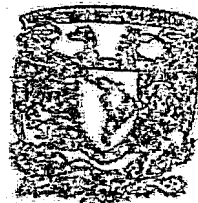


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



TRABAJO MONOGRAFICO

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

**Recopilación de Métodos y Medios de Cultivo para el
Aislamiento, Cuantificación y Determinación de la
Actividad Bioquímica de los Microorganismos
del Ciclo del Azufre**

FRANCISCO AVILA TOSCANO

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

OBJETIVO	1
1.- INTRODUCCION	2
2.- GENERALIDADES	6
3.- CARACTERISTICAS Y POSICION TAXONOMICA DE LAS BACTERIAS SULFUROSAS	15
4.- AISLAMIENTO Y CUANTIFICACION	37
4.1 Bacterias Químico Autotróficas	37
4.2 Bacterias Sulfurosas Incoloras	47
4.3 Bacterias Sulfurosas Fotosintéticas	50
4.4 Microorganismos Heterótrofos Oxidantes del azufre	52
4.5 Microorganismos Reductores de Sulfatos.	53
4.6 Método de Enriquecimiento de la Población de Microorganismos Oxidantes y Reductores del Azufre	63
5.- EVALUACION DE LA ACTIVIDAD BIOQUIMICA	65
6.- METODOS ANALITICOS	91
7.- MEDIOS DE CULTIVO	106
8.- CONCLUSIONES	124
9.- BIBLIOGRAFIA	128

OBJETIVO

El trabajo aquí presente tiene como objetivo el de proveer información y material bibliográfico a todas -- aquellas personas interesadas en el estudio o en la investigación de algunos aspectos del ciclo del azufre.

Cabe hacer la aclaración que lo que se presenta en este trabajo son solamente técnicas que pueden ayudar al investigador en la realización de proyectos cuya finalidad sea el estudio de los microorganismos del ciclo del azufre, su interrelación entre ellos, con el medio ambiente y con el cuerpo natural tan complejo como lo es el suelo. Por ello el uso que se le de a estas técnicas así como la interpretación de los resultados que se obtengan, dependerá únicamente del investigador en turno.

I.- INTRODUCCION

El ciclo del azufre es un ciclo biogeoquímico de gran importancia si tenemos en cuenta que es un nutriente esencial para las plantas y el reino animal.

El azufre es necesario en la producción agrícola ya que es esencial para ciertas funciones de las plantas -- tales como:

1.- La síntesis de algunos aminoácidos como la cistina y metionina, y por ende para la elaboración de proteína.

2.- La activación de ciertas enzimas proteolíticas, como las papaínas.

3.- La síntesis de ciertas vitaminas, glutatión y la coenzima A.

4.- La formación de los aceites glucósidos que se encuentran en la cebolla, el ajo y plantas crucíferas.

5.- La formación de enlaces disulfuro que han sido asociados con las características estructurales del protoplasma.

6.- En algunas especies la concentración de los grupos sulfhidrilo (-SH) en los tejidos de la planta está relacionada con el incremento de la resistencia al frío.

Por otra parte es conveniente señalar que además de los aspectos antes señalados, algunos de los productos formados en las transformaciones del ciclo del azufre -- tienen repercusión en una gran variedad de fenómenos económicos entre los que se pueden mencionar la corrosión de los metales, la mampostería y el hule, la formación y lixiviación de minas, alteración de aceites comestibles y otros alimentos, además de causar problemas en el agua.

El azufre en el suelo está sujeto a muchos cambios químicos y la diversidad de reacciones es posible debido a que el azufre aparece en varios estados de oxidación. (como sulfato, +6; sulfito, +4; tiosulfato, +2; azufre elemental, 0; bisulfuro, -1 y sulfuro, -2).

En muchas de las transformaciones del azufre están involucrados diversos tipos de microorganismos, los que actúan bajo condiciones diferentes, dando consecuentemente productos diferentes. La detección, la cuantificación y el estudio de su actividad bioquímica en condiciones naturales y artificiales presentan una serie de dificultades, por ejemplo:

- a) Es necesario emplear una serie de medios de cultivo selectivos para cada uno de los grupos metabólicos.
- b) Un medio selectivo para un tipo particular de bacterias no es necesariamente el que promueve el desarrollo óptimo de estos microorganismos.
- c) Los medios artificiales permiten detectar a un grupo microbiano en un sustrato pero de ninguna manera la actividad real que desarrollan sobre el sustrato bajo condiciones naturales.

Por lo que el propósito de este trabajo es la recopilación de métodos y medios de cultivo empleados para -

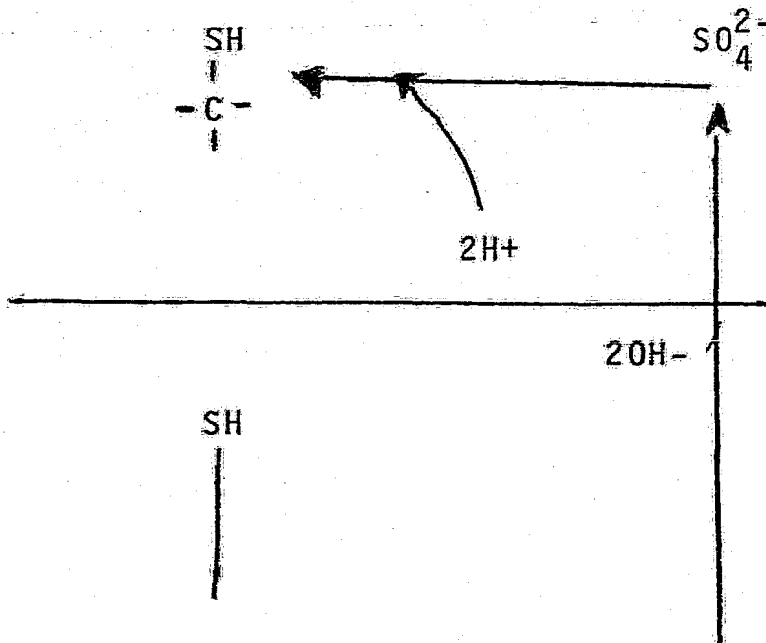
detectar, cuantificar, cultivar y estudiar la actividad bioquímica de algunos microorganismos del ciclo del azure.

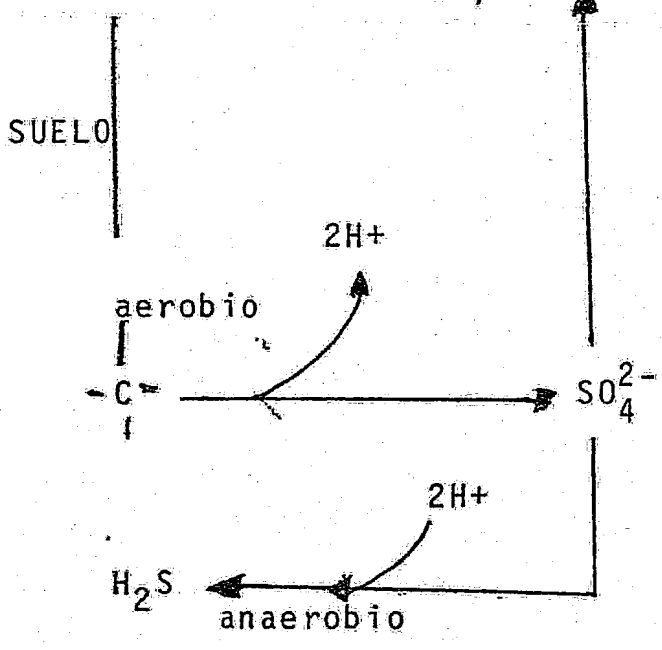
II.- GENERALIDADES

Las transformaciones microbianas del azufre pueden ser agrupadas en cuatro categorías:

- 1.- Asimilación del azufre.
- 2.- Descomposición de los compuestos orgánicos del azufre.
- 3.- Oxidación del azufre y compuestos inorgánicos del azufre.
- 4.- Reducción del azufre y de compuestos inorgánicos no completamente oxidados de azufre.

PLANTA

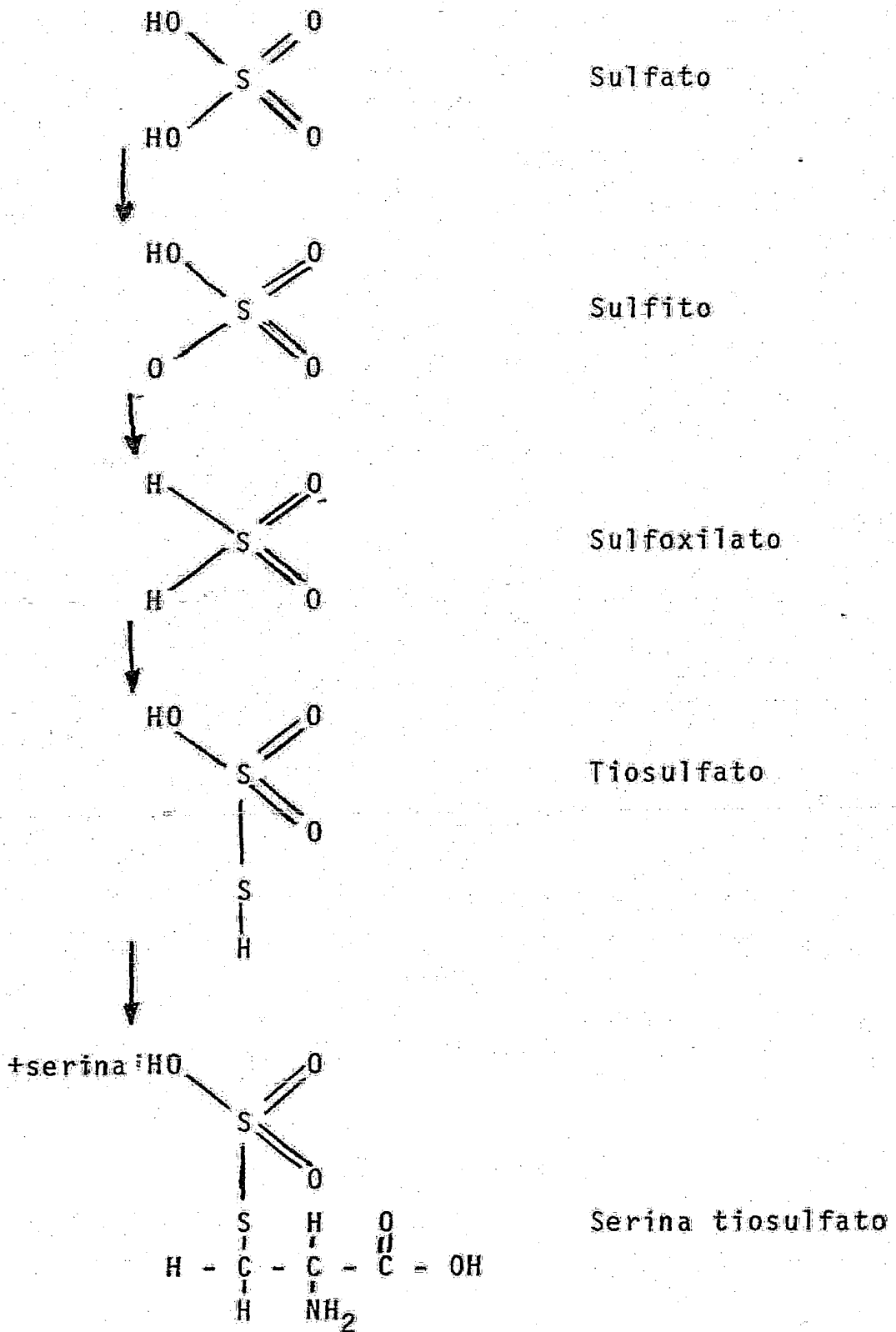


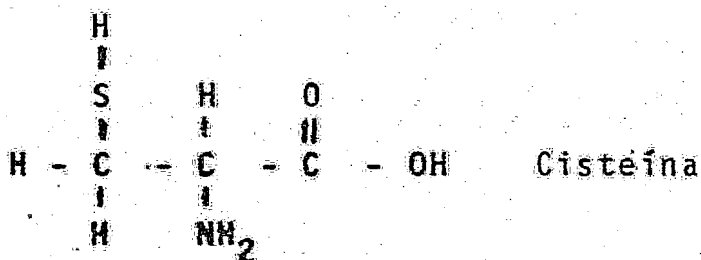


Ciclo del azufre.- Mostrando la formación o consumo de ácido por los varios procesos en la planta y el suelo.

ASIMILACION DEL AZUFRE.- Es efectuada por todos los organismos, muchos microorganismos lo toman como sulfatos, otros requieren de productos preformados que lo contengan como aminoácido o vitaminas.

El mecanismo de conversión de sulfatos a aminoácidos es conocido con Hockenhull en estudios realizados con Aspergillus nidulans, quien postuló los siguientes cambios:

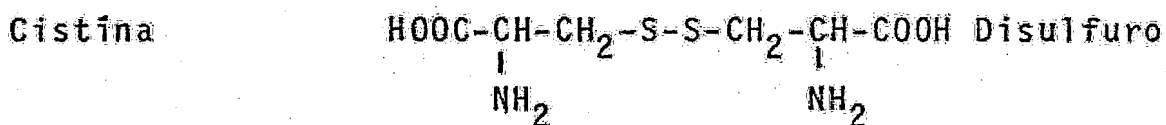
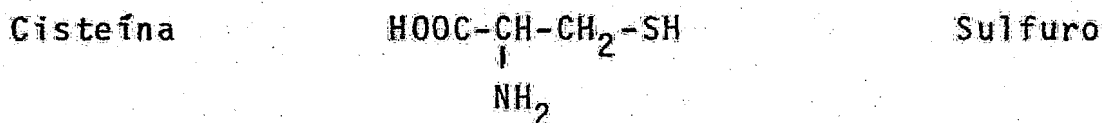




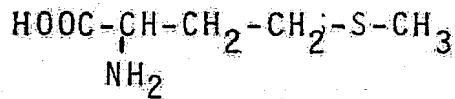
Esquema de reducción del sulfato en la asimilación por Aspergillus nidulans.

Como quiera Roberts, Abelson y otros establecieron que las células contienen 1.12% de azufre en base seca - y que el 95% de éste se encuentra en la cistina, cisteína y metionina.

Otros compuestos orgánicos que contienen azufre se exponen en la tabla 1:

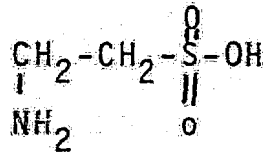


Metionina



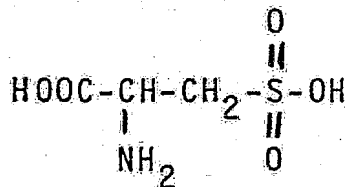
Tioeter

Taurina



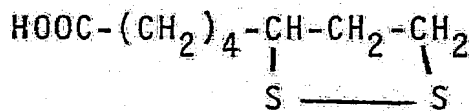
Acido Sulfônico

Acido Cisteico



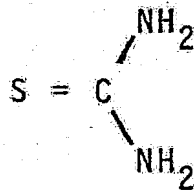
Acido Sulfônico

Acido Lipoico



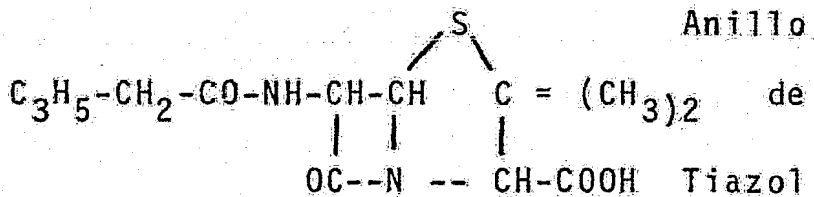
Disulfuro

Tiourea



Carbamida

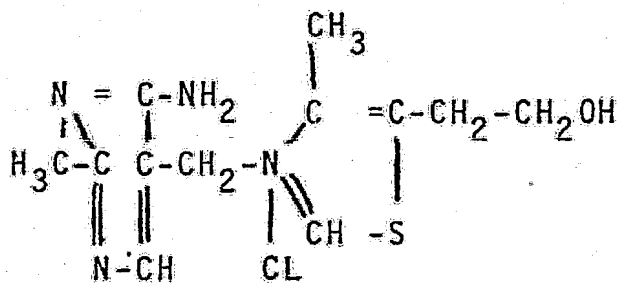
Penicilina G



Anillo

Tiazol

Tiamina

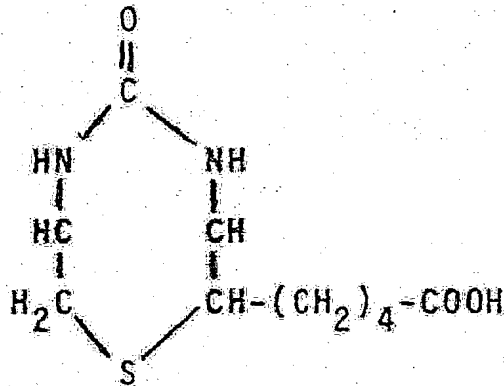


Anillo

de

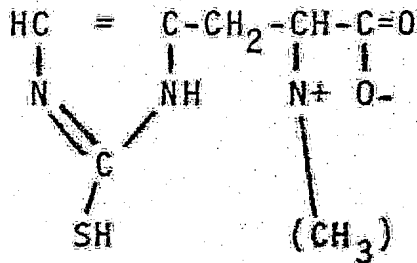
Tiazol

Biotina



Anillo de Tiofeno

Ergotionina



Hidrosulfuro

DESCOMPOSICIÓN DE COMPUESTOS ORGANICOS AZUFRADOS.- Los productos formados en el rompimiento de los compuestos orgánicos azufrados varían en relación con el tipo de compuesto y microorganismo así como de las condiciones ambientales.

Varios investigadores reportan que Achromobacter Cystinovorum produce azufre elemental como único producto azufrado en la descomposición aeróbica de la cistina en tanto que diversos hongos bajo las mismas condiciones producen sulfatos.

Aspergillus niger produce sulfato en la transformación aeróbica de cisteína, taurina y metionina; y en la descomposición de la lana por Microsporium gypseum se ha reportado la producción de cistina, la que es transformada a sulfato de la manera siguiente:

Cisteína -- Cistina -- sulfenato -- Sulfinato -- Sulfito -- Sulfato.

Bajo condiciones anaeróbicas se ha observado la formación de mercaptanos de la descomposición de metionina por Clostridium tetanomorphum, Scopulariopsis brevicaulis, Microsporium gypseum y Aspergillus niger.

Se ha demostrado que varias especies de Saccharomyces (levaduras del vino) pueden producir sulfato o sulfito en cultivos que contienen cisteína, metionina o sulfato. OXIDACION DE COMPUESTOS INORGANICOS SULFUROSOS.

El grupo más numeroso de microorganismos que utilizan el azufre inorgánico es el de las bacterias, aunque se ha encontrado que algunos hongos y actinomicetos pueden también oxidar formas reducidas del azufre in vitro. Se sabe que Penicillium decumbens es capaz de oxidar el

azufre elemental a tiosulfato en un medio con sacarosa - como fuente de carbono.

Wainwright (1978) aisló hongos que oxidan el azufre a partir de hojas y desechos contaminados tales como: Alternaria tenuis, Aureobasidium pullulans, Cephalosporium sp. y Epicoccum nigrum; y de los suelos aisló especies de Penicillium.

Las bacterias del azufre son un grupo heterogéneo - de microbios los cuales tienen en común el hecho de que los compuestos de azufre inorgánico tienen gran importancia en su metabolismo. Para propósitos prácticos, las bacterias oxidativas del azufre se agrupan convenientemente dentro de tres subgrupos:

- a) Las bacterias del azufre quimioautotróficas y fotosintéticas tales como Thiobacillus y Chromatium.
- b) Las bacterias de azufre incoloras tales como Beggiatoa.
- c) Las bacterias heterótrofas que oxidan el azufre como Arthrobacter sp., Bacillus sp., Flavobacterium sp., y Pseudomonas sp.

REDUCCION DEL SULFATO Y OTROS COMPUESTOS INORGANICOS ---
SULFUROSOS.

Las bacterias que reducen el sulfato se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente y tienen la característica particular de que al reducir el sulfato a sulfuro de hidrógeno, éste reacciona con el hierro y/o el manganeso formando precipitados negros, como ---- ejemplo se tiene a Desulfoyibrio y Desulfotomaculum.

III.- CARACTERISTICAS Y POSICION TAXONOMICA DE LAS BACTERIAS SULFUROSAS.

Las bacterias llamadas sulfurosas o del azufre constituyen un grupo muy heterogéneo y comprende a los siguientes subgrupos:

I.- La familia Thiobacteriaceae, en la cual se encuentra el género Thiobacillus. Los miembros de este género son gram negativos, no esporulados, de forma bacilar, miden de 0.5 por 1-3 micras. Oxidan el azufre y/o el tiosulfato a ácido sulfúrico y utilizan la energía de este proceso para su crecimiento autótrofo obligado o facultativo. A excepción de Thiobacillus novellus son polarmente flagelados e incapaces de utilizar cualquier compuesto orgánico. Dentro del género Thiobacillus se encuentran las siguientes especies:

T. thiooxidans, que al igual que T. concretivorius es aerobio, acidofílico, autótrofo que oxida el azufre y/o el tiosulfato y que no metaboliza compuestos inorgánicos de hierro, tiocianato o nitratos. T. thiooxidans crece mejor a un pH inferior a 5; aparte de su habitat ácido--

esta bacteria es primariamente distinguida por su habilidad para oxidar el azufre elemental a una velocidad comparable a la de la oxidación de tiosulfato, en contraste con T. thioparus y T. denitrificans las cuales oxidan el azufre más lentamente.

T. thioparus, es una bacteria estrictamente aerobia que crece rápidamente en medios minerales que contengan tiosulfato y con frecuencia deposita grandes cantidades de azufre molecular. Estos depósitos de azufre en cultivos con agar le dan a las colonias un color blanco-lechoso - a amarillo canario. Las especies aisladas del mar son generalmente más móviles y crecen más rápidamente que las aisladas en agua dulce.

T. denitrificans, semejante a T. thioparus, y difiere de esta última únicamente en su habilidad para usar el nitrato como aceptor terminal de electrones en la respiración bajo condiciones anaerobias. T. denitrificans puede también crecer con aereación en la ausencia de nitrato - pero rápidamente pierde su habilidad desnitrificante en subcultivos aerobios; de ahí que esta bacteria cultivada

aeróbicamente se hace indistinguible de T. thioparus. T. ferroxidans y Ferrobacillus ferrooxidans, autótrofos acidófilicos los cuales metabolizan el azufre, tiosulfato e iones de hierro, pero no tiocianatos y nitratos. T. ferroxidans es morfológicamente idéntico a T. thiooxidans y T. thioparus y es favorecido, por el mismo valor de pH -- que T. thiooxidans, puede diferenciarse de este último -- por su inhabilidad para oxidar el azufre elemental rápidamente. T. ferroxidans difiere de todos los otros Thiobacillus conocidos, en su habilidad de usar iones Fe^{++} -- en lugar de tiosulfato como donadores de electrones. Subcultivos repetidos de T. ferroxidans en un medio que -- contenga hierro dan como resultado una pérdida en su habilidad para oxidar el tiosulfato, no obstante las células que crecen con tiosulfato son todavía capaces de oxidar sales de hierro. El autótrofo obligado F. ferroxidans es morfológicamente indistinguible de T. thiooxidans, su pH óptimo de crecimiento es también alrededor -- de 3.5, pero el ión fierro es su único sustrato oxidable.

T. thiocyanoxidans, el cual hidroliza el tiocianato a -- cianato y sulfuro, seguida de una oxidación de sulfuro --

a sulfato, el cianato es hidrolizado a amonio y dióxido de carbono y parte de éste último es asimilado durante el crecimiento. Las células que crecen en tiosulfato oxidan el tiocianato lentamente, mientras que las células que crecen en tiocianato rápidamente consumen el tiosulfato.

2.- La familia Thiorhodaceae con los géneros siguientes:

a) Chromatium, con las siguientes especies:

Chromatium okenii, microorganismo gram negativo, móvil - no esporulado, con glóbulos de azufre desparramados en su citoplasma rojo-púrpura.

Fisiología: anaerobio estricto. Fotótrofo obligado en presencia de SH_2 ; pH óptimo de 6.5 a 7.6; temperatura -- óptima de 25-30°C.

Cultivo: Fuente de nitrógeno: sales de amoníaco. Donador de electrones en la fotosíntesis: sulfuro; en presencia de sulfuro y de bicarbonato, el acetato y el piruvato son fotoasimilables.

Chromatium warmingii, gram negativo, móvil, no esporulado con glóbulos de azufre intracitoplásmicos y con un color gris rosa a violeta púrpura.

Fisiología: Anaerobio estricto. Fotótrofo obligado, pH óptimo 6.5 a 7.6; temperatura óptima de 25 a 30°C.

Cultivo: El acetato y el piruvato son fotoasimilables -- en presencia de sulfuro y bicarbonato. Fuente de nitrógeno: sales de amoníaco y urea.

Chromatium buderi, móvil, con glóbulos de azufre intracitoplásmicos y con un pigmento gris amarillento a violeta púrpura.

Fisiología: Anaerobio estricto, fotótrofo obligado, pH óptimo de 6.5 a 7.6; temperatura óptima de 25 a 30°C. Halófilo obligado (1 a 3% P/V); requiere de vitamina B₁₂.

Cultivo: Donador de electrones; sulfuro. El acetato y el piruvato son fotoasimilables en presencia de azufre y bicarbonato. Fuente de nitrógeno: sales de amoníaco.

Chromatium minus, gram negativo, móvil, no esporulado, - con glóbulos de azufre intracitoplásmicos y con un pigmento rosa a rojo púrpura.

Fisiología: Anaerobio estricto. Fotótrofo obligado. pH óptimo de 6.5 a 7.6; temperatura óptima de 25 a 30°C. Catalasa +, hidrogenasa +.

Cultivo: Donador de electrones: sulfuro, azufre y tiosulfato. El acetato, el piruvato y la glucosa son fotoasimilables en presencia de sulfuro y bicarbonato. Fuente de N; sales de amonio.

Chromatium vinosum, gram negativo, móvil, no esporulado y con un pigmento café naranja a café rojizo.

Fisiología: Anaerobio, fotótrofo obligado. pH óptimo de 6.5 a 7.6; temperatura óptima de 25 a 30°C.

Cultivo: Donadores de electrones; sulfuro, tiosulfato, azufre, sulfito y H₂. Acetato piruvato y ácidos tricarbóxicos fotoasimilables. Algunos utilizan glucosa, ---

fructuosa. Fuente de N: sales de amonio, urea y nitratos.

Thiocystis gelatinosa, células esféricas con glóbulos de azufre periféricos y un pigmento rojo púrpura.

Fisiología: Anaerobio estricto, fotótrofo obligado. pH óptimo de 6.5 a 7.6; temperatura óptima de 25 a 30°C. Halófilo (exige 1% de NaCl).

Cultivo: Donadores de electrones: sulfuro y azufre. El acetato y el piruvato son fotoasimilables. Fuente de nitrógeno: sales de amonio.

c) Thiosarcina con las siguientes especies:

Thiosarcina rosea (especie única), células redondas, --- gram negativas, no esporuladas, con un pigmento rosa y glóbulos de azufre.

Fisiología: Anaerobio. Fotótrofo obligado en presencia de H₂S.

Cultivo: Donadores de electrones fotosintéticos: sul--

furo y azufre; fuente de N: sales de amonio.

d) Thiospirillum con las siguientes especies:

Thiospirillum anguinéum, células espirales, móviles, no esporuladas, gram negativas, con gránulos de azufre y -- con un pigmento rojo púrpura.

Fisiología: Anaerobio. Fotótrofo obligado en presencia de H_2S . Donador de electrones H_2 .

Cultivo: En un medio mineral donde el NH_4 es la fuente de N y el H_2S es necesario.

Thiospirillum jenense, células cilíndricas espirales, -- gram negativas, no esporuladas con un pigmento café na-- ranja.

Fisiología: Anaerobio. Fotótrofo obligado en presencia de H_2S . Requiere la vitamina B_{12} . pH óptimo de 7 a 7.5; temperatura óptima de 20 a 25°C.

Cultivo: Donadores de electrones: sulfuro y azufre. --

El acetato es fotoasimilable en presencia de sulfuro y bicarbonato.

e) Thiocapsa con las siguientes especies:

Thiocapsa pfennigii, células esféricas u ovoideas inmóviles, no esporuladas, gram negativas, con gránulos de azufre intracitoplásmicos y con un pigmento café-naranja en cultivo líquido.

Fisiología: Anaerobio estricto, fotótrofo obligado. pH óptimo de 6.5 a 7.5; temperatura óptima de 25°C,

Cultivo: Donadores de electrones fotosintéticos; el azufre y el sulfuro. En presencia de sulfuro y de bicarbonato el acetato y el propionato son fotoasimilables.

Fuente de N: sales de amonio.

f) Lamprocystis con las siguientes especies:

Lamprocystis roseopersicina, células redondas, no esporuladas, con gránulos de azufre intracitoplásmicos.

Fisiología: Anaerobio estricto. Fotótrofo obligado. ---

pH óptimo de 6.5 a 7.6; temperatura óptima de 20 a 25°C.

Cultivo: Donadores de electrones: H_2 , sulfuro y azufre. En presencia de sulfuro y de bicarbonato el acetato y el piruvato son fotoasimilables. Fuente de N: sales de amonio.

g) Thiodyction con las siguientes especies:

Thiodyction elegans, bastones inmóviles, no esporulados, gram negativos, con glóbulos de azufre intracelulares y un pigmento gris a violeta púrpura.

Fisiología: Anaerobio estricto, fotótrofo obligado, pH de 6.5 a 7.6; temperatura de 20°C.

Cultivo: Donadores de electrones: sulfuro y azufre. En presencia de sulfuro y bicarbonato, el acetato y el piruvato son fotoasimilables. Fuente de N: sales de amonio.

Thiodyction bacillosum, bastones inmóviles, no esporulados, gram negativos, con glóbulos de azufre intracelulares y un pigmento gris a violeta púrpura.

Fisiología: Anaerobio estricto, fotótrofo obligado. pH de 6.5 a 7.5; temperatura de 20 a 25°C.

Cultivo: Donadores de electrones: sulfuro y azufre. En presencia de sulfuro y bicarbonato el acetato y el piruvato son fotoasimilables. Fuente de N: sales de amonio.

h) Thiopedia con las siguientes especies:

Thiopedia rosea, células esféricas u ovoides inmóviles, no esporuladas, gram negativas, con glóbulos de azufre intracelulares y un pigmento rosa a púrpura.

Fisiología: Anaerobio estricto; fotótrofo obligado. pH de 7.2 a 9; temperatura de 20 a 25°C.

Cultivo: Donadores de electrones; sulfuro y azufre. La cantidad de H₂S tolerable es muy débil. Fuente de N: sales de amonio.

i) Amoebobacter con la siguiente especie:

Amoebobacter pendans, células redondas u ovoides inmóviles, no esporuladas, gram negativas, con glóbulos de a--

zufre, tiosulfato y sulfito. En presencia de sulfuro y bicarbonato el piruvato y la glucosa son fotoasimilables. Fuente de N: sales de amonio.

j) Ectothiorhodospira con las siguientes especies:

Ectothiorhodospira mobilis, bastones gram negativos, no esporulados, con un pigmento amarillo-naranja.

Fisiología: Anaerobio estricto, fotótrofo obligado. pH de 7.5 a 8; temperatura de 25 a 30°C, requiere NaCl y vitamina B₁₂.

Cultivo: Donadores de electrones: sulfuro, azufre, tiosulfato, sulfito y H₂, acetato, piruvato, malato y fructuosa. Fuente de N: sales de amonio.

Ectothiorhodospira halophila, bastones no esporulados, gram negativos con un pigmento rosa a rojizo.

Fisiología: Anaerobio estricto. Fotótrofo obligado, pH de 14 a 22% de NaCl.

Cultivo: Donadores de electrones: sulfuro, azufre, tio-

sulfato, acetato y succinato. Fuente de N: sales de amonio.

3.- La familia Chlorobiaceae, con los géneros siguientes:

a) Chlorobium, con las especies siguientes:

Chlorobium limicola, bastones inmóviles, gram negativos, no esporulados, con gránulos de azufre intracelulares y un pigmento color verde.

Fisiología: Anaerobio estricto, fotótrofo obligado. Requiere vitamina B₁₂. pH de 6 a 7; temperatura 25 a 30°C.

Cultivo: Donadores de electrones: sulfuro y azufre. En presencia de sulfuro y bicarbonato el acetato y el propionato son fotoasimilables. Algunos utilizan el piruvato, fructuosa, glutamato y peptona. Fuente de N: sales de amonio.

Chlorobium vibrioforme, células en forma de vibrio, no esporuladas, gram negativas y con un pigmento verde.

Fisiología: Anaerobio estricto, fotótrofo obligado. ---

Requiere vitamina B₁₂ y 1% de NaCl, pH de 6 a 7.5; temperatura de 25 a 30°C.

Cultivo: Donadores de electrones: sulfuro y azufre. En presencia de sulfuro y de bicarbonato, el acetato y el propionato son fotoasimilables. Fuente de N: sales de amonio.

Chlorobium pheobacteroides, bastones inmóviles, gram negativos, no esporulados con un pigmento amarillento a rojizo o café.

Fisiología: Anaerobio estricto, fotótrofo obligado. Requiere de vitamina B₁₂ y de 1% de NaCl. pH de 6 a 7.5; temperatura de 25 a 30°C.

Cultivo: Donadores de electrones: sulfuro y azufre. En presencia de sulfuro y bicarbonato el acetato y la fructuosa son fotoasimilables. Fuente de N; sales de amonio.

b) Prosthecochloris con las especies siguientes:

Prosthecochloris aestuarii, células redondas u ovoides, gram negativas, no esporuladas, inmóviles, con glóbulos -

de azufre intracelulares y con un pigmento verde,

Fisiología: Anaerobio estricto; fotótrofo obligado. Requiere de vitamina B₁₂. pH de 6,7 a 7; temperatura de 25 a -- 30°C. Requiere de 2 a 5% de NaCl,

Cultivo: Donadores de electrones: azufre y sulfuro, En -- presencia de sulfuro y de CO₂, el acetato es fotoasimilable. Fuente de N; sales de amonio,

c) Chloropseudomonas con la especie siguiente:

Chloropseudomonas ethylica, bastones no esporulados, gram negativos y con un pigmento verde.

Fisiología: Anaeróbico y fotótrofo obligado, pH de 7 a 7.2 temperatura de 25 a 30°C. Requiere una alta concentración de sal (NaCl o MgCl₂ en el habitat),

Cultivo: Donadores de electrones: sulfuro, azufre y compuestos orgánicos de carbono. En presencia de bicarbonato y de trazas de H₂S, el etanol, la glucosa, la maltosa y el piruvato son fotoasimilables. Algunos utilizan tiosulfato, glucósidos, acetato, formato, glicerol, lactato,-

manitol y propanol.

d) *Pelodyction*, con las siguientes especies:

Pelodyction clathratiforme, bastones inmóviles, no esporulados, gram negativos y con un pigmento verde.

Fisiología: Anaerobio estricto; fotótrofo obligado. pH de 6.5 a 7; temperatura de 20 a 25°C.

Cultivos: Donadores de electrones: sulfuro y azufre. En presencia de sulfuro y bicarbonato el acetato es fotoasimilable. Fuente de N; sales de amonio.

Pelodyction leteolum, células ovoides, no esporuladas, -- gram negativas, inmóviles y con un pigmento verde.

Fisiología: Anaerobio estricto. Fotosintético. Donadores de electrones sulfuro y azufre. En presencia de sulfuro y de bicarbonato el acetato y el propionato son fotoasimilables. Fuente de N: sales de amonio.

4.- La familia Vibrionaceae, en la cual se encuentra el género *Desulfovibrio*, con las siguientes especies:

Desulfovibrio desulfuricans, móvil, gram negativo.

Fisiología: Anaerobio estricto; temperatura de 30 a 55°C. Resiste 10 minutos a 70°C. Cultiivos de gran longevidad. - Hidrogenasa+.

Cultivo: Requiere de un medio especial (mineral + sulfato)

Nutrición: Quimioautótrofo. Emplea un gran número de compuestos orgánicos como fuente de hidrógeno del tipo de -- los alcoholes secundarios y terciarios y los ácidos aci--clicos de cadena recta.

Desulfovibrio rubentschicki .

Morfología: Semejante a Desulfovibrio desulfuricans.

Fisiología: Semejante a D. Desulfuricans, salvo el modo - de nutrición.

Nutrición: La diferencia con D. desulfuricans es que el - D. rubentschicki puede utilizar como fuente de hidrógeno a los alcoholes secundarios y terciarios, los glúcidos y los ácidos aciclicos de cadena recta.

Desulfoyibrio vulgaris.

Fisiología: Anaerobio estricto, reduce los sulfatos a sulfuros.

Cultivo: Con el mismo medio que para D. desulfuricans. No utiliza piruyato, malato ni colina.

Utiliza lactato, formato, metanol, etanol, propanol y butanol.

Desulfoyibrio gigas, bastones gram negativos.

Fisiología: Anaerobio estricto; temperatura de 30 a 35°C.

Cultivo: Requiere medio especial que contenga lactato + sulfato.

Caracteres bioquímicos; Utiliza los piruyatos en lugar de el lactato, pero no la glucosa ni el acetato. Reduce los sulfatos en sulfuros.

Desulfoyibrio africanus, bastones gram negativos, No es porulados.

Fisiología: Anaerobio estricto; temperatura de 28 a 40°C, Halotolerante.

Fuentes de carbono: Lactato, malato, piruvato y etanol en presencia de SO_4 .

Bioquímica: En la fermentación del lactato, produce ácido acético. Los sulfatos son reducidos en presencia de lactatos, malatos y piruvatos.

5.- La familia Beggiatoaceae, en la cual se encuentra el género Beggiatoa.

El género Beggiatoa, está ampliamente distribuido en el fondo de los lagos, arroyos, estanques y en habitats marinos o con fuentes de sulfuro. Los filamentos o tricomas de Beggiatoa, están compuestos de series lineales de células redondas individuales. Las células contienen gránulos lipídicos y metacromáticos, y también cuerpos nucleares discretos. El nitrato inorgánico así como las sales de amonio y las sustancias nitrogenadas orgánicas pueden satisfacer los requerimientos de nitrógeno de Beggiatoa.

Las especies crecen mejor a un pH de 7.2 a 8.2 y a 28°C, -
No pueden crecer bajo condiciones anaerobias.

6.- Bacteria heterótrofas de los géneros Arthrobacter, --
Bacillus, Flavobacterium y Pseudomonas.

7.- La familia Sporovibrionaceae, en la cual se encuen---
tran las especies siguientes de género Sporovibrio:

Sporovibrio orientis.

Sinónimo: Desulfotomaculum orientis.

Morfología: Células móviles gram negativas.

Fisiología: Anaerobio estricto. Reduce los sulfatos a --
sulfitos; temperatura de 30 a 37°C.

Cultivo: Con un medio que contenga lactato o piruvato, --
sulfato y tioglicolato.

Bioquímica: Reduce los sulfatos a sulfuros.

Sporovibrio ruminis.

Sinónimo: Desulfotomaculum ruminis.

Morfología: Células gram negativas con esporas redondas, -
pequeñas centrales o subterminales.

Fisiología: Anaerobio estricto; temperatura de 37°C.

Cultivo: En un medio que contenga lactato, piruvato, for-
mato o sulfato.

Bioquímica: Reduce los sulfatos y sulfitos en sulfuros.

Sporovibrio ferroxydans.

Sinónimo: Desulfotomaculum nigrificans.

Morfología: Células gram negativas, móviles, esporuladas
(esporas pequeñas y raras).

Fisiología: Anaerobio estricto. Termorresistente débil: -
resiste 20 minutos a 75°C.

Cultivo: En un medio que contenga; gelosa, nitrato y una sal ferrosa.

Bioquímica: Reduce los nitratos a nitritos y oxida la sal ferrosa.

4. AISLAMIENTO Y CUANTIFICACION DE :

4.1 BACTERIAS QUIMIOAUTOTROFICAS.

Este grupo ha sido estudiado por numeroso investigadores los que han recomendado diferentes medios de cultivo y la aplicación de los mismos está relacionada con la especie que se trata de aislar como por las características del sustrato.

4.1.1 Waksman (1922) empleó nueve medios de cultivo para aislar diferentes especies de Thiobacillus de suelos ácidos y alcalinos, estos corresponden a los descritos por --- Beijerinck (1); una modificación de este mismo medio que consiste en agregar CaCO_3 al 1% - o bien 0.2 g. de CaCl_2 por litro (2); el medio sólido descrito por el mismo -- Waksman (7) con dos modificaciones (8 y 9).

Los primeros seis medios son empleados para aislar Thiobacillus de condiciones alcalinas, los medios 7, 8 y 9 para aislamientos de condiciones ácidas, reportando de estos últimos, como mejores, a los medios 8 y 9 considerando que estos resultados se deben a que la reacción-

inicial de ellos es más favorable para el desarrollo de Thiobacillus y que la cantidad agragada de KH_2PO_4 que actúa como amortiguados impide que el medio se acidifique a un grado que interfiera con el desarrollo de la bacteria.

4.1.2 Rupela (1973) empleó el mismo medio de Beijerinck para aislar y cuantificar Thiobacillus en suelos alcalinos para lo que inoculó un gramo de la muestra de suelo en cien mililitros de medio (1), a un pH de 10 conteniendo azul de bromotímol como indicador e incubando con agitación rotatoria a 30°C . durante diez días. De las matras en los que se registró una reducción en el pH del medio se procedió a resembrar. Este autor recomienda con fines de cuantificación emplear cajas de Petri con el medio de tiosulfato de Beijerinck conteniendo indicador azul de bromotímol (1).

4.1.3 Fliermans (1972) en sus investigaciones sobre bacterias que oxidan el azufre procedente de suelos ácidos utiliza el medio básico de sales de Allen (11), ajustado a un pH de 3. A este medio se agrega azufre elemental a una concentración de 0.1%, y éste se esteriliza por separado con vapor durante 3 días consecutivos. Los cultivos

se preparan con matraces con tapa de rosca de 56 ml. con 15ml, de medio o en tubos de cultivo con tapa de rosca con 15 ml. de medio. Después de la inoculación, se hace pasar una corriente de CO_2 al 100%, dentro del espacio de gas por 10 segundos, y las tapas de rosca se cierran rápidamente.. El enriquecimiento de CO_2 favorece el desarrollo y cuando éste no se realiza se observa un crecimiento pobre o insignificante. Todas las incubaciones se llevan a cabo en baños de agua a temperatura constante. Los cultivos de T. thiooxidans se mantienen a 30, 45 y 55°C. Los cultivos de Sulfolobus acidocaldarius a 55, 65 y 70°C.

Para determinar el número de quimioautótrofos oxidantes del azufre en las muestras de suelo, se emplea la técnica del número más probable para lo que se hace un enriquecimiento selectivo en el medio de Allen (11) a un pH de 3, mejorado con azufre elemental estéril. Se preparan 20 series de diluciones con 5 repeticiones para cada dilución de suelo. Los tubos se incuban en la oscuridad durante 14 días a la temperatura del suelo. El número más probable de los organismos por gramo de suelo se determina usando las tablas de Cochran.

4.1.4 Wainwright (1979), aisló y cuantificó microorganismos que oxidan el azufre de plantas y suelos expuestos a contaminación atmosférica y empleó el medio descrito por Weiringa (12) que consiste en un medio basal carente de fuente de carbono, el que es cubierto con una capa blanca opaca de azufre, la aparición de zonas claras en la capa de azufre indica la presencia de bacterias quimioautótrofas oxidantes del azufre. Para cuantificar este tipo de microorganismos en plantas y en el suelo, la cuenta en placa se lleva a cabo de la siguiente manera:

a) En plantas. Se lavan las hojas con agua destilada y del extracto se toma 0.1 ml. y se siembran en el medio anterior.

b) En suelos. Se prepara una suspensión 1:10 de suelo en solución Ringer al 25% y se agita durante 15 minutos a 100 Rev/min. De esta suspensión se siembran 0.1 ml. en el medio antes mencionado. En ambos casos la incubación es a 25° C.

4.1.5 Postgate (1966) efectuó una revisión de los medios de cultivo empleados para el estudio de bacterias --

sulfurosas y los agrupa como medios selectivos para las diferentes especies de Thiobacillus, medios de enriquecimiento y señala aquellos que son empleados con fines de cuantificación. Todos los Thiobacillus excepto algunos miembros de grupo novellus usan el azufre, de ahí que el medio más usado para diagnosticar el género es el medio S(13). Descrito por Starkey (1925) y recomendado por Vishniac y Santer (1957). El medio de azufre se esteriliza mejor con vapor 30 minutos durante 3 días sucesivos, debido a que este procedimiento mantiene el material en la superficie acelerando el crecimiento. El cultivo aeróbico en matraces cónicos es satisfactorio y el crecimiento se observa por la turbidez e incremento en la acidez; con especies móviles, pueden verse con el microscopio bacilos apiñados a los gránulos de azufre en forma de rosetas características. Un valor inicial del pH de aproximadamente 5 es selectivo para el grupo thiooxidans, el cual puede bajar el pH a valores inferiores a 1, después de dos o tres semanas; un valor inicial del pH de 7.5 es selectivo para el grupo thioparus, el cual generalmente lo disminuye a cerca de 5 pero puede alcanzar valores hasta de 3. Los medios de tiosulfato muestran cambios de pH similares aunque de un carácter menos dramático; son úti

les porque pueden hacerse solidificar con agar y usarse - en el aislamiento de colonias. El medio R (14) es selectivo para T. denitrificans, los cultivos deben ponerse en condiciones anaerobicas a 30° C.

El desprendimiento de gas (N_2) se considera como un índice de crecimiento. Ciertos componentes del medio se deben esterilizar por separado.

Dos puntos generales deben ser enfatizados:

1) La necesidad de que existan iones amonio y nitratos porque el organismo no puede asimilar el nitrógeno de la reacción de desnitrificación.

2) La presencia de tiosulfato en un exceso molar sobre el nitrato, para evitar la acumulación de nitritos que son tóxicos para el organismo.

El medio (13) S a base de tiosulfato es adecuado para el cultivo en masa de todos los tipos a excepción de T. ferro-oxidans; los cultivos crecen mejor con aereación.

forzada dentro de los matraces, a excepción del grupo -- T. thioparus en el que una aereación vigorosa ocasiona el retraso del desarrollo inclusive los suprime.

Con T. denitrificans las precauciones para evitar la toxicidad antes mencionada deben llevarse a cabo a tiempo. El Dr. K. Sargeant (Postgate, 1966) incrementó el rendimiento de la especie en cultivo en masa mediante la continua adicción de NaHCO_2 (para mantener el pH de 6.7 a 6.9) y tiosulfato y nitrato durante el crecimiento.

El medio F (15) es adecuado para el cultivo en masa de T. ferro-oxidans en matraces con aereación. El Dr. M.G. Yates (Postgate 1966) encontró que la adición de 5% (v/v) de CO_2 al aire mejora el rendimiento de las células bacterianas.

4.1.6 En el manual Difco (1953) se describe el siguiente método para el aislamiento de Thiobacillus de muestras de agua o suelo: se inoculan en caldo Bacto-Thiobacillus (16), y se incuban a temperatura ambiente durante 1 ó 2 semanas hasta que haya evidencia de crecimiento, y a partir de este desarrollo se efectúa el aislamiento por --

transferencia a cajas con agar Bacto-Thiobacillus (17) - en el que se desarrollan colonias pequeñas que con frecuencia se impregnan de azufre y a cuyo alrededor se originan zonas claras debido a la formación de ácido - por la oxidación del tiosulfato, las que normalmente son más evidentes que el desarrollo microbiano.

DISCUSION.

Existen algunos inconvenientes en la utilización de los medios sólidos; si bien estas bacterias pueden ser-- fácilmente purificadas mediante la siembra en estria en medios sólidos, los cultivos generalmente sobreviven mejor en medios líquidos que en agar, posiblemente debido a que se pueden llegar a alcanzar altas concentraciones de ácido sulfúrico en la vecindad inmediata al desarrollo bacteriano.

Los ácido-sensitivos como *Thiobacillus thioparus* -- por ejemplo, requiere que se resiembren cada 3 días, sea el medio líquido o sólido. Los cultivos de *Thiobacillus* se pueden conservar bien por medio de la liofilización-- (Vishniac y Santer, 1957).

Existen sin embargo problemas originados por el desarrollo lento de *Thiobacillus*, lo que ha dado lugar a reportes con resultados conflictivos con respecto al efecto de la agitación en los cultivos de *T. thiooxidans* en el medio de Starkey (13), adicionado de partículas de azufre en polvo (Takakuwa, 1979).

Umbreit (1951) reporta que la oxidación del azufre es más lenta en los cultivos en agitación que en cultivos estáticos y sugiere que el movimiento separa a las bacterias de las partículas del azufre.

Cook (1964), investigó con más detalle el efecto del movimiento en cultivos de *T. thiooxidans*, y encontró que el movimiento inmediatamente después de la inoculación no es favorable pero cuando se introduce después de tres días de incubación estacionaria estimula el crecimiento.

Takakuwa e Iwasaki (1979), proponen dos mecanismos para el aprovechamiento y oxidación del azufre por *Thiobacillus*:

(1) El azufre reacciona con agentes químicos o enzimáticos excretados por la bacteria con la formación de compuestos solubles.

(2) Una reacción entre el azufre y un componente celular se lleva a cabo en la superficie de las células bacterianas. La mayoría de las evidencias hasta la fecha apoyan el segundo mecanismo, aunque la naturaleza de la reacción es todavía obscura. Reportan también que la adhesión de la célula a la partícula de azufre es completa en cinco minutos a una velocidad apropiada de movimiento, y sin embargo el crecimiento de *T. thiooxidans* es óptimo, bajo concentraciones muy bajas de oxígeno. De allí que el efecto de la aereación así como el de la agitación deben ser tomados en consideración para clarificar el efecto del movimiento en el crecimiento de este aerobio.

4.2. BACTERIAS SULFUROSAS INCOLORAS (J. R. POSTGATE --
1966).

Las bacterias del azufre incoloras son aeróbicas, oxidan sulfuros disueltos a azufre y generalmente a sulfato; algunos de los *Thiobacillus* comparten esta habilidad, pero los miembros del presente grupo generalmente acumulan gránulos de azufre dentro de sus células.

Las formas filamentosas tales como *Beggiatoa* y *Thiothrix* están esparcidas en la naturaleza, las formas unicelulares incluyen *Thiospirillum* y la marina *Thiovulum*.

Las técnicas de aislamiento y enriquecimiento de este grupo, han sido revisadas por la Riviére (1965),

No hay realmente un medio selectivo para ellas y se obtienen mejor usando la columna de Winogradsky o una variante, para ello deben coexistir H_2S , aire y CO_2 por un período razonablemente largo. Los cultivos puros son aislados por medio de estratagemas adaptadas al tipo par

ticular de microorganismos que se trata de enriquecer. - Una vez obtenidos son cultivados en soluciones salinas - sobre una capa de agar que contiene H_2S libre, dentro de la cual se burbujea aire para causar aereación restringi- da. Un artefacto para efectuar este procedimiento se -- presenta en la figura 1. La Riviére lo usó con éxito -- con Thiovulum. Fauré-Fremiet y Roviller (1958) usaron - tubos de vidrio con agar-sulfuro abiertos de la punta, - introduciéndolos dentro del agua de mar, en ambos méto- dos los organismos forman una especie de velo cuya dis- tancia del punto por donde penetra el H_2S al medio am- biente depende de la velocidad a la cual entra (se ilus- tra como F. en la figura 1).

La bacteria del azufre filamentosa Beggiatoa no es necesariamente autótrofa. Cataldi (1940) usó una infu- sión de paja para enriquecer al microorganismo y produ- cir H_2S .

Faust y Wolfe (1960) y Scotten y Stokes (1962) pu- rificaron cultivos a partir de películas de Beggiatoa -- que emigraban sobre placas de agar extracto de carne o -

agar extracto de levadura, incubadas a 30°C, y aislando los extremos de los tricomas, estos aislamientos fueron mantenidos en medio de la misma composición. Burton y Morita (1964) reportaron que para cultivos en masa, el rendimiento fue mejorado por la adición de catalasa al medio de cultivo; el medio tiene la siguiente composición: extracto de levadura, 2g.; cloruro de calcio, 0.1 g.; acetato de sodio, 0.5 g.; agar, 2.0 g.; agua destilada, 1 lt.; catalasa signa (10 unidades/ml) las que se añaden asépticamente por goteo a las placas del agar.

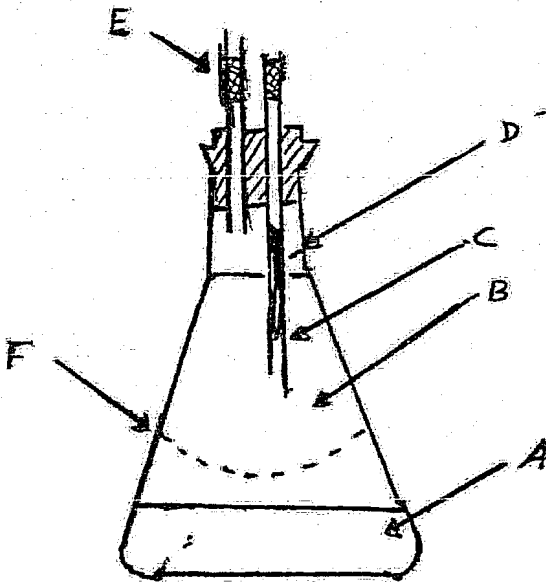


Fig. 1.- Aparato para el cultivo de *Thiovulum* y otras bacterias aeróbicas que oxidan el sulfuro.

A: agar que contiene H_2S o (Na_2S) .

B: medio (agua de mar o sales enriquecidas).

C: collar para reducir la turbulencia.

D: capilar para el paso del aire.

E: tubos con tapones para la entrada y salida del aire.

F: posición típica de la zona de Thiovulum en el medio de enriquecimiento de La Rivière.

4.3. BACTERIAS SULFUROSAS (O DEL AZUFRE) FOTOSINTÉTICAS (J.R. POSTGATE 1966).

Estas bacterias, las "bacterias del azufre coloridas" o Thiorhodaceae, son todas autótrofas fotosintéticas que requieren condiciones anaeróbicas. En presencia de luz oxidan el sulfuro a azufre libre y sulfato, y con frecuencia acumulan gránulos de azufre. Varias especies son autótrofas obligadas y el resto son facultativas. Se incluyen las bacterias verdes del azufre (Clorobium, -- Chlorobacterium) y las bacterias púrpuras del azufre -- (Chromatium, Thiopedia).

Las bacterias verdes tales como Chlorobium son favorecidas por la presencia de H_2S a una concentración de 100 ppm y pH de 7. C. thiosulfatophilum se distingue -- de C. limicola por su habilidad para usar tiosulfato en lugar de sulfuro. Chlorobacterium, un género móvil, -- puede aparecer y mostrar facultades heterótrofas. Las bacterias rojas como Chromatium o Thiopedia son favorecidas por H_2S a una concentración de 20ppm y pH de 8; -- las especies se distinguen por su movilidad y apariencia; ambos tipos pueden ser mantenidos en cultivos por picadura en el medio T (22) cubierto con agar.

Cultivos profundos en matraces con agar en los medios T(22) o P (23) son usados para el aislamiento de colonias de este grupo.

Los géneros Chromatium, Rhodospirillum, ---- Thiopedia y Chlorobium, de la familia Thiorhodaceae se desarrollan en el medio P (23); los dos primeros requieren vitamina B_{12} , y el crecimiento de Chlorobium se incrementa con la adición de vitamina B_{12} al medio de cultivo o aumentando la cantidad de cobalto en la solución de elementos traza.

4.4. MICROORGANISMOS HETEROTROFOS OXIDANTES DEL AZUFRE.

4.4.1. Pepper (1978) aisló bacterias heterótrofas capaces de oxidar tiosulfato o azufre elemental empleando el medio de Vishniac y Santer (24) enriquecido con -- 1% de azufre elemental y mejorado con 2% de glucosa. Con este método ha sido posible el aislamiento a partir de -- suelos arcillosos.

4.4.2 Mainwright (1979). En sus estudios sobre -- suelo y plantas contaminados aisló y cuantificó bacte--- rias, actinomicetos y hongos oxidantes del azufre empleando para bacterias el medio de Weiringa (12) con una -- sobrecapa de agar nutritivo a un pH de 7.0; para actino- micetos el mismo medio descrito por Porter y colaborado= res (25) y para hongos la subrecapa empleada fue la del- medio Czapek Dox/polisulfuro (26). En todos los casos el criterio empleado como índice de la oxidación de azu- fre es la aparición de manchas claras en la capa de azu- fre.

4.5. MICROORGANISMOS REDUCTORES DE SULFATOS.

Estos no corresponden propiamente a las bacterias sulfurosas pero por tener gran importancia en el ciclo del azufre, se incluyen en el presente trabajo.

4.5.1. Wakao (1973), empleó el método de la micropipeta para cuantificación de bacterias reductoras en suelos del arroz anegados en agua con un contenido de humedad de aproximadamente 60%. Para tales fines se preparan 100 micropipetas, cada una de 2 mm. de diámetro interior 3 mm. de diámetro exterior y 150 mm. de longitud y un alambrado de malla de 4 mm. con 40 mm. de largo y ancho.

Después de eliminar el agua superficial en el suelo, se acomoda el alambrado cerca de la superficie del suelo y cada una de las micropipetas se inserta verticalmente dentro del fango a través de cada una de las mallas a una profundidad de 25 mm. de la superficie del suelo. Una pequeña cantidad de suelo cerca de 100 mm. se succiona dentro de cada una de las micropipetas. Entonces se sacan las pipetas y se tapan ambos extremos -

con tapones de goma esterilizados para prevenir la evaporación del agua de las muestras de suelo y la exposición al aire.

La muestra de suelo en cada pipeta se trata de la siguiente manera: después de quitar los tapones de goma, la muestra del suelo se pone en una pequeña pieza delgada de aluminio, de 30 mm. cuadrados, la que ha sido previamente pesada y esterilizada. Se mezcla el suelo de la hoja delgada de aluminio por cerca de 20 segundos y medio y la mitad de la cantidad de suelo es separada y puesta en otra pieza de 10 mm. cuadrados de aluminio y pesada. Se coloca la mitad separada dentro de un tubo conteniendo 10 ml. de agua esterilizada y se agita con la mano vigorosamente durante un segundo. La suspensión de suelo así hecha está lista para usarse en el recuento de bacterias reductoras del sulfato. El número estimado de bacteria viable se expresa en una base de 2 mg. de suelo seco.

El número de bacterias reductoras del sulfato es determinado por el método de placa de agar anaeróbico.

4.5.2. Wakao (1973) utilizó este método con suelos de arrozales agotados con aproximadamente 40% de contenido de agua.

Después de las cosechas del arroz se extrae un bloque de suelo de 10 cm. de largo, 10 cms. de ancho y 15 cms. de profundidad. El bloque de suelo se divide en dos partes. De la superficie del suelo recientemente expuesta se selecciona un área de $20 \times 20 \text{ mm}^2$ de estructura y color homogéneos. Se divide el área en 100 secciones de aproximadamente 2 mm^2 , con una aguja estéril se toman aproximadamente 2 mg. de suelo de cada sección. La muestra de suelo es puesta en un tubo de ensaye y se le añade 1 ml. de agua esterilizada. El tubo se agita con la mano para así obtener una suspensión del suelo. Se hace el recuento de bacterias reductoras del azufre en la suspensión. Por lo tanto, de un área del suelo de 20 mm^2 , se obtienen 100 muestras de suelo para ser analizadas. El número de bacterias se expresa en base a --- 2 mg. de suelo.

El número de bacterias reductoras de sulfato es determinado por el método anaeróbico de agar en placa.

4.5.3. Postgate (1966) utiliza el medio B (18) el que corresponde al medio de Baar suplementando con extracto de levadura y agentes reductores. Se añade a un matraz el cual contiene la muestra, se llena hasta el tope y se tapa para así eliminar el aire. Para muestras marinas se añade NaCl al medio; la incubación generalmente es a 30°C. para los organismos mesófilos, 37°C. para las bacterias que reducen el sulfato en el rumen y a 55°C. para los microorganismos termófilos. La presencia de bacterias reductoras del azufre se pone de manifiesto al haber un oscurecimiento en el medio después de la incubación; el análisis debe indicar una concentración de H₂S de 30 mg/ml. o más.

La diferenciación de las especies se puede llevar a cabo de la manera siguiente: el crecimiento a 55°C. indica únicamente Desulfotomaculum nigrificans. El crecimiento a 30 °C. o a 37 °C. después de calentar 1 ml. del cultivo a 100°C. durante 10 minutos, indica miembros mesofílicos del género Desulfotomaculum, el cual puede ser identificado después en base a su morfología. Esta conclusión se ratifica mediante una prueba de fluorescencia negativa. Esta prueba que es específica para-

el generó Desulfovibrio, se lleva a cabo calentando 1 ml. del sobrenadante del cultivo (eliminando el precipitado de FeS) mediante centrifugación y añadiendo una gota de NaOH 2N y observando bajo luz ultravioleta a 375 nm, una fluorescencia fuerte color roja indica la presencia del género Desulfovibrio. El crecimiento en un medio que -- contiene más de 1% de NaCl, pero no en un medio de agua dulce indica la presencia de D. salexigens, aún cuando -- algunas otras especies marinas requieren NaCl; para con firmar esta prueba se hace crecer en presencia de inhibi dor "Hibitane" (Clorhexidina) en proporción de 1 mg./ml. La habilidad de crecer sin sulfato y con piruvato o coli na en el medio D (20), es característico de las especies D. desulfuricans; si no hay crecimiento sin sulfato in dica D. vulgaris, D. africanus, o D. gigas, las cuales, si bien son morfológicamente diferentes, no son fácilmen te distinguibles mediante pruebas en medios de cultivo.

Para el cultivo en masa de las bacterias que redu-- cen el sulfato, se usa el medio C (19) el cual es una -- modificación del medio de Starkey (1938) y Butlin, Adams y Thomas (1949) Este contiene lactato y sulfato los que

incrementan el crecimiento, y el citrato previene la formación de precipitados durante la esterilización con autoclave y la consecuente necesidad de filtrar y reesterilizar.

Para especies marina se suplementa con NaCl al 25% con un inóculo pequeño se añade asépticamente Na_2S a una concentración aproximadamente de 1 milimolar. El cultivo se hace crecer anaeróbicamente.

4.5.4. Wakao (1972), utiliza la siguiente técnica para el estudio cuantitativo de las bacterias que reducen el sulfato en los suelos:

Una muestra de suelo (1-5g) se pone dentro de un matraz de 200 ml. que contiene 100 ml. de agua estéril y se agita vigorosamente con la mano durante 5 minutos. La suspensión de suelo se diluye en serie y es usada para contar las colonias.

Enriquecimiento del cultivo de las bacterias que reducen el sulfato.

Una porción de suelo de arrozales se incuba mediante el método aneróbico de agar en placa. Las colonias negras típicas reductoras de sulfato que crecen separadamente una de otra, se recogen y se suspenden en 10 ml. de agua estéril. Una alícuota del volumen de esta suspensión bacteriana se inoculara con un inyector al medio líquido contenido en un tubo de ensaye tapado con un tapón de hule, y se incuba a 30°C. Después de 4 a 5 días de incubación, las bacterias que reducen el sulfato crecen y el medio se torna negro. El procedimiento es repetido varias veces hasta que se obtiene un cultivo enriquecido.

El medio líquido (cuya composición se describe mas adelante), es hervido y rápidamente enfriado, 10 ml. de éste se ponen dentro de un tubo de ensayo. El aire en el tubo es reemplazado pasando nitrógeno gaseoso durante un minuto, entonces el tubo de ensaye se tapa fuertemente con un tapón de hule, Se esteriliza a 120°C durante 15 minutos.

Preparación de la suspensión de suelo para cultivo del arroz y el cultivo enriquecido bajo condiciones anaerobias.

Una porción de suelo para cultivo del arroz (1-2g) o 1 ml. del cultivo enriquecido se añade a una matraz de 200 ml. que contienen 100 ml. de agua estéril, la cual se hierve rápidamente se enfría justamente antes de usarla, y se dispersa mediante burbujeo de hidrógeno gaseoso; entonces el matraz se tapa con un tapón de hule hasta usarse.

Medio.- Para la determinación de las bacterias que reducen el sulfato se usa el medio C (31) de Butlin y colaboradores (1949) de lactato de sodio-extracto de levadura-sulfato de acuerdo a los reportes de Postgate (1963)

Los ingredientes del medio son:

K_2HPO_4 0.5 g
 NH_4Cl 1.0 g

Na_2SO_4	1.0 g	lactato de sodio.....	3.5 g.
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 g	extracto de levadura.....	1.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.0 g	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
		Agar	15.0 g

Estos componentes se disuelven en 1 lt. de agua destilada y el pH del medio se ajusta a 7.2-7.4 con una solución de NaOH. Después de esterilizar el medio en auto clave se suplementan por separado los agentes reductores- (0.01% de tioglicolato de sodio y 0.01% de ascorbato de sodio).

Método anaeróbico de caja de petri en placa.

Se usa una caja de Petri de 9 cm. de diámetro. La tapa de la caja y el fondo se esteriliza a 150°C durante 30 minutos. Se transfiere dentro de la tapa un mi mililitro de la suspensión de suelo o de células y entonces se le añaden 20 ml. de medio de agar fundido y se gira con la mano. Mientras el agar está todavía líquido, el fondo de la caja de Petri se hunde dentro del agar en la caja asépticamente. Se debe prestar atención- de que no queden burbujas de aire entre la superficie del-

agar y la superficie de la caja.

Incubación y cuenta.- Se incuban a 30°C durante 8-10 días hasta que se observen las colonias negras-características de las bacterias que reducen el azufre. Cinco réplicas de cajas de Petri se usan para cada muestra y se calcula el número promedio de ellas.

Cuenta de bacterias aeróbicas.-Las bacterias-aeróbicas se cuentan por el método de dilución en placa. Se transfiere un ml. de la dilución apropiada dentro de las cajas de Petri y entonces se añade medio de agar caldo nutritivo. Se usan 5 cajas para cada cuenta. Las cajas se incuban a 30°C por 2 días y entonces se dejan a la temperatura ambiente durante dos días. Se cuentan todas las colonias que crecen en el medio. Los componentes de medio son los siguientes: extracto de carne 10 g., peptona 10 g., NaCl., agar 10 g., y se disuelven en un litro de agua destilada y el pH del medio se ajusta a 6.8-7.2 .

4.6 METODO DE ENRIQUECIMIENTO DE LA POBLACION DE MICRO-ORGANISMOS OXIDANTES Y REDUCTORES DEL AZUFRE.

Se utiliza el método de la columna de Winogradsky, el cual permite reproducir un microecosistema en el que se favorece el desarrollo de los diferentes grupos de bacterias del azufre, y consiste en colocar un recipiente de vidrio alto llenado hasta la mitad con una mezcla húmeda de papel filtro hecho polvo, sulfato de calcio y la muestra (generalmente lodo o agua contaminada), y se vierte un volumen igual de agua conteniendo trazas de fosfato a un valor de pH neutro. La columna es dejada en la luz. Entonces sobreviene en la mezcla una fermentación anaeróbica de la celulosa, y las bacterias reductoras de la fermentación y generando H_2S del sulfato. Este actúa como un substrato para los dos grupos de bacterias que oxidan el sulfuro de hidrógeno a lo largo del área iluminada de la columna se desarrollan bacterias rojas de la familia Thiorhodaceae, tales como Chromatium y Thiopedia y debajo de ellas, debido a que son favorecidas por las altas concentraciones de H_2S se desarrollan bacterias del azufre verdes como Chlorobium.

En la superficie agua aire se desarrollan bacterias que oxidan el azufre tales como Thiobacillus thioparus, y en ocasiones bacterias que oxidan el sulfuro tales como Beggiatoa o Thiothrix pueden aparecer.

Para las muestras marinas en las cuales pueden estar presentes Thiovulum y Thioplaca, el contenido de sal del líquido sobrenadante debe ser ajustado a 2.5%.

5.- EVALUACION DE LA ACTIVIDAD BIOQUIMICA

El objetivo de efectuar estos métodos en matraz es con el fin de estudiar el comportamiento de los microorganismos por separado del cuerpo tan complejo como lo es el suelo, obteniendo información propias de los microorganismos que puede utilizarse con fines prácticos en el suelo. Y el objetivo de efectuar estos métodos directamente en el suelo es con el fin de observar el efecto práctico de los microorganismos así como también la influencia del suelo en el comportamiento de los microorganismos y la interrelación entre ambos.

5.1 METODO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAR LA HABILIDAD DE MICROORGANISMOS DE OXIDAR EL AZUFRE ELEMENTAL Y EL TIOSULFATO (Wainwright, 1978).

La habilidad de microorganismos para oxidar el azufre elemental y el tiosulfato puede determinarse en cultivo con agitación, usando el siguiente método:

Los hongos que oxidan el azufre se hacen crecer por duplicado en cultivo agitado (100 r.p.m. a 25°C) en el -

medio siguiente:

Azufre o tiosulfato.....	1 g.
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3 g.
KH ₂ PO ₄	0.3 g.
CaCL ₂	0.025 g.
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05 g.
Elementos traza	1.0 ml.
Sacarosa	3 g/100 ml.

Como inóculo se utilizan discos cortados de la orilla de colonias jóvenes aisladas en el medio de Czapek - Dox Agar (7.30).

Las bacterias autótrofas que oxidan el azufre se hacen crecer en el medio arriba mencionado menos sacarosa, utilizando como inóculo 1 ml. de un subcultivo aislado en el mismo medio.

Todas las incubaciones se llevan a cabo a 25°C. Se hacen determinaciones de sulfato, tetracionato y tiosulfato por duplicado a intervalos de dos días durante diez días, utilizando los métodos de Hesse, para sulfato por turbidimetría; el método de colorimetría después de cia-

nolisis de Nor y Taba Tabai (1977a) para la determinación de tetrionato; y el método de Sorbo (1957) para determinar tiosulfato.

5.2 METODO EXPERIMENTAL PARA LA DETERMINACION DEL PODER OXIDANTE DE AZUFRE DEL SUELO (Bajpai, 1979).

100 gramos de suelo seco al aire se mezclan con 1000 ppm de azufre, se agrega agua hasta ajustar la humedad a 60% de la capacidad de campo, y se incuba a 30 - 1°C durante un período de 50 días. El sulfato se determina por turbidimetría como el método descrito por Jackson (6.2).

El cálculo de la actividad microbiológica se hace de la siguiente manera:

Actividad

Microbiológica

en por ciento = $\frac{Y \text{ en el suelo tratado} - Y \text{ en el suelo control}}{\text{Azufre añadido en ppm}} \times 100$

Azufre añadido en ppm

donde $Y = \text{SO}_4$ en ppm.

5.3 METODO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD DE OXIDACION DEL AZUFRE Y DEL TIOSULFATO por Thiobacillus thiooxidans Y POR BACTERIAS HETEROTROFAS (PEPPER, - 1978).

5.3.1. EN UN MEDIO DE CULTIVO ELABORADO.

Las bacterias heterótrofas aisladas en el medio de Vishnia y Santer (24) se hacen crecer en el medio de agar (peptona 5 g/L, extracto de levadura 1 g/L, y $\text{Fe}_2\text{SO}_4)_3$ 0.01 g/L.)

Los estudios del crecimiento y de la oxidación del azufre se llevan a cabo en matraces de 125 ml con alargadera. Tapados con algodón y con 25 ml. de medio. Se añade $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ filtrado y esterilizado para proveer una concentración final de 2 mg. de azufre/ml, a cada matraz para el estudio de oxidación de tiosulfato.

Para los estudios de oxidación del azufre se añaden flor de azufre esterilizada con vapor durante una hora - por tres días consecutivos, hasta obtener una concentración final de 10 mg./ml.

Thiobacillus thiooxidans se hace crecer en un matraz con alargadera de 125 ml. con medio para thiobacillus -- A (27) para el estudio de la oxidación de azufre elemental, y medio para thiobacillus B (28), para el estudio de la oxidación del $S_2O_3^{=}$.

Los matraces se inoculan con 0.1 ml. de inóculo de un cultivo en fase logarítmica del microorganismo en estudio. Después de la inoculación el organismo se incubaba a 25°C en un agitador giratorio New Brunswick a 160 rpm.

Las curvas de crecimiento se obtienen midiendo por turbidimetría con un colorímetro Klett usando un filtro-rojo (66). A determinado tiempo, alícuotas de 5 ml. se extraen asépticamente de los matraces con alargadera, se transfieren a tubos de centrifuga de polietileno de 50 ml. se diluyen con 15 ml. de agua destilada y se centrifugan a 10800 rpm durante 10 minutos. El líquido sobrenadante se decanta cuidadosamente y se analiza el sulfato por -- turbidimetría, siguiendo el procedimiento descrito por -- Pramer y Schmidt.

5.3.2. USANDO COMO DE CULTIVO EL SUELO.

Los estudios de la oxidación del tiosulfato y el azufre se llevan a cabo usando suelos esterilizados con autoclave y suelos no esterilizados. El esterilizar los sue+los en autoclave reduce la población microbiana esencialmente a cero.

El estudio de los suelos esterilizados en autoclave se lleva a cabo con 50 g. de muestra a los que se agregan algunos de los tratamientos siguientes:

- | | |
|---------------------------|---------------------------------|
| a) 0.2% de $S_2O_3^{=}$. | c) 0.2% de glucosa. |
| b) 0.2% de $S_2O_3^{=}$ y | d) 1% de S^0 |
| 2% de glucosa. | e) 1% de S^0 y 2% de glucosa. |

se ajusta a un tercio del por ciento de la húmedad atmosférica, y se incuba en matraces Erlenmeyer de 125 ml. Los matraces se tapan con algogón y se esterilizan durante 30 minutos en autoclave a una atmósfera de presión y 121°C.

Al comienzo de cada experimento los matraces se inoculan por duplicado con 0.5 ml. de un cultivo en crecimiento activo de cada microorganismo en estudio. Después de la inoculación los tapones de algodón se cubren con parafina para prevenir la pérdida de humedad durante la incubación.

El suelo control y los suelos inóculados se incuban a -- 25°C por períodos definidos de tiempo. Al final de cada período de tiempo un duplicado de los matraces se quitan de la incubadora y 10 g. de suelo se usan para medir el pH (proporción de suelo: agua de 1:2). Para el estudio de los cambios de población microbiana con respecto al tiempo de las bacterias heterótrofas se hace una cuenta en placa de diluciones apropiadas de suelo en el medio de agar.

EXTRACCION DEL SULFATO DEL SUELO.

En cada período de muestreo se toman muestras por duplicado de 10 g. de suelo de la parte principal de la muestra y se colocan en matraces Erlenmayer de 50 ml. con 25 ml. de solución extractora (39 g. de acetato de amonio en 100 ml. de ácido acético 0.24 molar) Los matraces se agitan durante 30 minutos en un agitador rotatorio.

La materia orgánica colorida es eliminada añadiendo 0.2 g. de carbón activado. Después de haber sido -- agitado durante 3 minutos adicionales las suspensiones se filtran a través de papel filtro Whatman # 42. El --

filtrado claro es usado para la determinación del sulfato.

ANALISIS DEL SULFATO.- Se usan 10 ml. del extracto de suelo claro o del filtrado del cultivo después de la centrifugación para determinar el sulfato turbidimétricamente como $Ba SO_4$ siguiendo el método descrito por -- Pramer y Schmidt (1964). Los controles se incluyen en todos los análisis.

5.4 METODO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA FORMACION DE COMPUESTOS DE AZUFRE VOLATILES DEBIDO A LA DESCOMPOSICION MICROBIANA DE AMINOACIDOS QUE CONTIENEN AZUFRE EN LOS SUELOS (Banwart, .1975).

Se toman las muestras de 0-15 cm. de la superficie del suelo. Antes de usar cada muestra ésta se seca con aire y se pasa a través de una malla de 2 mm.

El experimento con las muestras de suelo se lleva a cabo bajo condiciones aeróbicas e inundadas en agua, y en ambos casos la incubación es a 30°C.

En cada incubación la muestra de suelo (5 g.) se -

trata con 1 ml. de agua o con 1 ml. de agua que contiene 2 g. de azufre en la forma del aminoácido bajo investigación. Se ajusta el contenido de agua al 60% de la capacidad de campo para la incubación bajo condiciones aeróbicas o con 10 ml. para la incubación bajo condiciones inundadas.

Los matraces de reacción utilizados para estudiar la evolución de los compuestos de azufre volátiles de los suelos tratados con aminoácidos que contienen azufre son de vidrio, de 65 ml. de capacidad, con el cuello atornillado y la boca angosta acondicionados con unas tapas que tienen un dispositivo que cierra y que permite la inyección o extracción de muestras de gas con jeringas especiales. Los compuestos volátiles de azufre formados en la incubación de los suelos tratados y no tratados con el aminoácido en éstos matraces se identifican y estiman mediante un análisis por cromatografía de gases; de 0.1 a 2.0 ml. de muestra de la fase gaseosa a dos días de intervalo se toman de los matraces, y éstos son nivelados con aire y puestos en su lugar inmediatamente después de haber tomado la muestra.

La fórmula de los aminoácidos que contienen azufre y de los compuestos volátiles de azufre a usar se dan en la tabla 1 y 2 respectivamente. Los compuestos de la tabla 2 son usados para comprobar las técnicas de cromatografía de gases empleagos y para confirmar la identificación de los compuestos de azufre volátiles mediante estas técnicas.

El cromatógrafo de gases utilizado para la identificación y estimación de los compuestos de azufre volátiles es equipado con un detector fotométrico de flama. El detector se ajusta con un filtro de azufre (394 n.m) y es operado a 110°C, con una velocidad de flujo de H₂ de 75 ml/minuto, una velocidad de flujo de O₂ de 20 ml/min. y una velocidad de aire de 60 ml./min.

Las columnas que se usan son:

(A) de 10 a 4 metros de tubo de teflón empacado con Chromosorb T de malla 40 - 60 cubierto con polifenil eter al 12% y H₃PO₄ al 0.5%.

(B) 140 cm. de tubo de teflón empacado con carbopack - -
B - H - T - 100.

(C) 183 cm. de tubo de teflón empacado con Chromosil - 310.

(D) 30 cm. de tubo de teflón empacado con Deactigel de -
malla de 120 - 140 .

(E) 138 cm. de teflón empacado con Chromosorb 101 de ma-
lla 80 - 100.

El tubo de teflón usado para preparar las columnas-
tiene un diámetro interior de 2.16 mm. Todas las colum-
nas se operan isotéricamente con N_2 como gas acarreador.

La temperatura de las columnas y la velocidad del nitró-
geno es la siguiente:

(A) 100°C y 50°C, 80 ml./min.

(B) 100°C, 70 ml./min.

(C) 40°C, 40 ml./min.

(D) 50°C, 80 ml/min.

(E) 100°C, 70 ml/min.

(F) 110°C, 70 ml/min.

Todos los experimentos se llevan a cabo por duplica-
do o triplicado. A una de las muestras de suelo se le --
añade azida de sodio (500 microgramos por gramo de suelo)

para inhibir la biodegradación de los aminoácidos.

Tabla 1.- Aminoácidos que contienen azufre utilizados.

Aminoácido	Fórmula
Metionina	$\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
Sulfóxido de metionina	$\text{CH}_3\text{SOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
S-metil metionina	$(\text{CH}_3)_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
Etionina	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
Cisteína	$\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
Cistina	$\text{HOOC}(\text{NH}_2)\text{CHCH}_2\text{SSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
Homocistina	$\text{HOOC}(\text{NH}_2)\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{SSCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
Acido cisteico	$\text{HO}_3\text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
S-metil cisteína	$\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
S-etil cisteína	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
Lantionina	$\text{S}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH})_2$
Taurina	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$

Tabla 2.- Compuestos volátiles de azufre utilizados.

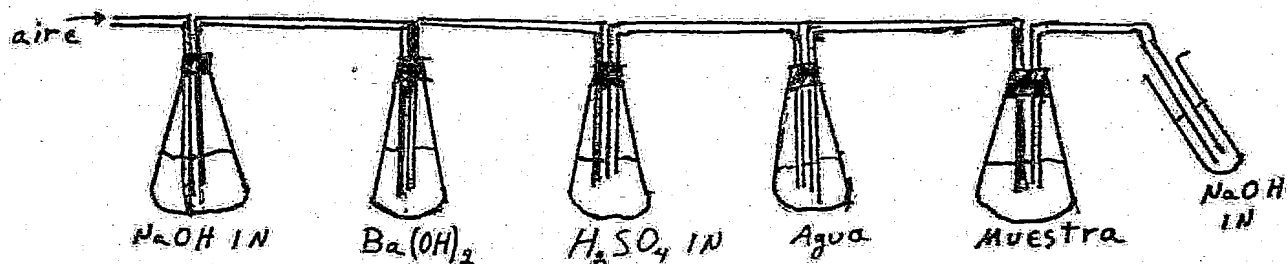
Nombre	Fórmula
Metil mercaptano	CH_3SH
Etil mercaptano	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SH}$
n-propil mercaptano	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$

n-butil mercaptano	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$
isobutil mercaptano	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{SH}$
Sulfuro de dimetilo	CH_3SCH_3
Sulfuro de dietilo	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_3$
Disulfuro de dimetilo	CH_3SSCH_3
Disulfuro de dietilo	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SSCH}_2\text{CH}_3$
Sulfuro de hidrógeno	H_2S
Dióxido de azufre	SO_2
Disulfuro de carbono	CS_2

5.5 METODO EXPERIMENTAL PARA MEDIR LA RESPIRACION DE UN SUELO TRATADO CON AZUFRE. (Bollen, 1977) .

Se mezclan 100 mg. de harina de azufre con 100 g. de suelo, mientras que 100 g. de suelo no tratado se usan como control. Los suelos se colocan en matraces de 473 ml., y se les adiciona agua destilada hasta ajustar a -- 50% la capacidad de campo. En seguida los matraces se tapan y se les suministra aire pesado a través de una solución de NaOH 1 N de una solución saturada de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ para eliminar el CO_2 , filtrado a través de una solución de H_2SO_4 1N y de agua par mantener la humedad del suelo (como lo indica la figura). Cada matraz se conecta por fuera a una regadera inmersa en un tubo de ensaye que con--

tiene 10 ml. de NaOH 1N. El carbón en forma de CO_2 es absorbido por el NaOH a los 7, 14, 21 y 28 días después del tratamiento, los tubos con el alcali se quitan y el CO_2 se determina por titulación diferencial con H_2CO_4 1N y 0.08 N y calculado a un punto de equivalencia de acuerdo con Cooper (1941).



El punto de equivalencia de Cooper consiste en - - usar un indicador mezclado para determinar los bicarbonatos presentes, se usan tres gotas de indicador mezclado (el cual se prepara disolviendo 0.02 g. de rojo de metilo y 0.1 g. de verde de bromocresol en 100ml. de alcohol al 95%), en 100 ó 250 ml. de solución. La tabla siguiente muestra los colores que el indicador mezclado adquiere en términos del pH de la solución.

Color de tres gotas de indicador mezclado en 100 ó 250 ml. de solución:

<u>pH de la solución</u>	<u>Color</u>
5.2 y arriba	Azul con trazas de verde.
5.0	Azul claro con gris.
4.8	Azul rosa claro con tinte azul
4.6	Rosa claro.
4.6 (abajo de)	Rosa o rosa claro.

Entonces los mililitros de H_2SO_4 0.08 N gastados -- usando el indicador mezclado nos determinan los bicarbonatos presentes en la solución, los cuales a su vez son producto del CO_2 presente.

5.2 METODO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAR LA PRODUCCION MICROBIANA DE SULFATO Y SULFURO EN ALGUNOS SUELOS DE AUSTRALIA (R.J. Swaby, 1973).

Los suelos se muestrean de 0 a 10 cm. de la superficie del suelo y se combinan 5 núcleos de sitios apartados 10 m uno del otro, luego se refrigeran a 2°C hasta ser examinados simultáneamente bajo condiciones inundadas y no inundadas para determinar su habilidad de oxi--

dara sulfato el azufre elemental al 1%, o para reducirlo a sulfuro. Los tratamientos fueron los siguientes:

- (a) 0.1% de azufre elemental.
- (b) Una mezcla de 0.3 % de sulfato de amonio y 0.2% de sulfato de sodio.
- (c) 0.5% de clorhidrato de cistina, debido a que Frederick Starkey y Segal (1957) encontraron que este compuesto de azufre orgánico se descompone fácilmente.

Se colocan aproximadamente 50 g. de muestra de suelo en matraces Erlenmeyer de 125 ml. La oxidación del azufre se mide a intervalos semanarios durante un período de 10 semanas de incubación a 25°C por medio de descenso en el pH y el incremento de la acidez titulable en alícuotas de una solución con 10 g. de suelo. La actividad de T. thiooxidans se determina aproximadamente por medio del número de días en que el pH del suelo alcanzó el valor de 4.0 .

El sulfuro libre se detecta insertando discos de papel de acetato de plomo de 5.5 cm. de diámetro en la tapa de los matraces. El número de días de incubación en que se produce una sombra oscura corresponde a 35 micro

gramos de sulfuro.

Para el estudio en medio de cultivo de la producción de sulfuro, los productores de sulfuro se detectan añadiendo diluciones adecuadas de suelo al medio modificado de Postgate (1966) medio C (19), contiendo 0.01% de Azufre ó 0.025% de sulfato de sodio ó 0.01% de cistina como el único compuesto orgánico de azufre, y no se añaden sales ferrosas. Los aeróbicos se hacen crecer en tubo de 1.5 cm. de diámetro conteniendo 5 ml. de medio mientras que los anaerobios se cultivan en 7.5 ml. de medio cubierto con 1.5 ml. de aceite de parafina.

Los esporulados se detectan después de la pasteurización de suspensiones de suelo durante 2 minutos a 90°C. Los mesófilos se incuban a 25°C y los termófilos a 55°C.

El sulfuro se detecta mediante la inserción de -- discos de papel de acetato de plomo de 1.3 cm. de diámetro en las tapas atornillables de los tubos de 1.5 mm x 10 mm que contienen medio de azufre u cistina o mediante la adición de clavos de fierro de 3 cm. de largo y 1.2 mm. de diámetro al medio de sulfato, como lo pro-

pone Abdel-Malek y Rizk (1960). La velocidad de producción de sulfuro se determina por medio del número de días de incubación en que se produce una sombra obscura la cual corresponde a 2 microorganismos de sulfuro.

5.7 METODO EXPERIMENTAL PARA INVESTIGAR LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA RHODANESA EN LOS SUELOS (Tabatabai y Singh 1976).

REACTIVOS.

Tolueno. Reactivo Fisher certificado.

Buffer de ácido sulfúrico-THAM (0.05 M, pH de 6.0).

Disuelva 6.1 g. de Tris (hidroximetil) amínometano (THAM Reactivo Fisher certificado) en aproximadamente 600 ml. de agua, ajuste el pH de la solución a 6.0 mediante titulación con H_2SO_4 0.2 N, y afore con agua a un litro.

Solución de tiosulfato de sodio (0.01 M), Disuelva 24.9 gramos de $Na_2S_2O_3$ y 6.1 gramos de THAM en aproximadamente 600 ml. de agua, ajuste el pH de la solución a 6.0 mediante titulación con H_2SO_4 0.2 N y afore con agua a un litro.

Solución de cianuro de potasio (0.1 M). Disuelva - 6.5 g. de KCN y 6.1 g. de THAM en aproximadamente 600 ml. de agua, ajuste el pH de solución a 6.0 mediante titulación con H_2SO_4 0.2 N y afore con agua a un litro.

Solución de formaldehído (37%). Reactivo Fisher - certificado.

Solución de formaldehído-sulfato de calcio. Disuelva 2.2 g. de $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ en aproximadamente 900 ml. de agua, y afore el volúmen a un litro con agua. Mezcle - 100 ml. de formaldehído con 900 ml de la solución de - sulfato de calcio.

Solución de ácido nítrico-nitrato férrico. (0.25 M $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$: 3.1 M HNO_3). Disuelva 50 g. de $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ en 100 ml. de HNO_3 concentrado (reactivo grado analítico, gr. esp. 1.42), añada esta solución a 300 ml. de agua y afore el volumen a 500 ml. con agua.

Solución de patrón de tiocianato. (20 milimolar). Disuelva 1.621 g. de NaSCN en aproximadamente 800 ml. de - agua y afore la solución a un litro. Un mililitro de es-

ta solución contiene 20 milimoles de NaSCN.

Procedimiento.

Ponga 4 g. de suelo en un matraz erlenmeyer de 50 ml. y añada 0.5 ml. de tolueno, 8 ml. de buffer THAM, -- 1 ml. de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1 M. y agite el matraz hasta que se mezcle el contenido. Tape el matraz y pongalo en una incubadora ajustada a 37°C. Después de una hora quite la tapa y añada 10 ml. de solución de formaldehído-sulfato de calcio, agite el frasco y filtre la solución a través de un papel filtro Whatman # 2v. Pipetee 5 ml. del filtrado dentro de un tubo de ensaye, añada 1 ml. de reactivo de nitrato férrico, y mida la absorvancia del color-café del complejo de SCH formado en un colorímetro ajustado a una longitud de onda de 460 mm. Puede usarse un espectrofotómetro Beckman modelo DBG con una celda de -- 1 cm. y una lámpara de tungsteno como fuente de energía.

El contenido de tiocianato del filtrado se calcula usando como referencia una gráfica de calibración hecha con los resultados obtenidos con patrones que contienen 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 milimoles de tiocianato. Para preparar esta gráfica, afore, 0, 2, 4, 6, 8 y 10 ml.

de la solución patrón de tiocianato a un litro en matraces volumétricos y mezcle las soluciones con cuidado. En tonces pipetee alícuotas de 5 ml. de estas diluciones patrón dentro de tubos de ensaye y proceda como se describe para el análisis de tiocianato en el filtrado del sue lo. Si la intensidad del color del filtrado excede al patrón de tiocianato de 1000 milimoles, tome una alícuota más pequeña del filtrado y afore el volumen a 5 ml. con agua antes de añadir 1 ml. del reactivo de nitrato férri co.

Los controles deben trabajarse con cada suelo para descontar el ligero color amarillo derivado del suelo. Pa ra trabajar los controles siga los procedimientos descritos para la actividad Rhodanesa, pero haga la adición de 1 ml. de KCH 0. 1 M. después de la adición de solución de formaldehído-sulfato de calcio.

Cualquier colorímetro o espectrofotómetro que permita medir la intensidad del color a 440-480 nm. puede ser usado para el análisis colorimétrico de tiocianato en el filtrado del suelo. La absorción máxima del color medido es a 460 nm. y el color es estable por lo menos durante-

una hora. Las gráficas de calibración preparadas a partir de las soluciones patrón de tiocianato son altamente reproducibles y son idénticas a aquellas obtenidas cuando los estándares son preparados con amortiguadores de THAM en lugar de agua.

5.8 METODO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA SOLUBILIZACION DE SULFUROS DE METALES PESADOS POR BACTERIAS HETEROTROFICAS DEL SUELO (Michael A.Cole, 1979)

Para el crecimiento de los cultivos, bajo cualquier otra especificación, se usa caldo nutritivo (29) o caldo nutritivo con 0.5% de glucosa (peso/volumen); el medio-sólido es preparado mediante la adición de 15% de agar (peso/vol.). Las cajas usadas para el aislamiento de solubilizadores de PbS se preparan mezclando 15 ml. de agar nutritivo adicionado con glucosa con 50 mg. de PbS-estéril y permitiendo que solidifique se le añade una sobre capa de 15 ml. del mismo medio pero sin PbS. Las cajas son inoculadas repartiendo una dilución apropiada de la muestra de suelo sobre la superficie. Este método permite una separación física entre las células y el PbS.

Si los organismos solubilizan el PbS, el plomo se difunde a través de la sobre capa de agar y es detectable en las células.

La solubilización del sulfuro de metal en un medio líquido se determina en un matríz de Erlenmeyer de 250 ml., que contiene 100 ml. de medio y un tubo de diálisis de 2.5 cm. de diámetro en el cual se colocan 50 mg. del sulfuro de metal. El matríz se inocula y se incuba a 30°C en un agitador rotatorio a 250 rpm. Las muestras se centrifugan durante 10 minutos a 4 300 rpm y el contenido de metal de las células y del cultivo sobrenadante se determinan (ver detalles más adelante). Se incuban en paralelo para todos los experimentos matraces sin inocular que contienen tubos de diálisis con sulfuro de metal para verificar la integridad del tubo de diálisis. El experimento se descarta si cualquier matríz sin inocular muestra un valor de concentración de metal de 0.5 a 0.2-miligramos/mililitro. Todos los experimentos se llevan a cabo por lo menos tres veces. Los sulfuros de metal se preparan dentro de una semana de su uso por medio de la precipitación de una sal de acetato o sulfato de metal con un exceso de Na_2S . El precipitado se lava repetida--

mente con agua destilada y se seca a 100°C. Los sulfuros de metal se esterilizan en una solución acuosa, dentro del tubo de diálisis y se añaden a los medios preesterilizados.

Las concentraciones de metal en los cultivos se determinan por medio de un espectrofotómetro de absorción atómica, después de una digestión de las células o del cultivo sobrenadante en HNO_3 al 50% (vol./vol.) durante 3 horas a 90°C.

Por este mismo método se determinan las concentraciones mínimas inhibitorias de los iones de metales pesados. Los metales son reemplazados como sales de acetato (Pb, Cd y Hg) o sulfato (Zn) los que se adicionan como sales de metal esterilizadas por separado al medio preesterilizado usando una serie de diluciones de dos en dos. Los cultivos se incuban durante 48 horas, La concentración mínima inhibitoria (UIC) se define como la cantidad de metal mas baja que inhibe el crecimiento completamente.

El crecimiento de las células se mide por medio --

del incremento en la absorvancia a 50 nm.

5.9 METODO EXPERIMENTAL PARA MEJORAR UN SUELO SODICO SALINO CON THIOBACILLI (S. W. Jadhav. 1978).

Este es un método de interés práctico ya que se --
aprovecha la capacidad de Thiobacillus thiooxidans y --
Thiobacillus novellus de oxidar el azufre y con ello pro-
vocar una disminución en el pH del suelo y de esta mane-
ra contrarrestar la alcalinidad de los suelos básicos.

Thiobacilli se aísla en el medio de Waksman (7).
Una vez aislados Thiobacillus thiooxidans y Thiobacillus
novellus; se inoculan en el medio de azufre a pH de 6.0
y 5.0 respectivamente (8) en matraces cónicos para te--
ner suficiente número de bacterias para el experimento.
El suelo se mezcla con azufre elemental en polvo 1% - -
(vol/vol) y suspensión de bacterias 25 ml./Kg. de suelo,
y entonces se colocan en crisoles especiales para la tie-
rra (4 Kg. de suelo/crisol) cubiertos con bolsas de po--
lietileno. El suelo se incuba a temperatura ambiente du-
rante un período de 56 días. La humedad del suelo se man-
tiene a 50% de la capacidad de campo a lo largo del pe-

río de incubación añadiendo agua esterilizada en el momento y en la cantidad en que se requiera.

El experimento se lleva a cabo con suelos esterilizados y no esterilizados.

El pH se mide a los 14, 28, 42 y 56 días de incubación. El porcentaje de sodio intercambiable, la conductividad eléctrica y el contenido de azufre como sulfato se miden mediante los métodos descritos por Richards (1968) después de la incubación (56 días).

6. METODOS ANALITICOS

6.1 METODO DE CUENTA EN PLACA.

Se transfieren 10 gramos de muestra de suelo a un matraz que contiene 95 ml. de agua y perlas de vidrio se tapa el matraz y se agita en posición horizontal durante 10 minutos; después de los 10 minutos se agita vigorosamente por unos segundos y se transfieren 10 ml. del centro de la suspensión a un matraz con 90 ml. de agua usando una pipeta estéril de 10 ml. Esto establece una dilución 10^{-2} .

De esta segunda dilución, similarmente se transfieren 10 ml. a los respectivos matraces con 90 ml. de agua para tener una serie de diluciones hasta 10^{-7} .

De la dilución más alta preparada (10^{-7}) se transfieren cantidades de 1 ml. a 5 cajas de petri estériles por medio de una pipeta de 1 ml. Haga transferencias similares de las dos siguientes diluciones más bajas (10^{-6} y 10^{-5}) a otras cajas de Petri. En cada caja se colocan aproximadamente 12 ml. de medio de cultivo. Inmediatamente después de añadir el medio, se gira la caja de Petri con la mano para asegurarse que el medio de cultivo que

de bien mezclado con el inoculo.

Una vez que el agar ha solidificado se invierten -- las cajas y se incuban a 25, 28 ó 30°C durante por lo me- nos 7 días, es preferible de 10 a 14 días.

Si las cajas de las diluciones más altas muestran -- arriba de 300 colonias, la dilución ha sido demasiado ba- ja y si aquellas de la dilución más baja muestran menos- de 30, la dilución ha sido demasiado alta. En cualquiera de los casos deseche todas las cajas. Si las cajas incu- badas aparecen satisfactoriamente, seleccione las cajas- de las diluciones en las cuales se han desarrollado de - 30 a 300 colonias por caja.

Si dentro de este grupo una o dos cajas tiene una ó más colonias de bacterias o de hongos (mayor de 2 cm. de diámetro) se descartan estas cajas sin contarlas.

Con la ayuda de un contador de colonias Quebec se -- cuentan el número total de colonias en cada una de las - cajas de Petri.

Multiplicando el número promedio de colonias en las cajas de una dilución dada por el factor de dilución se obtiene la cuenta total viable por gramo de la muestra de suelo húmedo inicial. Dividiendo la cuenta por gramo de suelo húmedo entre los gramos de suelo seco por gramo de suelo húmedo, se obtiene el resultado en base a suelo seco.

6.2 DETERMINACIONES TURBIDIMETRICA DE SULFATOS (METODO DE JACKSON).

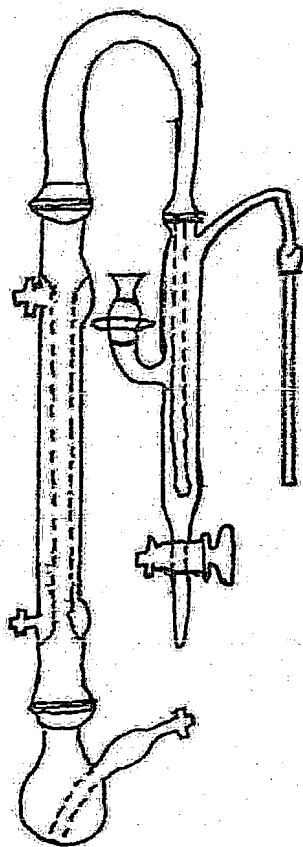
A una muestra de 20 g. de suelo seco al aire contenidos en un matraz Erlenmeyer de 250 ml., se añaden - - 100 ml. de la solución extractora de Morgan (100 g. de acetato de sodio y 30 ml. de ácido acético del 99.5% disueltos y mezclados con 500 ml. de agua, aforados a 1 lt) se agita la suspensión durante media hora y después se filtra a través de un papel Whatman número 43 (o se centrifugan hasta que quede claro). Se transfiere una alícuota de 10 a 20 ml. a un matraz de 25 ml., y la precipitación se verifica adicionando un gramo de cristales de $BaCl_2$ de tamaño adecuado (molidos en un mortero de ágata hasta que pases un tamiz de 0.5 mm. y queden retenidos -

por otro de 0.25 mm) y se añaden a la alícuota que está en el matraz, agitando seguidamente durante un minuto.- En estas condiciones:

- 1.- Si la cantidad de sulfato se encuentra por debajo de 20 ppm se añade un mililitro de una solución al 0.25% de goma de acacia.
- 2.- Si la cantidad de sulfato se encuentra entre 20 y 40 ppm. se añaden 2 ml. de la solución de goma de acacia.

Se afora el volumen de la solución y se agita durante un minuto. Las lecturas de turbiedad (filtro azul en el colorímetro) se leen entre 5 y 30 minutos después de la precipitación, y seguidamente se determina el sulfato con respecto a una curva patrón construida a partir de cantidades conocidas de sulfato.

6.3 MICRODETERMINACION DEL AZUFRE (METODO DE JOHSON Y NISHITA).



Aparato.- El aparato de digestión-destilación, como se muestra en la figura, consiste en un matraz de bo

la, un refrigerante de agua, un tubo en U, una columna de vidrio con 2 llaves y un tubo de salida (4 mm. de diámetro exterior) que llega a un matraz colector. El nitrógeno que penetra dentro del aparato de digestión-destilación, se lava en un matraz (no mostrado en la figura) -- que se coloca entre el tanque de nitrógeno y el brazo -- del matraz de bola, haciéndole burbujear a través de una solución de cloruro de mercurio en permanganato de potasio al 2%, para eliminar posibles trazas de gases de azufre. Para prevenir un burbujeo excesivo dentro del matraz de bola es esencial que el tubo por el cual fluye el gas que está dentro del matraz de bola termine a una distancia aproximada de 3 a 5 mm. del fondo del matraz.

El tubo desmontable que llega la matraz colector, es conectado al brazo de la columna de vidrio con 2 llaves mediante una pieza corta de tubo de hule. El hule debe estar libre de compuestos de azufre, para ello se hierve con un alcali diluido y se lava cuidadosamente.

Espectrofotómetro y colorímetro.- Se usa un espectrofotómetro Beckman modelo B con celdas de 1 cm; datos comparativos sobre un valor limitado son dados también --

usando un colorímetro fotoeléctrico Klett-Summerson con una celda de 4 cm. y un filtro No. 66.

Reactivos.- Mezcla reductora.- Coloque 15 gramos de fósforo rojo en 100 mililitros de ácido yodhídrico (gravedad específica 1.7, grado metoxilo), y 75 mililitros de ácido fórmico al 90% en un matraz de bola de 250 mililitros. Se introduce una corriente de nitrógeno hacia el fondo del matraz, para eliminar el sulfuro de hidrógeno involucrado y también para prevenir el vacío. Caliente la mezcla lentamente a 115°C - 117°C durante 1 a 1.5 horas. Tiempos largos de calentamiento dan como resultado una gran reducción del volumen del reactivo; tiempos cortos de calentamiento dan como resultado un reactivo de poca estabilidad y bajo poder reductor.

Una reducción en el volumen de aproximadamente 30% se presenta durante la preparación del reactivo. El reactivo preparado de esta manera es estable por 2 o 3 semanas y puede ser usado con precisión y sensibilidad reductora.

Solución purificadora del nitrógeno.- Añada un exceso de cloruro de mercurio, 5 a 10 g. por 100 ml. a una solución al 25% de permanganato de potasio.

Solución para lavar de pirogalol-fosfato de sodio.-

Disuelva 10 g. de monofosfato de sodio y 10 g. de pirogalol en 100 ml. de agua destilada libre de azufre con la ayuda de una corriente de nitrógeno burbujeada a través de la solución. Prepárese diariamente.

Agua destilada libre de azufre.- Si es necesario, - prepárese destilando agua que contenga permanganato alcalino en un alambique de vidrio.

Solución absorbente de sulfuro de acetato de sodio y acetato de zinc.- Disuelva en agua libre de azufre, - 50 g. de acetato de zinc dihidratado y 12.5 g. de acetato de sodio trihidratado. Afore el volumen a 1 lt. y filtre.

Solución de aminodimetilanilina;- Disuelva 2 g. de sulfato de p-aminodimetilanilina en 150 ml. de agua destilada. Añada 400 ml. de ácido sulfúrico concentrado. - Enfríe y afore el volumen a 2 lt.

Solución de sulfato férrico de amonio.- Añada a - 25 g. de sulfato férrico de amonio 5 ml. de ácido sulfúrico concentrado y 195 ml. de agua destilada.

Solución patrón de sulfato.- Prepare una solución que contenga 5.434 g. de sulfato de potasio por litro, usando agua destilada libre de azufre. Un mililitro de esta solución contiene un miligramo de azufre.

Lubricante molido libre de azufre.- Mezcle aproximadamente 5 g. de lubricante de silicón Dow-Corning con 10 ml. de un volumen igual de ácido yodhídrico y ácido hipofosforoso. Caliente la ebullición con agitación frecuente durante 45 minutos. Al final del período de ebullición vacíe la mezcla ácida y lave el lubricante cuidadosamente con agua libre de azufre.

Procedimiento.- Lubrique todas las juntas con una cantidad mínima de lubricante libre de azufre, coloque 10 ml. del reactivo de pirogalol-fosfato de sodio en la columna de vidrio con 2 llaves; añada 10 ml. de la solución acetato de sodio -acetato de zinc a 70 ml. de agua destilada libre de azufre en un matraz volumétrico con tapa de vidrio de 100 ml. al que se usa como matraz colector, y dentro del cual se coloca al tubo pequeño que va conectado al brazo de la columna de vidrio. Transfiera una alícuota del patrón o de la muestra al matraz de

digestión, no excediendo de 2 ml, en volumen (si es necesario usar grandes volúmenes, evapore casi a sequedad) y que no contenga más de 300 microorganismos de azufre - al matraz de bola. Resuspenda el fósforo rojo de la mezcla reductora mediante la agitación y añada 4 ml, con -- una pipeta. Rápidamente una el condensador al matraz de bola conectele el tubo que viene del matraz por el cual fluye el nitrógeno. Deje fluir el agua en el refrigerante y ajuste el flujo de nitrógeno a través del sistema a una velocidad de 100 a 200 ml. por minuto. Comience el calentamiento y mantengalo a ebullición lenta durante -- una hora. Quite el matraz colector. Usando una pipeta de liberación rápida añada prontamente 10 ml. de solución de p-aminodimetilanilina al matraz colector. Tape, mezcle, añada 2 ml. de solución de sulfato férrico amonio, - tape, mezcle otra vez, afore a un volumen determinado y mezcle cuidadosamente. Lea después de diez minutos pero dentro de 24 horas en un colorímetro o espectrofotómetro a 670 nm. El sulfuro de hidrógeno resultante se determina espectrofotométricamente con azul de metileno.

6.4 EXTRACCION Y DETERMINACION COLORIMETRICA DE TIOSULFATO Y TERATIONATO EN SUELOS. (Y.M.Nor, 1977a)

REACTIVOS.

Solución de cloruro de litio.- LiCL (0.1 molar).

Disuelva 4.2 de LiCL en aproximadamente 800 ml. de agua y afore el volumen a 1 lt. con agua.

Solución patrón de tiosulfato de sodio.- Disuelva - 3.871 g. de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en aproximadamente 800 ml. de Li.CL 0.1 molar y ajuste el volumen a 1 lt. con el mismo reactivo. Esta solución contiene 1 mg. de azufre como -- tiosulfato por mililitro.

Solución de cianuro de potasio.- (0.1 molar). Disuelva 6.51 g. de KCN en aproximadamente 800 ml. de agua y ajuste el volumen al 1 lt., con agua.

Solución de cloruro cúprico.- (0.033 molar). Disuelva 5.63 g. de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en cerca de 800 ml. de agua - y ajuste el volumen a 1 lt. con agua.

Solución de ácido nítrico-nitrato férrico.-

$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.25 molar; HNO_3 3.1 molar. Disuelva 50 g. de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml. de HNO_3 concentrado (reactivo grado analítico, gr. esp. 1.42), añada esta solución a 300 ml. de agua y ajuste el volumen a 500 ml. con agua.

Agua.- Use agua destilada y deionizada.

El tetratiónato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$) usando es sintetizado como lo describe Trudinger (1961). Para preparar este compuesto, 50 g. de tiosulfato de sodio - - - ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) se disuelven en 100 ml. de agua y se oxidan con iodo. Se añade un exceso de acetato de potasio, y el tetratiónato de potasio precipita mediante la adición de 4 volúmenes de etanol absoluto. El $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$ preparado se recristaliza tres veces con HCL 0.5 N.

Procedimiento.

Ponga 10 g. de suelo en un matraz de 250 ml., añada 50 ml. de LiCL 0.1 molar, tape el matraz, agite el contenido durante 1 hora y filtre (papel filtro Whatman # 42) la suspensión resultante. Si el extracto obtenido contiene materiales coloidales, filtre el extracto

a través de una membrana filtro Metricel GA-8 de 0.2 micras.

Para determinar el tiosulfato más tetrathionato, transfiera una alícuota de 1 a 20 ml. del extracto que contiene 25-250 microgramos de azufre como tiosulfato o tetrathionato a un matraz volumétrico de 25 ml., añada 1 ml. de KCN 0.1 molar, agite el matraz para mezclar el contenido y después de 15 minutos, añada 2 ml. de CuCl_2 0.033 molar y 1 ml. de reactivo de $\text{Fe}(\text{NO}_3)\text{-HNO}_3$. Afore a un volumen de 25 ml. con LiCl 0.1 molar, invierta el matraz varias veces para mezclar el contenido, y después de un minuto mida la absorbancia del color café del complejo de tiocianato de fierro formado usando un espectrofotómetro ajustado a una longitud de onda de 460 nm.

Para determinar el tetrathionato, se sigue el procedimiento descrito, pero se omite la adición de 2 ml. de CuCl_2 0.033 molar.

Calcule el contenido de tiosulfato más tetrathionato o tetrathionato de la alícuota analizada usando como-

referencia una gráfica de calibración hecha a partir de los resultados obtenidos con patrones que contienen 0,50, 100, 150, 200 y 250 microgramos de azufre como tiosulfato. Para preparar esta gráfica, diluya una alícuota de 25 ml. de la solución patrón de azufre como tiosulfato a 1 lt., con LiCl 0.1 molar, entonces pipetee alícuotas de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 ml. de esta dilución patrón dentro de matraces volumétricos de 25 ml. y proceda como se describe en la determinación de azufre como tiosulfato más azufre como tetrionato. Corrija las medidas de absorvancia del patrón con un blanco obtenido usando LiCl 0.1 molar e invirtiendo el orden de adición de los reactivos específicos.

Para calcular la cantidad de azufre como tetrionato presente en la muestra, multiplique los resultados obtenidos con el procedimiento en ausencia de Cu^{2+} por 1.75:

Las medidas de absorvancia se hacen usando un espectofotómetro Beckman modelo DB-6 con una celda de 1 cm. y una lámpara de tungsteno como fuente de energía.

Determinación en suelos de la oxidación de azufre a tiosulfato y tetraciónato.

Coloque una muestra de 20 g. de suelo secado al aire dentro de un matraz de 250 ml., agregue 0.4 g. de una mezcla 1:99 de azufre elemental (sublimado); bolitas de vidrio (de malla 130) 200 ppm de S en base al suelo) y mezcle con cuidado; añada 5 ml. de agua goteando hasta humedecer la muestra de suelo totalmente, e incube la muestra a 30°C durante varios períodos de tiempo. Los controles se preparan en la misma forma sin la adición de azufre. El azufre parcialmente oxidado y el sulfato se extraen con 100 ml. de LiCl 0.1 molar (filtrado a través de un papel filtro Whatman # 42 después de agitarse durante una hora). Para asegurar la ausencia de materiales coloidales en el extracto, éste se filtra a través de un filtro membrana metricel GA-8 de 0.2 micras. Al extracto obtenido se le determina tiosulfato y tetraciónato por el método que se describe anteriormente. El azufre como sulfato se determina por el método de azul de metileno de Johnson y Nishita (1952) a partir del mismo extracto de suelo y a este resultado se le sustrae el azufre como tiosulfato y el azufre como tetraciónato cuantificados.

7.- MEDIOS DE CULTIVO.

7.1 Medio de Beijerinck. (Waksman, 1922)

Agua corriente.....	1000 cc.	NH ₄ Cl.....	0.1 gm.
Na ₂ S ₂ O ₃	5.0 gm.	NaHCO ₃	1.0 gm.
MgCl ₂	0.1 gm.	Medio no esterilizado.	
Na ₂ HPO ₄	0.2 gm.		

7.2 Modificación al medio de Beijerinck. (Waksman, ---- 1922). Este medio es el mismo que el 7.1, con la adi--- ción de 1% de CaCO₃, pesado por separado, o 0.25 gm. de CaCl₂ por litro.

7.3 Medio sólido de Beijerinck. (Waksman, 1922).

Agua corriente.....	1000 cc.	NH ₄ Cl.....	0.1 gm.
Na ₂ S ₂ O ₃	5.0 gm.	Agar.....	20.0 gm.
K ₂ HPO ₄	0.1 gm.	con o sin 2% de CaCO ₃ .	
NaHCO ₃	0.2 gm.		

7.4 Medio de Jacobsen. (Walsman, 1922).

Agua destilada.....	1000 gm.	MgCl ₂	0.2 gm.
K ₂ HPO ₄	0.5 gm.	CaCO ₃ o MgCO ₃ ...	20.0 gm.
NH ₄ Cl.....	0.5 gm.	Azufre precipitado 10 gm.	

7.5 Medio de Lieske. (Waksman, 1922).

Agua destilada.....	1000 gm.	KNO ₃	5.0 gm.
Na ₂ S ₂ O ₃	5.0 gm.	NaHCO ₃	1.0 gm.
MgCl ₂	0.1 gm.	CaCl ₂ , FCl ₃	Trazas.
K ₂ HPO ₄	0.2 gm.		

7.6 Medio de Trautwein, (Waksman, 1922).

Agua destilada.....	1000 gm.	HNO ₃	1.0 gm.
Na ₂ S ₂ O ₃	2.0 gm.	NH ₄ Cl.....	0.1 gm.
MgCl ₂	0.1 gm.	NaHCO ₃	1.0 gm.
Na ₂ HPO ₄	0.2 gm.		

7.7 Medio de Waksman. (Waksman, 1922).

Agua destilada.....	1000 cc.	MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.5 gm.
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0 gm.	FeSO ₄	0.01 gm.
K ₂ HPO ₄	1.0 gm.	Azufre.....	10.0 gm.
KCl.....	0.5 gm.	Ca ₃ (PO ₄) ₂	10.0 gm.

7.8 Primera modificación al medio de Waksman. (Waksman, 1922). Para T. thiooxidans.

Agua destilada.....	1000 cc.	FeSO ₄	Trazas.
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2 gm.	KH ₂ PO ₄	3.0 gm.

MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0.5 gm.	Azufre.....	10.0 gm.
CaCl ₂	0.25 gm.	pH.....	4.0 gm.

7.9 Segunda modificación al medio de Waksman.

(Waksman, 1922).

(pH de 3.0)

(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2 gm.	Azufre.....	10.0 gm.
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0.5 gm.	KH ₂ PO ₄ , 1.0M.....	80 cc.
		(Solución)	
FeSO ₄	0.01 gm.	H ₃ PO ₄ , 1.0 N....	20 cc.
		(Solución)	
Ca ₃ (PO ₄) ₂	2.5 gm.	Agua destilada..	1000 cc.

Nota: en los medios 7.7, 7.8 y 7.9 el azufre y el -----

Ca₃(PO₄)₂ se pesan por separados en frascos individuales. Se esterilizan en 3 días consecutivos con vapor durante 30 minutos.

7.10 Medio sólido de Waksman para T. thiooxidans. ---

(1922).

Agua destilada.....	1000 cc.	CaCl ₂	0.25 gm.
Na ₂ S ₂ O ₃	5.0 gm.	KH ₂ PO ₄	3.0 gm.
NH ₄ Cl.....	0.1 gm	Agar.....	20.0 gm.

7.11 Medio Básico de sales de Allen (Allen, 1959).

Macroelementos.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.01 M	Fe.....	4.0 mg/L
KH_2PO_4	0.002 M	Mn.....	0.5 mg/L
MgSO_4	0.01 M	B.....	0.5 mg/l
CaCl_2	0.0005 M	Zn.....	0.05 mg/L
H_2SO_4	0.001 M	Cu.....	0.02 mg/L
		Mo.....	0.01 mg/L
		V.....	0.01 mg/L

7.12 Medio de Weiringa para microorganismos que oxidan el azufre. (Weiringa, 1966).

Medio con azufre precipitado in situ a partir de polisulfuro. Se usa el siguiente medio basal:

K_2HPO_4 , 500 mg; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 500 mg; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 250 mg; CaCl_2 , 100 mg; silicato de Na, 0.1 ml; Fe EDTA, 5 mg; - solución de microelementos de Gaffron (Hughes y col. -- 1958), 0.8 ml; agar dializado (oxid #3), 15 g; agua -- destilada. Aproximadamente de 25-30 ml. de medio basal- derretido, estéril y a una temperatura de 60°C se vier-- ten dentro de cajas de Petri de 10cm. que contienen de- 1 a 1.5 ml. de HCl 0.1 N. Después de mezclar el medio -

se deja solidificar. Una capa delgada 10 ml de medio basal suplementado con polisulfuro, se vierten encima de la primera capa. La colución de polisulfuro se prepara mediante la saturación de una solución saturada de Na_2S en agua con azufre elemental, seguida de la esterilización. Para la preparación del medio de la capa superior bastan dos mililitros de esta solución por litro de medio basal. El HCl de la capa inferior se difunde a través de la capa de encima y precipita el azufre del polisulfuro como una suspensión muy fina. El H_2S que llegara a formarse se elimina calentando la caja en un baño de agua.

7.13 Medio S' para Thiobacillus (Postgate, 1966).

Azufre.....	10 g.	Agua destilada 1 litro.
(o $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).....	5 g.	Se esteriliza con vapor
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2-4 g.	si el azufre es el sus--
KH_2PO_4	2-4 g.	trato, de otra manera se
CaCl_2	0.25 ig.	usa el autoclave.
MgSO_4	0.5 g.	Para el valor del pH ver
FeSO_4	10 mg.	el inciso 4.1.5.

7.14 Medio R para *T. denitrificans* únicamente (Postgate, 1966).

NH_4Cl	0.5 g.	Agua corriente 1 litro.
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5 g.	Ajuste el pH a 7; las -
KH_2PO_4	2.0 g.	soluciones de hierro,
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5.0 g.	fosfato y bicarbonato se
KNO_3	2.0 g.	esterilizan independien-
NaHCO_3	1.0 g.	temente.
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.0 g.	

7.15 Medio F para Thiobacillus (postgate, 1966).

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.15 g.
KCl.....	0.05 g.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g.
KH_2PO_4	0.05 g.
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.01 g.

Agua corriente 1 litro. Añada 10 ml. de una solución al 10% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ esterilizada por separado; compruebe que el valor del pH sea de alrededor de 3.5 después de la inoculación.

NOTA: El rendimiento de *Thiobacillus* se incrementa si-

se añade una solución de elementos traza al medio de -- cultivo. La cual contiene: EDTA, 50 g.; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 22 g.; $CaCl_2$, 5.54 g.; $MnCl \cdot 4H_2O$, 5.06 g.; $FeSO_4 \cdot H_2O$, 4.99 g.; $(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 1.1 g.; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1.57 g.; --- $COCl_2 \cdot 6H_2O$, 1.61 g.; agua, 1 litro; a un pH de 6 con -- KOH. Se añade a una parte por 100, este complemento su- ple al hierro inorgánico, el cual puede ser omitido en- los medios S y R arriba mencionados.

7.16 Caldo Bacto-Thiobacillus.

Tiosulfato de sodio..... 5.0 g.
Sulfato de amonio..... 0.4 g.
Fosfato monopotásico..... 4.0 g.
Cloruro de calcio.....0.25 g.
Sulfato de magnesio..... 0.5 g.
Sulfato ferroso.....0.01 g.

Para rehidratar el caldo Bacto-Thiobacillus, suspenda - 10.2 g. en 1000 ml. de agua destilada.

7.17 Agar Bacto-Thiobacillus.

Tiosulfato de sodio..... 5.0 g.
Sulfato de amonio..... 0.5 g.
Fosfato monopotásico..... 4 0 g.

Cloruro de Calcio..... 0.25 g.
Sulfato de magnesio..... 0.5 g.
Sulfato ferroso..... 0.01 g.
Bacto-Agar.....12.5 g.

Para rehidratar el Agar Bacto-Thiobacillus, suspenda --
22.7 g. en 1000 ml. de agua destilada.

7.18 Medio B para bacterias que reducen el sulfato ---
(Postgate, 1966).

KH_2PO_4 0.5 g. Acido Ascórbico...1.0 g.
 NH_4Cl 1.0 g. Acido
 CaSO_4 1.0 g. tioglicólico.....1.0 g.
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0.5 g.
Lactado de Na..... 3.5 g.
Extracto de levadura.... 1.0 g.

Agua corriente 1 litro; ajuste el pH entre 7 y 7.5. Es--
te medio siempre contiene un precipitado. Debe añadirse
 NaCl para especies marinas, o usar agua de mar en lugar
de agua corriente.

7.19 Medio C para bacterias que reducen el sulfato.
(Postgate, 1966).

KH_2PO_4	0.5 g.	Estracto de
NH_4Cl	1.0 g.	levadura.....1.0 g.
Na_2SO_4	4.5 g.	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0.1 g.
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.06 g.	Citrato de
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.06 g.	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$0.3 g.
Lactato de Na.....	6.0 g.	

Agua destilada 1 litro, pH 7.5 ± 0.2 . Este medio puede enturbiarse después del autoclaveado pero se aclarará al enfriarse. Añadir NaCl extra para especies de aguas saladas.

7.20 Medio D para bacterias que reducen el sulfato ---
(Postgate, 1966).

KH_2PO_4	0.5 g	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0.1 g.
NH_4Cl	1.0 g.	Piruvato de Na....3.5 g.
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 g.	o Cloruro de
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.6 g.	colina.....1.0 g.
Estracto de		
levadura.....	1.0 g.	

Agua destilada 1 litro, pH 7.5 ± 0.2 . Esterilizar por filtración; añadir NaCl extra para especies de aguas saladas.

7.21 Medio E para bacterias que reducen sulfato

(Postgate, 1966).

KH_2PO_4	0.5 g.	Acido ascórbico..	1.0 g.
NH_4Cl	1.0 G.	Acido	
Na_2SO_4	1.0 g.	Tioglicólico.....	1.0 g.
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0 g.	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g.
$\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.0 g.	Agar.....	15 g.
Lactato de Na.....	3.5 g.		
Extracto de levadura..	1.0 g.		

Agua corriente 1 litro, ajuste el pH a 7.6 con NaOH --- después de hervir para disolver el agar. Autoclaveado - y se usa antes de que solidifique. Añada NaCl extra para especies de agua salada.

7.22 Medio T para bacterias sulfurosa fotosintéticas.

(Postgate, 1966).

KH_2PO_4	1 g.	NaCl.....	10 g.
NH_4Cl	1 g.	Agua destilada.....	1 l.
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5 g.		

(Cuando sea necesario permítase en este volúmen - las adiciones dadas abajo).

Elementos traza: Añada 1 ml de la siguiente solución - (esterilizada por separado) a cada litro del medio básico T: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.5 mg.; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mg; $\text{NiCl}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 mg.; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g.; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.005 g.; $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.005 g.; agua destilada, 1.1.

Adiciones posteriores:

Las soluciones siguientes deben hacerse más concentradas, esterilizadas por separado mediante filtración y deben ser añadidas al medio básico T inmediatamente antes de usarse.

(a) NaHCO_3 : 2 g/l de medio básico para todas las especies. Esterilizada justo antes de usarse.

(b) $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$: 1g/l para Chlorobium limicola --- 0.2 g./l para Chbrobium thiosulfatophilum, Chromatium, Thiopedia.

(c) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 1 g./l para Chlorobium thiosulfatophilum, Chromatium, Thiopedia.

(d) Malato de Sodio: 1 g./l para Chromatium, ---- Thiopedia.

(e) H_3PO_4 a pH de 7 - 7.2 para especies Chlorobium y 8.0 - 8.4 para Chromatium, Thiopedia.

Nota: Chlorobium limicola crece mejor si el medio completo es preparado el día anterior a la inoculación y mantenido toda la noche en un refrigerador (en botellas llenas); inmediatamente antes de la inoculación una adición posterior de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ es hecha (1 gota de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ /10 ml. de medio al 10%).

7.23 Medio P para bacterias sulfurosas fotosintéticas.
(Postgate, 1966).

Solución 1.

CaCl_20.4 g. Esterilizada en ---
Agua destilada.....1.1 . autoclave.

Solución 2.(a)

EDTA, 0.5 g.; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g.; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10-
mg.; $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 3 mg.; H_3BO_3 , 30 mg.; $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mg.
 $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mg.; $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 mg.; $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 -
mg.; Agua destilada 1 l.; disuelva en EDTA PRIMERO.

Solución 2(b).

Cianocobalamina..... 2 mg. Agua destilada 100 ml.

Solución 2(c).

KH_2PO_41 g. Disuelva en 70 ml. de
agua destilada más --

KCl..... 1 g. 30 ml. de solución 2(a) más

NH₄Cl..... 1 g. 3 ml. de solución 2(b).

MgCl₂.6H₂O... 1 g.

Solución 3.

NaHCO₃.....4.5 g. Sature con CO₂ por 30 min. --

Agua por burbujeo. Mezcle con las

destilada...900 ml. soluciones 2 y filtre y este

rilize sobre la presión de -
CO₂.

Solución 4.

Agua destilada..3 g. Puede ser autoclaveado.

Na₂S.9H₂O....200 ml. Parcialmente neutralizado --
con H₂SO₄ estéril antes de -
usarse.

Mezcle las soluciones 2 + 3 con la solución 1 en-
la proporción de 2 : 1. Añada 2.4 a 4.8 por ciento ---
(v/v) de solución 4 de acuerdo a los requerimientos de
sulfuro del organismo. Use pH de 6.7 - 6.9 para las bac
terias verdes, 6.9 - 7.2 para las púrpuras. En botellas
llenas y fuertemente cerradas con el medio P. pueden --
ser guardadas en las obscuridad por varios meses.

7.24 Medio de Vishniac y Santer. (Vishniac y Santer, 1957).

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10.0 g.	NH_4Cl	0.4g.
KH_2PO_4	4.0 g.	Solución de	
K_2HPO_4	4.0 g.	metales traza ..	10.0 ml.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.8 g.	H_2O	10000 ml.

Solución de metales traza: Acido etiliendiamin -- tetra acético 50.0 g., $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22.0 g., CaCl_2 5.54 g., $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5.06 g., $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.99 g., $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.10 g., $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.57 g., $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.61 g., H_2O 1000 ml. Ajuste el pH a 6.0 con KOH.

En dos o tres días a 30°C el cultivo fluido se --- torna turbio y ácido. Se toma una asada de la superfi--- cie y se esparce en un medio de agar de la misma compo--- sición. Dentro de 48 horas pequeñas colonias opacas apa--- recen, con un tinte anaranjado en el centro de las colo--- nias. En el tercer día las colonias son blancas o ama--- rillas con azufre precipitado. Dos subcultivos sucesi--- vos de una sola colonia aseguran una pureza bacterioló--- gica.

7.25 Medio de Porter y colaboradores (Porter, Wilherlm, y Tresner, 1960).

Glicerol	20 g.	FeSO ₄ 7H ₂ O.....	0.1 g.
L-arginina	2.5 g.	MgSO ₄ 17H ₂).....	0.1 g.
NaCl.....	1.0 g.	Agar	20.0g.
CaCO ₃	0.1 g.	Agua destilada	1.0 l.

7.26 Medio de Czapek Dox/polisulfuro. (Wainwright 1978)

Sacarosa	30.0 g.	Cloruro de potasio	0.5 g.
Nitrato de sodio	3.0 g.	Sulfato ferroso ...	0.01 g.
Fosfato dipotásico	1.0 g.	Agar	15.0 g.
Sulfato de magnesio	0.5g.	Agua destilada ...	1.0 l.

pH final de 6.8

Aproximadamente de 25-30 ml. de este medio derretido y estéril a una temperatura de 60°C. se vierten dentro de cajas de Petri de 10 cm. que contienen de 1 a 1.5 ml. de solución 0.1N de HCl. Después de mezclar el medio se deja solidificar. Una capa delgada de 10 ml. de este medio suplementado con polisulfuro, se vierten enci-

ma de la primera capa. La solución de polisulfuro es -- preparada mediante la saturación de una solución saturada de Na_2S en agua con azufre elemental, seguida de la esterilización. 2ml. de esta solución por litro de medio basal bastan para la preparación del medio de la capa de encima. Se le añade estreptomycin (5 mg./l) para ayudar al control de la contaminación bacteriana.

7.27 Medio A. para *Thiobacillus thiooxidans*. (ATCC).

Azufre en polvo10.0 g.	CaCl_20.25 g.
ó $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_7$ 5.0 g.	FeSO_40.01 g.
KH_2PO_4 4.0 g.	Agua destilada	1.0 l.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g.	pH7.0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4 g.		

7.28 Medio para *Thiobacillus thiooxidans* (ATCC)

NH_4Cl0.1 g.	CaCl_20.1 g.
KH_2PO_43.0 g.	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$5.0 g.
MgCl_20.1 g.	Agua destilada1.0 l.

Ajuste el PH a 4.2. Esterilice con vapor durante--

30 minutos, por tres días sucesivos.

7.29 Medio de caldo nutritivo.

Estracto de carne3.0 g. Agua destilada ..1000ml.
Peptona5.0 g.

Suspender el extracto de carne y la peptona en el agua y calentar para disolver a 60°C. Enfriar, ajustar el pH a 7.0 - 7.2. esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

7.30 Medio de Czapek Dox Agar.

Sacarosa 30.0 g.	Cloruro de potasio 0.5 g.
Nitrato de sodio 3.0 g.	Sulfato ferroso 0.01 g.
Fosfato dipotásico 1.0 g.	Agar 15.0 g.
Sulfato de magnesio 0.5. g.	pH7.3
	Agua destilada ...1.0 l.

7.31 Medio C de Butlin y col (1949) de lactato de sodio extracto de levadura-sulfato. Wakao (1972).

K_2HPO_4	0.5 g	Lactato de sodio	3.5 g
NH_4Cl	1.0 g	extracto de levadura ..	1.0 g
Na_2SO_4	1.0 g	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1 g	agar	15.0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.0 g		

Estos componentes se disuelven en un litro de agua destilada y el pH del medio se ajusta a 7.2-7.4 con una solución de NaOH. Después de esterilizar el medio en autoclave se suplementan por separado los agentes reductores (0.01% de tioglicolato de sodio y 0.01% de ascorbato de sodio).

C O N C L U S I O N E S

En la literatura revisada se encontraron medios de cultivo adecuados para el aislamiento y cuantificación de los microorganismos del azufre, los cuales han sido utilizados por diversos investigadores con buenos resultados.

Los métodos para la determinación cuantitativa del número viable de bacterias que reducen el sulfato ya han sido discutidas por diversos autores y están divididos en dos grupos: los métodos de siembra en medios líquidos y los métodos de siembra en placa y cuantificación de colonias específicas que oscurecen el medio de cultivo.

En los métodos de cuenta por dilución el número de bacterias que reducen el sulfato se determina mediante diluciones de series de diez en medios líquidos o semi-sólidos que contengan lactato o sales inorgánicas, aplicando el método del número más probable. En el caso de los métodos de cuenta de colonias, se usa el medio selectivo de agar nutritivo para obtener colonias negras -

discretas después de la incubación, a partir de las cuales se calcula el número viable de organismos.

Un buen número de medios líquidos y sólidos han sido desarrollados para aislar y enumerar a Thiobacillus y bacterias autótrofas que oxidan el azufre. Todos carecen de una fuente de carbono, pero contienen azufre elemental o tiosulfato y son usados en conjunción con las técnicas de dilución o del número más probable. Es frecuente el asumir erróneamente que todas las bacterias que se desarrollan en la superficie del medio quimioautótrófico son Thiobacillus. De cualquier manera, estas bacterias generalmente se presentan en cantidades reducidas en los suelos y usualmente es necesario esparcir diluciones bajas de suspensiones de suelo en la superficie del medio para poder cuantificar. Existe entonces peligro de que se acarreen suficientes nutrientes en la suspensión del suelo y éstos permiten el crecimiento de bacterias heterótrofas. Para evitar la posibilidad de contar colonias heterótrofas, las colonias desarrolladas se resiembran por duplicado en un medio fresco y es específico para el crecimiento de microorganismos autotró

fos, eliminando de esta manera los materiales aportados por la suspensión inicial del suelo.

El medio de azufre descrito por Weiringa (12) es útil debido a que nos da una indicación visual directa de la presencia de bacterias que oxidan el azufre.

Con el empleo de este medio generalmente sólo se aislan bacterias quimioautótrofas ácido sensitivas que utilizan el azufre en tanto que para el aislamiento de bacterias que sólo usan el tiosulfato, o que son lentas para utilizar el azufre, no es recomendable este método.

El medio de Weiringa también se emplea para aislar a los microorganismos heterótrofos que oxidan el azufre de acuerdo a la modificación hecha por Wainwright. (26).

Las técnicas para la determinación de azufre total y compuestos del azufre (sulfato, tetracionato y tiosulfato) en el suelo y los medios de cultivo, también se revisaron y existen técnicas adecuadas para llevar a --

cabo tales mediciones.

Para la determinación de la actividad bioquímica - de los microorganismos del ciclo del azufre, se encontraron medios de cultivo adecuados y diversos métodos utilizados para estudiar algunos aspectos de la actividad bioquímica de estos microorganismos. Sin embargo, existen - problemas teóricos interesantes por resolver, tales como el papel de los microorganismos heterótrofos en la oxidación del azufre, y la ruta bioquímica involucrada.

Hay también interés y necesidad de un modelo real del ciclo global del azufre y de investigar y determinar las formas y cantidades de azufre emitidas al medio ambiente en los sistemas acuáticos y terrestre, ya que --- existe duda en lo concerniente a la confiabilidad de la mayoría de datos publicados en lo referente a las formas y cantidades del azufre en el aire, debido a que la mayoría de los métodos para la determinación de los compuestos de azufre en el aire deben ser considerados en un estado de evolución ya que la información basada en la exactitud, precisión y confiabilidad de estos métodos es muy limitada.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Abdel-Malek y Rizk S.G. Culture of Desulphovibrio desulphuricans. Nature, Lond. 185, 635-636.(1960).
- 2.- Allen, M.B. Studies with Cyanidium caldarium and - anomalously pigmented chlorophite. Archiv fur Microbiologie, 32: 270. (1959).
- 3.- Bajpai. Effect of Salinity and Alkalinity of soil on some important microbial activities. J. Indian-Soc. Soil Sci. Vol. 27 (2): 197-198, (1979).
- 4.- Banwart, W. L. y Bremmer J. M. Formation of Volatile sulfur compounds by microbial decomposition of sulfur containing amino acids in soils. Soil Biol. Biochem. Vol. 7: 159-64 (1975).
- 5.- Bollen, Walter B. Sulfur oxidation and respiration in 54-year old soil samples. Soil Biol. Biochem. - Vol. 9: 405-10 (1977).
- 6.- Burton, S.D. y Morita, R. Y. J. Bacteriology. 88: 1755 (1964).
- 7.- Butlin K. R., Adams M. E. y Thomas, M. J. gen. Microbiol. 3: 46. (1949).
- 8.- Cataldi, M. S. Rev. Inst. Bact. Buenos Aires 9:393 (1940).

- 9.- Catalogo A.T.C.C. (American Type Culture Collection),
pág. 65-66.
- 10.- Cochran, W.G. Estimation of bacterial densities by
means of the "Most Probable Number". Biometrics. -
6: 105-116 (1950).
- 11.- Cole, M.A. Utilization of heavy metal sulfides by
heterotrophic soil bacteria. Soil Science. 127: 313
(1979).
- 12.- Cook T.M.J. Bacteriol. 88: 620 (1964).
- 13.- Cooper S.C. The mixed indicator bromocresol green
methyl red for carbonates in water. Ind. Eng. Chem
Analyt Ed. 13: 446-470 (1941).
- 14.- Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Rea-
gents for Microbiological clinical Laboratory Pro-
cedures 9th Edition. pág. 30-31. (1953).
- 15.- Fauré - Fremiet, E. y Rouiller, Ch. exp. Cell Res. -
14: 29. (1958).
- 16.- Faust L. y Wolfe R.S. J. Bact. 81: 99 (1960).
- 17.- Fliermans, C.B. y Thomas D.B. Ecology of sulfur --
oxidizing bacteria in hot acid soils. Journal of -
bacteriology. 11, 343 (1972).

- 18.- Frederick L.R. Starkey R.L. y Segal W. Soil Science Soc. Am. Proc. 21, 287-292. (1957).
- 19.- Hesse, P.R. The effect of colloidal organic matter on the precipitation of barium. Analyst, 82: 710 (1977).
- 20.- Hockenhull, D.J.D. Biochem, Biophys. Acta 3, 326-35. (1949).
- 21.- Jackson, M.L. Análisis químico de suelos. 3a. Ed., Ediciones Omega, S.A. Pág. 81. (1976).
- 22.- Jadhav, W. Amelioration of a saline - sodic soil - with Thiobacilli. J. Indian Soc. Soil Sci. Vol. 26 (2): 228-9 (1978).
- 23.- Johnson, C.M. e Hideo Nishita. Anal. Chem. 24:736 (1952).
- 24.- La Riviere, J.W. Anreicherungskultur Muttantenauslese (E. Schlegel, H.G. y Kroger E.) Stuttgart; Fischer, pág. 17 (1965).
- 25.- Manual de procedimientos de laboratorio y de productos B.B.L. Versión española de la redacción de Becton, Dickinson de México, S.A. de C.V. impreso y editado en México por Editores Asociados, S.A. pág. 45 (1965).

- 26.- Nor, Y.M. y M.A. Tabatabai. Extraction and colorimetric determination of thiosulfate and tetrathionate in soil Science 122: 171-8 (1977a).
- 27.- Pepper I.L. y Miller, R.H. Comparison of the oxidation of thiosulfate and elemental sulfur by two heterotrophic bacteria and Thiobacillus thiooxidans. Soil Science 126: 9-14 (1978).
- 28.- Porter, J.N. Wilhelm J.J. y Tresner H.D. Method for the preferential isolation of actinomycetes from soils. Applied Microbiology. 8:174-78 (1960).
- 29.- Postgate, J.R. Appl. Microbiol., 11, 265 (1963).
- 30.- Postgate, J.R. Media or Sulphur Bacteria. Lab. Practice. 15: 1239-44 (1966).
- 31.- Pramer D. y Shmidt E.LL Experimental Soil Microbiology. Burgess Publishing Co. Minneapolis. Pág. 95 (1964).
- 32.- Richards, L.A. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. Oxford and LBH Publishing Co. (1968).
- 33.- Roberts, R.B., Abelson, P.H. y colab. Carnegie Inst. Wash. Publ. 607, 318-405. (1955).

- 34.- Rupela, O.P. y Tauro P. Isolation and Characterization of Thiobacillus from Alkali Soils. Soil Biol. Biochem. 5: 881-97 (1973).
- 35.- Scotten, H.L. y Stokes, J.L. Isolation and Properties of Beaggiatoa. Archiv fur Microbiologie 42: - 353-368 (1962).
- 36.- Starkey, R.L. J. Bact., 10: 135 (1925).
- 37.- Starkey, R.L. Arch. Mikrobiol., 9, 268 (1938).
- 38.- Sorbo B. A. colorimetric method for the determination of Thiosulfate. Biochimics et Biophysica Acta. 23: 412-16 (1957).
- 39.- Swaby R.J. y Rita Fedel. Microbial Production of Sulfate and Sulphide in some Australian Soils. Soil Biol. Biochem 5: 773-81 (1973).
- 40.- Tabatabai M.A. y Singh B.B. Rhodanese Activity of Soils. Soil Science Society of American Journal. - 40: 381-85 (1976).
- 41.- Takakuwa, S. Fujmori, T. e Iwassaki H. Some Properties of Cell-Sulfur Adhesion in Thiobacillus thiooxidans. Journal Gen. Appl. Microbiol. 25: 21-29 - (1979).

- 42.- Trudinger, P.A. Biochem. J. 78: 680 - 686 (1961).
- 43.- Trudinger, P.A. Aust. J. Biol. Sci. 17: 738 (1964).
- 44.- Umbreit, W.W. Significance of autotrophy for Comparative Physiology. In Bacterial Physiology. Edited by C.H. Weckman and P.W. Wilson. Academic Press, - New York, N.Y. 566-575 (1951)
- 45.- Vishniac, W. y Santer M. The Thiobacilli. Bacteriol Rev. 21: 195-213 (1957).
- 46.- Wainwright, M. Sulfur oxidizing microorganism on vegetation and in soils exposed to atmospheric pollution. Environ Pollution. Vol. 17, num. 3: 167-174 - (1978)
- 47.- Wainwright, M. A. Modified Sulphur Media for the Isolation of S. oxidizing fungus. Plant Soil. 49: - 191-3 (1978a).
- 48.- Wainwright, M. Microbial W-Oxidation in Soils Exposed to Heavy Atmospheric Pollution. Soil Biol. Biochem. 11: 95-8 (1979)
- 49.- Wakao, N. y Choseki F. New Agar Plate Method for the Quantitative Study of Sulphate-Reducing Bacteria in Soil. Soil Science and Plant Nutrition. Vol. 8. num. 2 35-41 (1972).

- 50.- Wakao N. Choseki F. Distribution of sulfate reducing bacteria in paddy field soil. Soil Sci. Plant Nutr. 19, (1): 47 - 52 (1973).
- 51.- Waksman, S.A. Microorganisms Concerned in the Oxidation of Sulfur in the Soil: III. Media Used for the Isolation of Sulfur Bacteria from the Soil. Soil -- Science. 13: 329-36 (1922).
- 52.- Waksman, S.A. A tentative outline of the plate method for determining the number of the microorganisms in the soil. Soil Science 14: 27-28 (1922).
- 53.- Wieringa. K.T. Antonie Van Leeuwenhoek, 32: 183-6 - (1966).
- 54.- Winograsky, S.: Bot. Ztg., 45, 489 (1887).