

Adecuación de un micrométodo colorimétrico para la cuantificación de fósforo soluble en cultivos microbianos

Adaptation of a Colorimetric Micro Method for Quantification Soluble Phosphorus in Microbial Cultures

MSc. Odalys Rodríguez-Gómez; Lic. Isabel Aguilera-Rodríguez; Dra. C. Rosa María Pérez-Silva 
oroga@cebi.uo.edu.cu; isabel@cebi.uo.edu.cu; rmaria@cebi.uo.edu.cu

Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

● Resumen

En el presente trabajo se realizó la adecuación del método colorimétrico del ácido ascórbico como micrométodo para la cuantificación de fósforo soluble en cultivos microbianos, mediante la determinación de los parámetros: linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y de cuantificación. Se utilizó una solución de dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) como patrón de referencia interno. El método puede cuantificar valores de fósforo solubles para concentraciones superiores a $0,9 \mu\text{g/mL}$. Se demostró que el micrométodo es exacto, preciso y lineal, para un 95 % de confiabilidad.

Palabras clave: micrométodo, fosfato, solubilización, ácido ascórbico.

● Abstract

The present research focuses the adaptation of the colorimetric method of the ascorbic acid as micro method for the quantification of soluble phosphorus in microbial cultures, by determination of the parameters: linearity, precision, accuracy, detection and quantification limits. A solution of phosphate potassium dehydrogenate (KH_2PO_4) was used as reference intern pattern. The method can quantify soluble phosphorus values above $0,9 \mu\text{g/mL}$. It was demonstrated that the micro method is exact, precise and lineal, for 95 % of confiability.

Key words: micro method, phosphate, solubilization, ascorbic acid.

● Introducción

El fósforo después del nitrógeno, es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos y, además, en el suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal, debido a que usualmente están presentes en formas no disponibles para las plantas. Algunos microorganismos tienen la capacidad de solubilizar estas fracciones de fósforo no disponibles en el suelo, los cuales son conocidos como microorganismos solubilizadores de fosfato, PSM por sus siglas en inglés /1/.

Los microorganismos solubilizadores de fosfatos utilizan fundamentalmente dos mecanismos: la producción de ácidos orgánicos tales como acetato,

lactato, oxalato, tartrato, succinato, citrato, etcétera /2/ y la producción de enzimas fosfatasas /3, 4/.

En el estudio de estos microorganismos, la capacidad de solubilizar fosfatos insolubles se determina principalmente de forma cualitativa, en placa, por la observación de un halo/zona clara alrededor de las colonias, debido a la producción de ácidos orgánicos en el medio. La mayor o menor capacidad se determina por la medición del diámetro de dicho halo. Sin embargo, la confiabilidad de este método cualitativo, aun no ha sido completamente comprobada, pues en muchos aislados que no producen un halo claro en placas de agar, se ha encontrado que son capaces de solubilizar fosfatos inorgánicos insolubles en medio líquido /5/.

Es por ello, que muchos autores aconsejan corroborar los resultados obtenidos en los ensayos cualitativos de solubilización de fosfatos con los obtenidos en ensayos de cuantificación.

Los métodos más utilizados para determinar la solubilización de fosfatos, se dividen en dos grupos: un primer grupo donde se encuentran los métodos colorimétricos, que permiten cuantificar los iones ortofosfatos como producto de la solubilización de los compuestos fosfatados; dentro de los cuales se encuentran el método de ácido vanadomolibdato fosfato, método *Mo-Blue* o del ácido ascórbico y método verde de malaquita. En el segundo grupo se encuentran los métodos para la cuantificación de la actividad enzimática, que determinan la cantidad de enzima fosfatasa producida por los microorganismos fosfato solubilizadores, uno de los cuales es el método del p-nitrofenilfosfato /6, 7/.

En este trabajo se utiliza el método colorimétrico *Mo-Blue* o método del ácido ascórbico, propuesto por Murphy and Riley /8/, para cuantificar el fósforo disuelto en el medio de cultivo por bacterias solubilizadoras de fosfato. En solución sulfúrica los iones ortofosfato reaccionan con los iones molibdato dando ácido molibdofosfórico, el cual con ácido ascórbico, se reduce a fosfomolibdeno, que al cabo de 5 min presenta una coloración azul y absorbe a una longitud de onda de 880 nm.

Como parte de la implementación de un sistema de gestión ambiental existe la estrategia de emplear métodos de ensayo que utilicen la menor cantidad de reactivos químicos y por ende, la disminución de la generación de residuos que puedan agredir el medio ambiente.

Por otra parte, la validación de un método analítico es el proceso a través del cual se obtiene evidencia documentada, desde la propia práctica analítica, de que el método es fiable, o sea, que siempre que se opere en las condiciones propias del laboratorio donde se realiza la verificación, se obtendrá el mismo resultado. Esto constituye una garantía de la calidad de los resultados por brindar. Parámetros como la *linealidad*, *precisión* y *exactitud* son evaluados para determinar la capacidad del método para obtener resultados fiables /9, 10/.

Por todo lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el desempeño de un micrométodo para la determinación de fosforo soluble en cultivos microbianos.

● Materiales y métodos

Material biológico

Para la realización del estudio se utilizaron cepas aisladas de muestras de suelo de la rizosfera de caña de azúcar (*Saccharum sp.* SP801816), pertenecientes al género *Bacillus* (B3, B67, B92, B129, B146), identificadas previamente por Orberá *et al.* /11/.

Ensayo cuantitativo de solubilización de fosfatos

En frascos de 250 mL se colocaron 50 mL de medio National Botanical Research Institute's Phosphate (NBRIP) /12/ con fosfato tricálcico y se inocularon con 200 μ L de un cultivo de 48 horas en caldo nutriente (10^6 - 10^7 UFC/mL). Se hicieron tres réplicas por cada cepa y se dejaron dos testigos sin inocular. Los cultivos se incubaron por siete días bajo agitación (150 rpm) a 28 °C.

Tratamiento de las muestras

Al finalizar el período de incubación, los medios de cultivos se centrifugaron a 10 000 rpm por 12 min para separar la biomasa. El sobrenadante libre de células se utilizó para determinar la concentración de fósforo soluble. El mismo se conservó en viales congelado a 4 °C, hasta su procesamiento.

Determinación espectrofotométrica

La absorbancia se leyó a 880 nm en un espectrofotómetro UV-visible VARIAN con celda de vidrio con paso de luz de 1,0 cm. Se utiliza un blanco de reactivos. La cuantificación del fósforo disuelto se realizó a partir de una curva estándar de KH_2PO_4 .

Toda la cristalería utilizada fue verificada en la Oficina Territorial de Normalización, la misma se lavó previamente con solución de HCl diluido al 5 % y se enjuagó con agua destilada para eliminar posible contaminación con fósforo por el uso de

detergentes comerciales que contienen fosfatos. Los reactivos empleados fueron de calidad puro para análisis.

Preparación de la curva de calibración

A partir de una solución estándar 100 µg/mL se preparan soluciones cuyo intervalo de concentración varía desde 1-8 ppm.

Procedimiento

En un tubo de ensayo se adicionan 500 µL del medio de cultivo libre de células, posteriormente se le añaden 400 µL del reactivo combinado (tabla 1) y se completa volumen a 2 mL con agua destilada. Se lee la absorbancia después de transcurridos 10 minutos y antes de los 30 min, a 880 nm. Con las soluciones patrones se sigue el mismo procedimiento.

TABLA 1. COMPOSICIÓN DEL REACTIVO COMBINADO UTILIZADO EN EL MÉTODO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO

Número de muestras	Volumen preparado (mL)	H2SO4 5N (mL)	Tartrato de antimonio y potasio (mL)	Molibdato de amonio (mL)	Acido ascórbico (mL)
10	4	2	0,2	0,6	1,2
15	6	3	0,3	0,9	1,8

Parámetros a evaluar para medir el desempeño del método

Para determinar el desempeño del micrométodo se evaluaron los parámetros linealidad, exactitud, precisión y límites de detección y de cuantificación, según NC Guía para la validación de ensayos químicos /13/.

Linealidad: De la solución patrón de referencia interno de 100 µg/mL PO₄³⁻P, se tomaron las alícuotas correspondientes para obtener concentraciones de 1, 2, 4, 6, 8 µg/mL y realizar el procedimiento para un tamaño de muestra (n= 10).

Precisión: Se determinó mediante el cálculo de las desviaciones estándar y típica relativa (% de coeficiente de variación), de los resultados obtenidos de los análisis a tres niveles de concentración, utilizando el programa Statgraphics Plus 5.1 para (n = 10).

Exactitud: Se realizó a tres niveles de concentración a partir de una solución patrón de referencia interno, y se determinó si existen diferencias significativas entre el valor teórico y el calculado para un 95 % de confiabilidad.

Límite de detección: Se evaluó como tres veces la desviación estándar de veinte muestras blanco.

Límite de cuantificación: Se determinó como diez veces la desviación estándar de veinte muestras blanco.

● **Resultados y discusión**

Parámetros evaluados para medir el desempeño del método

Para la evaluación de la linealidad del método se determinó la recta de mejor ajuste $y = 0,1138x$ (figura 1). El coeficiente de correlación calculado es igual a 0,993 6, demostrando que existe una dependencia lineal entre la concentración y la señal analítica en el intervalo evaluado.

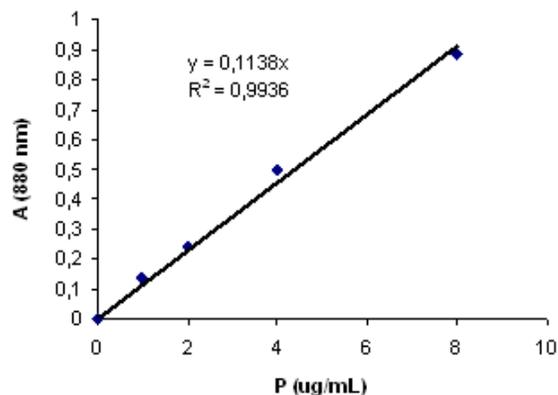


Fig. 1 Curva de calibración para la determinación de fósforo disuelto.

Teniendo en cuenta estos resultados, se procedió a la evaluación de la precisión y la exactitud en la determinación del fósforo disuelto con solución patrón interno en tres niveles de concentración. Los valores obtenidos muestran que existe una buena precisión y exactitud, pues los coeficientes

de variación (CV) están por debajo del 10 % y no se detectan diferencias significativas entre los valores de concentraciones obtenidas y las reportadas para el patrón de referencia interno a un 95 % de confiabilidad, al ser en todos los casos el p-valor mayor que 0,05 (tabla 2).

TABLA 2. EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN Y EXACTITUD EN LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO SOLUBLE EN SOLUCIÓN PATRÓN DE REFERENCIA POR EL MICROMÉTODO COLORIMÉTRICO

Concentración del patrón ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. exp.	Desv. estándar	Desv. típica relativa (% del coeficiente de variación)	t calculado	P valor
3,000	3,076	0,099	3,25	2,23	0,052
5,000	5,056	0,094	1,85	1,68	0,12
7,000	7,009	0,135	1,93	0,21	0,837

Según los resultados mostrados (tabla 3) queda establecido que el método puede emplearse en muestras cuya concentración de fósforo soluble se encuentre por encima de 0,27 $\mu\text{g/mL}$ y cuantifica con exactitud a un 95% de confiabilidad para muestras cuya concentración sea igual o mayor a 0,9 $\mu\text{g/mL}$.

TABLA 3. DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

No de muestras	20
Media (\bar{X})	0,07 $\mu\text{g/mL}$
DS	0,09 $\mu\text{g/mL}$
Límite de detección	0,27 $\mu\text{g/mL}$
Límite de cuantificación	0,9 $\mu\text{g/mL}$

Determinación cuantitativa de fósforo soluble

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la evaluación del método, se procede a determinar el contenido de fosforo soluble en los medios de cultivo inoculados con las 5 cepas ensayadas, cuyos valores se observan en la tabla 4.

TABLA 4. SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO TRICÁLCICO (5 g/L) CONTENIDO EN FÓSFORO (1 g/L) EN MEDIO LÍQUIDO POR BACTERIAS DEL GÉNERO *Bacillus* AISLADAS DE LA RIZOSFERA DE CAÑA DE AZÚCAR

Cepa	P solubilizado ($\mu\text{g/mL}$)	pH (U)
B3	321,6	4,9
B67	146,0	5,4
B92	64,3	6,0
B129	55,1	6,8
B146	214,6	4,9
Control	55	6,8

Excepto B129, todas las cepas testadas muestran la capacidad de solubilizar fosfatos en mayor o menor magnitud. Los valores de fósforo disuelto en el medio líquido, debido a la solubilización del fosfato tricálcico por estas bacterias, oscilan entre 100 y 300 $\mu\text{g/mL}$, siendo la cepa B3 la que presentó un mayor valor de fósforo disuelto en el medio (321,6 $\mu\text{g/mL}$), seguida por las cepas B146 y B67 con 214,6 $\mu\text{g/mL}$ y 146 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. También se observó una disminución del pH del medio en comparación con el grupo control, lo cual sugiere una relación entre el aumento de la solubilización del fosfato insoluble con la disminución del pH del medio.

La capacidad de solubilizar fosfatos que poseen las bacterias del género *Bacillus* ha sido reportada por varios autores /14-17/. Se plantea que uno de los mecanismos desarrollados para la actividad fósforo-solubilizadora de estos microorganismos, está asociado a la liberación de diferentes tipos de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, los cuales se unen al catión Ca mediante sus grupos carboxilos e hidroxilos, dejando al fósforo libre y en formas solubles /18/. Sin embargo, este es un fenómeno complejo, controlado por las condiciones nutricionales, fisiológicas y de crecimiento del cultivo microbiano /19/.

Como se observa en la tabla 5, los resultados en el análisis de los medios de cultivo muestran que el coeficiente de variación no excede del 10 %, evidenciando la precisión del método. Los resultados del ensayo de recuperación de la muestra, demostraron la exactitud del método, pues los recobrados alcanzados oscilan entre 93–100 %. Cuando se realiza una prueba de hipótesis, comparando la media de recobrado para la muestra de medio con respecto a 100 % (recobrado teórico), no se observan diferencias estadísticamente significativas para un 95 % de confiabilidad de las medias, ya que el p-valor es mayor que 0,05; aceptándose la hipótesis de nulidad:

$$(X \text{ teórica} - X \text{ experimental}) = 0$$

TABLA 5. EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN Y LA EXACTITUD EN LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO SOLUBLE EN CULTIVOS BACTERIANOS

Muestras	Determinaciones	Concentración soluble (media)	DS	CV (%)	% de recobrado	t calculado	P-valor
B3	10	321,6	3,9	1,3	98,5	0,19	0,85
B67	10	146,0	1,47	1,2	100,06	0,11	0,91
B92	10	64,3	1,71	2,54	99,8	1,13	0,39
B129	10	55,1	0,62	1,22	100,5	0,99	0,37
B146	10	214,6	2,56	1,18	99,23	1,24	0,42



Conclusiones

Se realizó la adecuación del micrométodo colorimétrico del ácido ascórbico para la determinación del contenido de fósforo soluble en muestras de cultivos microbianos de bacterias solubilizadoras de fosfato. El contenido de fósforo soluble osciló entre 100 y 300 µg/mL. Se demostró que es posible utilizar el micrométodo para determinar la capacidad de estas bacterias de solubilizar fosfatos insolubles.



Bibliografía

- FERNÁNDEZ, L. A. *et al.* "Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera". *CI. Suelo*. 2005, 23, 1, 31-37.
- RASHID, M. *et al.* "Organic acid production and phosphate solubilization by Phosphate Solubilizing Microorganism (PSM) under *in vitro* conditions". *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2004, 7, 2, 187-196.
- BEGONIA, M. *et al.* "Phosphatase activity and populations of microorganisms from cadmium and lead contaminated soils". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2004, 73, 1025-1032.
- ONTHONG, J. *et al.* "Effect of pH and Some Cations on Activity of Acid Phosphatase Secreted from *Ustilago sp.* Isolated from Acid Sulphate Soil". *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2007, 29, 275-286.
- BAIG, K.S. *et al.* "Comparative Efficacy of Qualitative and Quantitative methods for rock phosphate solubilization with phosphate solubilizing rhizobacteria". *Soil & Environ.* 2010, 29, 1, 82 - 86.
- DICK, W.; CHENG, L.; WANG, P. "Solid Acid Alkaline Phosphatase Activity as pH Adjustment Indicators". *Soil Biology & Biochemistry*. 2000, 32, 1915-1919.
- ODONGO, E. *et al.* "Improving Rock Phosphate Availability Through Feeding, Mixing and Processing with Composting Manure". *Bio. Technol.* 2007, 98, 2911-2918.
- MURPHY, J.; RILEY, J. P. "A modified Single Solution Method for the Determination of Phosphate in Natural Waters". *Anal. Chim. Acta.* 1962, 27, 31-36.
- AGUILERA, I. *et al.* "Validación de la determinación de la DQO en la Unidad Analítica del CEBI". *Revista Cubana de Química*. 2003, XV, 2, 18 - 25.

10. AGUILERA, I.; PÉREZ, R. M.; MARAÑÓN, A. "Determinación de sulfato por el método turbidimétrico en aguas y aguas residuales. Validación del método". *Revista Cubana de Química*. 2010, XXII, 3, 39-43.
11. ORBERÁ, T. *et al.* "Isolation and Characterisation of Aerobic Endospore Forming *Bacilli* from Sugarcane Rhizosphere for the Selection of Strains with Agriculture Potentialities". *World J Microbiol Biotechnol*. 2012, 28, 4, 1593-1603.
12. NAUTIYAL, C. S. "An Efficient Microbiological Growth Medium for Screening Phosphate Solubilizing Microorganisms". *FEMS Microbiology Letters*. 1999, 170, 265-270.
13. NC-TS 368:2010. *Guía para la validación de métodos de ensayos químicos para alimentos*, 48 p.
14. KHAN, A. *et al.* "Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, mechanisms and their role in crop production". *J. Agric. Biol. Sci.* 2009, 1, 1, 48-58.
15. AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. "Screening of Free-Living Rhizospheric Bacteria for their Multiple Plant Growth Promoting Activities". *Microbiological Research* 2008, 163, 173-181.
16. KENENI, A.; ASSEFA, F.; PRABU, P. "Isolation of Phosphate Solubilizing Bacteria from the Rhizosphere of Faba Bean of Ethiopia and their Abilities on Solubilizing Insoluble Phosphates". *J. Agr. Sci. Tech.* 2010, 12, 79-89.
17. CHEN, Y. *et al.* "Phosphate Solubilizing Bacteria from Subtropical Soil and their Tricalcium Phosphate Solubilizing Abilities". *Applied Soil Ecology*, 2006, 34, 31-34.
18. DEUBEL, A.; MERBACH, W. "Influence of Microorganisms on Phosphorus Bioavailability in Soils". En: BUSCOT, F. and VARMA, A. (eds.) *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany. 2005, 62.
19. REYES, I.; VALERY, A.; VALDUZ, Z. "Phosphate Solubilizing Microorganisms Isolated from Rhizospheric and Bulk soils of Colonizer plants at an Abandoned rock Phosphate Mine". En: VELÁZQUEZ, E. and RODRÍGUEZ-BARRUECO, C. (editors) *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. 2007, 69-75.