

V Taller y Seminario Latinoamericano TRATAMIENTO ANAEROBIO DE AGUAS RESIDUALES
Fifth Latin-american Workshop-Seminar WASTEWATER ANAEROBIC TREATMENT
27-30 October 1998, Viña del Mar, CHILE.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE
BACTERIAS TIOSULFATO REDUCTORAS
NO SULFATO REDUCTORAS EN
DIGESTORES ANAEROBIOS MESOFILICOS

INTRODUCCION

En digestores anaerobios con presencia de sulfato existe competencia entre las bacterias sulfato reductoras y las bacterias metanogénicas por substratos como el hidrógeno (O'Flaherty *et al.*, 1998). Por otro lado, el producto final de la reducción de sulfato es el sulfuro de hidrógeno, que puede ser reoxidado químicamente en condiciones de microaerofilia hasta sulfuro de hidrógeno (Magot *et al.*, 1997). Siendo este último un compuesto clave en el ciclo del azufre y que puede llegar a constituir cerca del 80% del total de los compuestos que intervienen en dicho ciclo en ambientes anaerobios como los sedimentos marinos (Jørgensen, 1990). Por ambas razones, el tiosulfato podría tener un papel importante en la ecología de los digestores anaerobios ricos en compuestos azufrados.

Frecuentemente, la actividad bacteriana sulfato reductora se encuentra ligada con la actividad tiosulfato reductora (Harry y Peck, 1992). Sin embargo, se ha encontrado recientemente que en ciertas condiciones estas dos actividades pueden estar disociadas (Fardeau *et al.*, 1993). Es decir, se puede encontrar la tiosulfato reducción independiente de la sulfato reducción. Esto implica poblaciones microbianas diferentes en cada uno de los casos. No obstante, todavía no se sabe si tales poblaciones están presentes en los digestores anaerobios y cual podría ser su papel en el proceso de mineralización de la materia orgánica.

Para este estudio, se planteó como objetivo aislar y caracterizar las bacterias tiosulfato reductoras no sulfato reductoras de tres digestores anaerobios industriales operados en condiciones mesofílicas y alimentados con aguas residuales conteniendo altas concentraciones de sulfato y proteína.

MATERIAL Y METODOS

Inóculos. Se utilizó como inóculo inicial el lodo de tres digestores UASB industriales que tratan aguas de una fábrica de quesos, de levaduras y de una reprocesadora de papel. Estas aguas contienen respectivamente 3000, 17000 y 3940 mg/l de DQO así como 369, 640 y 500 mg SO_4^{2-} /l dando relaciones DQO/ SO_4^{2-} de 8.3, 26.6 y 7.9. Una descripción completa de estas plantas es disponible en la tabla 4 (reactores 13, 19 y 25) del inventario de digestores anaerobios en México realizado por Monroy *et al.* (1997).

Enriquecimiento y aislamiento. Los inóculos iniciales fueron enriquecidos sucesivamente cuatro veces en presencia de tiosulfato de sodio (3.1 g/l). Se utilizó como medio de cultivo, la solución mineral siguiente (g/l):

Fisiología. En cuanto a la caracterización fisiológica, se determinó la rapidez de crecimiento en función del pH, la temperatura y la salinidad. El pH fue ajustado con diferentes cantidades de NaHCO₃ o Na₂CO₃ a 10%, para obtener los diferentes valores a estudiar. La evolución de la tasa de crecimiento en función de la temperatura fue estudiada en un intervalo de 14°C a 54°C. La incubación se realizó en baño María con termostato. En cuanto a la influencia de la salinidad sobre el crecimiento se determinó a diferentes concentraciones de NaCl.

Se evaluó también si las cepas podían usar diferentes aminoácidos tales como cisteína, arginina, serina, lisina, prolina, glutamina, treonina, alanina, glicina, glutamato, tirosina, isoleucina, leucina, fenilalanina, aspartato, asparagina, valina, metionina, histidina. El producto de metabolismo se identificó por HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

RESULTADOS Y DISCUSION

Aislamiento.

Se obtuvieron 9 cepas bacterianas del digestor que trata aguas de la fábrica de quesos, 17 del digestor de la reprocesadora de papel y 4 de la fábrica de levaduras. Todas las cepas obtenidas fueron capaces de usar por lo menos uno de los siguientes aceptores de electrones: sulfato, tiosulfato o azufre. Seis de las cepas aisladas resultaron ser sulfato reductoras además de reducir el tiosulfato (Tabla 1).

Tabla 1. Bacterias sulfato reductoras.

Cepa	Origen	Morfología	Utilización de glucosa
SR1	C	vibrio inmóvil	-
SR2	C	espiroqueta	-
SR3	U	bacilo fino	-
SR4	U	vibrio	+
SR5	I	vibrio	-
SR6	I	espiroqueta	-

C: fábrica de queso; U: reprocesadora de papel; I: fábrica de levadura

Estas bacterias provienen de los tres digestores (Tabla 1). De ellas, solo la cepa SR4 fue aislada en presencia de casaminoácidos, en tanto que las otras cinco fueron aisladas con peptona y todas ellas en presencia de hidrógeno.

Se encontraron también bacterias tiosulfato reductoras no sulfato reductoras capaces de reducir el azufre elemental (Tabla 2).

Tabla 2. Bacterias tiosulfato reductoras.

Cepa	Origen	Morfología	Utilización de glucosa
TR1	U	bacilo	-
TR2	C	bacilo	+
TR3	C	bacilo	-
TRH	C	bacilo	-
TR5	U	bacilo	-
TR6	U	bacilo	-
TR7	U	bacilo	-
TR8	U	bacilo	-
TR9	U	bacilo	+
TR10	U	bacilo	-

C: fábrica de queso; U: reprocesadora de papel; I: fábrica de levadura

Estas bacterias se encontraron solo en los digestores de la fábrica de quesos y de la reprocesadora de papel. Todas ellas fueron aisladas con peptona, excepto la TR1 y la TR2 que fueron obtenidas sobre peptona más hidrógeno. Cabe hacer resaltar que las bacterias tiosulfato reductoras no sulfato reductoras se encontraron en los reactores alimentados con aguas teniendo una relación DQO/SO₄ inferior a 10 y no en el reactor con una relación superior a 20.

Además, se obtuvieron 15 bacterias azufre reductoras no sulfato reductoras y no tiosulfato reductoras, las cuales provienen de los tres reactores (Tabla 3). Todas ellas fueron aisladas con peptona, únicamente la TR9 y la TR10 en presencia de hidrógeno.

Tabla 3. Bacterias azufre-reductoras.

Cepa	Origen	Morfología	Utilización de glucosa
AR1	C	bacilo	+
AR2	U	bacilo	+
AR3	U	bacilo	+
AR4	U	bacilo	-
AR5	U	bacilo	-
AR6	U	bacilo	-
AR7	C	bacilo	-

AR8	U	bacilo	+
AR9	I	bacilo	+
AR10	I	bacilo	+
AR11	U	bacilo	-
AR12	C	bacilo	-
AR13	C	bacilo	-
AR14	C	bacilo	+
AR15	U	bacilo	-

C: fábrica de queso; U: reprocesadora de papel; I: fábrica de levadura

Pruebas de biología molecular.

El ADN de las cepas bacterianas tiosulfato reductoras fue sometido al corte con tres enzimas de restricción. Se obtuvo el mismo perfil para todas ellas, lo que sugiere que podrían ser idénticas. Se seleccionaron dos cepas para hacer la caracterización fisiológica y filogenética (TR3 del digestor de la fábrica de queso y TR5 de la reprocesadora de papel). Después de secuenciar su ARNr 16S, se encontró que ambas son al 98% próximas a *Clostridium subterminale*. En cuanto al contenido de GC% (Guanina Citosina %) fue de 31.4% para TR3 y de 31.1% para TR5, mientras que el GC de *C. subterminale* es de 28% (Smith y Hobbs, 1974).

Fisiología.

Se encontró que ambas cepas son capaces de utilizar la isoleucina, valina, metionina e histidina. En la figura 1 se presenta la velocidad de crecimiento de las cepas TR3 y TR5 en función del pH, de la temperatura y de la salinidad. Se puede observar que la cepa TR3 presentó un pH óptimo de 7.5, mientras que la TR5 de 7, pero que los dos microorganismos tuvieron una temperatura óptima idéntica de 37°C. Ningún crecimiento se observó en los dos casos abajo de pH 6 y arriba de pH 10, así como de 14 y 46°C. Las cepas toleraron hasta el 6% (p/v) de NaCl, pero la TR3 mostró un crecimiento máximo a 0 g NaCl/l y la TR5 a 10 g/l. De la misma forma *C. subterminale* es tolerante a 6% de NaCl (Smith y Hobbs, 1974).

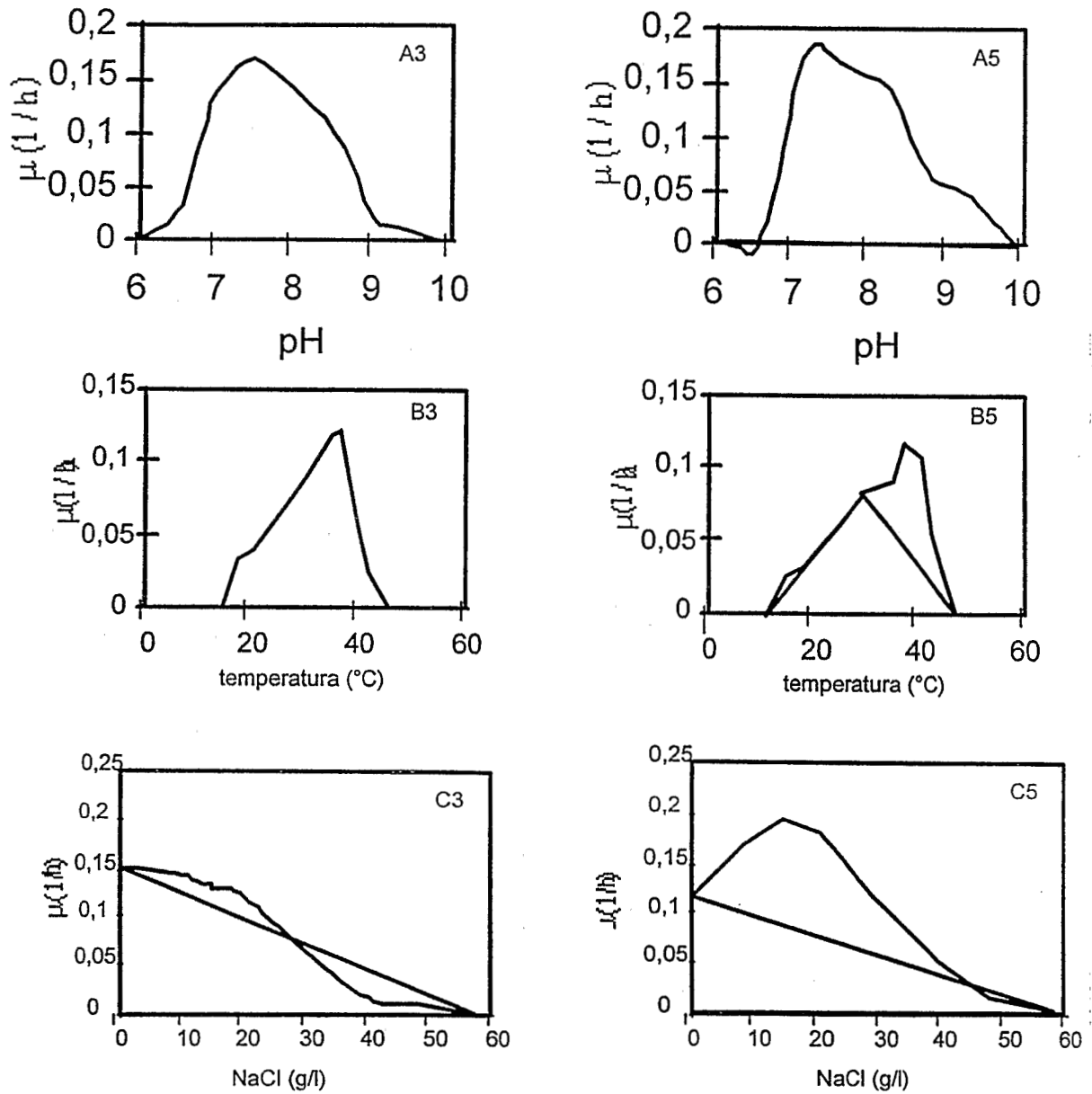


Figura 1. Velocidad de crecimiento de las cepas TR3 (3) y TR5 (5) en función del pH (A), de la temperatura (B) y de la salinidad (C).

Todo parece indicar que ambas cepas están muy próximas a *C. subterminale* sin embargo, es importante hacer hibridación ADN-ADN para confirmarlo.

CONCLUSION

Nuestros resultados muestran:

- que existe una gran biodiversidad de bacterias que intervienen en el ciclo del azufre, en los lodos de los digestores anaerobios ricos en proteína y compuestos azufrados

- la presencia de bacterias tiosulfato reductoras no sulfato reductoras en estos biotopos



Ravot, G., Magot, M., Ollivier, B. G., Patel, B. K. C., Ageron, E., Grimont, P. A. D., Thomas, P., Garcia, J.-L. (1997). *Haloanaerobium congolense* sp. nov., an anaerobic, moderately halophilic, thiosulfate and sulfur-reducing bacterium from an African oil field. *FEMS Microbiol. Lett.*, 147, 81-88.

Smith L. D. S. and Hobbs G. (1974). Genus III *Clostridium*. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. R. E. Buchanan & N. E. Gibbons (Eds.), pp. 551-572. The Williams Wilkins Company, Baltimore, USA.