

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA
Prof. Dr. VICENTE CALLAO

LA SULFATO-REDUCCION BIOLÓGICA EN LOS SUELOS DE LA PROVINCIA DE GRANADA Y SU INFLUENCIA EN LA FERTILIDAD DE LOS MISMOS (*)

por
P. ROMERO, V. CALLAO y C. PEREZ-MIRANDA

Ars Pharm. X, 85 (1969)

I N T R O D U C C I O N

Es en el mar donde la reducción biológica de los sulfatos a sulfuros se ha primeramente presentado y demostrado de manera indirecta. En el curso de la expedición CHALLENGER, MURRAY e IRVINE (1) analizaron numerosas muestras de lodos negro-azulados y demostraron que este tipo sedimentario extremadamente común en los fondos oceánicos, está caracterizado por un fuerte contenido en sulfuros, por una débil concentración en iones sulfatos y por un aumento proporcional del contenido en carbonatos. Estos autores han considerado que la formación de estos sedimentos estaba ligada a un doble proceso de reducción. De una parte el paso de los sulfatos a sulfuros y de otra, el desplazamiento de los sulfuros por el ión carbonato, procesos que conducen a la precipitación de los carbonatos alcalinos y alcalinoterrenos con liberación de ácido sulfhídrico. Por otra parte demostraron la naturaleza biológica del proceso por el cual los sulfatos son reducidos a sulfuros. Observaron (1) que si se siembra en un medio rico en sulfatos, una muestra fresca de lodo negro-azulado, los sulfatos son rápidamente reducido a sulfuros, pero que la esterilización,

Estas experiencias tuvieron una gran resonancia. Los biólogos rusos señalaron hacia 1880 (citado por J. SENEZ (2)) que las aguas profundas del Mar Negro contenían cantidades extremadamente elevadas de SH_2 . Encontraron estos investigadores que no había SH_2 en la superficie, que a unos 180 metros de profundidad la cifra media era de 45 mg/litro y el orden de 1 gramo por el litro a 2.160 metros.

Las verdaderas bacterias sulfato-reductoras fueron descubiertas en Holanda por BEIJERINCK en 1895, (3) quien primeramente las aisló a partir de lodo de un canal de agua dulce y les dio el nombre de *Spirillum desulfuricans*. Poco después van DELDEN en 1904 (4) aisló en aguas litorales de este mismo país un germen que denominó *Spirillum aestuarii*. Este organismo ha sido reaislado por ISSATCHENKO en 1924 (5) en las aguas libres y sedimentos del Mar Negro.

Posteriormente bacterias sulfato-reductoras se han puesto de manifiesto por diversos autores en diferentes biotipos marinos. Así ZOBELL y RITTENBERG (6) las han investigado sistemáticamente en los sedimentos marinos y han demostrado

(*) Para la realización de este trabajo fue concedida una ayuda de Investigación por el P.I.O. previa del lodo por el calor, evita el fenómeno.

que su presencia es ubicua e incluso se encuentran en los fondos abisales de las Islas Filipinas.

La clasificación de las bacterias sulfato-reductoras ha sido recientemente reorganizada (7) (8). Se establecen dos grupos:

1.º Grupo de las bacterias sulfato-reductoras formadoras de esporas: Género *Desulfotomaculum* (Dm.). Comprende: Dm. orientis, Dm. ruminis y Dm. nigrificans. Ninguna es marina o halófila y la última corresponde con el *Clostridium nigrificans* del Bergey, especie termófila y móvil. El Dm. orientis ha sido aislado por ADAMS y POSTGATE (1959), se trata de una especie mesófila y móvil por flagelos peritricos.

Ambas especies se encuentran deprovistas del citocromo c_3 y de desulfovirodina pigmentos ambos presentes en el grupo de sulfatoredutores no esporulados.

2.º Grupo de las bacterias sulfato-reductoras no formadoras de esporas: Género *Desulfovibrio*. Comprende cinco especies: D. desulfuricans, D. vulgaris, D. africanus, D. gigas y D. salexigens. Ninguna es termófila, siendo la última especie mencionada halófila obligada. Se encuentran principalmente en las aguas tanto libres como marinas.

Son estas especies bacilos Gram negativos, móviles por flagelos polares o lofotricos (*D. gigas*), mesófilos y que poseen los pigmentos citocromos c_3 y desulfovirodina. El *D. gigas* fija el nitrógeno atmosférico.

Es objeto del presente trabajo el aislamiento de bacterias sulfatoredutoras en campos de gramíneas situados en la provincia de Granada. Determinar su poder sulfatoreductor en condiciones de laboratorio. Estudiar el efecto de las bacterias aisladas sobre el desarrollo de cultivos en condiciones de invernadero paralelamente a la descomposición de los sulfatos, considerando otros factores físicos y químicos determinantes del grado de fertilidad de los suelos.

MATERIAL Y METODOS

Material.

Se han recogido 16 muestras de suelos cultivados con trigo o cebada, situados en la Vega de Granada.

La profundidad de la toma ha sido entre los 20 y 35 cm. Las fechas de recogida y el grado de humedad en el momento de la toma se indican en la tabla I.

Los medios de cultivo empleados han sido:

TABLA I

Muestra	Fecha recogida	% humedad
1	II-67	50,60
2	II-67	38,35
3	III-67	38,90
4	IV-67	40
5	IV-67	35,30
6	V-67	31,10
7	V-67	28
8	VI-67	30
9	IX-67	18,35
10	X-67	25
11	XI-67	30,15
12	I-68	35,70
13	I-68	33,70
14	II-68	47
15	III-68	40
16	IV-68	38,30

Medio n.º 1 (para enriquecimiento). Medio de Baar suplementado en extracto de levadura y agentes reductores. (9).

Fosfato monopotásico	0'5 g.
Cloruro amónico	1 g.
Sulfato cálcico	1 g.
Sulfato magnésico 7H ₂ O	2 g.
Lactato sódico	3'5 g.
Extracto de levadura	1 g.
Acido ascórbico	1 g.
Acido tioglicólico	1 g.
Sulfato ferroso 7 H ₂ O... ..	0'5 g.
Agua del grifo	1000 ml.

Se ajusta el pH entre 7 y 7'5. El medio contiene un precipitado. Para especies marinas se sustituye el agua del grifo por agua del mar o se adiciona cloruro sódico hasta una concentración del 2'5 %.

Se reparte en tubos gruesos a razón de 50 ml. y se esteriliza al autoclave a 112° C. durante 30'. Antes de usar se regeneran por ebullición durante media hora.

Medio n.º 2. Medio de Starkey modificado.

Sulfato dipotásico... ..	0'25 g.
Cloruro amónico	0'5 g.
Sulfato sódico... ..	0'5 g.
Cloruro cálcico 2H ₂ O	0'05 g.
Sulfato Magnésico.	1 g.
Lactato disódico	1'75 g.
Acido tioglicólico	0'05 g.
Extracto de levadura... ..	0'5 g.
Agar-agar	4 g.
Agua destilada	500 ml.

El medio se reparte en tubos de 7-8/180 mm. y de 13 X 180 mm. Se esteriliza al autoclave. Antes de usarlo se regeneran y añaden dos gotas por tubo de una solución al 20 % de sal de Mohr esterilizada por filtración.

Medio n.º 3.—Agar V F. glucosado (10). Se reparte en tubos de 7-8 x 180 mm. y se le adiciona antes de sembrar y previamente regenerados dos gotas por tubo y se le adiciona antes de sembrar y previamente regenerados dos gotas por tubo

Medio n.º 4.—Caldo de V F. glucosado (10). Se reparte en tubos de 13-14 x 180 mm. y se le adiciona antes de sembrar y previamente regenerados dos gotas por tubo de una solución estéril de sal de Mohr al 20 %.

Medio n.º 5.—Medio PL (11). (Para conservación de sulfatoreductores no marinos).

Peptona bacteriológica... ..	7
Extracto de levadura	7
Agua del grifo... ..	1000 ml.

El pH se ajusta a 7 y se le puede o no adicionar agar-agar. Se esteriliza al autoclave a 112° durante media hora.

La sal de Mohr se le adiciona en el momento del empleo después de regenerarlos los tubos se cierran a la llama después de hacer el vacío. Así se logra conservar los gérmenes durante un año.

Para conservar los sulfatos-reductores marinos el agua del grifo se sustituye por agua del mar madurada.

Medio n.º 6.—(Para diferenciar especies).

Fosfato monopotásico	0'5 g.
Cloruro amónico	1 g.
Cloruro cálcico 2H ₂ O	0'1 g.
Cloruro magnésico 6H ₂ O	1'6 g.
Extracto de levadura	1 g.
Sulfato ferroso 7H ₂ O	0'1 g.
Piruvato sódico	3'5 g.
Agua destilada	1000 ml.

El pH se ajusta entre 7'3 y 7'7. Se esteriliza por filtración. Se reparte en tubos de 13-14 por 180 mm. Para cepas marinas se añade ClNa al 2'5 %.

Técnicas.

Una vez en el laboratorio se procedió a determinar el grado de humedad del suelo (12). A continuación se colocaron cinco gramos de suelo en un matraz en Erlenmeyer de 50 c.c. al que se adicionan 50 c.c. del medio n.º 1 regenerado. Se cierra herméticamente con tapón de caucho e incuba a 32-35° C. durante una semana. A las 72 horas los matraces presentan un ennegrecimiento abundante y un intenso olor a ácido sulfhídrico. De éstos se procede a aislar siguiendo la técnica de Weinberg (13) empleando los medios de cultivo número 2 y 3. También se disemina en placas Petri conteniendo estos mismos medios e incubando en cámara de anaerobios tipo B L T en la que se introduce una presión de hidrógeno de 0'1 kg/cm² después de haber realizado el vacío.

Todas las colonias que presentan ennegrecimiento presumiblemente debido a la reducción de los sulfatos a sulfuros se resiembran a un tubo regenerado de 13-14 x 180 mm. que contiene uno de los medios número 2 y 3 líquido. A continuación se estrangulan a llama, se les hace el vacío mediante bomba neumática y se cierran al fuego. La incubación se realiza durante tres semanas a 32° C.

Identificación (9).

La identificación de bacterias sulfatoreductoras se realiza atendiendo a los siguientes criterios.

- 1.º Ennegrecimiento del medio de cultivo que contiene una sal ferrosa.
- 2.º Gram.

3.º *Prueba de termoresistencia*.—Una ampolla de 1 c.c. de una suspensión de gérmenes se somete 10' a 100° C. Se enfría rápidamente al grifo y se siembra el contenido de la ampolla en el medio n.º 2 líquido. Al término de una semana de incubación a 32° C. se observa si hay o no crecimiento, y en este último si va acompañado o no de un precipitado negro.

Si hay crecimiento acompañado de un ennegrecimiento del medio: género *Desulfotomaculum*. La diferencia de especie se realiza:

Crece a 55° C.	<i>Dm. nigrificans</i>
Crece a 30-37° C.	<i>Dm. orientis</i> , <i>Dm. ruminis</i>

No hay crecimiento: Género *Desulfovibrio*:

Crece en el medio n.º 6	<i>D. desulfuricans</i>
No crece en el medio n.º 6	<i>D. vulgaris</i>
	<i>D. africanus</i>
	<i>D. gigas</i> .

Crece en un medio que contenga: 1 mg/ml del inhibidor chlorhexidine o Hibitane *D. salexigens*.

La confirmación de si una especie sulfatoreductora pertenece o no al género *Desulfovibrio* se realiza mediante una prueba de fluorescencia negativa. Esta prueba se realiza tomando 1 ml. del sobrenadante de un cultivo (evitando el pre-

citado de S Fe) y se centrifuga. Al sedimento se añade 1 gota de una solución 2 N de hidróxido sódico bajo luz ultravioleta de 375 milimicras. Las especies del género *Desulfovibrio* dan una intensa coloración roja fluorescente (1).

(1) MILLER and SALEH en 1964 han encontrado una cepa que no da dicha prueba (15).

RESULTADOS Y DISCUSION

En ningún caso se han aislado gérmenes que reduzcan los sulfatos en los medios líquidos ensañados. El fuerte olor a ácido sulfhídrico detectado en el matracito Erlenmeyer (está enriquecido en sustancias orgánicas procedentes del suelo), así como el débil ennegrecimiento que presentan las colonias crecidas tanto en profundidad como en la superficie de las placas Petri incubadas en anaerobiosis, se debe a la actuación de los gérmenes sobre sustancias orgánicas azufradas ya que al resembrar una colonia de éstas en los medios líquidos apropiados no se logra la formación apreciable de ácido sulfhídrico ni el ennegrecimiento del medio.

El grado de humedad de la tabla I no guarda relación con la época del año, cosa lógica ya que se trata de suelos de regadío.

El número de gérmenes aislados por nosotros de cada muestra así como el género a que pertenecen se indica en la tabla II.

El estudio microbiológico realizado con las 24 estirpes aisladas las sitúa como especies pertenecientes al orden Eubacteriales —familias Bacillaceae, Enterobacteriaceae, Bacteroidaceae— y al orden Actynomicetales, familia Actynomicetaeae.

Es de resaltar que se han aislado gérmenes anaerobios estrictos no esporulados en las muestras de mayor grado de humedad (muestras n.º 1 y 14).

TABLA II

Muestra n.º	Formación de SH ₂ en el Erlenmeyer	N.º colonias "diferentes ennegrecidas en anaerobiosis"	Gérmenes (1)
1	+	2	Clostridium Bacteroides
2	+	3	Clostridium Escherichia Proteus
3	+	1	Actinomyces
4	+	1	Clostridium Clostridium
5	+	1	Proteus
6	+	1	No tipado
7	+	2	Clostridium Bacteroides
8	+	1	Escherichia Escherichia
9	+	2	Clostridium
10	+	1	Proteus
11	+	1	Clostridium
12	+	1	Proteus
13	+	1	Clostridium Bacteroides
14	+	2	Actinomyces Clostridium
15	+	2	Aerobácter Clostridium
16	+	2	Actinomyces

(1) La identificación se ha realizado según el Bergey (14).

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en nuestro trabajo experimental se concluye que en los suelos ensayados (situados en la vega de Granada), apenas se encuentran bacterias sulfatoreductoras, por lo que la pérdida de azufre en forma de ión sulfato ocasionada por dichas bacterias, es prácticamente nula. Estos resultados concuerdan grandemente con los publicados por STARKEY (16). También se demuestra que el fenómeno de la sulfidricación es muy intenso en este tipo de suelos.

Los géneros bacterianos en los que se encuentran los gérmenes aislados se indican en la tabla II.

RESUMEN

En este trabajo se indican medios de cultivo y de conservación, así como técnicas de aislamiento e identificación, de gérmenes sulfatoreductores ya sea su habitat el suelo, el agua dulce o el mar.

Se exponen los resultados obtenidos en la investigación de este tipo de gérmenes en 16 muestras de suelo dedicados al cultivo de gramíneas (trigo y cebada) en la provincia de Granada, así como los grupos de gérmenes que más frecuentemente se presentan en esta clase de tierras. Se concluye que el número de gérmenes sulfatoreductores en el tipo de suelos ensayados es prácticamente nulo. Por el contrario el fenómeno de la sulfidricación es muy intenso.

SUMMARY

Culture and conservation media and the techniques for the isolation and identification of the bacteria which reduce the sulfur isolated from the soil, fresh water and sea water are described in this paper.

The results obtained from the investigation of this kind of bacteria in 16 samples of soils used the cultivation of graminea (wheat and barley) in the province of Granada are shown.

It is concluded that these bacteria are practically not present in the types of soil studied. On the contrary the phenomenon of sulfidrication is very intense.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—MURRAY, SIR, J. and R. IRVINE (1895).—On the chemical changes which take place in the composition of the seawater associated with blue muds on the floor of ocean. *Trans Roy. Soc. Edinburgh* 37, 481-508.
- 2.—J. SENEZ (1962).—"Role écologique des bacteries sulfato-reductrices" *Publ. Staz, zool. Napoli* 32 Suppl.
- 3.—BELJERINCK, M. W., (1895).—"Ueber Spirillum desulfuricans als Ursache von Sulfatereduction. *Zemtr. Bakteriologie, Parasitenkunde, Abt II* 1, 1-19, 49-59, 104-114.
- 4.—DELLEN, A. van, (1904).—"Beitrag Kenntniss der Sulfatreduktion durch Bakteriologie, Parasitenkunde, Abt II 11, 81-94 y 113-119.
- 5.—ISSATCHENKO, B. (1924).—"Sur la fermentation sulfidrique de la Mar Negra. *Compt rend.* 178, 2.204-2.206.

- 6.—ZOBELL, C. E., and S. C. RITTENBERG (1948).—"Sulfate reducing bacteria in marine sediments. J. Marine Research Sears Foundation 7 602-617.
- 7.—CAMPBELL, L. L. and POSTGATE, J. R. (1965).—"Bact Rev 29, 359.
- 8.—POSTGATE, J. R., and CAMPBELL, L. L. (1966).—"Bact. Rev. 30.
- 9.—POSTGATE, J. R. (1966).—"Laboratory Practice" Vol. 15, n.º 11 pág. 1.239-1.244.
- 10.—PREVOT, A. R. "Techniques pour le diagnostic des bacteries anaerobies". 2.^a edición. Editions de la Tourelle. (Paris).
- 11.—BILLY, C. (1966).—"Etude sur l'alginolyse bacterienne en Milieu Marin". Ann. Inst. Pasteur. 110, pp. 591-602.
- 12.—F. E. IX edición (1954) pág. 89, Editorial Estades. Madrid.
- 13.—ZAPATERO, E.; GRACIAN, M. (1941).—"Manual de técnica Bacteriológica". Imprenta Castellana. Valladolid.
- 14.—BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D. and colab. (1957).—"Bergey's Manual of determinative bacteriology. Seventh Edition. The Willians-Wilkins Company.
- 15.—MILLER, J. D. A. and SALEH, A. M. (1964).—"J. Gen. Microbiol, 37, 419.
- 16.—STARKEY, R. L. (1950).—"Relation of microorganism to transformations of sulfur in soils. Soil. Sci. 70, 55-65.