

ANALISIS DE LA ACTIVIDAD SULFATO-REDUCTORA EN BACTERIAS MARINAS Y SU SIGNIFICACION GEOLOGICA

POR

A. BALLESTER*, J. CASTELLVI*, A. PLANA**, M. DE RENZI**
Y A. CRUZADO*

INTRODUCCION

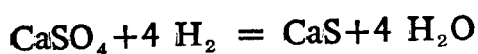
A lo largo de este trabajo se utilizarán los términos pirita y piritización en un sentido más amplio del que usualmente se les asigna. Por razones prácticas vamos a dejar que los conceptos referentes a estos términos surjan del contexto del presente escrito. Otra aclaración que deseamos anticipar es que, con él, pretendemos tan solo explicar los pasos preliminares de acercamiento al problema enunciado, que los autores han realizado hasta el momento.

Desde hace unos años, se ha incrementado el estudio de los procesos bioquímicos relacionados con la actividad sulfato-reduc-

* Inst. Inv. Pesqueras C. S. I. C. P.º Nacional s/n; Barcelona.

** Cátedra de Paleontología; Universidad de Barcelona.

tora de las bacterias del tipo *Vibrio desulfuricans*, capaces de realizar la reducción de los iones sulfato utilizando distintas fuentes de energía. Por ejemplo, Yu. I. SOROKIN (1956) considera al hidrógeno molecular como *dador* de energía en los procesos de crecimiento de las poblaciones de bacterias sulfato-reductoras, las cuales son capaces de utilizar energía liberada en la oxidación del H_2 para asimilar carbono a expensas del dióxido de carbono libre:



Los procesos oxidativos del H_2S a cargo de bacterias del tipo *Thiobacillus thioparus* darian lugar, según ISACHENKO (1958) a depósitos de azufre libre mientras un nuevo aporte de energía entraría en el ciclo vital de las poblaciones bacterianas. Una ulterior oxidación del azufre cierra el ciclo químico de los compuestos sulfurados pasando el azufre-elemento a sulfato-ión con una nueva liberación de energía.

Para que este ciclo sea capaz de explicar los fenómenos de crecimiento de las poblaciones bacterianas, es preciso que se produzca un aporte exterior de energía o bien que existan reservas energéticas precias y, por supuesto, efímeras. Más adelante volveremos sobre esta cuestión fundamental. Por el momento nos interesa tan solo destacar que las sustancias capaces de permitir el crecimiento de los gérmenes sulfato-reductores (SR) ofrecen un amplio espectro de posibilidades. Frecuentemente se citan como fuentes adecuadas de energía los ácidos láctico y fórmico, los hidrocarburos y los alcoholes; pero no los azúcares, por lo menos directamente. Por otra parte PECK (1959) y ISHIMOTO y FUJIMOTO (1959) consideran que el ATP es capaz de permitir el desarrollo de las poblaciones de *Desulfovibrio desulfuricans*.

PARTE EXPERIMENTAL

En los distintos experimentos realizados con gérmenes SR se han utilizado como fuentes de energía el ácido láctico y el ATP. En

todos ellos el resultado ha sido positivo y el desarrollo del cultivo se ha prolongado proporcionalmente a la cantidad de energía adicionada. El medio de cultivo más generalmente usado es el siguiente:

Extracto de levadura	1	g
Fosfato potásico monobásico	0.01	g
Sulfato magnésico	2	g
Cloruro sódico	30	g
Agua destilada	1.000	ml
Lactato sódico (60%)	20	g
pH ajustado a 7.2		

Un ejemplo típico del desarrollo de estos cultivos se describe en la Tabla I. Al iniciar el cultivo se añadieron 8 μ ci de una solución radiactiva de $^{14}\text{CO}_3\text{HNa}$. En tiempos sucesivos se filtraron partes alicuotas del cultivo mediante filtros Millipore AA (0.8 μ de poro) y la radiactividad (proporcional al carbono asimilado) medida con un contador TRACERLAB mod. SC/72.

Las tasas de asimilación de carbono, relativamente altas, son función de la densidad de población bacteriana del cultivo; pero aparece clara, también, la influencia de los dos tipos de aporte energético ensayados. En efecto, mientras en el cultivo I los filtrados alcanzan escasamente 20 kcontajes a las 72 horas, el cultivo II sobrepasa los 40 kcontajes en el mismo tiempo de incubación. Basta la adición indicada de ATP al cultivo I para que sus contajes se eleven a igual nivel que los registrados en el cultivo II. Aún cuando este experimento concuerda satisfactoriamente con lo previsto por nosotros, debemos hacer la salvedad de que los beta-impulsos registrados en los filtrados del cultivo I antes de la adición de ATP nos parecen desproporcionados a las reducidas disponibilidades energéticas existentes en el medio. Este problema, con un enmarque más general, se está estudiando en este momento.

En el curso de las campañas hidrográficas que algunos de los autores (BALLESTER Y CASTELLVI) están realizando en la Costa

TABLA I

Tiempo de cultivo	B E T A I M P U L S O S		
	Cult. I (sin lactato)	ATP	Cult. II (con lactato)
24 horas	16.250	—	39.990
48 horas	21.000	—	55.000
72 horas	19.510	mg/l 34.1	46.011
90 horas	35.410	—	41.130
114 horas	50.400	—	46.050
140 horas	39.780	—	47.400

TABLA II

Muestra	Nivel Geológico	Fe (ugAt/g)	P (ug At/g)		C-CO ₂ (mgAt/g)
			fracción CIH soluble	Tot. roca	
C—1	Terciario	230	—	—	9.2
C—4	Terciario	140	—	—	9.1
C—33	Terciario	—	—	—	9
C—37	Terciario	80	—	—	9.1
C—73	Terciario	230	—	—	9.8
C—77	Terciario	340	—	—	9.6
C—78	Terciario	320	—	—	8.8
C—79	Terciario	330	—	—	9.2
C—80	Terciario	250	—	—	9.4
C—85	Terciario	260	—	—	8.5
Sta. Creu d'Olorde (calizas)	Silúrico	360	7.9	12.2	9.5
Peramea (calizas)	Silúrico	100	5.5	11.	9.8
Sta. Creu d'Olorde (lutitas)	Silúrico	1.360	65.2	87.	3.1
Benasque (lutitas)	Silúrico	930	40.8	—	5.8
Montjuich (margas)	Mioceno	1.690	10.2	16.2	6.6
Fosa de Cariaco (predominantemente foraminíferos)	Actual	1.730	25.2	43.3	6.

Catalana como parte integrante del programa científico que soporta el Inst. de Inv. Pesqueras del CSIC, se han investigado sistemáticamente las bacterias SR en sedimentos obtenidos de profundidades variables comprendidas entre los 300 y los 1.000 metros a una distancia de la costa de 25 millas marinas, aproximadamente.

Como resultado de esta investigación ha sido posible elaborar un modelo muy esquemático y provisional de la distribución de estos gérmenes; pero del cual se deducen importantes consecuencias: Más allá de una isobata aún no bien establecida pero que raya en los 800 metros *no se detectan sulfato-reductores en los sedimentos* mientras que en los cilindros obtenidos a menor profundidad *se han detectado siempre bacterias SR*. Las aguas próximas a los sedimentos participan siempre de idénticas características que éstos en cuanto a la presencia o ausencia de bacterias SR. En cambio, en los niveles comprendidos entre la superficie libre del mar y las aguas profundas, es decir en toda la masa de agua que no tiene un estrecho contacto con la plataforma submarina, los ensayos son *siempre negativos*. Este resultado es idéntico al citado por todos los microbiólogos que han realizado experimentos análogos. No obstante, en el mar Negro o en la recientemente estudiada fosa de Cariaco (FUKUOKA Y BALLESTER, 1963), de carácter anóxico desde los 200-300 metros hasta el fondo, la presencia de H_2S disuelto en las aguas hace pensar en la existencia de una activísima población de sulfato-reductores en los niveles anaeróbicos.

De acuerdo con nuestra experiencia el color de los sedimentos está íntimamente relacionado con la reducción de sulfatos. Siempre que los sedimentos presentan tonalidades grises (frecuentemente veteadas de sustancias negras) la respuesta al examen de bacterias SR es positiva. Por el contrario los sedimentos profundos, más allá de la plataforma continental (800 metros de profundidad o más) son amarillentos y han dado respuesta negativa sin excepción. Es lógico esperar este resultado considerando que los tonos grises en los sedimentos son debidos a la presencia de sulfuros de metales pesados (u otros compuestos similares desde un punto de vista de

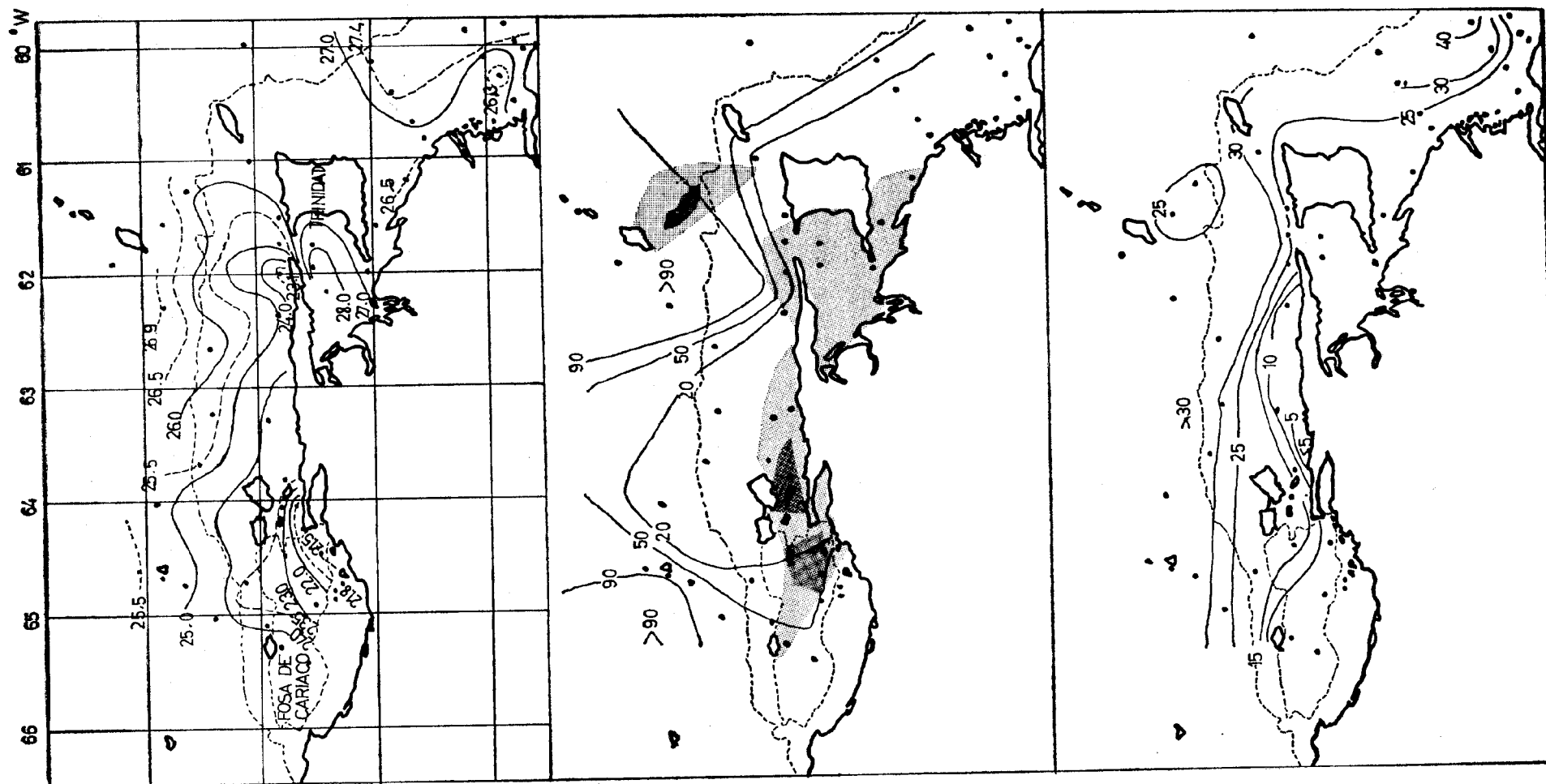


Fig. 1.—En el cartograma superior se puede observar la distribución de las isotermas cuyos valores van en aumento al alejarse de la costa. En el cartograma medio se comprueba la relación entre sedimentos piritizados (zonas sombreadas) y la abundancia de Cianofíceas, expresada en t%, que es mínima en la zona litoral, justamente donde los fondos presentan abundantes esqueletos de foraminíferos piritizados y silicificados. En el cartograma inferior puede verse como los altos valores en contenido de carbonatos alcalinotérreos se producen en las áreas de “aguas afuera” coincidiendo con los altos valores de las isotermas y los altos porcentajes de Cianofíceas.

potencial redox). Por el contrario, los tonos amarillos son debidos a óxidos de hierro presentes en los sedimentos. Cuando no existe actividad sulfatoreductora, el sedimento (en contacto con aguas de elevado contenido en oxígeno que oscila en la plataforma costera Catalana, según nuestros datos, entre 4 y 5 ml/l) presenta facies oxidada. Sin embargo los extractos acuosos de todos los sedimentos estudiados (sea cual fuere la profundidad de la que han sido extraídos) han dado respuesta positiva en relación con su capacidad de mantener el desarrollo de una población de sulfato-reductores, inoculada posteriormente, sin adición alguna de otro medio de cultivo. Principios necesarios para el desarrollo de las bacterias SR se dan en todos los sedimentos de la plataforma costera Catalana estudiados. La ausencia de sulfato-reductores en sedimentos de más de 800 metros es evidentemente un problema de equilibrio en el que cuenta, más que la calidad de los compuestos orgánicos o inorgánicos que integran los materiales detríticos, el contenido energético total.

Para buscar una explicación plausible a este hecho, aparentemente contradictorio, hemos de volver necesariamente al examen de las observaciones oceanográficas realizadas en el mar Caribe (donde está situada la fosa de Cariaco) y en la costa Catalana (de donde proceden la mayoría de los sedimentos sobre los que se han verificado las experiencias citadas). En la fig. 1 se observa la distribución de la temperatura superficial de las aguas en las proximidades de la costa sub-oriental del mar Caribe (costa septentrional de Venezuela). El gradiente térmico horizontal es muy considerable (distancias de 100 millas suponen una diferencia de temperatura de 6°C) y las temperaturas de las aguas próximas a la costa, excepcionalmente bajas teniendo en cuenta la temperatura media de las aguas superficiales del mar Caribe en esta región. Esta anomalía térmica va acompañada, en este caso, de salinidades anormalmente altas. Los contenidos en oxígeno son también anormalmente bajos, etc. Todo ello concuerda con un movimiento ascensional de aguas profundas ricas en nutrientes minerales (nitratos, fosfatos, silicatos)

y capaces, por tanto, de sostener un alto nivel de productividad biológica. El examen de las poblaciones fitoplanctónicas ha dado lugar a un extenso y exhaustivo trabajo de MARGALEF (en prensa) que permite establecer la existencia, en la zona costanera, de una población de diatomeas de alta productividad primaria. En las áreas periféricas predominan poblaciones de cianofíceas que ocupan los espacios oceánicos, alejados de la costa, de esta región del Caribe (fig. 1).

Las circunstancias especiales del régimen de vientos (alisios) y del perfil de la costa, justifican la existencia de este movimiento ascendente de las aguas profundas (afloramiento o upwelling) y, por tanto, justifican también las observaciones que antes hemos citado en relación con las características hidrográficas y florísticas en esta zona. Como consecuencia de estos hechos cabe esperar que los sedimentos correspondientes presenten unas características relacionadas con las condiciones ecológicas del mar en el que se han formado. En efecto, tanto los sedimentos de la franja litoral venezolana (donde el afloramiento presenta una intensidad máxima) como los de la fosa de Cariaco, próximo a ella, tienen las propiedades esperadas: color gris, presencia de H_2S , alto contenido en materia orgánica, alto contenido en productos de degradación de los pigmentos fotoactivos, etc. Además, en esta zona, se produce un fenómeno del mayor interés y que permite atribuir a mecanismos biogénicos relacionados con la actividad de las bacterias SR la presencia de núcleos piritosos en sedimentos recientes o consolidados. En efecto, han sido aislados caparazones de foraminíferos piritizados en los que el esqueleto calizo está recubierto de sulfuro ferroso y compuestos similares englobando, a su vez, un molde silíceo. Como puede observarse en la Tabla II todos los sedimentos piritosos contienen Fósforo y en mayor proporción en el total-sedimento que en la fracción ácido clorhídrico-soluble lo cual indica que el contenido en fósforo de los núcleos piritosos es muy elevado. Ello, de por sí, establecería una relación entre núcleos piritosos y determinados procesos biológicos; pero, además, el estudio de la relación

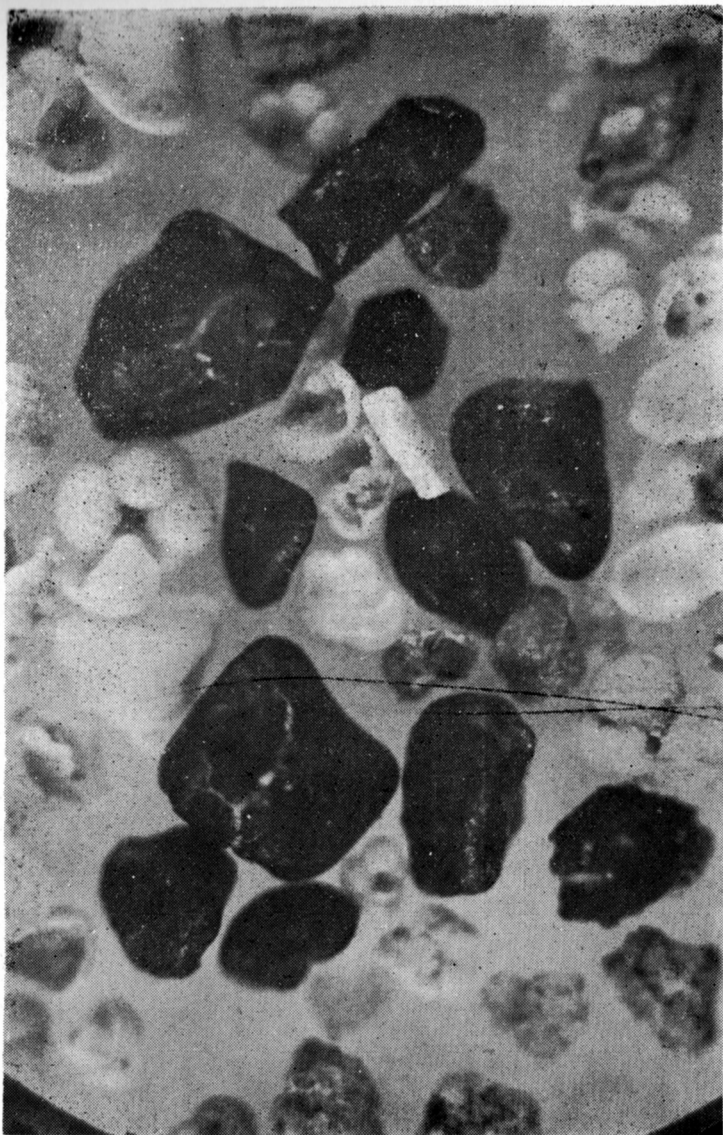


Fig. 3.—Sedimentos de la fosa de Cariaco con abundantes Foraminíferos que presentan fuerte piritización. Los limos han sido separados por lavado (Foto F. Vives).



Fig. 4.—Moldes silíceos correspondientes a un sedimento similar al anterior después de haber sido atacado con $\text{No}_3\text{H}:\text{ClH}$ (3:1) hasta sequedad, tratado con ClH diluido y lavado. Estos moldes son solubles en ácido fluorhídrico. (Foto F. Vives).

S^{32/34} (THODE, WANLESS y WALLOUCH, 1954) en los núcleos piritosos de la fosa de Cariaco realizado por el Dr. MEAD LAROEY JENSEN de Utah (USA) (DOMINGO, comunicación particular) confirma el origen orgánico de estos sulfuros metálicos.

En general, los fenómenos de afloramiento son menos intensos a medida que nos vamos alejando de la costa hasta hacerse nulos.

De igual manera los sedimentos van enriqueciéndose en carbonatos alcalinotérreos (MIRO, comunicación particular) y desaparecen los foraminíferos piritosos que, en este caso, actúan como trazadores biológicos y definen unas circunstancias ecológicas del medio en el que se han sedimentado. En la fig. 1 puede observarse la relación entre la presencia de foraminíferos piritizados en los sedimentos, la anomalía térmica debida al afloramiento y el bajo contenido en carbonatos alcalinotérreos.

De igual o parecida manera puede explicarse la existencia de las siguientes zonas (perfectamente definidas mediante el examen de las características de los sedimentos colectados) en la plataforma costera Catalana:

A) Zona próxima a la costa, afectada por fenómenos de afloramiento que condicionan la productividad en los niveles fóticos dentro del límite que define la isobata de 800 metros (productividad en sentido general significa tasa de captación de energía radiante) y que a la vez permiten un activo transporte vertical de esta energía captada en la superficie hacia las poblaciones bacterianas adscritas a los sedimentos cuyos fondos están constituidos por barros grises (piritosos).

B) Zona de aguas afuera más allá de los 800 metros, fuera del talud continental, con sedimentos de tonos amarillentos.

A fin de establecer la validez de estas consideraciones hemos analizado el contenido en hierro, fósforo y carbonatos alcalino-térreos, así como la presencia o ausencia de vestigios de compuestos porfirín —derivados, en algunas muestras correspondientes a diversos niveles geológicos. El Hierro se determinó espectrofotométricamen-

te por el procedimiento del Sulfocianuro potásico estandarizando con hierro electrolítico.

El Fósforo se determinó, como Fosfato, por el método del Molibdato amónico debido a RILEY de la Universidad de Liverpool, utilizando ácido ascórbico como reductor.

Se estimó que la pérdida de peso de las muestras por acción del ácido clorhídrico era fundamentalmente debida a los carbonatos alcalinotérreos y se tomó este dato gravimétrico como base para el cálculo de estos componentes con una precisión que los autores estiman suficiente.

Los pigmentos fotoactivos (en realidad sus productos de degradación) se determinaron mediante extracción con acetona del 90% y cromatografía de capa fina (CCF) sobre placas DC-Fertigplatten Kiesegel F₂₅₄ de la casa Merck. La elución se verificó con la mezcla de disolventes descrita por RILEY Y WILSON (1965).

En la tabla II se consignan los resultados analíticos; las muestras numeradas y precedidas de la letra C corresponden a calizas con *Alveolina* colectadas en la cuenca de Tremp. Las muestras C-1 y C-4 pertenecen a la parte inferior de una serie marina de unos 500 metros de espesor; las C-33 y C-34 corresponden a la zona intermedia; las restantes proceden del extremo superior. Las demás muestras llevan el nombre de la localidad de procedencia. La meteorización de las lutitas gotlandienses de Sta. Creu d'Olorde da lugar a un fosfato cuya exacta composición química se está determinando en el laboratorio de cristalografía del Dr. FONT ALTABA de la Universidad de Barcelona.

DISCUSION

En la figura 2 se analiza la relación entre el contenido en hierro (que en cierta manera es el exponente del grado de piritización alcanzado por la roca al formarse) y el contenido en carbonatos alcalinotérreos. La relación es inversa, como podíamos esperar, si el modelo estudiado en las costas Venezolanas era válido. En algunas muestras

el Cobalto sustituye al Hierro y predomina el Arsénico sobre el Fósforo (Peramea). Ello introduce algunas anomalías en la relación anteriormente citada. En realidad debieran considerarse el conjunto de los metales pesados así como Fosforo más Arsénico.

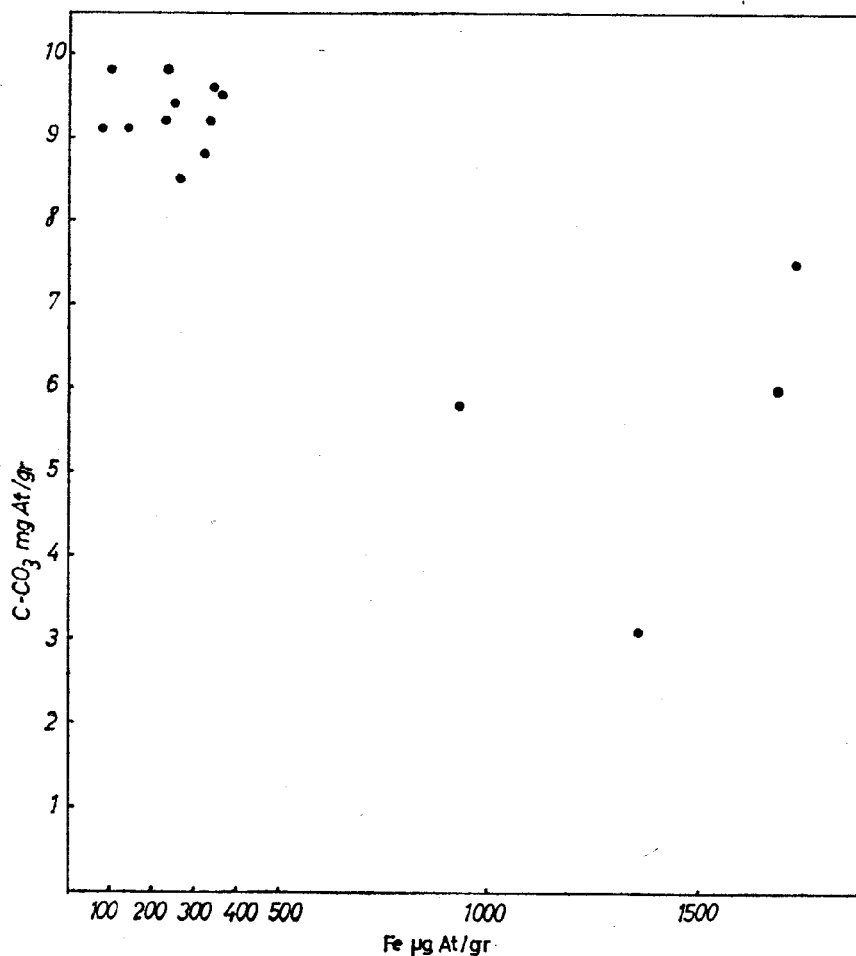


Fig. 2.—La relación entre contenido en Hierro y en Carbonatos alcalino-térreos es claramente inversa dentro de la dispersión esperada debido a la importante proporción de otros metales pesados presentes en algunos sedimentos.

A nuestro modo de ver tiene una gran importancia la presencia constante de compuestos que dan fluorescencia a la luz ultravioleta de 254 m μ después de desarrollar cromatográficamente los extractos acetónicos verificados sobre los compuestos estudiados. En las pro-

ximidades del frente de elución aparecen manchas de fluorescencia azul al ser iluminadas con U.V. de 350 m μ . Cerca del origen las manchas dan fluorescencias anaranjadas con luz de 350 m μ . Observando el cromatograma con luz de 254 m μ aparecen manchas negras (RF 0.6-0.8) sobre un fondo fluorescente debido al soporte utilizado.

Diversos autores (BALLESTER, 1966; BOGOROD, 1962; EGGER, 1962; FALK, 1964) citan fenómenos similares de fluorescencia debidos a compuestos porfirínicos.

La identificación de las sustancias que motivan las fluorescencias en este caso, se está llevando a cabo por uno de nosotros (PLANA).

Por todas estas observaciones pensamos que los sedimentos piritizados se habrán formado en las plataformas continentales (o en sus inmediaciones) y en mares de relativamente elevada productividad. Apoya esta posibilidad el siguiente hecho: Los sedimentos de la fosa de Cariaco solamente presentan vestigios de piritización desde la superficie superior hasta los 400 cm., niveles cuya antigüedad alcanza los 10.700 ± 400 años (HEEZEN, comunicación particular). Los niveles anteriores a esta época presentan facies oxidada lo cual indica que hace aproximadamente 11.000 años se produjo una crisis en las condiciones ecológicas del mar inmediato a la fosa de Cariaco. Efectivamente, se estima que esta es la antigüedad del movimiento que originó la apertura del canal existente entre isla Margarita y el continente (fig. 1) que es donde actualmente se detectan los mayores niveles de productividad fitoplanctónica (BALLESTER Y MARGALEF, en prensa) la cual es capaz de proporcionar reservas energéticas suficientes para el mantenimiento de una población activa de bacterias SR en la plataforma continental, en las profundas aguas de la fosa de Cariaco (1.460 m) y en sus sedimentos.

CONCLUSIONES

La actividad de determinadas bacterias marinas sulfato-reductoras permite encontrar una explicación plausible a la presencia de

núcleos piritosos (más o menos alterados por la meteorización subsiguiente a su afloramiento y a procesos metamórficos diversos) en los sedimentos estudiados.

La presencia de H_2S libre en determinadas cuencas marinas, así como la de organismos piritizados en los sedimentos correspondientes, hace pensar en el origen biológico de las piritas de los sedimentos marinos (vía actividad de gérmenes sulfato-reductores condicionada a la existencia de un activo transporte energético desde la superficie a las zonas profundas) lo cual viene confirmado por la relación S^{32}/S^{34} en nucleos piritosos procedentes de la fosa de Cariaco.

En todos los sedimentos que hemos analizado existe anhídrido silícico que se presenta de diferentes maneras. Teniendo en cuenta que los foraminíferos piritizados hasta ahora estudiados por nosotros contienen un molde constituido por anhídrido silícico puro que representa de un 20 a un 40% del peso de la muestra de foraminíferos (fig. 3 y 4), se explica la estrecha relación entre piritización y silicificación de los sedimentos. De esta observación se deduce un mecanismo de precipitación del SiO_2 , fuertemente relacionado con procesos de naturaleza biológica.

Los problemas que plantea el estudio de los procesos reordenativos que dan lugar a las rocas sedimentadas a partir de materiales parecidos a los sedimentos actuales escapan a nuestra intención.

SUMMARY

The study of the activity of marine sulfate-reducing bacteria was carried out in actual and consolidated sediments via chemical analysis of Iron, Phosphorus, Calcium plus Magnesium —carbonates and porfirin— compounds. The chemical results and the microbiological study of sulfate-reducing bacteria in marine sediments, in sea water and in laboratory cultures (using $^{14}CO_3HNa$ as a source of carbon) shows that their possibility of growth depends on the plankton photosynthesis. The main source of energy for all microor-

ganisms (if we exclude the original vital processes of the Earth) is the energy of photosynthetic organisms as convertors of light energy to chemical energy. Then, the higher level of piritization corresponds at coastal sediments because both the upwelling and the high productivity characterized the coastal sea water.

In addition we found an interesting process of silicification in all piritized foraminifera from Cariaco Trench. This phenomena can explain the strong relationship between the rate of piritization and silica contents in actual and consolidated sediments.

BIBLIOGRAFIA

BALLESTER, A.—1966. Crítica de los métodos espectrofotométrico y cromatográfico en el estudio de los pigmentos del plancton. *Investigación Pesquera*, XXX: 613-630.

BALLESTER, A. y MARGALEF, R.—Productividad primaria en el Caribe sud-oriental venezolano. *En prensa*.

BOGORAD, L.—1962. *Chlorophylls. Physiology and Biochemistry of algae*. Acad. Press. New-York and London.

DOMINGO, M.—1966. Comunicación particular.

EGGER, K.—1962. Dünnschicht chromatografie der Chloroplastenpigmente. *Pflanze*, 58: 664-667.

FALK, J. E.—1964. Porphyrins and metalloporphyrins. *Elsevier Publishing Company*. New-York.

FUKUOKA, J. y BALLESTER, A.—1963. Un análisis de las condiciones hidrográficas del mar Caribe (III). *Mem. Soc. Cien. Nat. La Salle XXIII*: 132-142.

HEEZEN, B. C.—1964. Comunicación particular.

ISACHENKO, B. C.—1958. Genezise Mestorozhdeny Sery. *Trudy In-ta Mikrobiol. AN SSSR*, núm. 5.

ISHIMOTO, M. and FUJIMOTO, D.—1959. Adenosine-5-phosphosulfate as an intermediate in the reduction of sulfate by sulfate-reducing bacterium. *Proc. Japan Acad.* 35: 243.

MARGALEF, R. Fitoplancton y pigmentos fotoactivos en el Caribe sud-oriental venezolano. *En prensa*.

MIRO, M.—1966. Comunicación particular.

PECK, H. D. Jr.—1959. The ATP-dependent reduction of sulfate with hydrogen in extracts of *Desulfovibrio desulfuricans*. Proc. Nat. Acad. Sci: U. S., 45:701.

RILEY, S. P. and WILSON, T. R. S.—1965. The use of thin-layer chromatography for the separation and identification of phytoplankton pigments. J. Mar. Biol. Ass. U. K., 45: 583-591.

THODE, H. G., R. K. WANLESS and WALLOUCH.—1954. The Origin of Native Sulphur Deposits From Isotope Fractionation Studies: *Geochim. et Cosmochim. Acta*, v. 5, núm. 6.