



# *Las bacterias reductoras de sulfato en algunos suelos inundados del Distrito Mara del Estado Zulia.\**

L.J. FERNANDEZ C., P. GONZALEZ H., MARITZA GONZALEZ M. Y  
J.H. BERTI M.\*\*

## RESUMEN

De suelos inundados de Puerto Caballo, Estado Zulia, se aisló una bacteria reductora de sulfato que fué provisionalmente identificada como del género *Desulfotomaculum*. Se ensayaron diferentes medios y condiciones de anaerobiosis, describiéndose un medio líquido, óptimo para el aislamiento de bacterias reductoras de sulfato.

## ABSTRACT

A sulfate-reducing bacterium was isolated from flooded soils of Puerto Caballo, Estado Zulia. It was tentatively identified as belonging to the genus *Desulfotomaculum*. Several media and anaerobic conditions were tested. A liquid medium, optimum for isolating sulfate reducing bacteria is described.

## INTRODUCCION

El azufre presente en los suelos, sea en forma orgánica o inorgánica, tiene gran importancia ya que entra a formar parte de la composición química de las células vegetales. Las transformaciones que sufre este elemento en el suelo obedecen fundamentalmente a la acción de microorganismos. Así como existen bacterias que logran la transformación del azufre elemental a

---

\* Recibido para su publicación el 25-10-68.

\*\* Alumnos de Cuarto Año, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Apartado 606, Maracaibo, Venezuela.

formas oxidadas, principalmente sulfatos, igualmente existen en los suelos bacterias que son capaces de transformar los sulfatos a formas no utilizables por las plantas, tales como los sulfuros. Entre las bacterias capaces de realizar este proceso de reducción se encuentran las de los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*. Estas bacterias, las cuales son uno de los principales responsables por la reducción de sulfato, requieren para su crecimiento unas condiciones anaeróbicas bastantes exigentes (7). La iniciación del proceso de reducción tiene lugar a un bajo potencial de oxidación-reducción (alrededor de  $-200$  milivoltios). Esta situación de bajo potencial redox se presenta en suelos cultivados bajo condiciones de inundación. Takai y Kamura, citados en la referencia anterior, reportan que la reducción de sulfato a sulfuro en suelos inundados tiene lugar a potenciales redox que varían desde 0 a  $-190$  milivoltios. Es decir, que en suelos cultivados bajo condiciones de inundación, tal como se hace en el cultivo del arroz, las condiciones son óptimas para el crecimiento de bacterias reductoras de sulfato, con la consiguiente disminución de esta forma de azufre asimilable en el suelo.

Probablemente existen en Venezuela zonas que presentan deficiencias en azufre asimilable por las plantas, principalmente sulfatos, debido en parte, a que estas bacterias han transformado el sulfato en sulfuro.

El presente trabajo fué realizado con el objeto de comprobar en los suelos bajo condiciones de anaerobiosis (inundación) la presencia de bacterias reductoras de sulfatos y realizar la identificación de las mismas.

## MATERIALES Y METODOS

### Toma de muestras

Se tomaron muestras de suelos inundados de Puerto Caballo, Estado Zulia. También se tomaron muestras de agua para la determinación de cloruros, ya que determinadas bacterias reductoras de sulfatos requieren cloruro sódico para su desarrollo. La concentración de NaCl en el agua fue de 6.55 gr/l (6.550 p.p.m.).

### Medios de cultivo

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

Medio N (2) (g/l): Mg  $\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,06; Na. citrato.  $2\text{H}_2\text{O}$ , 0,30;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,06;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5; NaCl, 1,00;  $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ , 7,00; Extracto de levadura, 1,00; Na. Lactato, 4,00; Fe  $(\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,01.

Medio C (2) (g/l):  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 5,90; ácido láctico, 4,10;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1,00;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 0,83; Fe citrato.  $5\text{H}_2\text{O}$ , 1,90;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1,65;  $\text{CaCl}_2$ , 0,045.

Estos medios de cultivo fueron a su vez modificados con el objeto de lograr un medio adecuado para el desarrollo de las bacterias estudiadas. A con-

tinuación se incluyen las modificaciones efectuadas y el procedimiento de preparación.

**Modificaciones:** a) El medio N se modificó añadiendo  $\text{Na}_2\text{S}$  a una concentración final de 1 milimolar (Medio N modificado); b) El medio C se modificó del modo siguiente (medio C modificado) (1) (g/l).  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 5,90; Na lactato, 4,00;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1,00;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 0,83; Na citrato  $2\text{H}_2\text{O}$ , 0,30;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1,65;  $\text{CaCl}_2$ , 0,045;  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,01; c) Tanto al medio C como al medio C modificado se les agregó cloruro sódico a una concentración final de 1 gr/l, y en algunos experimentos se usó 2.5 gr/l (para referencia véase la Tabla 1). d) El medio N a su vez fue modificado al sustituir el  $\text{Na}_2\text{S}$  por ascorbato sódico (concentración final: 0,5 mM) o tioglicolato sódico (concentración final: 1 mM); e) En todos los medios líquidos se utilizó sulfito de sodio (1 mM) en lugar de sulfuro de sodio. El sulfuro, ascorbato y el tioglicolato se emplearon para conseguir condiciones reductoras en el medio (2). El cloruro sódico se añadió ya que existen bacterias reductoras de sulfatos que requieren cloruros para crecer (2). El sulfito de sodio se usó para inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes (2). La levadura se añadió como fuente de vitaminas, el lactato como fuente de carbono y el sulfato como fuente de azufre (que sería reducido). Todos los medios utilizados se ajustaron a pH 7,5 y se trabajó a 26°C de temperatura.

### **Preparación de las diluciones de muestras**

Se prepararon diluciones desde 1:10 hasta 1:10<sup>7</sup> en agua estéril ya que se consideró que la población microbiana era tan grande que a estas diluciones, además de propiciar un buen crecimiento, nos permitiría un conteo de la población.

### **Inoculación**

a) Medio sólido: Teniendo el medio esterilizado se colocó 1 ml de cada dilución en cada placa y a continuación se añadió el medio líquido esterilizado a una temperatura de 45°C aproximadamente. Se inocularon tres placas por muestra y un total de 27 placas por medio de cultivo.

b) Medio líquido: Sin esterilizar el medio, se colocó éste en tubos de ensayo y se procedió a inocular con 1 ml de cada dilución.

### **Anaerobiosis**

Para conseguir la anaerobiosis se emplearon los siguientes métodos: a) Se conectó un desecador a una bomba de vacío, para producir la extracción del aire contenido en el desecador; b) Usando el método anterior, pero luego de producido el vacío, se llenó el desecador con gas nitrógeno comercial; c) En un desecador se colocó un envase conteniendo carbonato de sodio, añadiéndose por medio de un tubo fino, gota a gota, ácido sulfúrico concentrado, de manera que el anhídrido carbónico desprendido en la reacción reemplazara al aire en el desecador; d) En un desecador se colocó una pequeña cantidad de fósforo que al arder produjera la eliminación del oxígeno

contenido en el desecador; e) En un desecador se colocó un envase conteniendo pirogalol y otro conteniendo hidróxido de sodio y carbonato potásico. Se mezclaron de manera que el pirogalol reaccionara rápidamente con la mezcla y consumiera todo el oxígeno presente en el desecador. Se utilizó una relación pirogalol (15% peso/vol) - hidróxido sódico (10% peso/vol) de 1:10; f) Se utilizó el método de Butlin (2) con tubos de ensayo llenos hasta 3 cm del borde con medio líquido sin esterilizar y tapados con algodón impregnado de pirogalol alcalino.

### Indicador de anaerobiosis

Para comprobar si las condiciones de cultivo eran completamente anaeróbicas se usó el indicador recomendado por la Sociedad Americana de Bacteriólogos (6), pero usando el doble de la concentración de hidróxido de sodio recomendada en el método.

### Métodos de trabajo

Los medios utilizados y las condiciones de trabajo están indicados en la Tabla 1.

## RESULTADOS

Se obtuvieron los siguientes resultados (con referencia a la Tabla 1). A. Operando con el método 1 se comprobó lo siguiente: a) se desarrollaron innumerables colonias de bacterias aeróbicas; b) no se desarrollaron bacterias anaeróbicas; c) después de perfeccionar el método de anaerobiosis utilizado; no se desarrollaron bacterias de ningún tipo. B. Operando con los métodos 3 y 4 no apareció crecimiento bacteriano. C. Operando con el método 5 se comprobó lo siguiente: a) no crecieron bacterias anaeróbicas, b) crecieron algunas bacterias aeróbicas. D. Operando con el método 6 se comprobó lo siguiente: a) no crecieron bacterias anaeróbicas; b) crecieron bacterias aeróbicas (pero después de 2 semanas), las cuales se aislaron para un estudio posterior. E. Operando con los métodos donde la consistencia del medio era líquida, se obtuvo lo siguiente: a) buen crecimiento de bacterias anaeróbicas; b) no se desarrollaron bacterias aeróbicas. F. Los mejores crecimientos se observaron empleando el método 16. G. Las características de las bacterias anaeróbicas aisladas fueron:

- a) Bacilos de 2 a 5 micras de largo, curvos y finos.
- b) Gran negativos.
- c) Forman esporas.
- d) Crecen en el fondo de los tubos.
- e) Producen un precipitado de color negro intenso.
- f) Desprenden gas  $\text{SH}_2$  como consecuencia de la reducción de sulfatos.

TABLA N° 1

Métodos de Trabajo Usados en el Cultivo de Bacterias Reductoras de Sulfato<sup>a</sup>

Método	Medio	Consistencia	Esterilización	Anaerobiosis <sup>b</sup>	CINa	Sulfito	Placas o tubos
1	C	Sólido	Sí	a	No	No	placas
2	C mod.	Sólido	Sí	a	No	No	placas
3	C	Sólido	Sí	d	No	No	placas
4	C mod.	Sólido	Sí	e	No	No	placas
5	C	Sólido	No	c	No	No	placas
6	N	Sólido	No	c	Sí	No	placas
7	C	Líquido	No	f	Sí	No	tubos
8	C	Líquido	No.	f	Sí	Sí	tubos
9	C	Líquido	No	f	No	No	tubos
10	C	Líquido	No	f	No	Sí	tubos
11	C mod.	Líquido	No	f	Sí	No	tubos
12	C mod.	Líquido	No	f	Sí	Sí	tubos
13	C mod.	Líquido	No	f	No	No	tubos
14	C mod.	Líquido	No	f	No	Sí	tubos
15	N	Líquido	No	f	Sí	No	tubos
16	N	Líquido	No	f	Sí	Sí	tubos
17	N	Líquido	No	f	No	No	tubos
18	N	Líquido	No	f	No	Sí	tubos
19	N mod.	Líquido	No	f	Sí	No	tubos
20	N mod.	Líquido	No	f	Sí	Sí	tubos
21	N mod.	Líquido	No	f	No	No	tubos
22	N mod.	Líquido	No	f	No	Sí	tubos

<sup>a</sup> En todos los métodos el pH se ajustó a 7.5 y se trabajó a una temperatura de 26°C.

<sup>b</sup> Las letras se refieren al método de anaerobiosis usado (ver MATERIALES y METODOS).

## DISCUSION

**Resultado A.** Al intentar el aislamiento de bacterias reductoras de sulfato, utilizando el método de anaerobiosis a), se tropezó con la dificultad de evitar la entrada de aire al desecador donde estaban colocadas las placas inoculadas, por lo que se observó la aparición de bacterias aeróbicas. Cuando se logró evitar la entrada de aire al desecador, se observó que no crecieron bacterias de ningún tipo, debido probablemente a la falta de anhídrido carbónico en el desecador o a que la anaerobiosis no fué total.

**Resultado B.** Los métodos de trabajo 3 y 4 no resultaron efectivos debido a la imposibilidad de lograr anaerobiosis con el equipo disponible. Es difícil bajo las condiciones de trabajo usadas estimar que cantidad de oxígeno consume una determinada cantidad de pirogalol alcalino, por lo cual con este método no se puede asegurar si las condiciones son anaeróbicas.

**Resultado C.** Se observaron bacterias aeróbicas debido a que el método 3 de anaerobiosis no fué efectivo. No crecieron bacterias anaeróbicas.

**Resultado D.** Se concluyó que el desarrollo de bacterias aeróbicas era debido a que la anaerobiosis no era total. Estas bacterias aeróbicas se aislaron para un estudio posterior. No se desarrollaron bacterias anaeróbicas.

Entre las posibles causas de la ausencia de crecimiento de bacterias anaeróbicas, utilizando los medios de trabajo donde la consistencia del medio fué sólida se pueden mencionar. a) La dificultad de lograr condiciones de anaerobiosis efectivas; b) El medio sólido no es el más apropiado para obtener un cultivo puro dadas las complicadas condiciones de aislamiento; c) Aún cuando se logre la anaerobiosis, las bacterias requieren anhídrido carbónico.

**Resultado E.** El éxito obtenido utilizando los métodos de trabajo donde la consistencia del medio fué líquida, puede obedecer a algunas de las siguientes causas: a) Empleo de un medio líquido donde se dan condiciones de desarrollo similares a las del sitio de donde fueron tomadas las muestras; b) Mediante estos métodos se logra una anaerobiosis total, lo que impide el desarrollo de bacterias aeróbicas.

**Resultado F.** El método 16 resultó ser el más adecuado para el desarrollo de estas bacterias.

## CONCLUSIONES

- 1) Para lograr un buen crecimiento de bacterias sulfato-reductoras se recomienda utilizar el método de trabajo No. 16 (Ver Tabla 1).
- 2) Las bacterias sulfato-reductoras aisladas de suelos inundados de Puerto Caballo pertenecen probablemente al género *Desulfotomaculum*. No se realizó la identificación de la especie.
- 3) Con escasez de medios no se recomienda intentar el aislamiento de bacterias de este tipo utilizando medios sólidos.

4) El crecimiento de estas bacterias es óptimo cuando la concentración de cloruro de sodio es similar a la del medio de donde se toman las muestras, pero este compuesto no es necesario para el crecimiento de las bacterias.

#### LITERATURA CITADA

1. BAKER, F D.; PAPISKA, H.R. and CAMPBELL, L.L. Choline fermentation by *Desulfovibrio desulfuricans*. *J. Bacteriol.* 84: 973-978. 1963.
2. BUTLIN, K.R., M.E. ADAMS, and THOMAS HALL. The isolation and cultivation of sulphate-reducing bacteria. *J. Gen. Microbial* 3: 46-59. 1957.
3. GARASSINI, LUIS A. Suelo y su microflora. Universidad Central de Venezuela. Maracay. 1962.
4. GARASSINI, LUIS A. Microbiología. Universidad Central de Venezuela. Caracas. Pág. 152-161. 1958.
5. SANCHEZ MARROQUIN, ALFREDO. Microbiología Agrícola. Escuela Nacional de Agricultura. Chapingo, México. 1964.
6. SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. *Manual of Microbiological Methods*, Mc Graw-Hill, New York. 1957.
7. CONNELL, W.E. and PATRICK, W.H. Sulfate Reduction in Soil: Effects of Redox Potential and pH. *Science* 159: 86-87. 1968.