

DESNITRIFICACIÓ BACTERIANA EN UN PRAT EXPERIMENTAL

Comunicació presentada el dia 22 de maig de 1969 per

J. VIVES

Professor ajudant del Departament de Microbiologia a la Facultat
de Ciències de la Universitat de Barcelona

i

R. PARÉS i FARRÀS

Professor del Departament de Microbiologia a la Facultat
de Ciències de la Universitat de Barcelona

INTRODUCCIÓ

En un prat de margall o «ray-grass» (*Lolium perenne*) dels Camps Experimentals de la Facultat de Ciències, ha estat estudiat el balanç de nitrogen, tenint en compte el complex terra-vegetal-adob-rentat. Els resultats obtinguts fins ara fa uns dos anys semblaven posar de manifest una pèrdua inexplicable de nitrogen. L'objecte del present treball és d'evidenciar la presència d'una flora desnitrificant, fer-ne l'avaluació quantitativa i examinar la seva potencialitat d'alliberar nitrogen molecular a l'atmosfera. És a dir, tractar de quadrar l'esmentat balanç i introduir-hi un element més: la flora desnitrificant del sòl.

MATERIAL I MÈTODES

Cal preparar el medi de cultiu utilitzat per a l'enumeració de desnitrificants quimioorganotròfics en tres parts:

a) 40 ml d'amortidor 0,07 M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ pH = 6,8; 1 gr de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,5 gr d'extret de llevat (Difco); 300 ml d'aigua destil·lada.

b) 10 gr de KNO_3 ; 700 ml d'aigua destil·lada.

Cal esterilitzar a) i b) a 120°C , durant 20 minuts, i després afegir-hi

c) 5 gr d'etanol.

Els tres components, a, b i c, són mesclats estèrilment i distribuïts en tubs de 10×160 mm (2,5 ml a cada un).

Els tubs de medi de cultiu per a desnitrificants quimioorganotròfics són inoculats amb 1 ml de suspensió aquosa de la mostra de terra. Després hom procedeix a tapar-los curosament amb Bacto-agar 20 g/l, a 45°C aproximadament. Aquesta operació ha d'ésser efectuada justament després d'haver refredat els tubs inoculats amb el medi de cultiu, per tal que l'agar

prengui tot seguit damunt del medi. Tot plegat és incubat a 30° C. El creixement de desnitrificants quimioorganotròfics es manifesta per l'alliberament de gas que s'acumula sota el tap d'agar. Per al cultiu dels desnitrificants quimiolitotròfics hom utilitza el medi R de Posgate⁶. Un cop esterilitzat es distribueix en tubs, s'inocula i es tapa amb Bacto-agar (Difco), així com per als desnitrificants quimioorganotròfics.

El mètode d'enumeració de bacteris desnitrificants quimioorganotròfics i quimiolitotròfics és realitzat inoculant dilucions successives de mostres de terra en sèries de 10 tubs fins a trobar la sèrie on hi hagi tubs amb creixement i sense creixement. El nombre mitjà de microorganismes per gram de terra és calculat llavors utilitzant taules del nombre més probable de microorganismes⁷.

Hom fa el mostreig amb una broca amb la qual hom pot separar la terra de 10 a 20 cm de profunditat. Hom prepara una barreja de la terra recollida per la broca després de cinc perforacions d'una partió dividida en quadrats llatins. La mostra mitjana és cada cop de cinc quadrats diferents i estadísticament independents. Les mostres han estat preses després d'haver estat segada l'herba.

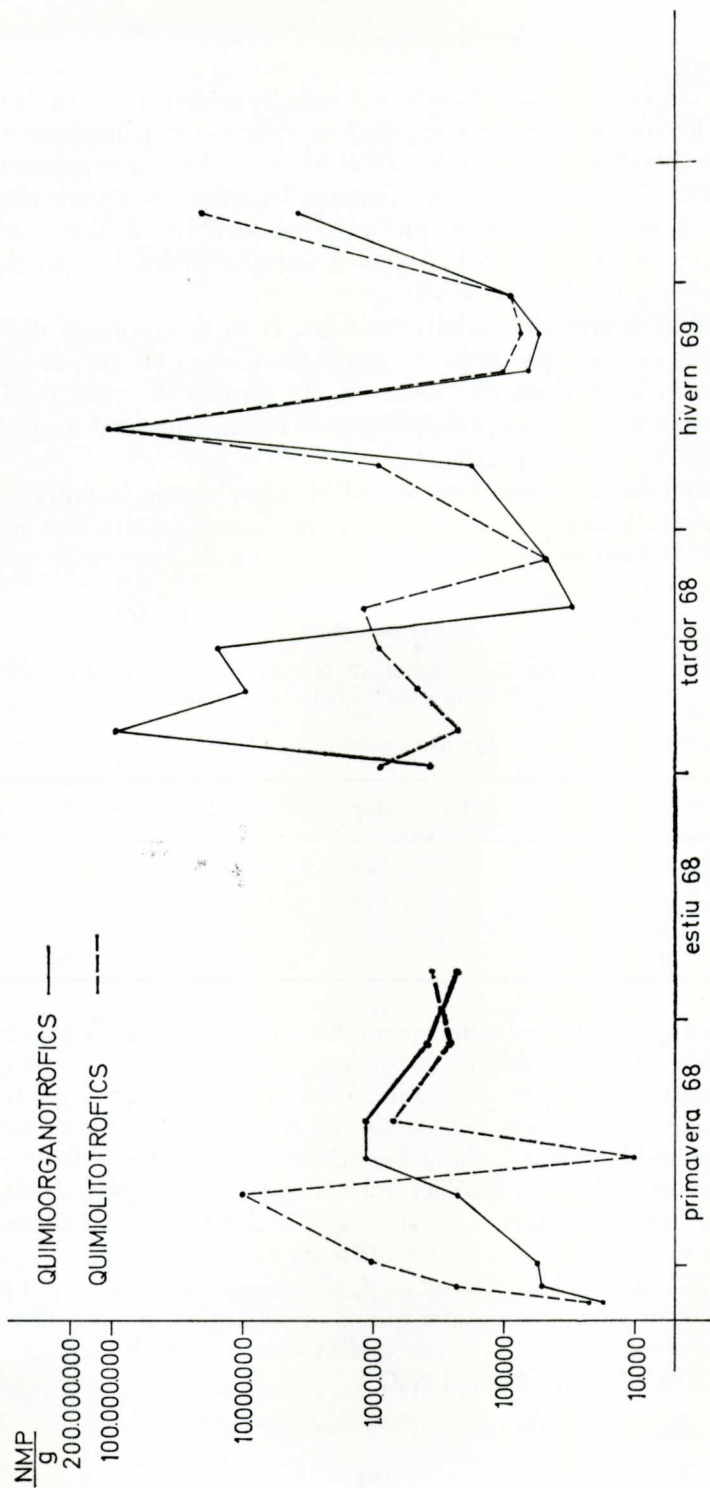
Una vegada ben barrejades les fraccions de terra per tal d'obtenir la mostra mitjana objecte d'anàlisi, cal separar-ne 30 gr, els quals són dispersats en 300 ml d'aigua estèril. D'aquesta dilució 10^{-1} , cal fer les següents en ordre de potències naturals de 10: hom pren 10 ml de la dilució anterior per a preparar la vinent. La primera dilució de la mostra de terra és sotmesa a agitació durant 20 minuts, dins un Erlemmeyer, mitjançant un agitador magnètic. Després cal deixar sedimentar la terra i prendre volums del sobrenedant per fer la dilució següent. Les altres poden fer-se sense cap precaució especial.

L'estima del volum de nitrogen alliberat en primera aproximació ha estat feta amb els tubs de creixement anaerobi de Smith-Eihorm⁵. Com que el creixement i la corresponent utilització del nitrat com a acceptor d'electrons es fan lentament, cal impedir l'arribada de l'oxigen tapant amb oli de parafina estèril la branca tancada. Hom omple la branca tancada curosament després d'haver posat l'oli de parafina.

El nombre dels bacteris present en l'inòcul emprat en els tubs de creixement anaerobi, així com la població final, són determinats pel mètode del nombre més probable.

RESULTATS

El diagrama de la fig. 1, mostra com evoluciona, al llarg de l'any, la població de desnitrificants quimioorganotròfics i quimiolitotròfics, a la



partió de terra que ha estat objecte d'estudi. És evident l'existència de tres màxims. El corresponent a març-abril és determinat principalment per als quimiolitotròfics. El d'octubre és únicament degut als quimioorganotròfics. El de l'hivern, a tots dos. Manquen les dades corresponents al fort de l'estiu, però és versemblant que no es presenti cap oscil·lació notable, la qual cosa correspondria a la depressió estival comuna a molts elements del medi edàfic en el nostre clima.

La taula I mostra els resultats obtinguts en la determinació del volum de nitrogen alliberat per gram de terra. El nombre de microorganismes continguts en l'inòcul era de l'ordre de 10^7 . En tots els casos, les diferències de volum són degudes principalment al creixement total anaerobi que en aquestes condicions pot tenir lloc.

Prenent com a primera base de càlcul els valors de la taula I i referint-los a una població mitjana de l'ordre de 10^8 , resulta una potència desnitrificant total per gram de terra de l'ordre de 13,7 ml de nitrogen.

TAULA I

Valoració de la potència desnitrificant de la flora de la terra, d'una porció de margall o "ray-gras" («Lolium perenne»)

Desenvolupament	Quimioorganotròfics					Quimiolitotròfics		
Dilucions del medi	M/3	M/4	M/7	M/10	M	M/2	M/3	M/4
Experiment 1	43,5	39	—	—				
2		14	8	6				
3		14	9	7				
4					12	5,5	3,5	2,5

A una superfície d'un metre quadrat, entre 10 i 20 cm de profunditat, corresponen $16,4 \times 10^5$ ml de nitrogen. Aquesta quantitat de nitrogen en forma de NO_3NH_4 i sota la suposició que tot l'amoniac sigui oxidat a nitrat en el sòl, representa uns 5,8 Kgs de NO_3NH_4 . Aquesta quantitat és la que versemblantment la flora bacteriana de la part estudiada pot arribar a passar a nitrogen, i alliberar a l'atmosfera en un període de temps comprès entre 2 i 10 dies. Aquest temps és el que ha resultat necessari perquè la producció de gas fos estabilitzada en el cultiu.

L'addició de 10 ml de sosa al 20 % al medi de cultiu anaerobi després del creixement de desnitrificants quimioorganotròfics, no modifica el volum gasós recollit. Això fa pensar que és constituït exclusivament de nitrogen o d'una barreja de N_2 i N_2O .

DISCUSSIÓ

No ha estat fet ací un estudi sistemàtic de la natura de la flora desnitrificant quimiolitotròfica i quimioorganotròfica. Cal per això considerar que els dos medis utilitzats són selectius per a un tipus fisiològic determinat dins el qual hom podria reconèixer organismes taxonòmicament separats. La població del medi per bacteris quimioorganotròfics pot ésser constituïda principalment per *Pseudomonas*, *Bacillus lichenniformis*, i, amb menys probabilitat, *Micrococcus denitrificans*^{1, 8}. La capacitat de desnitrificar és una propietat comuna a tots els *Pseudomonas aeruginosa*, *P. Mallei*, *P. pseudomallei*, *P. stutzeri* i potser encara a d'altres espècies aeròbiques de *Pseudomonas*⁸. La població de bacteris quimiolitotròfics ha d'ésser constituïda pels bacteris oxidadors del sofre que poden utilitzar facultativament oxigen i nitrats, fonamentalment *Thiobacillus denitrificans*^{1, 6, 10}. Aquesta espècie compta amb diferents biòtipus, ultra les eventuais contaminacions amb *Micrococcus denitrificans*⁹. Cal, doncs, tenir en compte que, així com l'enumeració de desnitrificants quimiolitotròfics pot referir-se a una població relativament homogènia, la corresponent als desnitrificants quimioorganotròfics ha d'ésser constituïda per una flora barrejada i potser molt diferent al llarg del temps.

El mètode d'enumeració és basat en els principis generals del mètode de les dilucions successives fins a la sèrie de cultius positius i negatius. Hom considera també que en la suspensió inicial de la terra hom aconsegueix una dispersió dels microorganismes homogènia, en la qual hi ha la mateixa concentració a la fase sòlida que a la líquida⁴. Si en les dilucions hom traspasa també la fase sòlida, es produeixen importants errors deguts a la presència de grumolls.

Ha estat assenyalat que la flora desnitrificant constitueix de l'ordre de l'1/10.000 de la flora total en terres de jardí i en alguns terrenys cultivats¹⁰. Això dóna valors absoluts de l'ordre de 1.000-10.000 organismes desnitrificants per gram de terra. Segons que mostra la taula I, el nombre mitjà de desnitrificants quimioorganotròfics i quimiolitotròfics a la partió estudiada és superior en unes 1.000 vegades. En canvi, de l'ordre de 10.000 organismes per gram és el nombre mínim d'organismes quimiolitotròfics. Els altres tots són superiors, i poden arribar a ésser fins a 10.000 vegades més grans. Això fa pensar que les condicions de la partió estudiada són particularment favorables per al desenvolupament d'aquesta flora i també que potser es tracta d'un terreny esdevingut distròfic. El valor potencial desnitrificant de la flora trobada permet d'arribar a la conclusió que en condi-

cions favorables podria passar a nitrogen elemental tot el que hi ha al sòl i el que hi és afegit en forma d'adob. És molt probable que els valors de desnitrificació reals siguin més petits, però no solament permeten de quadrar el balanç de nitrogen en el complex terra-vegetal-adob-rentat, sinó que àdhuc fan pensar en la necessitat d'un contrapès per part de la flora fixadora de nitrogen, principalment la de tipus anaeròbic.

Si considerem separatament la flora quimioorganotròfica i la quimiolitotròfica obtindrem dues corbes, esquemàticament representades a la fig. 2. En la corresponent als desnitrificants quimiolitotròfics es presenta un ritme bimodal amb un màxim a la primavera i un altre al principi de l'hivern; tots dos van seguits dels corresponents mínims. El primer màxim primaveral coincideix amb el de la vegetació, molt constant, i és el més important quantitativament³. L'altre màxim té relació aparent amb la vegetació, ja que apareix després del segon màxim d'aquesta, el qual té lloc a la tardor. Bé que el màxim tardoral de la vegetació és molt mòbil d'un any per l'altre, hom considera que el corresponent a la flora quimiolitotròfica és significativament posterior.

La corba de desnitrificants quimioorganotròfics es també bimodal, però els dos màxims són molt pròxims; el segon correspon al màxim hivernal del organismes quimiolitotròfics. El màxim tardoral pot donar-se en concordança amb el màxim de la vegetació o ésser lleugerament anterior, potser lligat a la putrefacció de les arrels, la qual té lloc cap al final de la depressió estival.

Cal tenir en compte que en la partió estudiada no hi ha aportació de matèria vegetal de les parts aèries, ja que hom les ha separades sistemàticament per als estudis de productivitat que s'hi efectuen.

BIBLIOGRAFIA

1. BERGEY. — *Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1957.
2. BURGÉS, A. — *Microbiología del suelo*. Ed. Acribia. Saragossa, 1960.
3. CABALLERO, A. — *Ritmos de período largo en el crecimiento de las plantas*. «Mem. R. Acad. Cien. y Art. Barcelona», 1968.
4. HUNGATE, R. E. — *Ecology of Bacteria* IV. Ed. Gunsalus I. C. i Sanier R. Y. Academic Press. Nova York i Londres, 1962.
5. PARÉS, R. — *Cinética de la fermentación alcohólica; una relación funcional entre velocidad y período de inducción*. Publicaciones de la Universidad de Barcelona, 1954.
6. POSGATE, J. R. — *Media for sulphur bacteria*. «Laboratory Practice», 15: 1239-1245 (1966).

7. PRAMER, D., i E. L. SCHMIDT. — *Experimental Soil Microbiology*. Burgess Publ. Co. Minneapolis. Minn., 1965.
8. STANIER, R. Y.; PALLERONI, N. J., i DOUDOROFF, M. — *The aerobic "Pseudomonas": a taxonomic study*. «The Journal of General Microbiology», 43: 302 (1966).
9. SOKOLOVA, G. A., i KARAVAIK, G. I. — *Israel Program for Scientific Translations*. Ltd. Jerusalem, 1968.
10. THIMANN, K. V. — *The Life of Bacteria*. The Macmillan Co. Nova York, 1963.