

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

G. Hernández<sup>a,b</sup>, M.L./Fardeau<sup>a</sup>, B.K.C. Patel<sup>c</sup>, H./Macarie<sup>a,b</sup>,  
J.L./García<sup>a</sup> B/Ollivier<sup>a,\*</sup>.

<sup>a</sup> Laboratoire ORSTOM de Microbiologie des Anaérobies, Université de  
Provence, CESB-ESIL case 925, 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille, Cedex  
9, France.

<sup>b</sup> Laboratorio de Microbiología Ambiental y Tratamiento de Aguas residuales,  
Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Av.  
Michoacán y Purísima. Col. Vicentina, Iztapalapa C. P. 09340, México D.F.,  
México

<sup>c</sup> School of Biomolecular and Biomedical Sciences, Faculty of Science, Griffith  
University, Brisbane, Qld. 4111, Australia.

\* Correspondencia. e-mail : ollivier@orstom.esil.univ-mrs.fr

### RESUMEN

Frecuentemente se encuentra ligada la actividad bacteriana sulfato reductora con la actividad tiosulfato reductora, sin embargo se ha encontrado recientemente que en ciertas condiciones estas actividades pueden estar disociadas. Todavía no se sabe con precisión si estas dos actividades se encuentran presentes y desvinculadas en los digestores anaerobios y cual es su papel en el proceso de mineralización de la materia orgánica. El objetivo de este trabajo es aislar y caracterizar las bacterias tiosulfato reductoras no sulfato reductoras de tres digestores anaerobios industriales operados en condiciones Mesofilicas.

Se aislaron bacterias sulfato reductoras, tiosulfato no sulfato reductoras y azufre no sulfato no tiosulfato reductoras. Se seleccionaron dos cepas tiosulfato reductoras (TR3 y TR5), provenientes de dos digestores diferentes, para hacer una caracterización completa. Después de secuenciar su RNAr 16S se encontró que ambas cepas son muy próximas a *Clostridium subterminale*. En cuanto a su contenido de GC% es de 31.4% para TR3 y de 31.1% para TR5.

Nuestros resultados muestran la existencia de bacterias tiosulfato reductoras, no sulfato reductoras, en digestores anaerobios mesofilicos, alimentados con proteínas y sulfato.

### PALABRAS CLAVE

Aislamiento, digestores anaerobios, tiosulfato reducción

Fonds Documentaire IRD  
Cote: B\*21432 Ex: 1



## INTRODUCCION

En digestores anaerobios con presencia de sulfato existe competencia entre las bacterias sulfato reductoras y las bacterias metanogénicas por sustratos 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  $\text{SO}_4^{2-}$ /l dando relaciones DQO/ $\text{SO}_4^{2-}$  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):  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 3;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3;  $\text{NaCl}$ , 0.6;  $\text{MgCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.2;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.1;  $\text{KCl}$ , 0.1; resazurina (0.1%), 1ml/l; oligo-elementos de Balch, 10ml/l (Balch *et al.*, 1979); cisteína, 0.5; pH 7, y  $\text{Na}_2\text{S}$  0.01%. Las fuentes de carbono empleadas fueron casaminoácidos a 5 g/l o peptona a 5g/l. En ambos casos se utilizó atmósfera de hidrógeno/ $\text{CO}_2$  a 2 bar de presión. Paralelo a estos enriquecimientos, se hicieron otros utilizando peptona como fuente de carbono y una atmósfera de nitrógeno. Se utilizaron estos compuestos debido a que son sustratos de predilección para las bacterias tiosulfato reductoras (Fardeau, *et al.*, 1997), no obstante, algunas bacterias sulfato reductoras pueden también usarlos. Las colonias bacterianas fueron aisladas en medio sólido con la técnica de tubo rodado (Hungate, 1969) e incubadas a 37°C. El criterio de selección fue la velocidad de crecimiento. Las bacterias aisladas fueron cultivadas en presencia de glucosa como prueba de pureza y su capacidad de usar tiosulfato 20 mM, sulfato 20 mM y azufre elemental 2% como aceptor de electrones fue evaluada.

Pruebas de biología molecular. Para la extracción de ADN, las células fueron centrifugadas, lisadas con tampón (Tris:EDTA:SDS) e incubadas a 65°C. Los ácidos nucleicos fueron extraídos en una solución orgánica bifásica (fenol:cloroformo) y purificados por precipitación en isopropanol. Del ADN extraído fue amplificada la secuencia que codifica para el rRNA 16S por ciclos consecutivos de disociación fijación de "primers" y elongación, mediante PCR. La técnica de secuenciación del gen rRNA 16S fue descrita anteriormente por Ravot *et al.* (1997). Las secuencias fueron alineadas manualmente usando el editor ae2. El producto PCR fue fraccionado por las enzimas de restricción ALU 1, Cfo 1, Tru 91 (Boehringer Mannheim Biochemica). La determinación de GC% fue efectuada por el Dr. K. D. Jahnke en la DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania).

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 NaHCO<sub>3</sub> o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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/SO<sub>4</sub> 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).

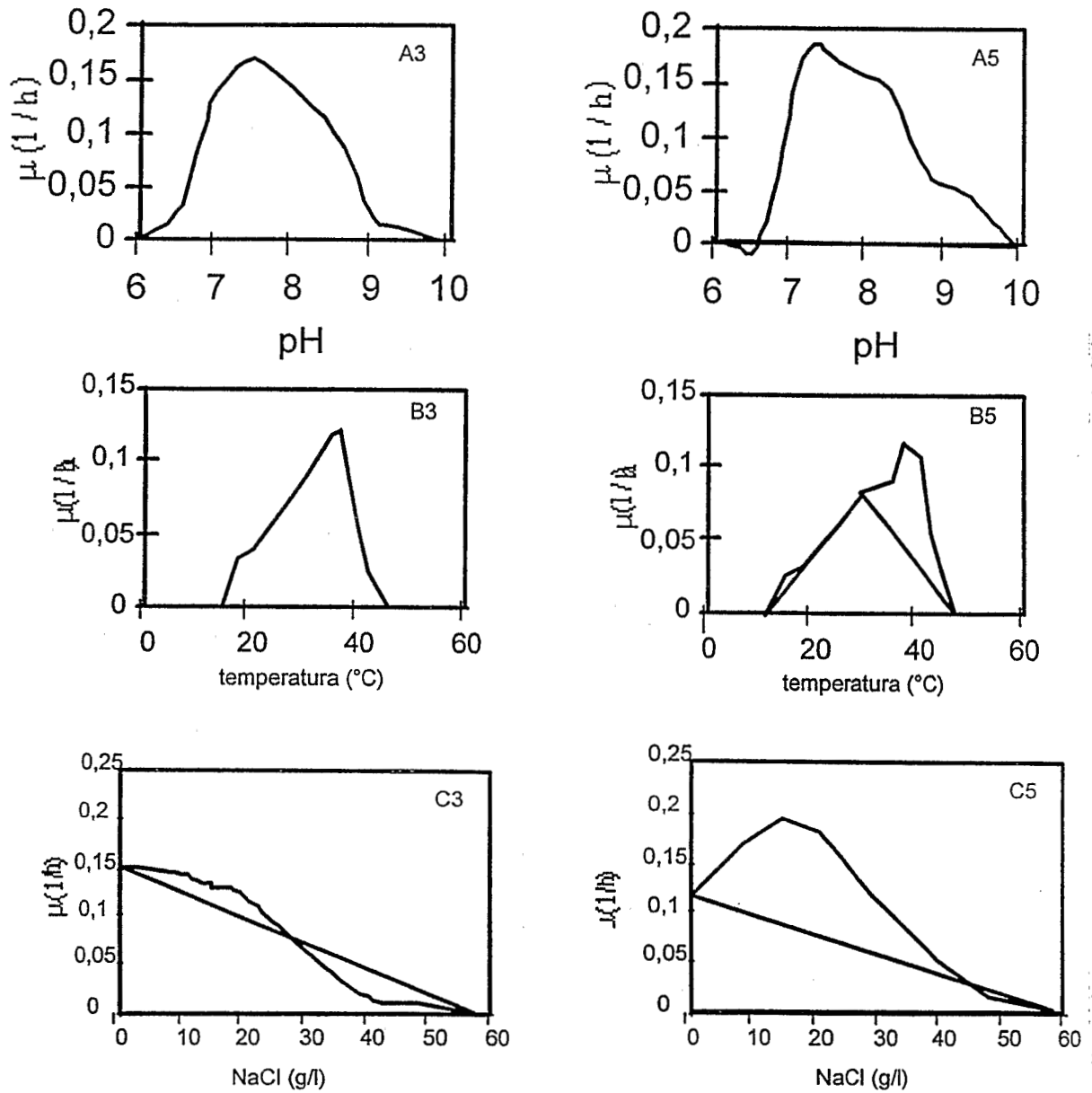


Figura 1. Velocidad de crecimiento de las cepas TR3 (3) y TR5 (5) en función del pH (A), de la temperatura (B) y de la salinidad (C).

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.

Falta sin embargo por determinar su papel en estos ecosistemas.

## AGRADECIMIENTOS

G. Hernández agradece ORSTOM por la beca otorgada para la realización de su doctorado. Los autores agradecen también a Alejandro Olmos por revisar el manuscrito.

## BIBLIOGRAFIA

- Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R., Wolfe, R. S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.*, 43 (2), 260-296.
- Fardeau, M.-L., Cayol, J.-L., Magot, M., and Ollivier, B., (1993). H<sub>2</sub> oxidation in the presence of thiosulfate by *Thermoanaerobacter* strain isolated from an oil producing well. *FEMS Microbiol. Lett.*, 113, 327-332.
- Fardeau, M.-L., Patel, B. K. C., Magot, M., Ollivier, B. (1997). Utilization of serine, isoleucine, and valine by *Thermoanaerobacter brockii* in the presence of thiosulfate or *Methanobacterium* sp. as electron acceptor. *Anaerobe*, 3, 405-410.
- Harry, D., Peck, Jr. (1992). Bioenergetic strategies of the sulfate-reducing bacteria. In: *The sulfate-reducing bacteria contemporary perspectives*. J.M. Odom, Rivers Singleton, Jr.(Eds.), pp. 41-76. Springer-Verlag, New York, USA.
- Hungate, R. E. (1969). A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. In: *Methods in Microbiology*, J. N. Norris, y D. W. Ribbons (Eds.), pp. 117-132. Academic Press, New York, USA.
- Jørgensen, B. B. (1990). A thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. *Science*, 249, 152-154.
- Magot, M., Ravot, G., Campaignolle, X., Ollivier, B., Patel, B. K. C., Fardeau, M.-L., Thomas, P., Crolet, J.-L., and Garcia, J.-L. (1997). *Dethiosulfovibrio peptidovorans* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, slightly halophilic, thiosulfate-reducing bacterium from corroding offshore oil wells. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47 (3), 818-824.
- Monroy, O., Meraz, M., Montoya, L. Famá, G., Macarie, H. (1997). Anaerobic digestion in Mexico: state of the technology, limitations and potential for its development. In: *Proc. 8th Int. Conf. on Anaerobic Digestion*. Vol. 2, pp. 272-284, May 25-29, 1997, Sendai, Japan.
- O'Flaherty, V., Lens, P., Leahy, B., and Colleran, E. (1998). Long term competition between sulphate reducing and methane-producing bacteria during full-scale anaerobic treatment of citric acid production wastewater. *Wat. Res.*, 32 (3), 815-825.

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.