

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA

Prof. Dr. V. CALLAO

IDENTIFICACION DE GERMEENES NITRIFICANTES DE LOS
SUELOS ARIDOS

por

C. PEREZ MIRANDA y V. CALLAO

Ars. Pharm. XI, 35 (1970)

Las bacterias nitrificantes son gérmenes quimiolitótrofos, aerobios estrictos, siendo el aislamiento e identificación de especies puras muy largo y laborioso. Ya KINGMA BOLTJES (1934) observó, durante las purificaciones progresivas de cepas nitrificantes, que era casi constante encontrar microorganismos heterótrofos en estrecha unión con aquellos y la separación de ambos era difícil. La existencia de estos gérmenes no autótrofos se puede explicar por el hecho de que en los tubos y matraces empleados en su cultivo en el laboratorio, puede haber, pese a todos los cuidados, restos de materia orgánica suficientes para que se desarrollen a sus expensas estos gérmenes. IMSHENECKI (1946) encontró la asociación de los gérmenes nitrificantes con el *Sorangium symbioticum*; STAPP (1940) había descrito la asociación con gérmenes del tipo de los *Bacterium* y *Pseudomonas*. Más recientemente GUNDERSEN (1955) descubrió la asociación de los nitrificantes con el *Hypomicrobium vulgare*.

Las bacterias nitrificantes son muy sensibles a los cambios de pH. No hay un criterio definido acerca de cuál es el pH más óptimo para su crecimiento. MEYERHO (1916) determinó como valor óptimo para cultivos de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* el correspondiente a una ligera alcalinidad. LANDELON y VAN TICHEREN (1939) demostraron que para cultivos puros de *Nitrosomas winogradsky* el pH más favorable es el de 6,7, ya que para ese valor el desarrollo de los *Nitrosomonas* es mayor y la cantidad de heterótrofos contaminantes es mínima. La separación, pues, de gérmenes nitrificantes del resto de microorganismos heterótrofos es un problema que parece estar ligado al pH del medio en que se desarrollan.

En este trabajo se ha realizado un aislamiento e identificación de gérmenes nitrificantes contenidos en las muestras de suelos áridos recogidos en diversos puntos de la provincia de Jaén. Al mismo tiempo se ha realizado un estudio del valor del pH más favorable al crecimiento de dichos gérmenes.

MATERIAL Y METODOS

Para el aislamiento se han empleado las placas de silicol-gel (*Winogradsky*) impregnadas de una solución nutritiva; la composición de esta solución es la siguiente:

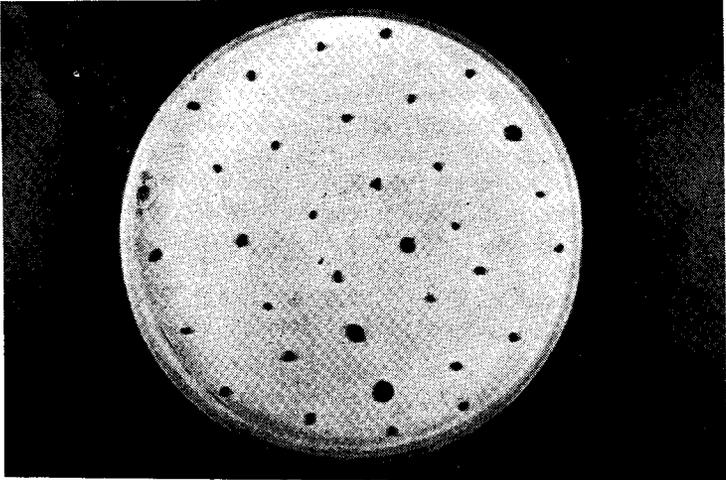
1.º) Para los gérmenes nitrosos:

- A) Solución salina standard adicionada al 1 por ciento de sulfato amónico.
- B) Suspensión acuosa de carbonato cálcico al 20 por ciento.

2.º) Para los gérmenes nítricos:

- A) Solución salina standard adicionada al 1 por 100 de nitrito sódico.
- B) Suspensión acuosa de carbonato cálcico al 20 por ciento.

Una vez preparadas las placas de silico-gel se procede a su siembra por la técnica de los granos de tierra. Se incuban a 25° C. Las lecturas se hacen a los 15 y 20 días. En caso positivo aparece alrededor de cada grano de tierra un halo transparente o ligeramente pardo (Foto I).



(R-9-1970)

Foto I.—Placa de silico-gel con halos de crecimiento alrededor de algunos granos de tierra

Para la identificación se han seguido los criterios dados por POCHON (1958) y el Bergey's Manual of determinative Bacteriology (1957). Se han realizado tinciones de Gram, de esporas y de cápsulas; pruebas de movilidad, tinción de flagelos y siembras en medios líquidos preparados a diferentes valores de pH con objeto de determinar la intensidad del crecimiento a estos distintos valores. Se han realizado numerosas pruebas bioquímicas, tales como: siembras en distintos medios azucarados (glucosa, galactosa, sacarosa, fructosa, lactosa, maltosa...), en agar glucosado, gelatina, leche tornasolada, patata... etc.

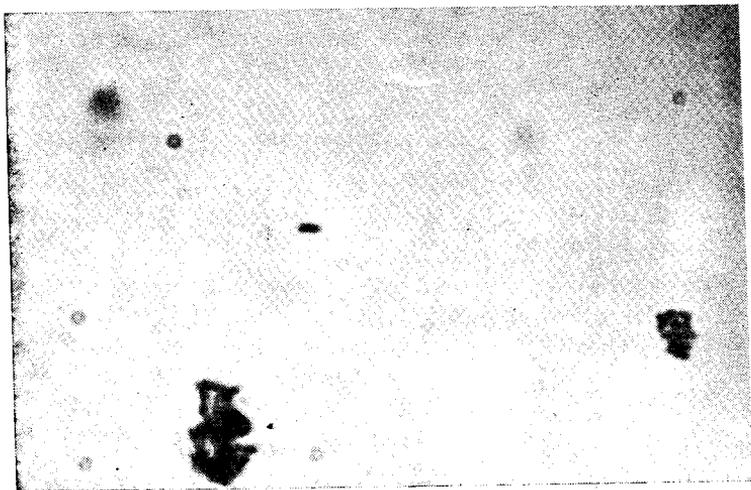
Con el fin de comprobar la autotrofia o heterotrofia de los gérmenes aislados se han sembrado en agar común y en placas de silico-gel impregnadas con solución nutritiva. Se incuban a 25° C. Las lecturas se realizan a los 2 y 15 días, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se han sembrado 22 muestras de suelos colocando en cada placa de silico-gel de 28 a 30 granos de tierra. En total se han aislado 86 cepas de gérmenes nitrosos y 31 de gérmenes nítricos.

En el aislamiento de los gérmenes nitrosos se encontraron con bastante frecuencia otros microorganismos heterotrofos contaminantes. Estos últimos gérmenes suelen aparecer en los cultivos a partir de los 15 días, o después, de haber aislado los gérmenes nítricos, creciendo en estrecha unión con ellos. La separación de ambos es en extremo larga y laboriosa. Hemos visto que si se hacen resiembras periódicas cada 15 días y se mantienen los valores del pH de los cultivos próximo a 6'5 se evita en gran parte las contaminaciones de los cultivos. De esta forma, en el 90 por ciento de los casos, al cabo de nueve pases sembramos en tubos de agar inclinado, y no se obtuvo crecimiento después de 6 y 8 días de su incubación a 25° C.

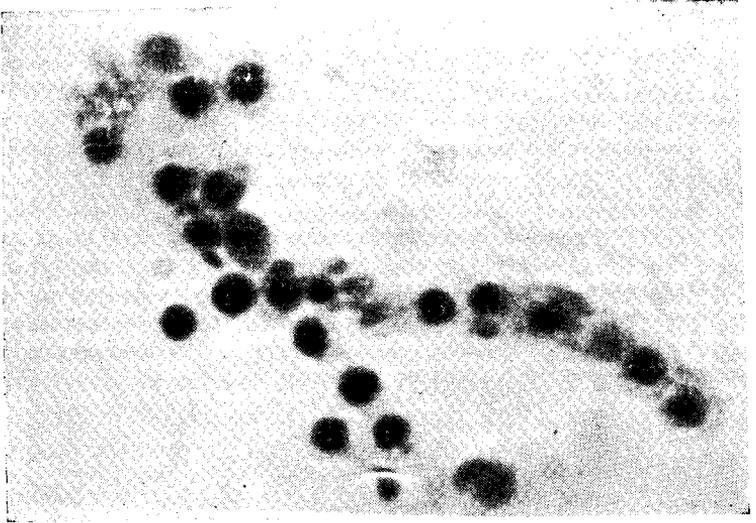
Los gérmenes heterotrofos contaminantes han sido identificados como diversas especies pertenecientes al género *Corynebacterium* (Foto II).



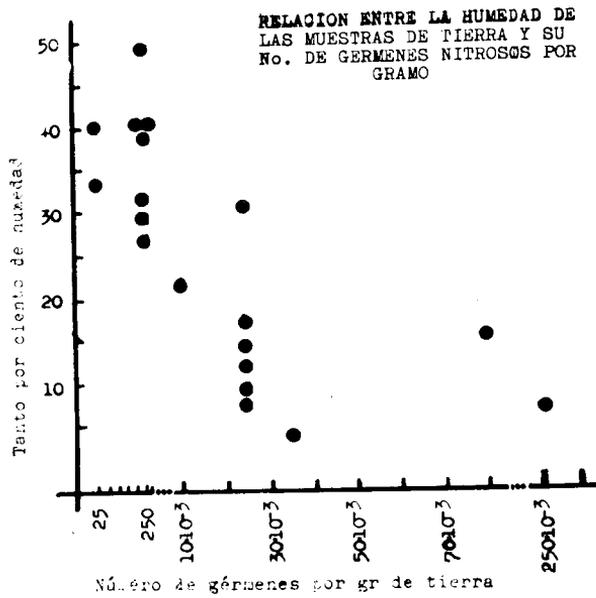
(R-10-1970)

Foto II.—*Corynebacterium* que contaminan frecuentemente los cultivos nitrosos

De las 86 cepas de gérmenes nitrosos aisladas, 12 de ellas pertenecen al género *Nitrosocystis*, identificando la especie *Nitrosocystis javanensis* (Foto III). Otras 7 cepas corresponden a la especie *Nitrosococcus nitrosus*. Las 67 restantes pertenecen al género, siendo la especie *Nitrosomonas europaeae* la única identificada. El valor de pH más óptimo para el crecimiento de estos gérmenes es el de 6'7, estando comprendidos los límites de crecimiento entre los valores de pH 5'5 y 7.



(R-11-1970) Foto III.—Quistes del *Nitrosocystis javanensis*



(R-12-1970)

Gráfica I.—Relación entre las humedades de las muestras y el número más probable de gérmenes por gramo de tierra

El aislamiento de los gérmenes nítricos nos ha ofrecido menos dificultades. De las 31 cepas aisladas solo un 7 por ciento presentan contaminación. Identificados estos heterotrofos contaminantes han resultado ser especies del género *Micrococcus* y levaduras.

Todos los gérmenes nítricos aislados pertenecen a un solo género: el *Nitrobacter*, identificándose las especies *Nitrobacter winogradsky* y *Nitrobacter ágilis*. El pH más óptimo para el crecimiento es el de 8. A pH 6'5 aún es posible el crecimiento.

Dado que el crecimiento de las especies contaminantes no se produce, como ya hemos indicado, antes de los 15 días de sembrar, pensamos que estos gérmenes no crecen a expensas de la materia orgánica que pudiesen contener los tubos, sino que los gérmenes resisten en los medios inorgánicos hasta que, al producir los nitrificantes materia orgánica, estas especies se desarrollarían a sus expensas.

RESUMEN

Se hace un estudio de aislamiento e identificación de los gérmenes de 22 muestras de suelos áridos. Se aíslan 67 especies de *Nitrosomas europeae*, 12 especies de *Nitrosocystis javanensis* y 7 cepas de *Nitrosococcus nitrosus*. Los cultivos de estos gérmenes están contaminados frecuentemente con diversas especies de *Corynebacterium*.

El valor más óptimo de pH para el crecimiento de estos gérmenes nitrosos es el de 6'7. Los límites de crecimiento están comprendidos entre los valores de 5'5 y 7.

Se aíslan e identifican 31 especies del género *Nitrobacter*. Las especies identificadas son el *N. winogradsky* y *N. ágilis*. No se ha encontrado ninguna especie del género *Nitrocystis*. El pH más óptimo para el crecimiento es el de 8; a un pH 6'5 aún es posible el crecimiento.

SUMMARY

A study has been made of isolating the nitrifying germs in 22 samples of arid soil. 61 species of *Nitrosomas europeae*, 12 species of *Nitrosocystis javanensis* and 7 species of *Nitrosococcus nitrosus* have been isolated. The cultures of these germs are frequently contaminated by different species of *Corynebacterium*.

It has been ascertained that 6'7 is the most efficient value for the growth of nitrous germs. The limits of growth are contained within the values 5'5 and 7.

31 species have been isolated and identified of the *Nitrobacter* type *N. winogradsky* and *N. ágilis*. No species have been found of the *Nitrocystis* type. The most efficient pH for growth is 8; at pH 6'5 growth is still possible.

BIBLIOGRAFIA

- GUNDERSEN K.—Plant and soil. 1955, 7, 26.
IMSHENECKI A.—Nature. 1946, 157, 877.
IMSHENECKI A.—Microbiologija. 1955, 54, 579.
LEWIS and PRAMER.—J. Bact. 1958, 76, 524.
KINGMA BOLTJES.—Recherches sur bacteries nitrifiantes. Theses, Delft 1934.
LANDELON and VAN TICHELEN.—J. of Bacteriol. 1939, 79, 60.
MEYERHOF.—Plüg. Arch. ges. Phisiol. 1916, 164, 355, 165, 229, 166, 240.
MEIKLEJOHN.—J. Gen. Microbiol. 154, 4, 185.
MEIKLEJOHN.—J. Soil. Sci. 1953, 4, 59.
POCHON.—Traité Microbiologie des sols ed. Uunod 1958.
TEMPLE.—J. Bact. 1949, 57, 383.
WINOGRADSKY.—C. R. Ac. Sc. 1931, 192, 1000.