

Evaluación de los cambios en algunas propiedades físicas y químicas de un ultisol por efecto del *Bacillus subtilis*

Evaluating changes in some ultisol physical and chemical properties caused by *Bacillus subtilis*

Gladys Elena Acosta Olaya¹, Ramiro Ramírez Pisco²

Resumen

El interés en estudios de biorremediación de suelos deteriorados por sobreexplotación y uso indiscriminado de agroquímicos se debe a que alteran la microflora, el sistema de autorregulación y la sustentabilidad en el largo plazo. Un Ultisol, suelo de baja fertilidad química y sometido a reducción de tamaño de agregados (<2,0 mm), solarizado para reducir la población microbiológica, fue inoculado con la bacteria *Bacillus subtilis* en concentraciones de 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ unidades formadoras de colonias (ufc). En 120 días se observó un incremento importante en magnitud de: estabilidad estructural, tamaño promedio de agregados, pH, fósforo disponible y una disminución del aluminio intercambiable. Estas variaciones en la respuesta estuvieron relacionadas con la actividad de los microorganismos en el suelo, y responden a la capacidad de solubilización de minerales por la bacteria, de producción de condiciones alcalinas y de biofilms, que unidos al aumento de biomasa de raíces de la planta, mucílagos y carbohidratos, coadyuvan en la formación de agregados estables y de mayor tamaño. Las propiedades físicas y químicas al final del experimento se estabilizaron en valores mayores a los encontrados en el suelo inicial, produciendo un efecto positivo general sobre el mismo, desde el punto de vista de la fertilidad global, al aumentar el fósforo disponible, disminuir la acidez intercambiable e incrementar la estabilidad y el tamaño promedio de agregados del suelo a corto plazo.

Palabras clave: bacteria calcificante, biofilms, tamaño de agregados.

Abstract

Interest in bioremediation studies of deteriorated soils caused by over-exploitation and the indiscriminate agrochemical use is due to them altering microflora, the self-regulation system and long-term sustainability. An ultisol (soil having poor chemical properties and low fertility because of reduced aggregate size (< 2.0 mm)) was solarised to reduce the microbiological population; it was inoculated with the bacteria *Bacillus subtilis* in 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ colony forming unit (cfu) concentrations. There was a significant increase in structural stability, average aggregate size, pH and available phosphorus during the 120 days; interchangeable

1 Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín

2 Ingeniero Agrónomo MSc., Dr. , Profesor Asociado. Escuela de Geociencias. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. rramirez@unal.edu.co

aluminium became reduced. Such variations in response were related to microorganism activity in the soil and responded to minerals' solubilisation capacity because of bacterial activity, production of alkaline conditions and biofilms; these variations combined with increased plant root biomass, mucilage and carbohydrates in the formation of larger sized stable aggregates. Physical and chemical properties at the end of the experiment became stabilised at higher values than those initially found in the soil, thereby confirming a positive effect on soil from the point of view of overall fertility by increasing available phosphorus, reducing interchangeable acidity and increasing soil stability and average aggregate size in the short-term.

Key words: Calcified bacteria, biofilm, aggregate size.

Recibido: febrero 15 de 2010

Aprobado: octubre 27 de 2010

Introducción

En Colombia, al igual que en otras zonas del mundo, se evidencian diversos procesos de degradación tanto física como química de los suelos, principalmente los de uso agrícola, debido a prácticas inapropiadas de labranza y uso intensivo del recurso suelo. Esto trae como consecuencia la disminución drástica de su capacidad productiva.

Los efectos sobre las propiedades químicas por las actividades agrícolas son: acidificación, desequilibrio y pérdida de nutrientes, toxicidad por salinización y alcalinización. Efectos originados por prácticas de laboreo, y uso excesivo de fertilizantes y productos fitosanitarios de diversa índole.

De acuerdo con reportes del Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC) (1988), alrededor del 85% del territorio colombiano está constituido por suelos ácidos con pH menores a 5,5, y en el mundo la distribución porcentual de suelos ácidos es 41% en América, 17% en África, 26% en Asia y 6% en Australia, lo que equivale a 3.950 millones de hectáreas. Lo anterior constituye una limitante en la producción de cultivos y en la sustentabilidad de la seguridad alimentaria en el mundo.

En búsqueda de alternativas para recuperar la estructura del suelo y disminuir la acidez a fin de mejorar la productividad agrícola, se estudió el efecto de la bacteria *Bacillus subtilis* sobre las propiedades físicas y químicas de un Ultisol

degradado, sin estudios previos similares de aplicación de esta bacteria. Teniendo en cuenta que esta bacteria es gram positiva, aeróbica, potencialmente solubilizadora de carbonatos (Hammes and Verstraete, 2002), y con capacidad para formar biopolímeros (Mclean *et al.*, 1999), propiedades que pueden contribuir en la recuperación de estos suelos (Fall *et al.*, 2004).

Se evaluó la acción del *Bacillus subtilis* sobre propiedades físicas como la estabilidad estructural y el incremento en tamaño promedio de agregados, y propiedades químicas como el contenido de aluminio, fósforo y pH.

Materiales y métodos

Inóculo de Bacillus subtilis LST DSMZ 18595®.

El experimento se llevó a cabo con un horizonte subsuperficial Bt de un Ultisol del cerro El Volador en Medellín, Antioquia. Se extrajeron aproximadamente 400 kg de suelo, el cual fue sometido a proceso de solarizado durante dos meses en invernadero como tratamiento de desinfección inicial (Streck *et al.*, 1996; Al-Karaghoulí and Al Kayssi, 2001; Stapleton *et al.*, 2000), y no el esterilizado en autoclave con alta temperatura y presión, porque entre los intereses de las variables por evaluar estaban propiedades como la estabilidad estructural, que es afectada irreversiblemente por este proceso.

El suelo se dispuso en una capa de un espesor promedio de 5,0 cm, completamente cubierto con una película de polietileno transparente de calibre 2,0 mm, donde se registró una temperatura promedio de 35 °C. Posteriormente, el suelo fue molido y tamizado, seleccionando aquel con tamaño inferior a 2,0 mm; se homogeneizó y se tomó una submuestra para realizar análisis de caracterización física inicial de densidad aparente, distribución por tamaño de agregados, estabilidad estructural y caracterización química inicial que incluyó pH, aluminio y fósforo. Posteriormente, se adicionaron 1.200 g de suelo por maceta, para 200 macetas acordes con el diseño experimental, el cual fue completamente al azar con cuatro concentraciones y testigo, cinco repeticiones con y sin planta, realizando destrucciones cada mes durante cuatro meses. Se llevó a humedad cercana a capacidad de campo, se realizó el transplante de plántulas de lechuga germinadas previamente en semilleros, se adicionaron 5,0 ml de inóculo de *B. subtilis* (concentración 1: 1×10^6 , concentración 2: 1×10^7 , concentración 3: 1×10^8 , concentración 4: 1×10^9 ufc) a los tratamientos con y sin planta. El experimento se ubicó en el invernadero de la Escuela de Geociencias de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, 6° 15' N, 75° 35' W y a 1.495 m de altitud. Las macetas fueron regadas diariamente con el fin de mantener el suelo con humedad cercana a capacidad de campo y favorecer el desarrollo de las plantas. El muestreo se llevó a cabo cada 30 días y durante 120 días, seleccionando al azar cinco macetas de cada tratamiento. Se realizaron los análisis físicos y químicos. Los resultados se analizaron con SAS 8.0, se realizó análisis de varianza y prueba de comparación de Duncan de medias de tratamientos con un α de 0,05.

Métodos

Determinación de las propiedades químicas (IGAC, 2006)

El pH se midió por el método potenciométrico, en una suspensión suelo:agua, en proporción volumétrica de 1:1.

P por el método de Bray II, colorimetría (IGAC, 2006).

Al con KCl 1M y titulación con Na OH (IGAC, 2006).

Determinaciones de propiedades físicas (IGAC, 2006).

Estabilidad estructural, método de Yoder (IGAC, 2006).

Resultados

1. Población de *Bacillus subtilis* presente en macetas durante los 120 días del experimento en tratamientos con y sin planta.

La concentración del inóculo adicionado al inicio del experimento de *B. subtilis* a las macetas con y sin planta, de 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 ufc disminuyó inicialmente hasta los treinta días con diferencias significativas entre $cp10^9$ y tcp , luego aumentó a 1×10^8 hacia los sesenta días de evolución del experimento donde se presentaron concentraciones similares a las iniciales; finalmente, la población de *B. subtilis* disminuyó a valores cercanos a 1×10^5 hacia los 90 días y permaneció relativamente estable hasta los 120 días al final del experimento, con diferencias significativas entre $sp 10^6$ y $sp 10^8$ (figura 1 a, b).

2. Variación del diámetro medio ponderado de los agregados en seco (dm_{ps}) durante los 120 días del experimento en tratamientos con y sin planta.

El diámetro medio ponderado de los agregados en seco aumentó considerablemente en relación con el inicial que era 0,84 mm, hasta los 90 días, presentándose el incremento mayor en el tratamiento $sp 10^8$ donde el dm_{ps} fue 2,0 mm y tsp 1,9 mm, produciéndose a partir de este momento la disminución en dm_{ps} de agregados para todos los tratamientos hasta llegar al día 120, generando una ganancia en el tamaño promedio total en relación

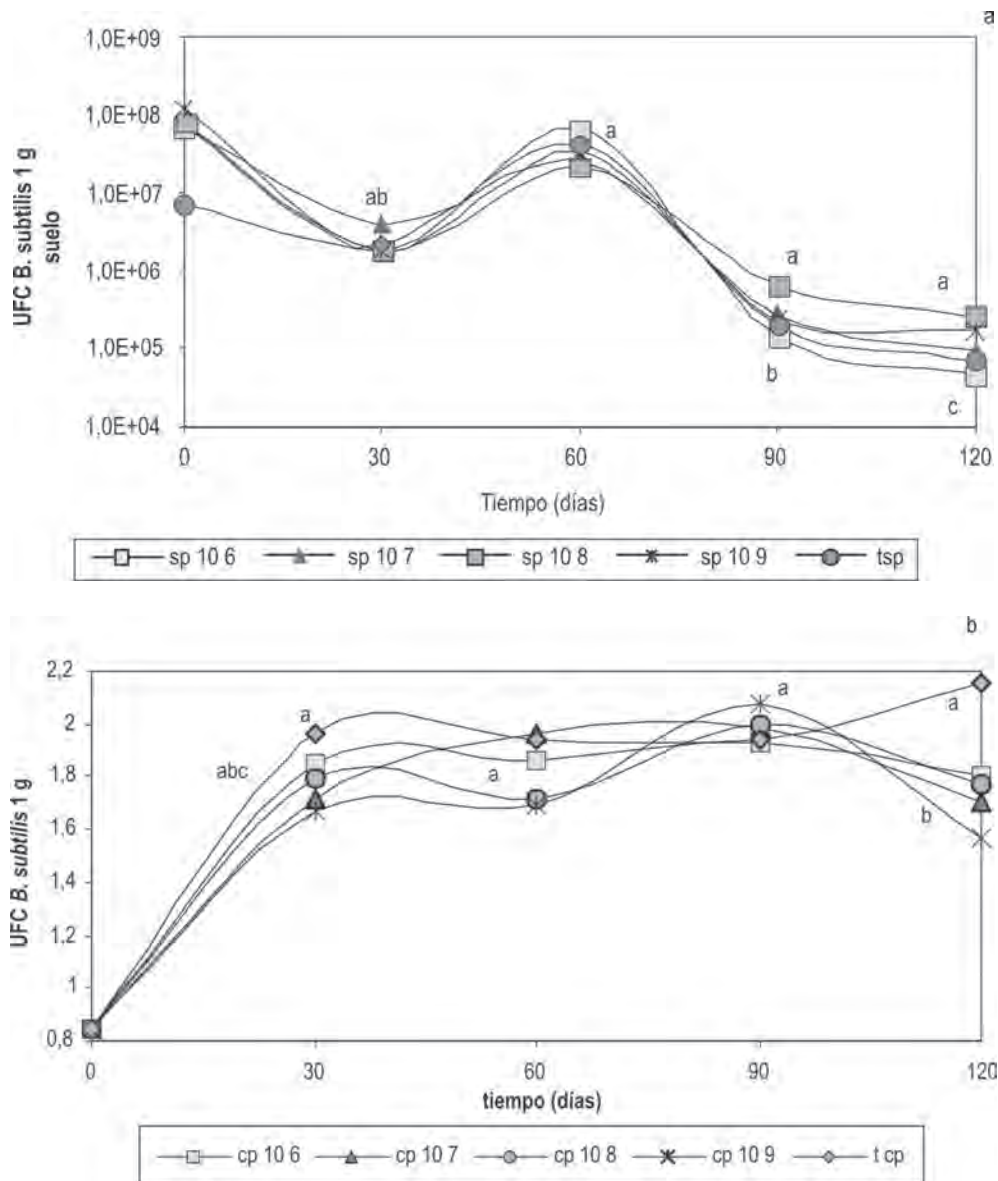


Figura 1. Comportamiento del inóculo de *B. subtilis* aplicado a un Ultisol en concentraciones de 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 ufc, a) sin planta (sp) y b) con planta (cp). Letras iguales en las gráficas significan que no hubo diferencias significativas con un α de 0,05 en la prueba de comparación de medias de Duncan.

con el inicial del 100% en los cuatro meses de duración del experimento (figura 2a). El diámetro medio ponderado de los agregados en seco con planta aumentó considerablemente en relación con el inicial, presentándose los incrementos mayores en los tratamientos cp 10^9 2,0 mm y tcp 2,2 mm a los 90 días y 120 días respectivamente.

Por último, se alcanzó un incremento del 125% en la mayoría de tratamientos con relación al dmp inicial, y 175% en tcp con diferencias significativas para este tratamiento (figura 2 b).

3. Variación del diámetro medio ponderado de los agregados en húmedo (dmph) durante los 120 días de trans-

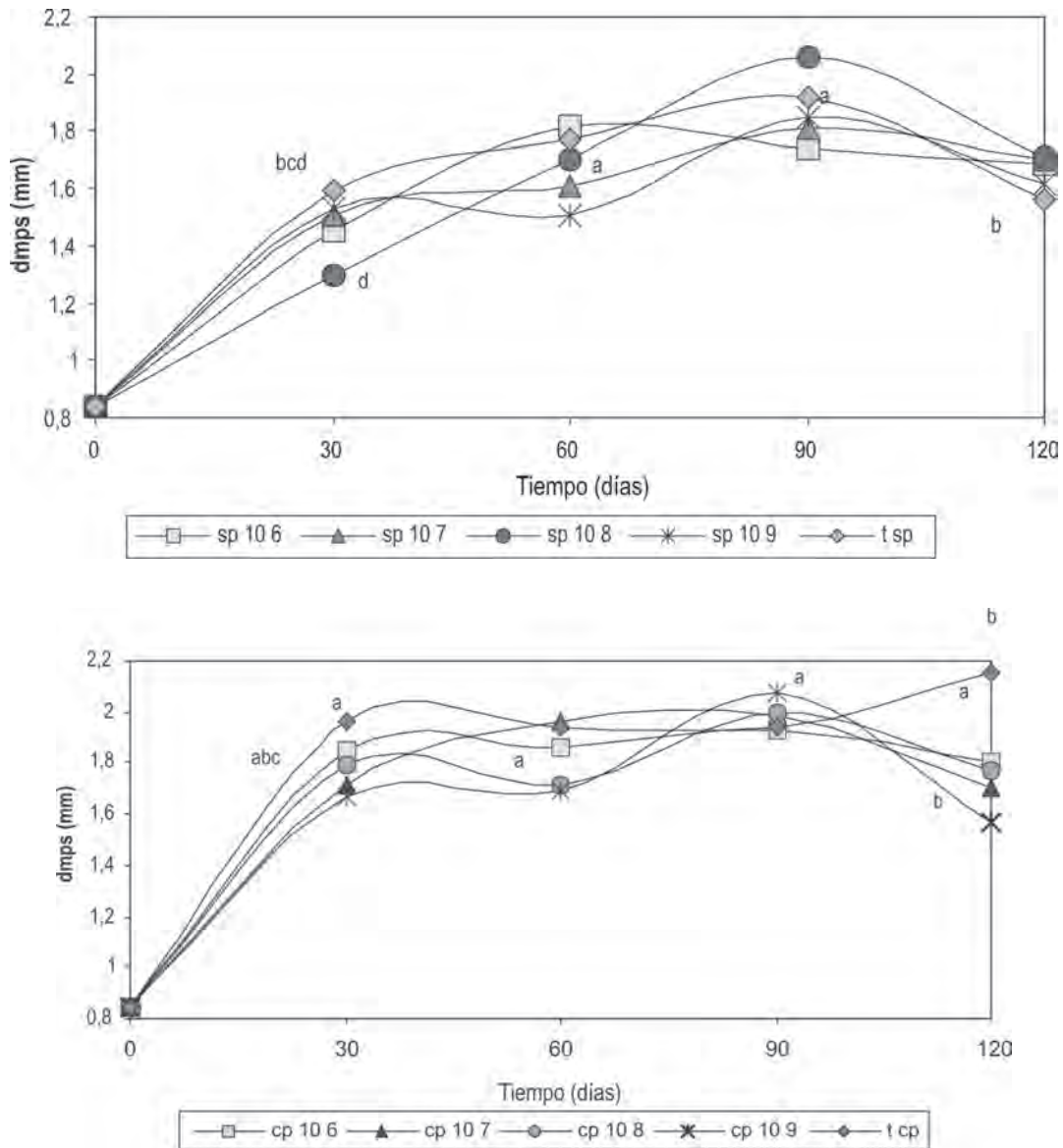


Figura 2. Diámetro medio ponderado en seco de agregados en un Ultisol, con aplicación de *B. subtilis* en concentraciones de 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 ufc, a) sin planta (sp), y b) con planta (cp). Letras iguales en las gráficas significan que no hubo diferencias significativas con un α de 0,05 en la prueba de comparación de medias de Duncan.

curso del experimento en tratamientos con y sin planta.

El dmph aumentó sin diferencias significativas entre tratamientos, presentando incrementos de 160% en los tratamientos tsp y sp 10^9 a los 90 días, y disminución al final del experimento, con un 100% de incremento neto

en tamaño del dmph con relación al tamaño inicial de 0,55 mm, para todos los tratamientos (figura 3a). Los tratamientos a partir de los cuales se obtuvo un aumento del 100% en dmph de agregados en húmedo fueron cp 10^9 y cp 10^8 a los 90 días, generándose a partir de este momento una

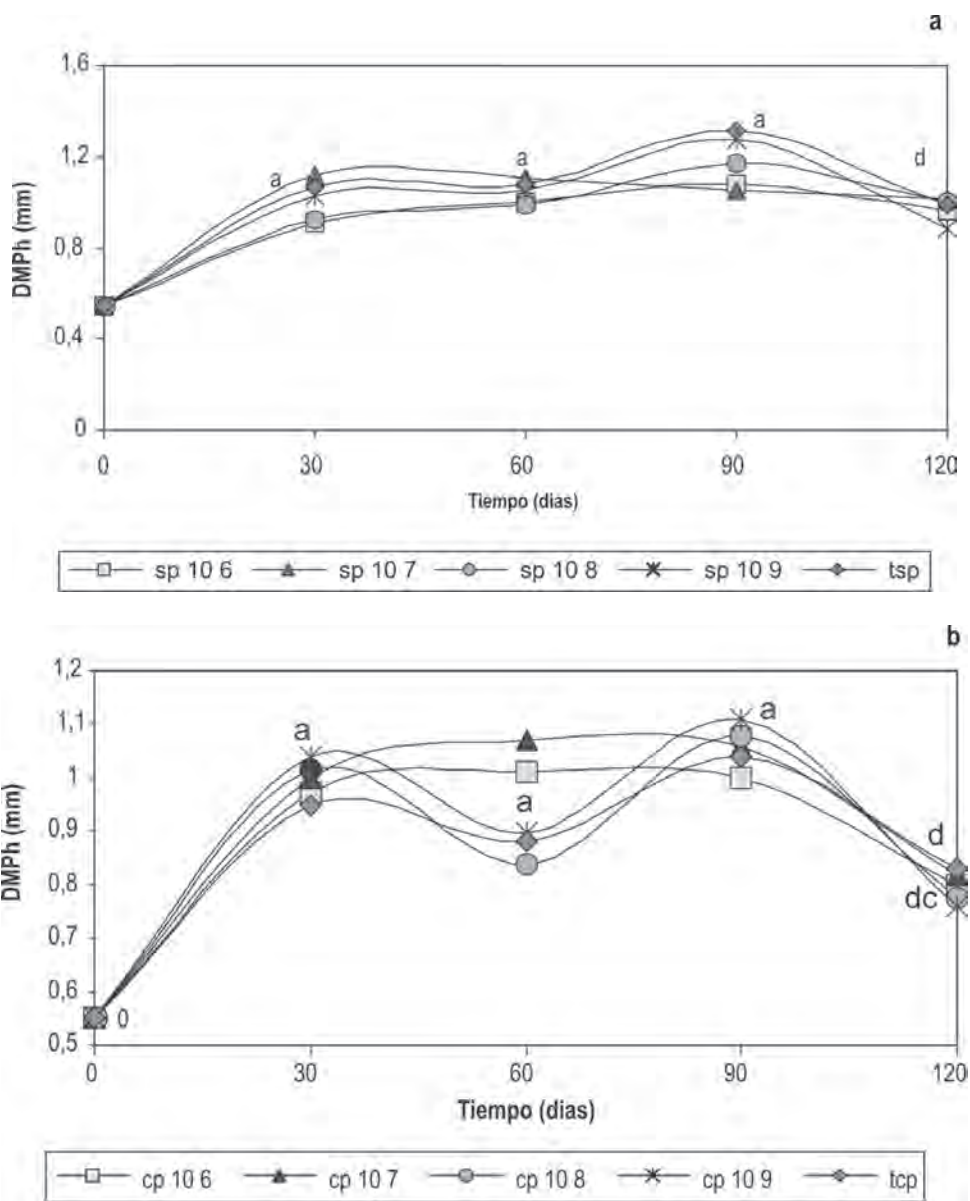


Figura 3. Diámetro medio ponderado en húmedo de agregados en un Ultisol, con aplicación de *B. subtilis* en concentraciones de 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 ufc, a) sin planta (sp) y b) con planta (cp). Letras iguales en las gráficas significan que no hubo diferencias significativas con un α de 0,05 en la prueba de comparación de medias de Duncan.

leve disminución que conllevó un aumento neto en tamaño de agregados del 54% para todos los tratamientos con planta sin diferencias significativas (figura 3b).

4. Variación del pH durante el transcurso del experimento en tratamientos con y sin planta.

El pH de los tratamientos sin planta aumentó en todos los casos, presentándose un incremento mayor a los 90 días de iniciado el experimento en los tratamientos tsp, aumentaron a 5,1, y en sp 10^6 a 4,8. El tratamiento sp 10^6 conservó el pH hasta el final del experimento en 4,8 (figura 4a). En los tratamientos con planta el pH se

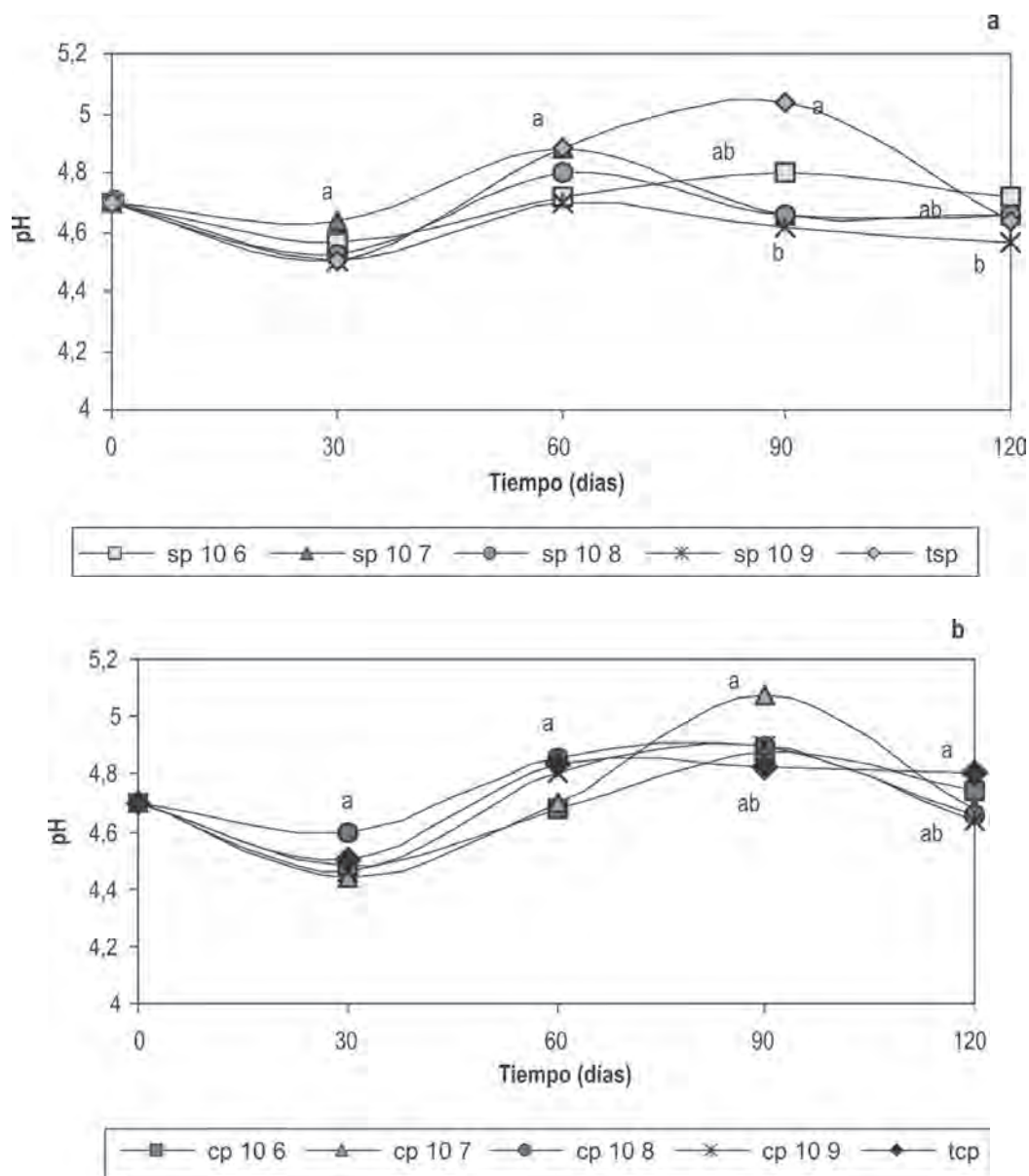


Figura 4. Cambios de pH de un Ultisol, con aplicación de *B. subtilis* en concentraciones de 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 ufc, a) sin planta (sp) y b) con planta (cp). Letras iguales en las gráficas significan que no hubo diferencias significativas con un α de 0,05 en la prueba de comparación de medias de Duncan.

incrementó a partir de los 30 días de iniciado el experimento, alcanzando un máximo a los 90 días en todos los tratamientos, especialmente en cp 10^7 de 5,1; sin embargo, luego disminuyó al valor inicial (figura 4b). El rango para todos los tratamientos fue entre 4,4 y 5,08.

5. Variación en la concentración de aluminio disponible en el suelo durante el transcurso del experimento en tratamientos con y sin planta.

La concentración de aluminio disminuyó durante todo el experimento, los valores de concentración más ba-

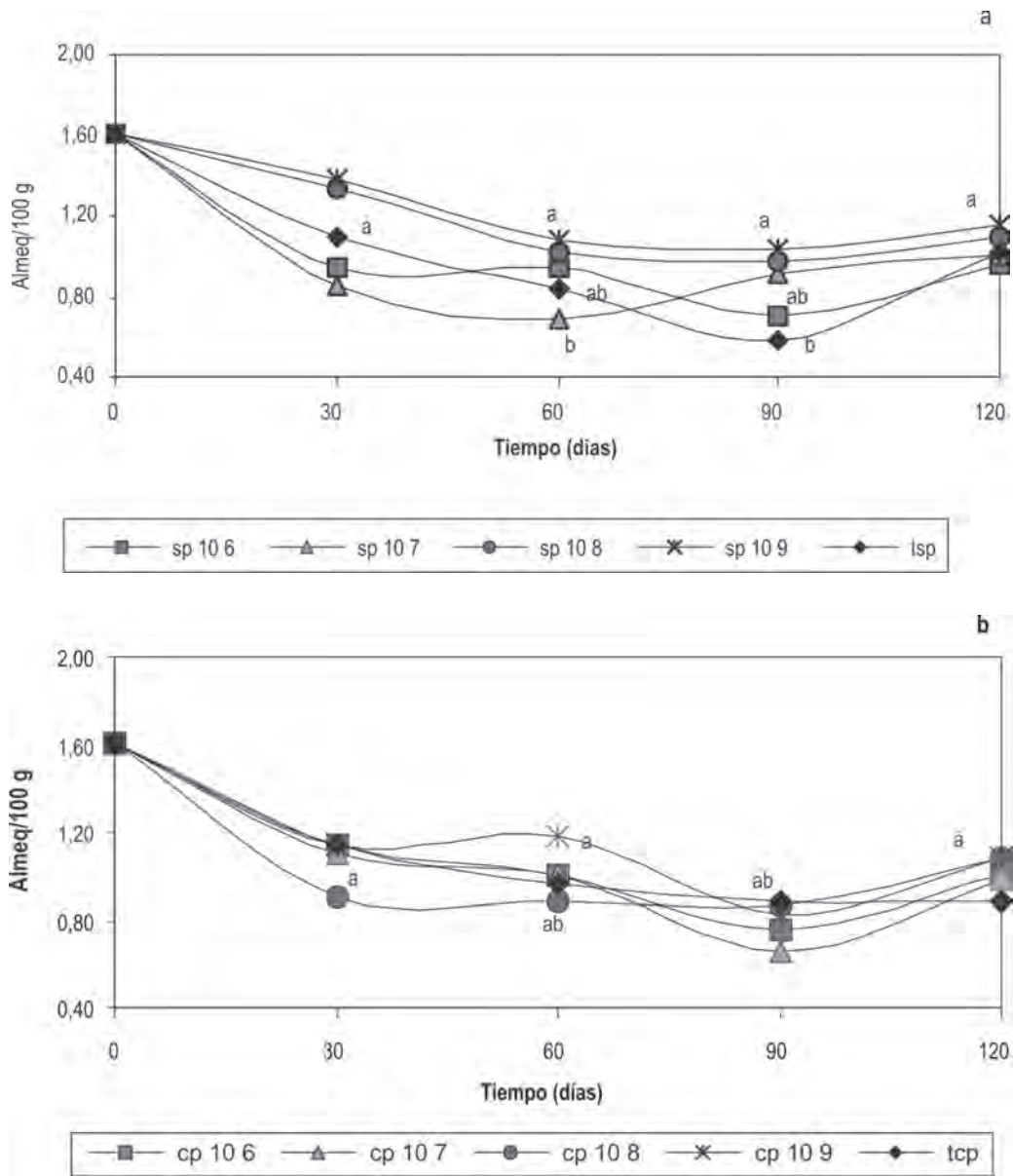


Figura 5. Variación en la concentración de aluminio de un Ultisol, con aplicación de *B. subtilis* en concentraciones de 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 ufc, a) sin planta (sp) y b) con planta (cp). Letras iguales en las gráficas significan que no hubo diferencias significativas con un α de 0,05 en la prueba de comparación de medias de Duncan.

jos se encontraron en los tratamientos tsp y sp10⁶ a los 90 días, equivalente a una reducción del 68,75 y 56,25% respectivamente con relación a la concentración inicial (figura 5a). La concentración de aluminio disminuyó en el transcurso del experimento con planta, presentando la mayor reduc-

ción en el tratamiento cp 10⁷ a los 90 días, equivalente al 60% del aluminio inicial (figura 5b).

6. Variación en la concentración de fósforo durante el transcurso del experimento en tratamientos con y sin planta.

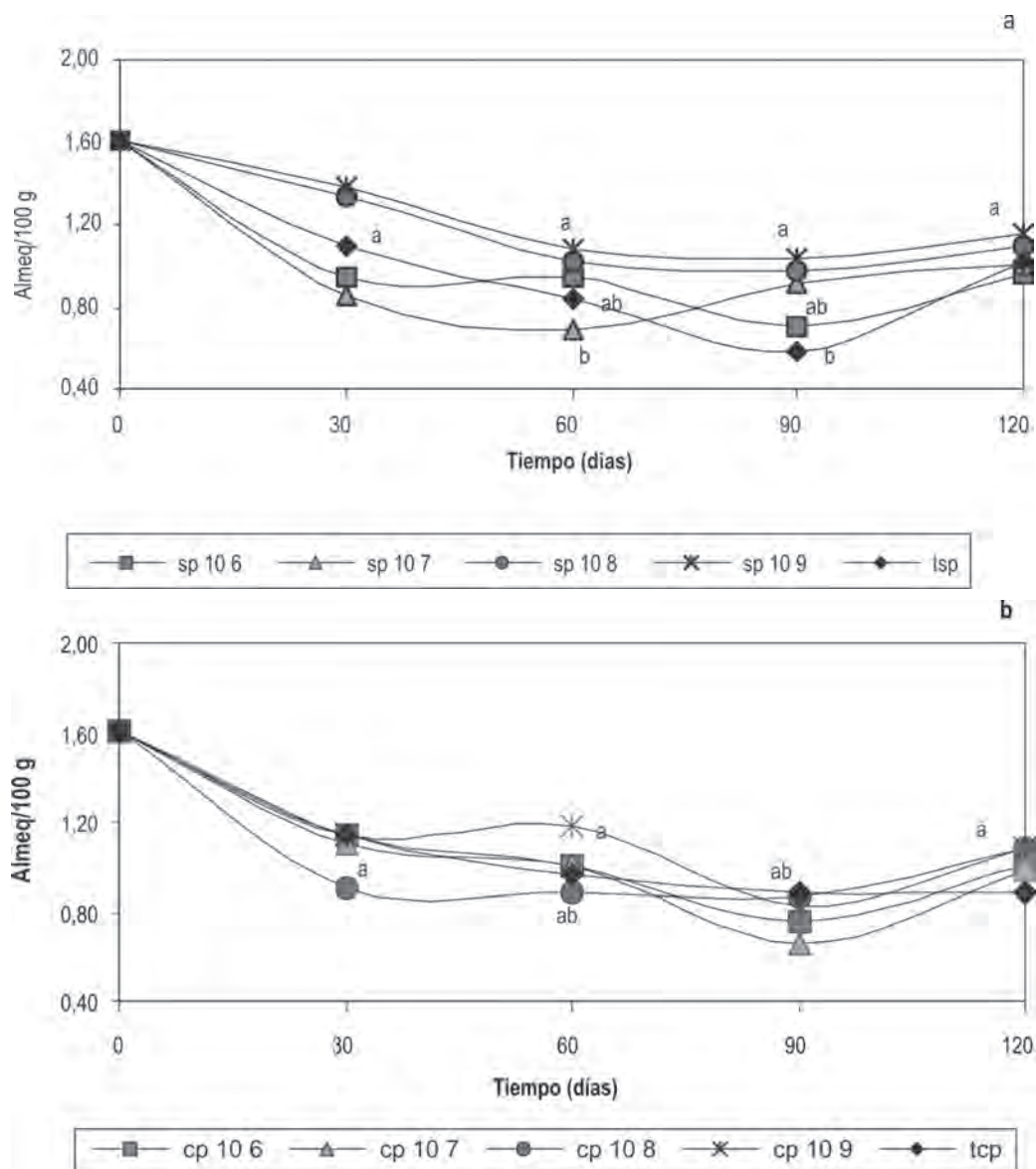


Figura 6. Variación en la concentración de fósforo de un Ultisol, con aplicación de *B. subtilis* en concentraciones de 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ ufc, a) sin planta (sp) y b) con planta (cp). Letras iguales en las gráficas significan que no hubo diferencias significativas con un α de 0,05 en la prueba de comparación de medias de Duncan.

La concentración de fósforo disponible para los tratamientos en ausencia de plantas presentó tendencia al aumento. Las mayores concentraciones se detectaron a los 90 días de iniciado el experimento en los tratamientos tsp y sp10⁶, alcanzando incrementos del 450% con relación a la concentración inicial de fósforo; en el tratamiento

sp10⁸ la concentración aumentó hasta los 60 días, posteriormente permaneció constante en un valor cercano a 4,0 mg/kg equivalente a un 100% de incremento en relación al valor inicial (figura 6a). En la gráfica podemos observar cómo la concentración de fósforo disponible aumentó significativamente en todos los tratamientos,

en especial en cp 10⁷ hasta los 90 días llegando a un valor de 11,0 mg/kg equivalente a un incremento de 550% con relación a la concentración inicial, para luego descender hasta valores de 1,5 mg/kg (figura 6b).

Discusión

Las variables físico-químicas medidas se incrementaron notablemente en el tiempo con relación a la concentración de *B. subtilis*. La estabilidad estructural aumentó en todos los tratamientos debido a la presencia de *B. subtilis*, ya que estos microorganismos participan en la descomposición de la materia orgánica y la producción de polisacáridos extracelulares que actúan como agentes de unión entre partículas (Bronick y Lal, 2005). El tamaño promedio de agregados del suelo al inicio del experimento fue 94% inferior a 2,0 mm y el 48% inferior 0,5 mm. El diámetro medio ponderado de los agregados del suelo en seco (dm_{ps}) inicial fue 0,84 y el dm_{ph} 0,55 mm. Durante el desarrollo del experimento el diámetro medio ponderado en seco aumentó a 1,6 mm en tratamientos sin planta y a 1,9 mm en tratamientos con planta, debido según Gomathi y Ramasamy (2004), a la producción de polisacáridos por los microorganismos, los cuales son rápidamente mineralizados y actúan como agentes iniciadores de agregación; sin embargo, este estado de unión por sí sólo no permanece en el tiempo (Tisdall y Oades, 1982; Tisdall, 1996), por esta razón, después de los 30 días de desarrollo del experimento comienza la disminución en el tamaño promedio de agregados en seco, e inicia el proceso de estabilización, en el cual los mucílagos de alto peso molecular de origen microbiano o de raíces ayudan a mantener los agregados a largo plazo (Traorea *et al.*, 2000). El dm_{ph} inicial de los agregados del suelo fue 0,55 mm, a los 90 días de transcurso del experimento se incrementó a 1,17 mm en tsp y sp10⁸, y a 1,47 mm en tcp, cp10⁷ y cp10⁸, alcanzando un tamaño final de 0,81 mm en promedio, equivalente a un aumento en el tamaño promedio de agregados estables al agua del 50% en 4 meses. El incremento en estabilidad de agregados se debió probablemente a la producción de ácido

poly r-glutámico (r-PGA) que es producido por *B. subtilis*, el cual presenta una alta actividad floculante. La actividad floculante del PGA en una suspensión de caolín es estimulada por la presencia de Ca²⁺, Mg²⁺, o Fe³⁺ en la suspensión (Yokoi *et al.*, 1996), iones que se encontraban presentes en el Ultisol estudiado y los cuales favorecieron este representativo aumento del tamaño de agregados en tan corto periodo de tiempo. El pH se incrementó durante el transcurso del experimento en tratamientos con y sin planta debido a la habilidad del *B. subtilis* de producir condiciones alcalinas (Lian *et al.*, 2006; Fujita *et al.*, 2000), favorecer la precipitación del carbonato de calcio (Shannon *et al.*, 1999; Fortín y Beveridge, 1997) y la producción de exudados bacteriales (Song *et al.*, 2007).

Todas las cepas de *Bacillus* son capaces de hidrolizar úrea, la cual incrementa el pH del medio (Cacchio *et al.*, 2003). El solarizado redujo la carga microbiana inicial total y la de *B. subtilis* apreciablemente, pero dejó una concentración residual de la misma, la cual durante el desarrollo del experimento posiblemente compitió con el *B. subtilis* inoculado al suelo y pudo ser lo que al final del experimento causara la reducción de las ufc de *Bacillus* presentes.

Conclusiones

1. El *Bacillus subtilis* mejoró las propiedades físicas del Ultisol degradado. Con relación al tamaño de agregados y la estabilidad estructural, se encontraron cambios importantes en tiempos relativamente cortos, a pesar de realizar el experimento con un suelo de baja fertilidad y muy pobres condiciones de agregación.
2. Las propiedades del *Bacillus* de formar biofilms, por la producción de biopolímeros, y de solubilizar minerales son las que logran que en el corto tiempo se presenten aumentos del 50% en el tamaño promedio de agregados en seco y en húmedo.
3. En relación con las características químicas lo más importante que se en-

contró —por tratarse de un elemento limitante en el desarrollo de las plantas y producción de cultivos— fue el aumento a los 90 días del fósforo disponible en el suelo en un 550%, en relación con la concentración inicial, que al final disminuyó por absorción por la planta.

4. El pH aumentó de 4,7 a 5,0 hasta los 90 días, y luego disminuyó al valor inicial, lo que determinó el aumento en la disponibilidad en el suelo del fósforo.
5. El aluminio disminuyó, debido a que este elemento deja de estar disponible en el suelo, al incrementar el pH, por la acción del *Bacillus subtilis*.

Agradecimientos

A Live Sistem Technology y a la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín por el apoyo y la cofinanciación del proyecto de investigación.

Referencias bibliográficas

- AlKaraghoul, A.A., and Al-Kayssi, A.W. 2001. Influence of soil moisture content on soil solarization efficiency. *Renewable Energy*, 24: 131-144.
- Bronick, C.J., and Lal, R. 2005. Soil structure and management: a review. *Geoderma*, 124: 3-22.
- Cacchio, P., Ercole, C., Cappuccio, G. and Aldo, L. 2003. Calcium carbonate precipitation by bacterial strains isolated from a limestone cave and from a loamy soil. *Geomicrobiology Journal*, 20: 85-98.
- Fall, R., Kinsinger, R.F. and Wheeler, K.A. 2004. A simple method to Isolate biofilm-forming *Bacillus subtilis* and related species from plant roots. *Systems Apply Microbiology*, 27: 372-379.
- Fortin, D. and Beveridge, T. J. 1997. Role of the bacterium thiobacillus in the formation of silicates in acid mine tailings. *Chemical Geology*, 141: 235-250.
- Fujita, Y., Ferris, F. G. and Lawson, R. D. 2000. Calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 17: 305-318.
- Gomathi, V. and Ramasamy, K. 2004. Polysaccharide and its component sugars from natural soil aggregates. *Madras Agricultural Journal*, 91: 23-26.
- Hammes, F. and Verstraete, W. 2002. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1: 3-7.
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC). 2006. *Métodos analíticos del laboratorio de suelos*. Bogotá. 648 p.
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC). 1988. *Suelos y bosques de Colombia*. Bogotá. 513 p.
- Lian, B., Hu, Q., Chen, J., Ji, J. and Teng, H. 2006. Carbonate biomineralization induced by soil bacterium *Bacillus megaterium*. *Geochimica et Cosmochimica*, 70: 5522-5535.
- McLean, R. J., Fuqua, C., Siegle, D., Kirkland, B. L., Adams, J. L. and Whiteley, M. 1999. Biofilm growth and illustrations of its role in mineral formation. *Microbial Biosystems: New Frontiers Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology Atlantic Canada Society for Microbial Ecology*, Halifax, Canada.
- Shannon, S. F., Galinat, J. K. and Bang, S. S. 1999. Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 1563-1571.
- Song, W. N., Ogawa, C. T., Oguchi, T., Hatta, T. and Matsukura, Y. 2007. Effect of *Bacillus subtilis* on granite weathering: a laboratory experiment. *Catena*, 70: 275-281.
- Stapleton, J. J. 2000. Soil solarization in various agricultural production systems. *Crop Protection*, 19: 837-841.
- Streck, N. A., Schneider, F. M. and Buriol, G. A. 1996. Soil heating by solarization inside plastic greenhouse in Santa Maria, Rio Grande do Sul. *Agricultural and Forest Meteorology*, 82: 73-82.
- Tisdall, J. M. and Oades, J. M. 1982. Organic matter and water stable aggregates in soils. *Journal of Soil Science*, 33: 141-163.
- Tisdall, J. M. 1996. Formation of soil aggregates and accumulation of soil organic matter. In: Carter M. R. and Stewart, B. A. (eds.). *Structure and organic matter storage in agricultural soils*. Boca Raton: CRC Press.
- Traorea, O., Groleau, V., Plantureux, S. and Tubeileh, A. 2000. Effect of root mucilage and modelled root exudates on soil structure. *European Journal of Soil Science*, 51: 575-581.
- Yokoi, H., Arima, T., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y. 1996. Flocculation properties of poly(L-glutamic acid) produced by *Bacillus subtilis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82: 84-87.