 2 g de él. Para evitar el crecimiento de otros microorganismos del suelo, se trataron éstos con 1 ml. de alcohol etílico redestilado por cada 0,5 g de suelo, eliminando luego por completo el alcohol mediante una evaporación en baño de agua caliente (8). La cantidad de suelo pesada se suspendió en 50 ml de solución de cultivo previamente esterilizado en autoclave y luego se inoculó 0,5 ml de la suspensión de esporas, se incubó durante 7 días a 28°C en forma estática y se determinó luego el peso seco del micelio desarrollado.

Los datos obtenidos se interpretaron por interpolación en la curva patrón construida, empleando cantidades crecientes de fósforo y que corresponde a la curva del medio Nº 2 de

Cuadro 2 — Fósforo y Zinc extraídos por métodos microbiológicos y químicos en suelos de origen volcánico. Todos los resultados están expresados en microgramos del elemento por gramo de suelo seco

Suelo	Horizonte	P extraído por método microbiológico	P extraído por método de Bray Kurtz	Zn extraído por método microbiológico	Zn extraído por HCl
Arrayán	A	708	3,3	2,6	2,0
Collipulli	A	50	3,1	6,6	2,5
	B	72	1,1	2,6	2,2
Temuco	A	726	3,8	4,7	5,7
	B	274	1,8	1,5	2,4
Padre Las Casas	A	606	4,3	7,7	4,8
	B	577	5,7	5,8	4,0

la Figura 1. La ecuación de la recta patrón da un valor de $y=658x+153$.

Realizados los ensayos preliminares necesarios para seleccionar el tamaño adecuado de la muestra de suelo por usar, se observó que con los suelos ensayados no hubo crecimiento adecuado al usar 0,25 g de él y que con 0,5 g sólo el Collipulli no dio respuesta adecuada. Se utilizó por lo tanto 0,5 g de suelo, excepción hecha del suelo Collipulli para el cual se utilizó 1 g. Los resultados están consignados en el Cuadro 2.

Cabe hacer presente que en algunos casos, en que se utilizaron cantidades mayores a 1 ó 2 g de muestra, la respuesta no fue lineal. Esto hace suponer que en el suelo existe algún factor limitante para el crecimiento de los hongos. Esto estaría en concordancia con las observaciones hechas por autores japoneses (5) que mencionan la existencia de un "factor biológico" de toxicidad para los suelos y cuyas características son desconocidas.

Puede observarse (Cuadro 2) que el hongo es capaz de extraer cantidades altas de fósforo, que llega en algunos casos hasta un 60% del fósforo total. Estas cifras resultan aún más notorias al compararlas con aquellas obtenidas por el método químico de extracción de fósforo "disponible".

Esto está señalando que la acción fosfolítica del hongo es alta siendo capaz de aprovechar, aparentemente, reservas de fósforo del suelo que no son asimiladas por las plantas. Este debe ser el caso sobre todo en estos suelos que son conocidamente deficientes en fósforo. Por otra parte, las pequeñas cantidades extraídas por el reactivo de Bray y Kurtz confirman lo anterior y hacen al mismo tiempo inoperante el efectuar cálculos de correlación estadística.

Determinación de cinc

La determinación microbiológica del cinc fue realizada utilizando el medio de cultivo ya citado (7), (8) y empleando una técnica similar a la utilizada para el fósforo.

Se construyó una curva de referencia, agregando cantidades crecientes de cinc a cada vez 50 ml de medio líquido de cultivo, se sembró el hongo y luego de 7 días de incubación, se aisló el micelio, se secó a 60°C y se pesó. La curva de referencia (Figura 2) luego de aplicar la ley de los cuadrados mínimos, tiene un valor de

$$y=128x+31$$

El rango útil de trabajo fluctúa entre 2 a 6 microgramos de cinc y el tamaño de la muestra fue elegido de acuerdo con ensayos preliminares, que en nuestro caso señalan una can-

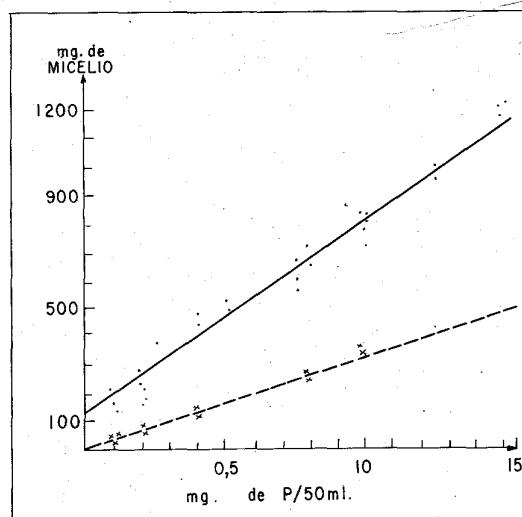


Figura 1.— Curva patrón para la determinación de fósforo.

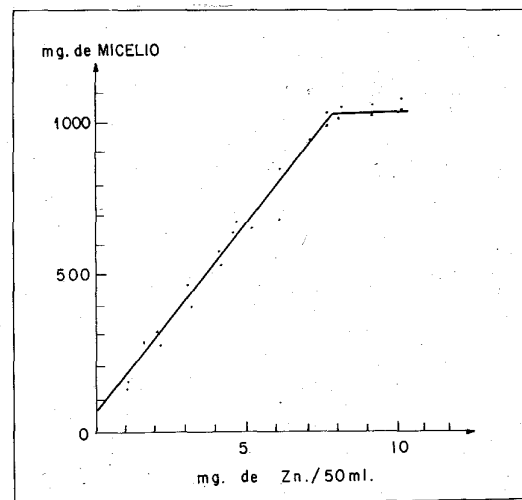


Figura 2.— Curva patrón para la determinación de cinc.

cantidad del orden de los 0,5 g de suelo. También en este caso se observó un fenómeno limitante en el crecimiento del hongo y que podría ser el mismo ya citado en el caso de la determinación del fósforo.

Las cantidades de cinc determinadas por este método biológico resultaron ser muy similares a aquellas extraídas por HCl 0,1 M y ambos métodos correlacionan significativamente a nivel 0,05 con un "r" de 0,79.

Los resultados obtenidos para el cinc (Cuadro 2) son satisfactorios y la magnitud de ellos es semejante a aquellos obtenidos por

extracción con HCl 0,1 M. Esto puede ser útil tanto desde un punto de vista de diagnóstico, como también de patrón o base para la calibración de otros métodos.

Cabría hacer presente que el empleo de métodos analíticos microbiológicos no presenta mayores problemas operacionales, pero que su

utilidad práctica, por lo menos con la cepa aquí empleada, no es significativamente mayor que la de los métodos químicos.

Como conclusión final podríamos indicar que la cepa seleccionada es apropiada para la determinación del cinc, pero excesivamente activa para el caso del fósforo.

RESUMEN

Se determinó fósforo y cinc por procedimiento microbiológico utilizando para ello un método en base al peso seco del micelio de un *Aspergillus niger*. Este hongo se seleccionó luego de haber aislado 48 cepas de hongos provenientes de suelos derivados de cenizas volcánicas.

El procedimiento empleado en la determinación de P y de Zn consistió en incubar durante 7 días a 28°C la muestra de suelo con un inóculo del hongo y comparar luego el peso seco del micelio desarrollado, con aquel que se obtiene al incubar el hongo con cantidades conocidas del elemento a determinar.

Se encontró que es posible extraer hasta un 30% del P total de los suelos, lo que induce a pensar que el hongo seleccionado es demasiado sensible y por tanto no adecuado para fines de diagnóstico de "disponibilidades" de P.

El cinc extraído resultó ser similar a aquel que extrae una solución 0,1 N de HCl y correlaciona significativamente con él ($r=0,79$).

SUMMARY

Phosphorus and zinc were determined microbiologically using an *Aspergillus niger* strain isolated from a volcanic-ash derived soil. This strain gave the highest response both to P and Zn when compared with 48 other fungus strains isolated from 8 different volcanic-ash derived soils.

Techniques based on the dry weight of the mycellium of the fungus grown in the presence of soil for 7 days at 28°C were used, and compared with standards set up for each element. Growth response to P was very high and up to 30% of the total P was accounted for. Results for Zn were of the same order of magnitude than the one extracted by 0.1 M HCl, and correlated significantly with it ($r=0,79$).

LITERATURA CITADA

1. BROUWERS, L. Contr. a l'étude de la nutr. miner. d'*Asperg. niger*. Bull. Inst. Agr. et des stations de Rech. de Gembloux. T **30** (1-2). 1965.
2. CANALES, C. Acción fosfolítica de algunas cepas de hongos de suelos trumao. Ann. Fac. Quím. y Farm. Universidad de Chile. 1965. 85 p.
3. GONZALEZ, C. Determinación de cinc, cobre y plomo en aguas minerales. Tesis Químico Farm. Santiago, Universidad de Chile. 1953 186 p. (Mimeografiada).
4. JACKSON, M. L. Soil Chemical Analysis. Englewood Cliffs, N. J. Prentice-Hall, Inc. 1958. pp. 45, 284, 407.
5. JAPAN. Ministry of Agriculture and Forestry. Volcanic ash soils in Japan. Tokyo. Sakurai-Kosudo Print Co. Ltd. 1964. p. 127.
6. MANIL, P. CULOT, J. P. BROUWERS, L. Microbiol. detn. of available phosphorus and potassium in soils. Bull. Inst. Agr. et des stations de Rech. de Gembloux. C. A. **68**: 769le. 1954.
7. MARTENS, D. C., CHESTERS, G. MURDOCK, J. T. Available zinc status of Wisconsin soils as det. by *Asp. niger*. Agr. J. **56**: 262-265. 1964
8. NICHOLAS, D. J. D. The use of fungi for det. trace metals in biol. materials. The Analyst **77**: 629. 1952.
9. OSHIMA, H., TANAKA, Y., SANPEI, M. Rapid detn. of availability of phosphate fertilizer by means of fungi. Bull. of the Nat. Inst. of Agr. Sci. (Japan), Series B, N° 14: s. p. 1964.