

(10)

1.1.4-3

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

✓ DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

✓ AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE
BACTERIAS QUE UTILIZAN TIOSULFATO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

✓ MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A:

✓ BIOLOGA MONICA DEL PILAR BONILLA SALINAS

✓ TUTORES: M. EN C. FLORINA RAMIREZ V.
DR. OSCAR MONROY H.

JURADO: DR. HERVE MACARIE
DR. TEOFILO HERRERA

MEXICO, D.F.

✓ 1999



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Posgrado en Biotecnología

10

1.1.1.4.3

Octubre 03, 1999.

**M. en C. FLORINA RAMÍREZ VIVES
P R E S E N T E .**

Por medio de este conducto, la **Comisión del Posgrado en Biotecnología**, le agradece su participación como Secretaria en el examen de grado de la alumna **Mónica del Pilar Bonilla Salinas**, quien defendió y expuso la tesis **"Aislamiento y caracterización de bacterias que utilizan tiosulfato"** a los 03 días del mes de noviembre de mil novecientos noventa y nueve.

Así mismo, le agradece su participación como Tutora durante el desarrollo de la misma.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E .
"CASA ABIERTA AL TIEMPO"**

**DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ
COORDINADOR**



UNIDAD IZTAPALAPA

Av. Michoacán y La Purísima, Col. Vicentina, México, D.F. 09340, Tels: (5) 723-63-51 (5) 724-49-99, Fax: (5) 724-47-12,
e-mail: psgbt@xanum.uam.mx internet: <http://v.ww.iztapalapa.uam.mx/iztapala.www/division.cbs/biotecnolo/inicio.htm>

DEDICATORIA

A mi querida mamá Cristina Salinas Flores

A la memoria de mi papá Miguel Angel Bonilla Loranca

A ti Hervé con amor

Y a todo aquel al que este trabajo pueda servirle

*"La verdad necesita de dos para ser descubierta:
uno para decirla y otro para entenderla".*

Gibrán Jalil Gibrán

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Florina Ramírez y al Dr. Oscar Monroy por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente, bajo su dirección.

Al Dr. Hervé Macarie, al Dr. Teófilo Herrera, al Dr. Alejandro Olmos y a la Dra. Ortega por su apoyo y aliento para la consumación de este trabajo.

Al Dr. Aboubakar Ouattara y al Dr. Bernard Ollivier por los comentarios y sugerencias que me brindaron.

Al Fotógrafo Jorge Lodigiani por su ayuda con las fotografías al microscopio.

A todas las personas que favorecieron la realización de esta tesis.

Sobre todo a Dios, que me ha permitido vivir esta valiosa experiencia.

RESUMEN

En este trabajo se presenta el aislamiento y la caracterización de las bacterias que utilizan el tiosulfato: BSR y BTR procedentes del lodo de un reactor UASB operado en mesofilia y alimentado con sulfatos, lactosa y 4 - carboxibenzaldehído.

El aislamiento, se dividió en dos fases: la primera consistió en dos series de medio líquido de enriquecimiento en botellas serológicas y la segunda consistió en tres series de medio sólido en tubos Hungate.

Durante la primera fase se logró la propagación de los cultivos de interés y se determinó el tipo de metabolismo (respiración o dismutación) que realizaban las bacterias del inóculo.

En la segunda fase se logró la obtención de cepas puras.

Finalmente se hizo una caracterización de las cepas puras en base a la utilización de aceptores de electrones y de sustratos, se hizo una preidentificación comparando sus características con las especies reportadas en la literatura y se concluyó que se trataba de dos cepas de bacterias sulfato reductoras BSR, que correspondían a los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*, sin embargo esta última con características metabólicas interesantes, como la utilización de casaminoácidos y de una amplia variedad de carbohidratos como sustratos, características poco frecuentes y sólo reportadas en algunas especies.

En la parte destinada al aislamiento de tiosulfato reductoras que no utilizan sulfato BTR, no se encontraron bacterias de este tipo, de acuerdo con los resultados se trataba de cepas de BSR capaces de oxidar los casaminoácidos en presencia de tiosulfato, pero que también pueden utilizar el sulfato.

La estructura de la tesis es la siguiente: En el capítulo 1, se hace una revisión bibliográfica que permite introducirse en el tema, comenzando con el ciclo biológico del azufre para ubicar al tiosulfato como uno de los compuestos de mayor impacto en el ciclo, así como a los microorganismos que intervienen en las reacciones que lo utilizan; posteriormente se señalan las principales características de las bacterias involucradas en las reacciones del tiosulfato BSR y BTSR; finalmente se destaca la importancia de éstas en los reactores anaerobios.

En el capítulo 2 se presentan los materiales y métodos empleados durante los experimentos así como la descripción de las técnicas analíticas utilizadas.

Los resultados y la discusión se dividen en el capítulo 3 para las BSR y en el capítulo 4 para las BTSR; estos capítulos comprenden todo el proceso de aislamiento y la caracterización de las cepas.

El capítulo 5 presenta las conclusiones generales y las recomendaciones sugeridas.

Finalmente en el capítulo 6 se muestran las referencias bibliográficas que se tomaron en cuenta para la realización de la tesis.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 JUSTIFICACIÓN	1
1.2 EL CICLO BIOLÓGICO DEL AZUFRE	2
1.3 BACTERIAS QUE REDUCEN EL TIOSULFATO	4
1.3.1 Clasificación	4
1.3.1.1 Bacterias sulfato reductoras	4
1.3.1.2 Bacterias tiosulfato reductoras que no reducen sulfato	5
1.3.2 Procesos metabólicos	6
1.3.3 Requerimientos nutricionales	8
1.3.3.1 Bacterias sulfato reductoras	8
1.3.3.2 Bacterias tiosulfato reductoras	11
1.3.4 Factores ambientales	15
1.4 IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS EN LOS REACTORES ANAEROBIOS	16
1.5 OBJETIVOS	17
2. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 INÓCULO	18
2.2 MEDIOS DE CULTIVO	18
2.3 AISLAMIENTOS	21
2.3.1 Aislamientos BSR y BTSR en medio líquido de enriquecimiento	22
2.3.1.1 Aislamientos de BSR	22
2.3.1.2 Aislamientos de BTSR	24
2.3.2 Aislamientos de BSR y BTSR en medio sólido	25
2.3.2.1 Inoculación	26
2.3.2.2 Traslado de colonias	26
2.3.2.3 Dilución en serie del inóculo	29
2.3.2.4 Criterio de pureza	30
2.3.2.5 Reinoculación en medio líquido	30
2.4 PRUEBAS DE PUREZA	30
2.4.1 Observación al microscopio	33
2.4.2 Inoculación en un medio con glucosa	33
2.5 CARACTERIZACIÓN DE BSR Y BTSR	33
2.5.1 Utilización de aceptores de electrones: sulfato y tiosulfato	33
2.5.2 Utilización de sustratos	33
2.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS	35
2.6.1 Crecimiento celular	35
2.6.2 Cuantificación de H ₂ S gaseoso	35
2.6.3 Cuantificación de H ₂ S disuelto.	37

3. BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS	
3.1 AISLAMIENTOS DE BSR EN MEDIO LÍQUIDO	38
3.1.1 Primer aislamiento de BSR en medio líquido de enriquecimiento: determinación de la concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo.	38
3.1.2 Segundo aislamiento de BSR en medio líquido de enriquecimiento: utilización de sustratos	40
3.1.3 Determinación de la utilización del acetato + H_2/CO_2 por respiración y de la dismutación del tiosulfato en presencia del acetato	42
3.2 AISLAMIENTOS DE BSR EN MEDIO SÓLIDO	44
3.2.1 Inoculación en tubo rodado	44
3.2.2 Reinoculación en medio líquido	46
3.3 PRUEBAS DE PUREZA	46
3.3.1 Observación al microscopio	46
3.3.2 Inoculación en un medio con glucosa	48
3.4 CARACTERIZACIÓN	48
3.4.1 Utilización de aceptores de electrones: sulfato y tiosulfato	48
3.4.2 Utilización de sustratos	49
3.4.3 Identificación preliminar	52
4. BACTERIAS TIOSULFATO REDUCTORAS QUE NO REDUCEN SULFATO	
4.1 AISLAMIENTOS DE B TSR EN MEDIO LÍQUIDO	54
4.1.1 Primer aislamiento de B TSR en medio líquido de enriquecimiento: utilización de casaminoácidos + H_2/CO_2	55
4.1.2 Segundo aislamiento de B TSR en medio líquido de enriquecimiento: utilización del tiosulfato por respiración de casaminoácidos o por dismutación	56
4.2 AISLAMIENTOS DE B TSR EN MEDIO SÓLIDO	58
4.2.1 Inoculación en tubo rodado	58
4.2.2 Reinoculación en medio líquido	60
4.3 PRUEBAS DE PUREZA	60
4.3.1 Observación al microscopio	60
4.3.2 Inoculación en un medio con glucosa	62
4.4 CARACTERIZACIÓN	62
4.4.1 Utilización de aceptores de electrones: sulfato y tiosulfato	62
5. CONCLUSIONES	64
6. REFERENCIAS	66

FIGURAS

	Página
Capítulo 1	
Figura 1.1 Ciclo del azufre	3
Capítulo 2	
Figura 2.1 Preparación del medio de cultivo	20
Figura 2.2 Inoculación y rodamiento de tubos	27
Figura 2.3 Traslado de colonias dentro de la cámara anaerobia	28
Figura 2.4 Crecimiento de colonias al cabo de 30 días de incubación	31
Figura 2.5 Purga de jeringa y reinoculación en medio líquido	32
Figura 2.6 Curva de calibración del H ₂ S gaseoso	36
Figura 2.7 Curva de calibración del H ₂ S disuelto	37
Capítulo 3	
Figura 3.1 Producción de H ₂ S disuelto a diferentes concentraciones de extracto de levadura, usando acetato como sustrato y sulfato como aceptor de electrones	39
Figura 3.2 Producción de H ₂ S disuelto a diferentes concentraciones de extracto de levadura usando lactato como sustrato y sulfato como aceptor de electrones	40
Figura 3.3 Producción de H ₂ S disuelto correspondiente al 2o. enriquecimiento, usando acetato y lactato como sustratos y sulfato como aceptor de electrones	41
Figura 3.4 Producción de H ₂ S disuelto correspondiente al 2o. enriquecimiento, usando acetato y lactato como sustratos y tiosulfato como aceptor de electrones	41
Figura 3.5 Producción de H ₂ S disuelto, usando tiosulfato como aceptor de electrones	43
Figura 3.6 Bacterias sulfato reductoras	47
Capítulo 4	
Figura 4.1 Producción de H ₂ S de los cultivos del primer enriquecimiento para BTSR, utilizando tiosulfato como aceptor de electrones	56
Figura 4.2 Producción de H ₂ S de los cultivos del primer enriquecimiento para BTSR, utilizando tiosulfato como aceptor de electrones	57
Figura 4.3 Bacilos en cadena	61

TABLAS

Capítulo 1		Página
Tabla 1.1	Clasificación de las B TSR	6
Tabla 1.2	Reacciones de dismutación	7
Tabla 1.3	Comparación del metabolismo de las bacterias anaerobias estrictas que reducen el tiosulfato	14
Capítulo 2		
Tabla 2.1	Composición del medio de cultivo	18
Tabla 2.2	Sustratos para determinar procesos metabólicos en BSR	23
Tabla 2.3	Sustratos para determinar procesos metabólicos en B TSR	25
Tabla 2.4	Sustratos utilizados para la caracterización de las BSR	34
Capítulo 3		
Tabla 3.1	Aislamientos de BSR	45
Tabla 3.2	Producción de H ₂ S en cultivos en medio líquido con lactato y tiosulfato	46
Tabla 3.3	Prueba de utilización de aceptores de electrones de las cepas aisladas de BSR en lactato	49
Tabla 3.4	Utilización de diferentes sustratos expresada como crecimiento en las cepas aisladas de BSR en los dos aceptores de electrones	50
Tabla 3.5	Características de las cepas aisladas de BSR	53
Capítulo 4		
Tabla 4.1	Aislamientos de B TSR	59
Tabla 4.2	Diluciones correspondientes a las máximas absorbancias en los cultivos líquidos de las cepas aisladas con tiosulfato	60
Tabla 4.3	Prueba de utilización de sulfato y tiosulfato como aceptores de electrones en las cepas aisladas en casaminoácidos	63

INTRODUCCIÓN

1.1 JUSTIFICACIÓN

Entre el 68 y el 78 % de los compuestos azufrados reciclados por procesos de óxido - reducción, se encuentra en forma de tiosulfato. Desde principios de los años noventa, al tiosulfato se le ha considerado el producto más importante de la oxidación del sulfuro de hidrógeno, porque sus transformaciones son reacciones clave en el ciclo del azufre (Jorgensen, 1990; Jorgensen y Bak, 1991).

La reducción biológica del tiosulfato, es llevada a cabo por bacterias anaerobias facultativas y estrictas (Ravot *et al.*, 1995 a); estas últimas son de interés en el presente trabajo y principalmente destacan dos importantes grupos:

Las bacterias sulfato reductoras BSR, que son un grupo heterogéneo de procariontes anaerobios, con gran diversidad morfológica, ecológica y nutricional y que tienen en común la capacidad para utilizar sulfato, tiosulfato y azufre elemental como aceptores finales de electrones (Singleton, 1993).

En años recientes nuevas especies de bacterias tiosulfato reductoras que no reducen sulfato BTSR, se han logrado aislar de yacimientos acuíferos de pozos petroleros en condiciones extremas; sin embargo, de acuerdo con la literatura, es probable que existan BTSR mesófilas en otros hábitats, como lodos de reactores anaerobios que tratan aguas con alto contenido en sulfatos y proteínas (Ollivier *et al.*, 1996).

No se sabe hasta el momento si las BTSR pueden coexistir con otros microorganismos en los digestores anaerobios ni cual sea su interacción con ellos en el proceso de mineralización de la materia orgánica.

1.2 EL CICLO BIOLÓGICO DEL AZUFRE

El azufre existe en la naturaleza bajo distintos estados de oxidación +6 en (SO_4^{2-} y SO_3), +4 en (SO_3^{2-} y SO_2), +2 en ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ y $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$), 0 en S^0 , -2 en (HS^- , H_2S y R-SH) que están interrelacionadas; sin embargo, las formas de oxidación mas abundantes son -2 y +6. La serie de reacciones que permite pasar de una forma de oxidación a la otra constituye lo que se llama el ciclo del azufre. La cantidad de azufre presente sobre el planeta es limitada y definida y solo se observan cambios de una forma a la otra. La mayoría del azufre se encuentra inmovilizada bajo la forma de sedimentos o rocas de sales de sulfato o de sulfuro y azufre elemental. También el azufre se encuentra en forma mineral o ligado a la materia orgánica de los seres vivos.

Las reacciones que permiten pasar del estado más oxidado + 6 en la cual el azufre se encuentra bajo la forma de SO_4^{2-} a la forma mas reducida -2 del HS^- , corresponden a una reducción; mientras que las reacciones que permiten pasar de S^{-2} a S^{+6} son reacciones de oxidación.

Los descubrimientos de Bak y Cypionka (1987) y Bak y Pfennig (1987) para BSR y recientemente de Ollivier *et al.*, (1996) para las BTSR, concernientes a las reacciones de dismutación del $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ y del HSO_3^- dirigidas a la producción de SO_4^{2-} y de HS^- , agrega una nueva complejidad al potencial ambiental de estas bacterias (Singleton, 1993).

A pesar de que una parte de estas reacciones pueda ser realizada por vía abiótica, la mayoría de ellas hacen intervenir microorganismos. Las reacciones de incorporación de las formas de azufre mineral a azufre orgánico por los seres vivos se llama asimilación y su reconversión a azufre mineral desasimilación.

Introducción

Bajo condiciones anaerobias la mineralización de compuestos orgánicos del azufre forma el sulfuro de hidrógeno, que es la forma final energéticamente estable del azufre.

En condiciones óxicas y anóxicas, la oxidación química del sulfuro de hidrógeno produce tiosulfato, el cual actúa como un intermediario durante el ciclo del azufre en sedimentos marinos. En las partes óxicas el tiosulfato puede ser oxidado por quimiolitótrofos, mientras que en las partes anóxicas el tiosulfato puede ser dismutado o reducido. La reducción biológica del tiosulfato es un proceso altamente significativo, ya que un alto porcentaje de los compuestos azufrados reciclados, se encuentra en esta forma (Atlas, 1984; Brock *et al.*, 1987; Widdel, 1988; Singleton, 1993; Ravot *et al.*, 1995 a). En la figura 1.1 se desarrollan las reacciones redox del ciclo del azufre con los microorganismos que intervienen en ellas de acuerdo con Brock *et al.*, (1987).

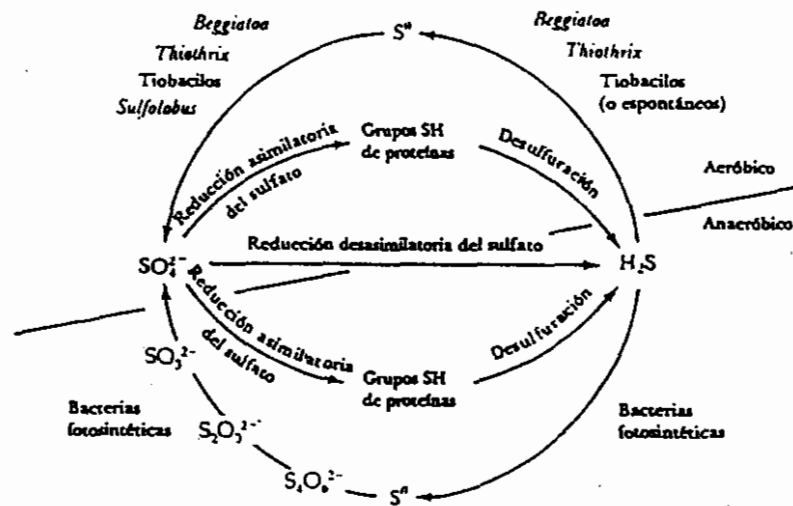


Figura 1.1 Ciclo del azufre

1.3 BACTERIAS QUE REDUCEN EL TIOSULFATO

La reducción biológica del tiosulfato es llevada a cabo por diferentes microorganismos. El interés se centra particularmente en las bacterias anaerobias estrictas: las BSR y las BTSR.

1.3.1 Clasificación

1.3.1.1. Bacterias sulfato reductoras

Las BSR constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos procariontes anaerobios estrictos, pertenecientes al dominio *Bacteria*, que tienen como factores comunes, la capacidad de desasimilar el sulfato además de otros compuestos oxidados del azufre y de producir H₂S (Widdel, 1988; Gibson, 1990; Singleton, 1993).

La clasificación de las bacterias sulfato reductoras, se basa principalmente en características nutricionales y morfológicas, así como el contenido de DNA y la presencia de algunos pigmentos particulares (citocromos).

La clasificación es compleja, pues algunas bacterias con morfologías similares, difieren nutricionalmente y otras con similitudes nutricionales presentan morfología diferente.

En conclusión, la clasificación, se hizo por fines prácticos, pero no refleja necesariamente relaciones filogenéticas.

De acuerdo a sus capacidades metabólicas las BSR, han sido divididas en dos grandes categorías:

Grupo I: las especies que oxidan sus sustratos a acetato son: *Desulfotomaculum* y *Desulfovibrio*

Muchas BSR no pueden oxidar los sustratos hasta CO₂. Esta limitación metabólica usualmente refleja la ausencia de una vía bioquímica para la oxidación de acetyl - CoA hasta CO₂.

Posteriormente se descubrieron especies capaces de oxidar completamente los sustratos, constituyendo así la segunda categoría:

Grupo II: las que oxidan sus sustratos a CO₂ son: *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema* y *Desulfobacterium*.

Las bacterias del grupo II pueden oxidar completamente el grupo acetyl de la acetyl - CoA hasta CO₂.

1.3.1.2 Bacterias tiosulfato reductoras que no reducen sulfato

Las BTSR son especies pertenecientes tanto al dominio *Archea* como al *Bacteria*, tienen como característica común, la habilidad para reducir el tiosulfato y el azufre elemental, pero no el sulfato y forman como producto final el H₂S (Ravot *et al.*, 1995 a; Magot *et al.*, 1997).

Los criterios de identificación que se han considerado, en general, son los mismos que para cualquier grupo bacteriano y corresponden al tipo de donador de electrones, la fuente de carbono, la temperatura y la tolerancia a concentraciones salinas, entre otros. Sin embargo al tratarse de especies recientemente descubiertas no se cuenta hasta el momento con suficiente información.

De acuerdo con la literatura (ver tabla 1.1), las BTSR se pueden clasificar en base a sus relaciones filogenéticas así como a algunas características metabólicas como son su tolerancia a la temperatura y a diferentes concentraciones salinas (Ravot *et al.*, 1995 b; Ravot *et al.*, 1996 a; Fardeau *et al.*, 1996).

Tabla 1.1 Clasificación de las BTSR

Mesófilas	<i>Peptidovibrio</i> y <i>Desulfitobacterium</i>
Halófilas	Familia Haloanaerobiaceae
Termófilas Grupo I	Dominio <i>Archea</i> : <i>Thermoproteus</i> , <i>Pyrodictium</i> , <i>Pyrobaculum</i> y <i>Archeoglobus</i> Dominio <i>Bacteria</i> : <i>Thermoanaerobacter</i> y <i>Thermoanaerobacterium</i> <i>Fervidobacterium islandicum</i> , <i>Thermosipho agricanus</i> , <i>Thermotoga elfii</i> y <i>Thermotoga</i> cepa 7054.
Hipertermófilas Grupo II	Dominio <i>Bacteria</i> : <i>Thermotoga neapolitana</i> y <i>T. maritima</i> , <i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i> y algunas especies de <i>Thermoanaerobacter</i> y <i>Thermotoga</i> cepa 2665

1.3.2 Procesos metabólicos

Las BSR pueden usar una variedad de donadores de electrones y pueden acoplar la oxidación de estos compuestos a la reducción de sulfato, tiosulfato o azufre elemental. Mientras que las BTSR sólo pueden reducir el tiosulfato y el azufre elemental. Este proceso se conoce como desasimilación y es opuesto a la asimilación. El primero es energético mientras que el último reduce compuestos de azufre para incorporarlos a compuestos biológicos como cisteína o Coenzima -A.

La desasimilación por reducción de un compuesto azufrado es un clásico ejemplo de lo que se conoce como respiración anaerobia. En el proceso de respiración, los electrones generados por oxidación de un compuesto son usados para reducir un segundo compuesto que es independiente de la vía de oxidación inicial.

En la fermentación, los electrones generados por la oxidación de un compuesto son usados para reducir un producto generado durante el proceso de oxidación. En la fermentación un solo sustrato provee ambas moléculas: donador y aceptor para reducir los equivalentes transferidos en los procesos de oxidación y reducción.

Tradicionalmente se ha considerado que la fermentación involucra tres características: ausencia de aceptores de electrones, ausencia de fosforilación oxidativa de transporte de electrones directamente acoplada al proceso de oxidación y exclusivamente la utilización de compuestos orgánicos; sin embargo en la década anterior se comenzaron a cuestionar estos puntos.

Bak y Cypionka (1987), Bak y Pfennig (1987) y Krämer y Cypionka (1989) observaron que varias especies de BSR podían llevar a cabo reacciones de dismutación involucrando compuestos azufrados (sulfito o tiosulfato) y recientemente Thamdrup *et al.*, (1993) observó la dismutación del azufre elemental. En todas las reacciones se forman como productos de reacción sulfato y sulfuro de hidrógeno (Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Reacciones de dismutación

Sulfito	$4 \text{SO}_3^{2-} + \text{H}^+ \longrightarrow 3 \text{SO}_4^{2-} + \text{HS}^-$
Tiosulfato	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{HS}^- + \text{H}^+$
Azufre	$4 \text{S}^0 + 4 \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{SO}_4^{2-} + 3 \text{H}_2\text{S} + 2 \text{H}^+$

Este nuevo metabolismo conocido como dismutación, corresponde a una fermentación inorgánica, en donde los microorganismos pueden crecer quimiolitotróficamente sin usar reacciones redox y globalmente no presentan cambios en el número de oxidación del compuesto azufrado (Kelly 1987, Singleton, 1993; Smith, 1993). Ravot *et al.*, (1995 a) y Ollivier *et al.*, (1996) observaron la dismutación del tiosulfato en varias especies de BSR.

Estos descubrimientos han contribuido a comprender mejor las reacciones que constituyen el ciclo del azufre.

1.3.3 Requerimientos nutricionales

1.3.3.1 Bacterias sulfato reductoras

Los requerimientos nutricionales de las BSR, son relativamente simples. Requieren un aceptor inorgánico de electrones, que generalmente, es el ion sulfato aunque la mayoría, pueden utilizar también el sulfito o el tiosulfato e inclusive el azufre elemental. Algunas especies como por ejemplo *Desulfovibrio desulfuricans*, son capaces de utilizar otros compuestos azufrados, como el tetrionato (Gibson, 1990).

Requieren también un donador de electrones que actúa como fuente de energía. Las BSR tienen la habilidad de crecer con compuestos orgánicos reducidos, tales como propionato, butirato, ácidos grasos, que son sustratos de baja energía. Pero también hay especies que son capaces de usar sustratos de alta energía como lactato o etanol así como otros mas.

De acuerdo con Widdel (1988) y Hansen (1993) las bacterias sulfato reductoras tienen la capacidad de utilizar los compuestos siguientes como donadores de electrones:

Utilización de lactato

El lactato es uno de los sustratos más ampliamente usados para cultivar BSR del grupo I. Algunas especies de *Desulfovibrio* son capaces de utilizar ambos isómeros (L y D).

Oxidación de alcoholes primarios, secundarios, dioles y glicerol

El etanol es usado como fuente de energía por muchas especies de BSR como *Desulfovibrio*. Además se ha observado que algunas especies pueden oxidarlo sin presentar crecimiento.

La utilización de alcoholes primarios de cadena larga por especies del grupo I, se logra mediante la inclusión de otra fuente de carbono en el medio de cultivo como la mezcla de acetato + CO₂. Se ha observado la utilización de propanol y butanol, pero no isopropanol.

Los dioles como etanediol y propanediol no son frecuentemente usados como sustratos sin embargo algunas especies pueden usarlos. Otras pueden oxidar el glicerol hasta acetato y CO₂, particularmente las del género *Desulfovibrio*.

Utilización de formiato, acetato y ácidos de cadenas lineales y ramificadas

El formiato puede ser oxidado por casi todas las especies de *Desulfovibrio* algunas de *Desulfatomaculum* y por *Desulfococcus*, *Desulfobacterium* y *Desulfonema*. Muchas especies que crecen en hidrógeno, pueden también crecer en formiato, aunque algunas sólo crecen en alguno de los dos.

El propionato es usado como sustrato por *Desulfobulbus* y es oxidado hasta acetato y CO₂ aunque varias especies del grupo II pueden también utilizarlo, pero muy lentamente.

En el acetato, es donde se ha observado mayor crecimiento de sulfato reductoras del grupo II.

El butirato, lo pueden usar tanto especies del grupo I, como del grupo II; aunque éstas últimas tienen un crecimiento lento. La utilización de isobutirato ha sido reportada sólo por ciertas especies del grupo II.

Utilización de carbohidratos

La utilización de carbohidratos como fuente de energía no es común entre las BSR, sólo pocas especies de *Desulfotomaculum*: *Dtm. nigrificans* y *Dtm. geothermicum*, utilizan la fructosa y algunas especies de *Desulfovibrio* han mostrado habilidad para utilizar la glucosa.

Utilización de compuestos aromáticos

La cantidad de compuestos aromáticos que pueden ser degradados por las BSR es impresionante.

En general la degradación de los compuestos aromáticos por BSR, que rompen la estructura del anillo, ha sido reportada para muchos compuestos y ocasionalmente se ha observado que algunas especies, pueden utilizar los compuestos sin romper el anillo aromático.

Las principales fuentes naturales de compuestos aromáticos son: los aminoácidos aromáticos y la lignina así como sus precursores y sus productos degradados. Además los compuestos xenobióticos que son compuestos sintéticos que normalmente no están presentes en el ambiente, como la anilina (aminobenceno).

Utilización de ácidos dicarboxílicos

El malato y el fumarato son usados principalmente por varias especies de *Desulfovibrio* y por algunas de *Desulfobacterium*. El succinato puede ser utilizado como sustrato, pero el crecimiento es considerablemente pobre.

Utilización de aminoácidos

En general no es muy común que las BSR tengan un buen crecimiento en aminoácidos, aunque algunas especies tienen la capacidad metabólica de oxidarlos.

Utilización de diversos compuestos

Actualmente se sabe que existe una gran diversidad de compuestos que pueden ser usados como sustratos por algunas especies:

La acetona es un producto de la fermentación de ciertas cepas de *Clostridium* y *Desulfococcus biacutus* presenta un crecimiento lento cuando la oxida hasta CO₂. En *Desulfovibrio furfuralis* se ha observado la utilización de furfural y furfuralcohol.

Mientras que *Desulfobacterium autotrophicum* puede oxidar algunos compuestos clorados como diclorometano y tricloroetano, percloroetano, tricloroetano. El catecol es oxidado por una especie formadora de esporas del género *Desulfotomaculum*. (Kuever *et al.*, 1993).

El hidrógeno, puede ser usado como donador de electrones por especies del grupo I (Widdel, 1988; Hansen, 1993). El 3 - metoxibenzoato puede ser usado por algunas BSR (Mohn y Tiedje, 1990). El hexadecano y el caprilato pueden ser oxidados por las especies del grupo II, sin embargo en éste último, se obtiene un crecimiento pobre (Aeckersberg *et al.*, 1991).

1.3.3.2 Bacterias tiosulfato reductoras

En comparación con las BSR, en las BTSR, falta mucho por estudiar ya que es un grupo bacteriano recientemente descubierto, actualmente se conocen sólo algunos compuestos que pueden ser utilizados como sustratos.

Los requerimientos nutricionales de las BTSR, son similares a los de las BSR, son un aceptor de electrones que es el tiosulfato o el azufre elemental y un donador de electrones.

Se ha observado que los compuestos proteínicos y algunos carbohidratos, particularmente la glucosa, son los sustratos predilectos de las BTSR (Faudon *et al.*, 1995; Ravot *et al.*, 1995; Magot *et al.*, 1997).

Han sido demostradas actividades proteolíticas, peptidolíticas o amilolíticas y xilanolíticas en especies de BTRSR mesófilas y termófilas del dominio *Bacteria*. (Fardeau, 1997).

Por otra parte, se ha demostrado que la adición de tiosulfato como aceptor de electrones al medio de cultivo, repercute en un incremento en la velocidad de crecimiento y en la producción celular; mejora la oxidación de los péptidos y de los aminoácidos y permite el consumo de hidrógeno aliviando su efecto inhibitorio (Faudon *et al.*, 1995; Ravot *et al.*, 1995 a; Fardeau *et al.*, 1996; Ravot *et al.*, 1997).

Utilización de carbohidratos

Se ha observado que *Thermoanaerobacter finii*, presentó habilidades metabólicas para fermentar carbohidratos como glucosa y xilosa, presentando como productos de fermentación lactato, acetato H_2 y CO_2 , siendo el etanol el mayor producto final (Fardeau *et al.*, 1996).

Se ha observado la utilización de glucosa en especies del orden Thermotogales (Ravot *et al.*, 1995 a) y en el género *Thermoanaerobacterium* (Ollivier *et al.*, 1996). La fructosa, la galactosa, la D - glucosa, la maltosa, la D - manosa, la D - Ribosa, la sacarosa y la trehalosa, han sido usados como sustratos por especies halófilas de la familia Halobacteriaceae, siempre y cuando se agreguen al medio el extracto de levadura y o bio-tripticosa (Ravot *et al.*, 1997). Algunas especies de *Thermotoga* pueden fermentar glucosa (Ravot *et al.*, 1995 a; Ravot *et al.*, 1996 b).

Utilización de compuestos proteínicos

En algunas especies de *Thermoanaerobacter* se ha observado la capacidad para oxidar compuestos proteínicos que incluyen gelatinas, péptidos y casaminoácidos (Faudon *et al.*, 1995; Ravot *et al.*, 1995 a; Fardeau *et al.*, 1996). Ha sido observada la utilización de la serina, la leucina, la isoleucina y la valina por *Thermoanaerobacter brockii* (Fardeau *et al.*, 1997).

Utilización de hidrógeno

Se ha demostrado que *Thermoanaerobacter brockii*, *T. ethanolicus*, *T. thermohydrosulfuricus* y *T. finnii* pueden oxidar el hidrógeno en presencia de tiosulfato (Fardeau *et al.*, 1993; Faudon *et al.*, 1995; Fardeau *et al.*, 1996). Otras especies del orden Thermotogales también lo utilizan (Ravot *et al.*, 1995 b).

Los compuestos utilizados como sustratos y aceptores de electrones por las BSR y BTSR, están resumidos en la tabla 1.3 hay que notar que algunos de los compuestos son usados por varias especies, mientras que otros sólo son usados por algunas especies en particular (Atlas, 1984; Widdel, 1988; Fardeau *et al.*, 1993; Hansen, 1993; Kuever *et al.*, 1993; Lovley y Phillips, 1994; Faudon *et al.*, 1995; Ravot *et al.*, 1995 a; Ravot *et al.*, 1995 b; Fardeau *et al.*, 1996; Ollivier *et al.*, 1996; Ravot *et al.*, 1996 b; Fardeau *et al.*, 1997; Ravot *et al.*, 1997).

Tabla 1.3 Comparación del metabolismo de las bacterias anaerobias estrictas que reducen el tiosulfato

	BSR	BTSR
Requerimientos de potencial redox	Anaerobiosis estricta	Anaerobiosis estricta
Tolerancia a sales	baja alta (halófilas)	baja alta (halófilas)
Rangos de temperatura	Psicrófilas Mesófilas Termófilas	Mesófilas Termófilas Hipertermófilas
Aceptores de electrones	Sulfato Tiosulfato Azufre elemental Tetracionato Nitrito Nitrito Fumarato Manganeso	Tiosulfato Azufre elemental
Sustratos	Oxiácidos Acidos monobásicos Acidos dibásicos Acidos alcanóicos Alcoholes Hidrógeno H ₂ /CO ₂ Compuestos Aromáticos	Aminoácidos Péptidos Glucosa
Sustratos utilizados sólo por algunas especies	Carbohidratos (fructosa, glucosa, manosa, xilosa, ramnosa) Aminoácidos Citrato Acetona Catecol	Xilosa Hidrógeno

1.3.4 Factores ambientales

El crecimiento de las bacterias sulfato reductoras BSR y tiosulfato reductoras no sulfato reductoras BTSR, no puede determinarse únicamente por sus características nutricionales, ya que en el medio ambiente, existen factores fisicoquímicos, como potencial redox, temperatura, presión y concentración de sales, que repercuten en su desarrollo.

Potencial redox

Para lograr el crecimiento de BSR y BTSR en cultivos puros, el potencial redox (Eh) del medio de cultivo debe estar abajo de -100 mV. Esto indica, que una mera exclusión de aire, no es suficiente para asegurar el crecimiento en un medio de cultivo. Reduciendo el medio de cultivo, por ebullición se alcanza un Eh de -200 mV, en presencia de un reductor el valor de Eh irá abajo de -220 mV (Postgate, 1979).

Rangos de temperatura y presión

Tanto la temperatura, como la presión, restringen el crecimiento bacteriano de BSR y BTSR. Se sabe sin embargo, que el proceso de sulfato y tiosulfato reducción, puede ocurrir arriba de 640 atmósferas y de 60 a 80°C por especies termófilas y a temperaturas mas altas para especies hipertermófilas.

Requerimientos de las sales

Las especies tienen diferente tolerancia a las sales, dependiendo de su hábitat. En el caso de algunas bacterias de hábitats marinos, requieren tanto cloruro de sodio como de magnesio entre 1 y 10 g/l.

Efecto del pH

Tienen un crecimiento adecuado a pH 7 y su crecimiento disminuye a pH menor de 6 y mayor de 9 (Widdel, 1988).

1.4 IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS EN LOS REACTORES ANAEROBIOS

Una amplia gama de transformaciones bioquímicas tiene lugar durante la digestión anaerobia, como resultado de diferentes grupos de microorganismos, que degradan gran variedad de sustratos. Son reconocidos cuatro grupos: (1) bacterias hidrolíticas, que catabolizan polímeros biológicos; (2) bacterias acetógenas productoras de hidrógeno, que catabolizan ciertos ácidos grasos y productos finales neutros; (3) bacterias homoacetógenas, que catabolizan compuestos unicarbonados o fermentan compuestos multicarbonados a ácido acético; (4) bacterias metanógenas, que catabolizan acetato y compuestos unicarbonados a metano.

La secuencia termodinámica o sucesión ecológica en sistemas metanógenos ha sido propuesta de la siguiente forma: respiración aerobia, reducción de nitrato y desnitrificación, fermentación, sulfato reducción y producción de metano (Garcia, 1982).

Las bacterias sulfato reductoras BSR aisladas de reactores pertenecen sobre todo al género *Desulfovibrio*, pero igualmente se han encontrado especies de *Desulfobulbus* y de *Desulfotomaculum* y más recientemente *Desulfohabdus amnigenus*. En presencia de una concentración no limitante de sulfato, las BSR entran en competencia con las metanógenas por los sustratos comunes H_2/CO_2 y acetato (Macarie, 1992; Oude *et al.*, 1995).

Las BSR pueden interferir con la producción de metano en una primer etapa del proceso de digestión, por competencia con acetógenas. Es evidente que la competencia entre sulfato reductoras, metanógenas y acetógenas es de primera importancia para el tratamiento anaerobio de aguas residuales (Oude, 1998).

La inhibición de las metanogénicas por las BSR, parece ser debida a la interacción de estos dos grupos, más que al resultado de la sulfato toxicidad. El primer grupo de BSR oxida parcialmente el ácido láctico a ácido acético, mientras que el segundo grupo oxida completamente los ácidos láctico y acético.

Comparadas con las metanogénicas, las bacterias que pueden reducir el tiosulfato BSR y BTSR tienen capacidades metabólicas muy diversas. Ambos grupos juegan un papel muy importante en el proceso de mineralización de la materia orgánica.

1.5 OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de bacterias tiosulfato reductoras en el lodo de un reactor anaerobio operado en mesofilia alimentado con sulfato y 4 - carboxibenzaldehído y estudiar algunas de sus características metabólicas.

ESPECÍFICOS

Aislar las bacterias anaerobias estrictas sulfato reductoras BSR que utilicen tiosulfato o sulfato y las BTSR que utilicen tiosulfato pero no sulfato como aceptor final de electrones.

Caracterizar parcialmente las cepas aisladas

Determinar el tipo de metabolismo involucrado (dismutación ó respiración)

MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos que se usaron a lo largo del experimento se presentan en este capítulo, se describen las técnicas microbiológicas para los aislamientos y el montaje de las técnicas analíticas para la medición de H₂S disuelto y gaseoso.

2.1 INÓCULO

Se usó como inóculo el lodo de un reactor anaerobio de tipo UASB, que fue operado durante un año a un TRH de un día y fue alimentado con lactosa (1 g/L), sulfato (50 mg/L) y 4 - carboxibenzaldehído (100 mg/L).

2.2 MEDIOS DE CULTIVO

En todos los experimentos, se usó el medio basal de Balch (1979) y de acuerdo con los requerimientos específicos de cada grupo de microorganismos (BSR y BTSR) así como del metabolismo involucrado (dismutación y respiración) se hicieron algunas modificaciones tanto en la composición (sustratos y compuestos nutritivos) como en las concentraciones (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Composición del medio de cultivo

Compuestos	BSR	BSR Gpo. I	BSR Gpo. II	BTSR	BTSR
	Dismutación	Respiración	Respiración	Respiración	Dismutación
NH ₄ Cl (g/L)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
K ₂ HPO ₄ (g/L)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
MgCl ₂ 6H ₂ O (g/L)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
CaCl ₂ 2H ₂ O (g/L)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
NaCl (g/L)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
KCl (g/L)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Cisteína - HCl (g/L)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Acetato de sodio (mM)	2.0	0	20.0	0	0
Lactato de sodio (mM)	0	20.0	0	0	0
Casaminoácidos (g/L)	0	0	0	5.0	0.1
Extracto de levadura	0.2	0.2	0.2	0	0
Peptona (g/L)	0.2	0.2	0.2	0	0
Solución de oligoelementos de Balch (mL)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Resazurina (g/L)	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
NaHCO ₃ (g/L)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Agua destilada (mL)	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0

Para la preparación de los medios de cultivo anaerobios, se siguió la técnica de Hungate (Hungate, 1969; Miller y Wolin, 1974; Ljungdahl y Wiegel, 1986).

Se disolvieron todos los componentes en agua destilada y el pH se ajustó a 7.0 con una solución de KOH (10 M) y se agregaron 2.0 g/L de una solución de NaHCO₃ (10% p/v) así como un tercio más del volumen final de agua.

El medio se mantuvo en ebullición durante algunos minutos y antes de llegar al volumen inicial de aforo, se colocó bajo corriente de nitrógeno hasta enfriarse. Entonces se agregó la cisteína, manteniendo la anaerobiosis a través un sistema de distribución de gases formado por mangueras (Figura 2.1) en donde se introdujo un flujo de gas N₂ por un lado al interior del medio recién preparado y por otro lado a los tubos o botellas para desplazar del interior el aire previamente a la distribución del medio. Se agregaron 20 mL para botellas serológicas o 5 mL para tubos Hungate. Las botellas y los tubos se cerraron con tapones de goma y se sellaron con aros de aluminio y tapones de rosca respectivamente, para impedir la entrada de aire y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Todos los medios se prepararon de la misma manera, sin embargo para los cultivos en tubo rodado se agregaron 20 g/L de agar bacteriológico.

Además se prepararon en anaerobiosis algunas soluciones: extracto de levadura, peptona, casaminoácidos, sulfato y tiosulfato que se esterilizaron en autoclave y que de acuerdo con la composición del medio, se agregaron en las concentraciones requeridas justo antes de la inoculación.

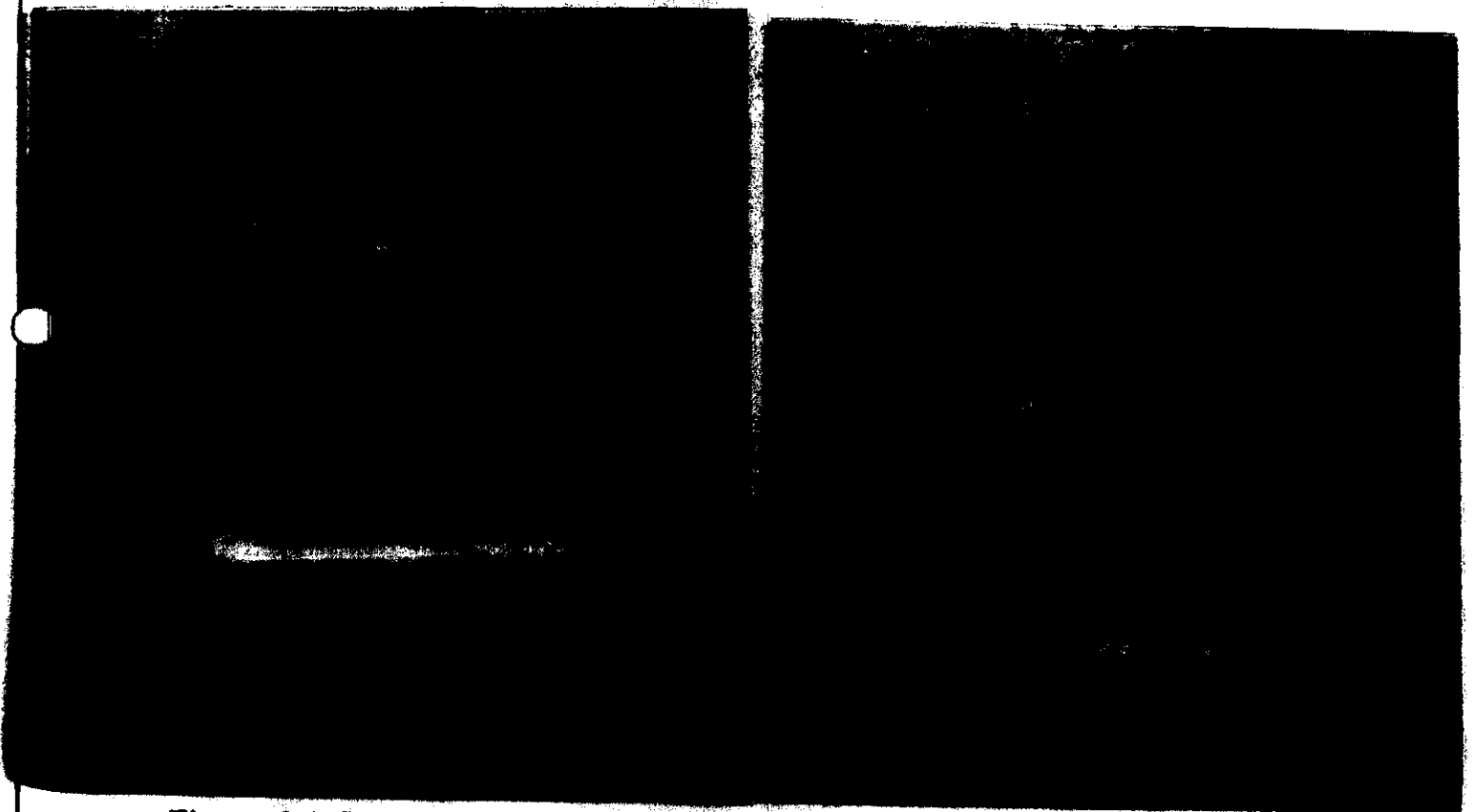
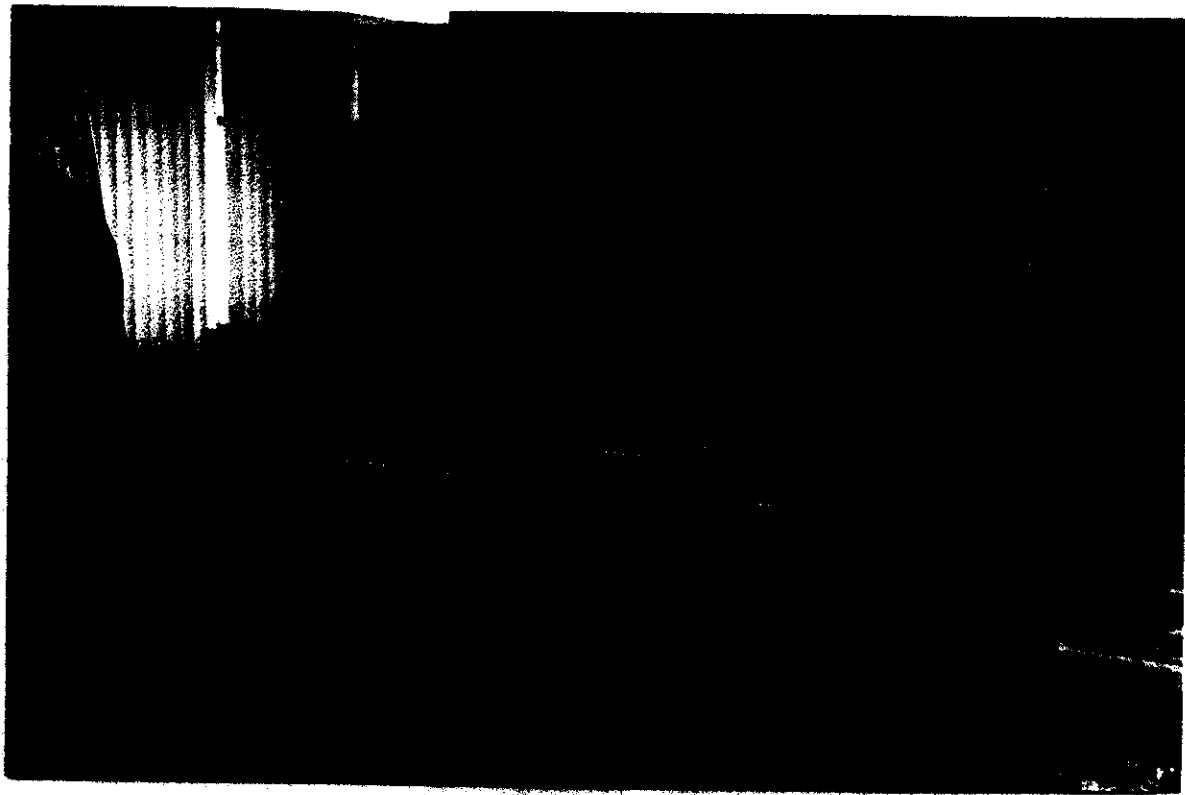


Figura 2.1 Preparación del medio de cultivo. (a) Sistema de distribución de gases; (b) Medio no reducido; (c) Medio reducido

Mónica Bonilla Salinas

2.3 AISLAMIENTOS

De acuerdo con Hespell (1990), existen dos métodos para llevar a cabo el aislamiento de microorganismos: usando un medio sólido selectivo o bien usando un medio líquido de enriquecimiento.

En el primer método el inóculo se diluye y la inoculación se realiza sobre placas de agar cuya composición permitirá sólo el desarrollo de cierto tipo de microorganismos. Sin embargo este método frecuentemente no tiene éxito por diversas razones, entre las más importantes destaca la diferencia de condiciones fisiológicas entre su hábitat natural y el laboratorio, simplemente los microorganismos no pueden adaptarse a esta rápida transferencia, sobre todo en cultivos sólidos. Estas nuevas condiciones pueden requerir numerosos cambios metabólicos que involucran la inducción o represión de enzimas o la utilización de nutrientes diferentes de los que se encuentran naturalmente disponibles en su hábitat original. Otras razones por las cuales no siempre se obtienen resultados satisfactorios en el aislamiento en medio sólido selectivo, son que posiblemente la fuente de donde se tomó el inóculo contiene una baja cantidad de los microorganismos deseados, o bien que la utilización del nuevo sustrato administrado al medio puede requerir una interacción metabólica de dos o más microorganismos que no tiene lugar debido a la separación física de las células sobre la placa de agar.

A diferencia del anterior, se ha observado que el medio líquido de enriquecimiento provoca una apropiada respuesta de crecimiento de los microorganismos deseados, siempre que se haga con una adecuada composición y se escojan los aspectos ambientales correctos. Generalmente estos cultivos son entonces serialmente transferidos hasta lograr ya sea un cultivo aparentemente puro con un solo microorganismo o bien un consorcio estable de varios microorganismos. Sin embargo si la biotransformación involucra una combinación de microorganismos, varios aislamientos pueden ser usados para reconstruir el consorcio.

En este sentido, la función de cada uno de los microorganismos participantes puede establecerse.

En esta etapa el número de microorganismos deseados ya es relativamente alto y se han adaptado a las condiciones de crecimiento del laboratorio. Así que en este punto el uso de técnicas selectivas en medio sólido para obtener cultivos puros aislados tendrá mejor oportunidad de lograrse.

De acuerdo con lo anterior, en este trabajo el aislamiento fue dirigido a dos tipos de microorganismos: bacterias sulfato reductoras del grupo I y II y bacterias tiosulfato reductoras que no reducen sulfato. Además se trató de determinar si en el inóculo existían bacterias con capacidad para realizar la fermentación o la respiración en el proceso de crecimiento. El aislamiento de BSR o BTSR se hizo mediante diferentes sustratos y aceptores de electrones.

Se comenzó con dos series consecutivas de cultivos en medio líquido de enriquecimiento seguidas de tres series consecutivas de cultivos en medio sólido.

2.3.1 Aislamientos de BSR y BTSR en medio líquido de enriquecimiento

En las series consecutivas de medio líquido de enriquecimiento, se utilizaron botellas serológicas de 57.5 ml de capacidad con 20 ml de medio y con 2 ml de inóculo.

Todos los cultivos se incubaron a 35°C hasta alcanzar la fase estacionaria y se hizo un seguimiento de la producción de H₂S disuelto.

2.3.1.1 Aislamientos de BSR

Para aislar BSR, se utilizaron los medios especificados en la tabla 2.1 y los aceptores de electrones y fuentes adicionales de energía y carbono indicados en la tabla 2.2 para discernir entre respiración y dismutación.

Tabla 2.2 Sustratos para determinar procesos metabólicos en BSR

Sustratos	Fuente de energía y carbono adicional	Aceptor de electrones	Proceso metabólico	Microorganismo
Acetato 20 mM	-	Sulfato	Respiración	BSR
Acetato 20 mM	-	Tiosulfato	Respiración	BSR
Lactato 20 mM	-	Sulfato	Respiración	BSR
Lactato 20 mM	-	Tiosulfato	Respiración	BSR
Acetato 2 mM	-	Tiosulfato	Dismutación	BSR
Acetato 2 mM	H ₂ /CO ₂	Tiosulfato	Respiración	BSR

- Sin fuente de energía y carbono adicional

Como el extracto de levadura favorece el crecimiento de varias especies de BSR, se probaron dos concentraciones para seleccionar la mas adecuada para el medio de cultivo. Como no hubo diferencias significativas en la producción de H₂S en todas las concentraciones estudiadas, se seleccionó la mas baja que fue la de 0.2 g/L, para evitar que favoreciera también el desarrollo de la microbiota acompañante. Sin embargo en los cultivos para dismutación no se agregó, pues no se requieren nutrientes adicionales, ya que en este caso el tiosulfato actúa como única fuente de energía (Krämer y Cypionka, 1989).

Sabiendo que existen dos principales vías metabólicas por las cuales las BSR heterótrofas, pueden oxidar los sustratos, que son la respiración y la fermentación (Peck, 1993; Singleton, 1993) y que algunas especies son capaces de llevar a cabo una fermentación quimiolitotrófica por dismutación de compuestos inorgánicos del azufre como el tiosulfato (Bak y Cypionka, 1987; Jorgensen y Bak, 1991) se cultivaron las BSR en medios que permitieran discernir la vía metabólica: respiración ó dismutación, para determinar si existían bacterias en el inóculo capaces de llevarlas a cabo.

Dado que en la respiración las BSR pueden utilizar sulfato y la mayoría son capaces de utilizar el tiosulfato como aceptor terminal de electrones entre otros compuestos azufrados (Peck, 1993) en este trabajo se seleccionaron ambos para aislarlas. Los electrones son transferidos del sustrato que actúa como donador de electrones a los aceptores de electrones (sulfato o tiosulfato) y se agregaron en la misma concentración (20 mM).

Para el caso de la dismutación, tomando en consideración que en la fermentación inorgánica el tiosulfato actúa como única fuente de energía, se agregó en la concentración de (20 mM) mientras que el acetato se agregó a baja concentración (2 mM) sólo para que actuara como fuente de carbono, en este caso el crecimiento no está relacionado con la cantidad de acetato adicionada sino con la concentración del tiosulfato (Bak y Cypionka, 1987; Bak y Pfennig, 1987).

Existe gran variedad de compuestos que pueden ser utilizados como sustratos, como el lactato que es uno de los más ampliamente utilizados para cultivar BSR del grupo I o el acetato utilizado para aislar BSR del grupo II. (Widdel, 1988). Por lo tanto se seleccionaron ambos sustratos para lograr abarcar en el aislamiento un mayor espectro de especies.

Además se hicieron cultivos con H_2/CO_2 , ya que se ha observado que permite la utilización del acetato por algunas especies de BSR (Hamilton, 1998).

2.3.1.2 Aislamientos de BTSR

Para aislar tiosulfato reductoras que no reducen sulfato, se utilizaron los medios especificados en la tabla 2.1 y los aceptores de electrones y fuentes adicionales de energía y carbono indicados en la tabla 2.3.

Tabla 2.3 Sustratos para determinar procesos metabólicos en BTSR

Sustratos	Fuente de energía y carbono adicional	Aceptor de electrones	Proceso metabólico	Microorganismo
Casaminoácidos 0.1 g/L	-	Tiosulfato	Dismutación	BTSR
Casaminoácidos 0.1 g/L	H ₂ /CO ₂	Tiosulfato	Respiración	BTSR
Casaminoácidos 5.0 g/L	-	Tiosulfato	Respiración	BTSR
Casaminoácidos 5.0 g/L	H ₂ /CO ₂	Tiosulfato	Respiración	BTSR

- Sin fuente de energía y carbono adicional

Se excluyeron del medio el extracto de levadura y la peptona, porque los casaminoácidos proporcionan por sí mismos los nutrientes necesarios para el desarrollo de estas bacterias.

La respiración y la dismutación, son los procesos metabólicos que pueden ser empleados por las BTSR heterotróficas para reducir el tiosulfato (Ravot *et al.*, 1995 b; Ollivier, 1996); por lo tanto, se pretendió obtener cultivos enriquecidos con bacterias que realizaran alguno de los dos procesos. El aceptor de electrones utilizado fue el tiosulfato porque las BTSR no son capaces de utilizar el sulfato y como sustratos se utilizaron los casaminoácidos.

En algunos cultivos, además del sustrato se adicionó el H₂/CO₂, para favorecer su utilización y promover el crecimiento.

2.3.2 Aislamientos de BSR y BTSR en medio sólido

Se seleccionaron los cultivos de medio líquido de enriquecimiento que tuvieron mayor producción de H₂S para continuar con la serie de aislamientos, que se inocularon en los tubos rodados.

2.3.2.1 Inoculación

El método de tubos rodados fue descrito por Hungate en 1969 y modificado por varios autores (Macy *et al.*, 1972).

Se usa principalmente para obtener crecimiento de colonias aisladas en la superficie interna del tubo, inoculando una suspensión líquida de células y rodando el tubo. La inoculación en tubo rodado se hace a 46°C, antes de que el medio fundido solidifique (Figura 2.2).

El exceso de líquido y células escurre a la base del tubo y no afecta el crecimiento de las células que queda arriba en la superficie del agar, siempre y cuando el tubo no se coloque en posición horizontal.

Muchas colonias se desarrollan dentro del agar pero cuando incrementan su tamaño la mayoría llega a la interfase del gas y continúa desarrollándose en la superficie del agar. Otras llegan a la pared del tubo y crecen como una película entre el agar y el vidrio.

La apariencia de las colonias en este tipo de cultivos difiere marcadamente de la que pueden tener en otros cultivos y cuando no hay mucha experiencia pueden dar una falsa impresión de impureza.

2.3.2.2 Traslado de colonias

Las colonias pueden ser picadas por una aguja o pipeta pasteur y las células que se adhieren ser transferidas rápidamente a subcultivos.

La transferencia por aguja expone las células al oxígeno y algunas células de la superficie pueden morir. Para prevenir esto se puede tomar algo de agar que actúa como escudo protector de las células incrementando su viabilidad o bien como en este caso trabajar en el interior de una cámara anaerobia (Figura 2.3).



Figura 2.2 Técnica de tubos rodados. (a) Inoculación; (b) Rodamiento de tubos



Figura 2.3 Técnica de tubos rodados. (a) y (b) Traslado de colonias dentro de la cámara anaerobia

La transferencia con una pipeta Pasteur es mejor para aislamientos difíciles y para proteger el inóculo del aire. La colonia picada se introduce rápidamente en un subcultivo con medio líquido, que es de nuevo reinoculado en medio sólido para realizar otra serie de aislamientos. El tubo con agar inoculado se solidifica rodándolo en un equipo Bellco Glass y para acelerar el proceso se coloca hielo sobre los tubos. Durante los 30 días de incubación a 35°C, el agua de sinéresis escurre a la base del tubo por las paredes verticales de la película de agar. Esto generalmente no interfiere con el desarrollo de las colonias, pero para prevenir contaminaciones hay que evitar que se extienda no inclinando los tubos.

2.3.2.3 Dilución en serie del inóculo

Debido a que la concentración de colonias en el tubo inoculado es generalmente alta, no es fácil picar una sola colonia por lo tanto es necesario inocular varias diluciones del material para lograr obtener colonias aisladas. Estas diluciones pueden hacerse directamente en los tubos con agar fundido a una temperatura de 46°C, bajo condiciones anaerobias. Previo a la inoculación se introducen soluciones estériles que forman parte de la composición del medio. Una vez que el inóculo procedente de un subcultivo líquido se ha colocado en el primer tubo con agar fundido, se realizan varias diluciones, en este caso 15 con una jeringa que penetra en los tapones de goma. De esta forma se obtienen colonias aisladas en una o más diluciones. El método de jeringa es muy rápido y conveniente también para transferir cultivos líquidos. Justo antes de que se use la jeringa, el aire de su interior debe ser eliminado, insertando la aguja en un flujo de gas libre de oxígeno, en este caso se usó N₂ en condiciones estériles.

2.3.2.4 Criterio de pureza

Las colonias de diferentes especies difieren en tamaño, textura, color, transparencia, márgen, forma, consistencia y otras características (Figura 2.4).

Se necesita realizar una observación cuidadosa para eliminar falsas conclusiones de impureza debidas a la localización de la colonia en el agar.

En el tubo rodado la proporción de colonias en la superficie o entre el agar y el vidrio es usualmente mayor que en otros métodos como en el de cajas Petri, debido a que la película de agar en el primero es más delgada.

Sólo se continúan los aislamientos cuando la producción de H₂S es notable, es decir equivalente a la media del sulfato o tiosulfato adicionado.

Se hicieron 3 series de aislamientos en tubo rodado para cada colonia, hasta lograr purificarla

2.3.2.5 Reinoculación en medio líquido

Finalmente las cepas aisladas se reinocularon en 2 series más de 12 diluciones en medio líquido para lograr su purificación y propagar el cultivo (Figura 2.5).

2.4 PRUEBAS DE PUREZA

Después de los aislamientos en medio líquido y agar, se hicieron pruebas complementarias para confirmar la pureza de las cepas.

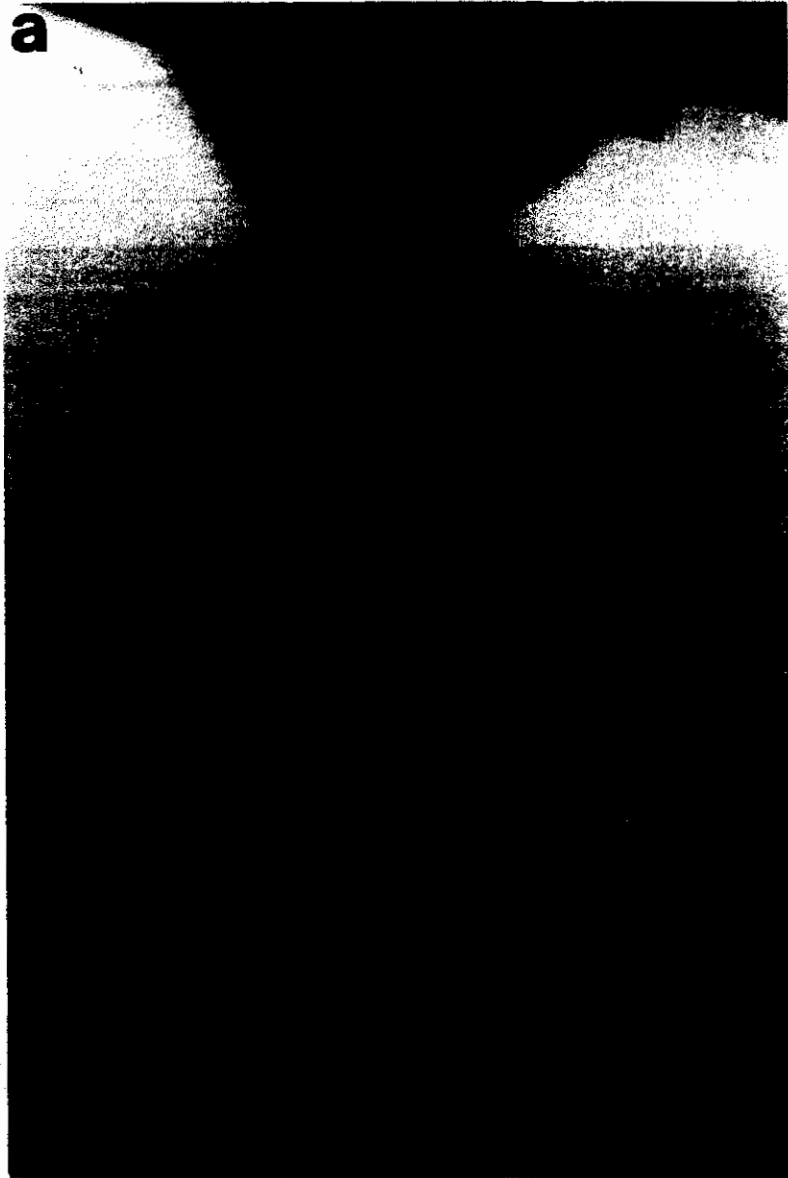


Figura 2.4 Técnica de tubos rodados. (a) Crecimiento de colonias al cabo de 30 días de incubación



Figura 2.5. Técnica de tubos rodados. (a) Purga de la jeringa; (b) Reinoculación en medio líquido

Mónica Bonilla Salinas

2.4.1 Observación al microscopio

Se hicieron preparaciones en estado fresco y con tinción de Gram para observar la morfología de los cultivos.

2.4.2 Inoculación en un medio con glucosa.

Se hicieron inoculaciones por triplicado en medio líquido con glucosa 20 mM, sin aceptores de electrones y se midió la densidad óptica a 580 nm para observar el crecimiento de posibles microorganismos contaminantes.

2.5 CARACTERIZACIÓN DE BSR Y BTSR

Una vez confirmada la pureza de las cepas se determinaron sus características metabólicas.

2.5.1 Utilización de aceptores de electrones: sulfato y tiosulfato

Se hizo una prueba de utilización de aceptores de electrones de las cepas aisladas, en tubos Hungate con medio líquido. Se incubaron a 35°C y se midió la densidad óptica a 580 nm. Se utilizaron los sustratos en donde se aislaron las cepas y se midió la producción de H₂S.

2.5.2 Utilización de sustratos

De acuerdo con Widdel (1988) y Hansen (1993) se presenta la tabla 2.4 con los compuestos que se conoce pueden ser utilizados como sustratos por las BSR.

Tabla 2.4 Sustratos utilizados para la caracterización de las BSR

Carbohidratos	Acidos Carboxílicos Alifáticos	Hidrocarburos aromáticos	Compuestos nitrogenados
D-Manitol			
L-Ramnosa	Propiónico	Tolueno	Aminas
Galactosa	Butírico		Anilina
Maltosa	Fórmico		
D-Fructosa			Aminoácidos
D-Ribosa	Aromáticos		Casaminoácidos
D-Xilosa	Benzoico		
L-Xilosa			
Manosa	Acidos Dibásicos		
Sacarosa	Succínico		
Lactosa	Oxálico		
Glucosa			
Alcoholes y Fenoles	Oxiácidos	Cetonas	Gases
Etanol	Málico	Acetona	H ₂ /CO ₂
Fenol	Láctico		
Polifenol			
Catecol			

Se hicieron 3 series consecutivas de cultivos líquidos en tubos Hungate por triplicado para determinar la utilización de los sustratos en las BSR. Se prepararon soluciones a 1 M de cada uno de ellos, las cuales se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min, excepto los carbohidratos, que se esterilizaron por filtración en filtros millipore de 0.20 µm de porosidad. Estas soluciones madre se agregaron finalmente para alcanzar una concentración final de 20 mM en los 5 mL de medio líquido justo antes de la inoculación. Para estas pruebas se utilizó un volumen de inóculo del 10% y los cultivos fueron incubados a 35°C.

El criterio empleado para determinar la utilización de los sustratos por los microorganismos fue la aparición de crecimiento medido por espectrofotometría a 580 nm.

Se contaba con testigos, cultivos sin sustrato, inoculados para comprobar que el aumento de densidad óptica no venía de sustratos residuales presentes en el inóculo o de los componentes del medio.

2.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS

Para determinar el crecimiento de las bacterias, se tomaron como parámetros la absorbancia medida por fotolorimetría y la producción de H₂S cuantificada por cromatografía de gases y fotolorimetría.

2.6.1 Crecimiento celular

El crecimiento celular, se midió por fotolorimetría a 580 nm en un aparato Spectronic 20 Bausch & Lomb.

2.6.2 Cuantificación de H₂S gaseoso

Se cuantificó el H₂S gaseoso, de los cultivos con un cromatógrafo de gases Varian modelo 3400, equipado de una columna capilar Poraplot Q de Chrompack de 28 m de longitud por 0.83 mm de diámetro, con un sistema de inyección split y un detector fotométrico de flama (FPD) usando las siguientes condiciones de operación:

Temperatura de la columna:	80°C
Temperatura del detector:	220°C
Temperatura del inyector:	150°C
Gas acarreador:	He
Volumen de inyección:	1 mL de muestra gaseosa

Se preparó una curva de calibración de la manera siguiente: Se inyectaron diferentes volúmenes de H₂S (0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 15.0 y 20.0 mL) en botellas serológicas de 57.57 mL de capacidad, con 20 mL de agua reducida.

Se calculó la concentración molar correspondiente a la fase gaseosa de las botellas y se inyectó 1 mL de cada una de las diluciones en el cromatógrafo. Se graficaron los datos de la altura vs la fracción mol de H₂S y se hizo una regresión lineal simple (Figura 2.6).

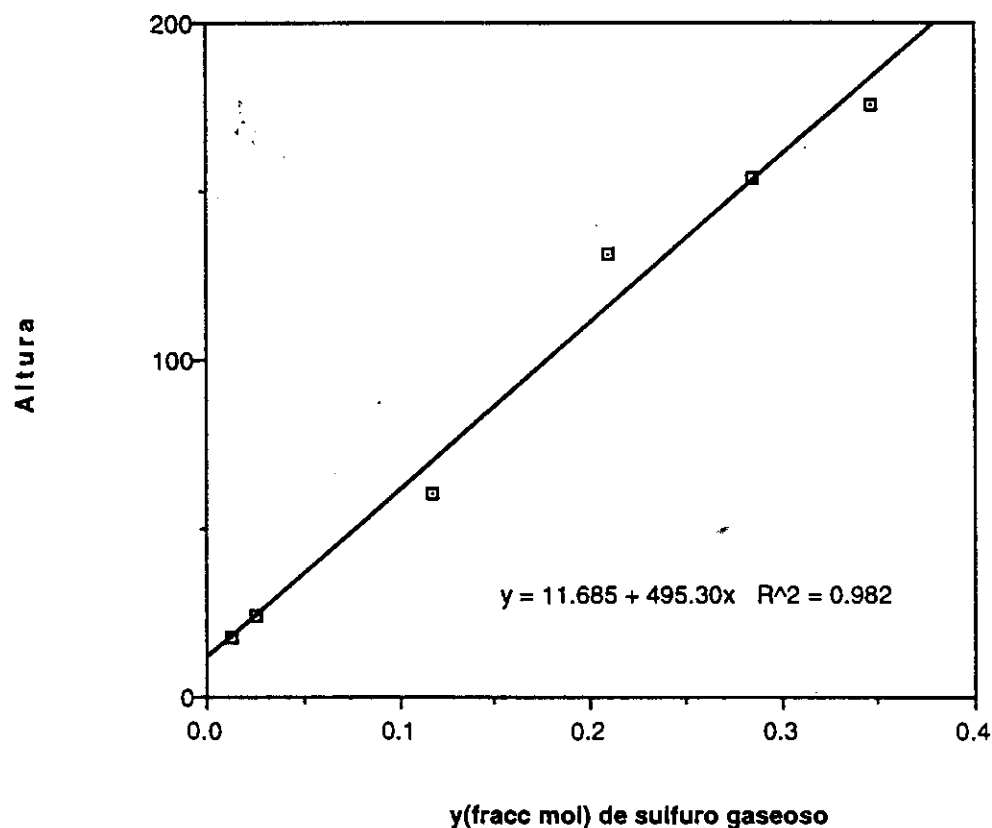


Figura 2.6 Curva de calibración del H₂S gaseoso

2.6.3 Cuantificación de H₂S disuelto

Para cuantificar la producción de H₂S disuelto, se usó la técnica colorimétrica de Cord - Ruwisch (1985). Se agregó 0.1 mL de las muestras a tubos Hungate en agitación, que contenían 4 mL de un reactivo de cobre (HCl 50 mM y CuSO₄ 1 M) y se midió la absorbancia a 480 nm, en un fotocolorímetro Spectronic 20. Se calibró el aparato con un blanco, que consistía de 4.0 ml de HCl (50 mM) y 0.1 ml de muestra. Se hizo una curva de calibración a partir de una solución patrón de Na₂S, con diluciones en cascada de 10 a 90 mM. A los tubos Hungate con 4.0 ml de reactivo de cobre, se les adicionó 0.1 mL de las diluciones correspondientes mientras se agitaban, se midió la absorbancia a 480 nm.

Los datos correspondientes a la concentración de Na₂S (mM) vs absorbancia, se graficaron y se hizo una regresión lineal simple (Figura 2.7).

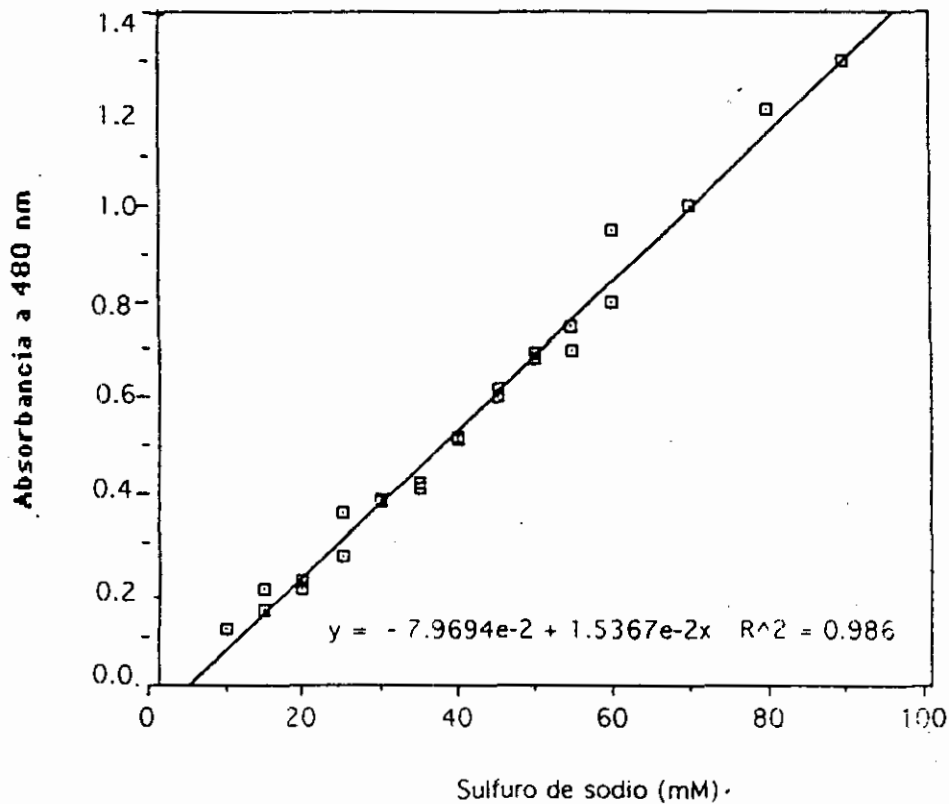


Figura 2.7 Curva de calibración del H₂S disuelto

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS

Las BSR pueden utilizar el sulfato y el tiosulfato entre otros compuestos oxidados del azufre, como aceptores finales de electrones en reacciones de oxido - reducción con sustratos.

En esta primera parte se presenta el aislamiento y la caracterización de las BSR del lodo analizado con ambos aceptores de electrones. El aislamiento se dividió en dos etapas: medios líquidos de enriquecimiento para propagación y medios sólidos en tubo rodado para lograr una separación física de las colonias. Se hizo la caracterización de las cepas aisladas con base en la utilización de aceptores de electrones y sustratos, finalmente se compararon los resultados con las especies de BSR reportadas.

3.1 AISLAMIENTOS DE BSR EN MEDIO LIQUIDO

Esta etapa tiene como objetivo obtener cultivos enriquecidos de BSR que reduzcan el sulfato y el tiosulfato oxidando sustratos en el proceso de respiración.

Se hicieron dos aislamientos consecutivos en medio líquido de enriquecimiento usando como sustratos acetato y lactato (20 mM) ya que favorecen el desarrollo de una gran variedad de especies de BSR del grupo I y II respectivamente (Widdel, 1988).

Se midió el crecimiento de manera indirecta tomando como respuesta la producción de H₂S.

3.1.1 Primer aislamiento de BSR en medio líquido de enriquecimiento: determinación de la concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo

Se hizo un primer enriquecimiento con dos concentraciones diferentes de extracto de levadura, a manera de establecer la más adecuada para el desarrollo de BSR.

En las figuras 3.1 y 3.2 se muestran los resultados de la producción de H_2S disuelto y se observa que sólo cuando el extracto de levadura está presente en el medio de cultivo, se produce H_2S . No se observaron diferencias en la producción de H_2S en ninguna de las concentraciones, por lo que se seleccionó la más baja, para evitar que el extracto de levadura actuara como fuente de carbono.

Hay que tomar en cuenta que si bien por una parte el extracto de levadura, puede incrementar el crecimiento en algunas especies de BSR (Holt *et al.*, 1994), por otra puede favorecer el desarrollo de una gran cantidad de microorganismos no sulfato reductores, interfiriendo así con el proceso de aislamiento.

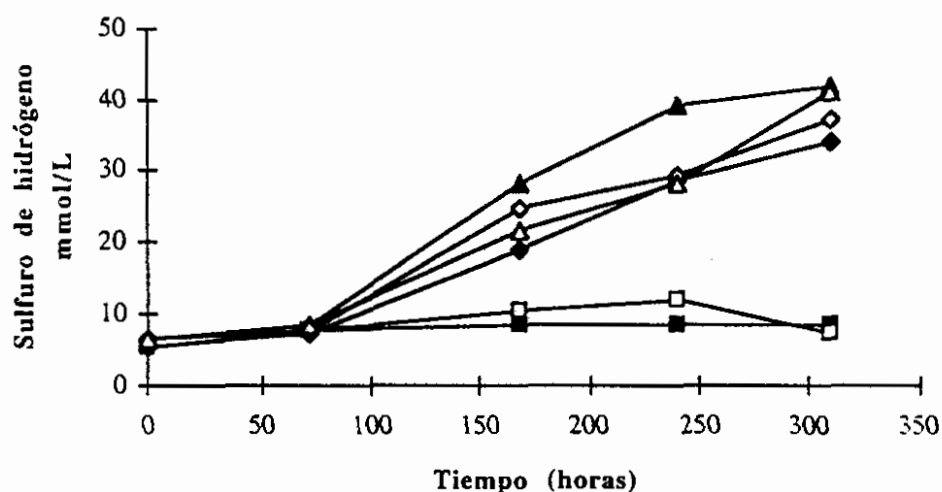


Figura 3.1 Producción de H_2S disuelto a diferentes concentraciones de extracto de levadura, usando acetato como sustrato y sulfato como aceptor de electrones. $T=35^{\circ}C$ $pH=7.0$. ■, □ sin extracto de levadura; ◆, ◇ 0.2 g/L de extracto de levadura; ▲, △ 2.0 g/L de extracto de levadura

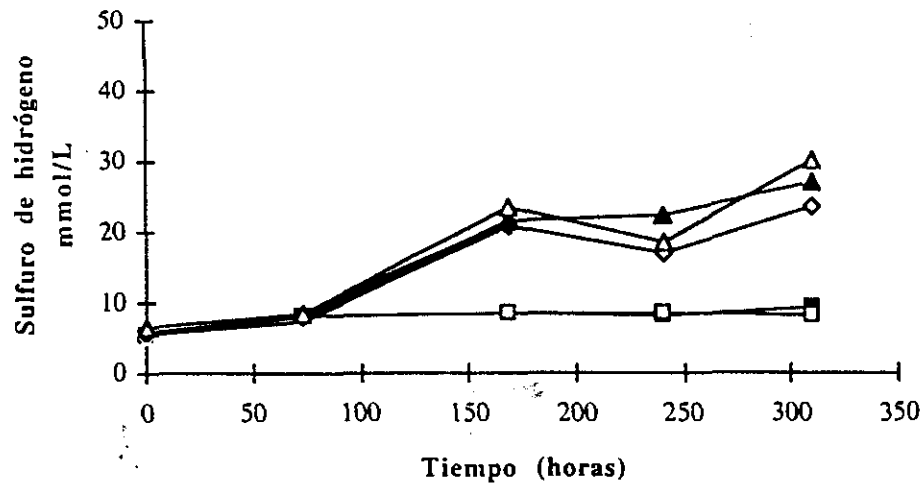


Figura 3.2 Producción de H_2S disuelto a diferentes concentraciones de extracto de levadura usando lactato como sustrato y sulfato como aceptor de electrones. $T=35^\circ C$ $pH=7.0$. ■, □ sin extracto de levadura; ◆, ◇ 0.2 g/L de extracto de levadura; ▲, △ 2.0 g/L de extracto de levadura

3.1.2 Segundo aislamiento de BSR en medio líquido de enriquecimiento: utilización de sustratos

Para diferenciar las bacterias sulfato reductoras del grupo I de las del grupo II, se utilizaron el lactato y el acetato como sustratos ya que son los compuestos más utilizados por las BSR en el proceso de sulfato reducción.

En los resultados de las figuras 3.3 y 3.4 se observó mayor producción de H_2S , cuando se utilizó lactato con cualquier aceptor de electrones. sulfato o tiosulfato.

Esto podría indicar que en el cultivo, predominan las BSR del grupo I, que fermentan el lactato hasta acetato.

Se observó también que los cultivos con acetato presentaron una producción de H_2S similar a la del testigo (sin sustrato) lo cual indica que éste no es utilizado como donador de electrones y que por lo tanto en el cultivo no hay BSR del grupo II, capaces de usar este sustrato.

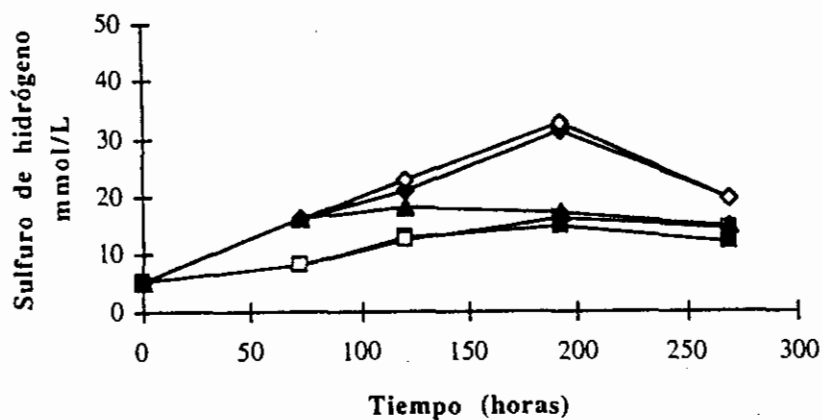


Figura 3.3 Producción de H₂S disuelto correspondiente al 2 o. enriquecimiento, usando acetato y lactato como sustratos y sulfato como aceptor de electrones. T=35°C pH=7.0. ■, □ Acetato ; ◆, ◇ Lactato; ▲ Testigo (sin sustrato)

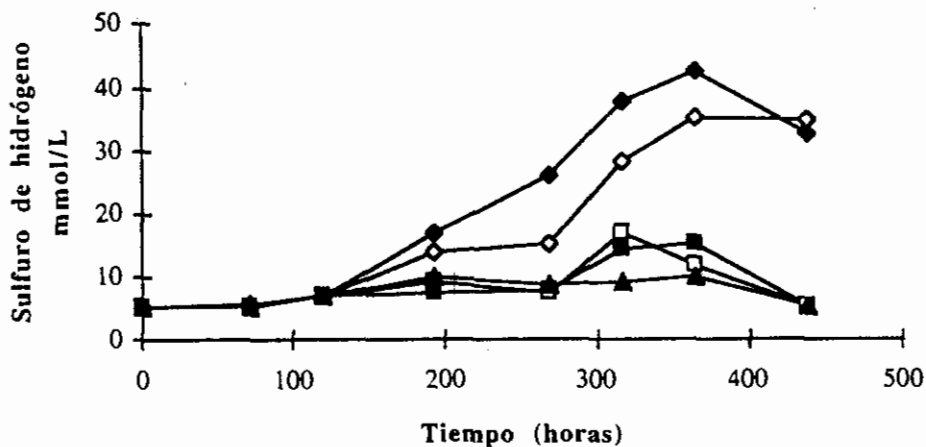


Figura 3.4 Producción de H₂S disuelto correspondiente al 2 o. enriquecimiento, usando acetato y lactato como sustratos y tiosulfato como aceptor de electrones. T=35°C pH=7.0. ■, □ Acetato ; ◆, ◇ Lactato; ▲ Testigo (sin sustrato)

Los resultados indican que en el reactor hay BSR, que utilizan sulfato y tiosulfato como aceptores de electrones. Hay que notar que se obtuvo una mayor producción de H_2S con tiosulfato (Figura 3.4).

Finalmente se puede decir, que de acuerdo con los resultados de los aislamientos en medio líquido de enriquecimiento, en la muestra del lodo se encontraron BSR, que llevaron a cabo la oxidación del lactato, aparentemente de manera incompleta hasta acetato, reduciendo preferentemente tiosulfato. No se encontraron BSR, que oxidaran el acetato.

Se puede explicar esto último si se toma en consideración que la muestra original de inóculo proviene del lodo de un reactor anaerobio, en el cual existe una gran variedad de microorganismos que interactúan entre sí en competencia por los sustratos disponibles.

Particularmente el acetato tiene un papel fundamental en el proceso de la digestión anaerobia y es consumido básicamente por dos grandes grupos de bacterias: las metanógenas acetoclásticas y las sulfato reductoras que debido a la competencia ven mermada su población hacia uno u otro sentido dependiendo de las condiciones fisicoquímicas propias del sistema (Widdel, 1988; Oude, 1998). En este caso, de acuerdo con los resultados, aún sin realizar una cuenta, el número de BSR degradadoras de acetato del grupo II era mínimo o nulo en la muestra analizada

3.1.3 Determinación de la utilización del acetato + H_2/CO_2 por respiración y de la dismutación del tiosulfato en presencia del acetato

Se hicieron algunos cultivos en paralelo a los enriquecimientos con acetato + H_2/CO_2 y tiosulfato (20 mM) para determinar si en el lodo había bacterias que tuvieran la capacidad de utilizarlos. El H_2/CO_2 permite la utilización del acetato en algunas bacterias (Badziong y Thauer, 1978; Hansen, 1993; Peck, 1993) ya que actúa como fuente de energía y carbono adicional al sustrato del cultivo. Además se probaron cultivos para evidenciar la capacidad de

las bacterias del lodo para dismutar el tiosulfato en presencia del acetato (2 mM) que en esta concentración no actúa como fuente de energía sólo proporciona el carbono; sin embargo en la dismutación el crecimiento esta en proporción a la cantidad del tiosulfato adicionado y no con la concentración del acetato (Bak y Cypionka, 1987; Bak y Pfennig, 1987).

Los resultados (Figura 3.5) muestran crecimiento en los cultivos con acetato y H_2/CO_2 , porque en la digestión anaerobia varios grupos de microorganismos están interrelacionados entre sí y el producto del metabolismo de unos es el sustrato de otros (Widdel, 1988; Oude, 1998).

Por lo tanto no es posible aislar sólo una especie con un único sustrato, ya que se requiere de la interacción de varios a fin de obtener los factores de crecimiento necesarios (Hespell, 1990). En este caso, fue necesario proporcionar al medio de cultivo otra fuente de energía y carbono además del acetato, que promovió su crecimiento; sin embargo existe la posibilidad de que fuera el H_2/CO_2 el sustrato inorgánico, que realmente sustentó el crecimiento por autotofía, proceso muy común entre las BSR.

Además en los cultivos con únicamente acetato (2 mM) no hubo crecimiento de BSR por dismutación del tiosulfato ya que no se observó producción de H_2S .

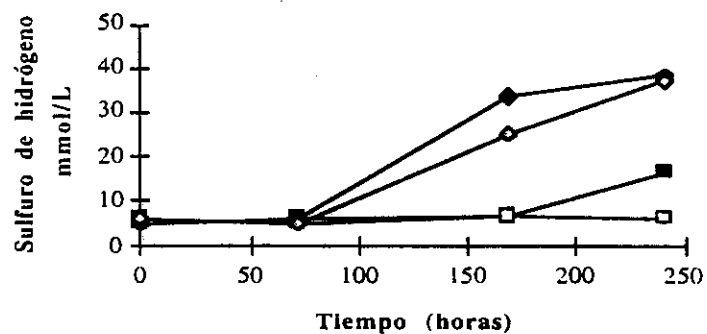


Figura 3.5 Producción de H_2S disuelto, usando tiosulfato como aceptor de electrones. $T=35^{\circ}C$ $pH=7.0$. ■, □ Acetato 2 mM ; ◆, ◇ Acetato 2 mM + H_2CO_2

3.2 AISLAMIENTOS DE BSR EN MEDIO SÓLIDO

3.2.1 Inoculación en tubo rodado

El objetivo de los aislamientos en tubo rodado es la obtención de colonias aisladas físicamente. A través de las reinoculaciones en medio selectivo, va lográndose la purificación del cultivo por la disminución de la microbiota acompañante.

Los cultivos con mayor producción de H₂S, correspondientes al segundo aislamiento en medio líquido de enriquecimiento, se inocularon en tubos Hungate en tres series consecutivas, realizándose cada vez 15 diluciones para cada cultivo.

En la tabla 3.1 se resumen los tres aislamientos consecutivos por duplicado, se presentan los resultados correspondientes a las diluciones más altas en cada inoculación, en donde la producción de H₂S haya sido la mayor de la serie y se resumen las características de las colonias aisladas.

En cada inoculación se incubaron los tubos durante 30 días a 35°C, haciendo un total de 90 días de incubación en medio sólido para la obtención de cada cepa pura.

Se puede observar, que debido a la presión selectiva ejercida por los medios de cultivo, en las reinoculaciones, en algunos casos no hubo crecimiento o bien fue de colonias blancas y sin producción de H₂S, como es el caso de los aislamientos con lactato + sulfato, debido probablemente a que las colonias no eran de BSR, sino otro tipo de microbiota contaminante que había logrado sobrevivir hasta ese momento. Sólo se continuaron los aislamientos de los cultivos con colonias negras, características de BSR y con alta producción de H₂S correspondientes a los de lactato + tiosulfato.

Tabla 3.1 Aislamientos de BSR

Sustratos	<u>1er aislamiento</u>		<u>2o. aislamiento</u>		<u>3er aislamiento</u>		Colonias
	Dilución	H ₂ S y (fracc mol)	Dilución	H ₂ S y (fracc mol)	Dilución	H ₂ S y (fracc mol)	
Lactato + Sulfato A	10 ⁻¹¹	0.183					Colonias blancas
Lactato + Sulfato A	10 ⁻¹⁰	0.882	10 ⁻¹²	0			Sin crecimiento
Lactato + Sulfato B	10 ⁻¹¹	0.082	10 ⁻¹¹	0			Sin crecimiento
Lactato + Sulfato B	10 ⁻¹²	0.194	10 ⁻¹²	0			Colonias blancas
Lactato + Tiosulfato A	10 ⁻¹¹	0.147	10 ⁻⁹	0.294	10 ⁻⁹	0.202	Colonias negras puntuales
			10 ⁻¹³	0.299	10 ⁻¹¹	0.332	Colonias negras con halo transparente
					10 ⁻¹²	0.309	Colonias negras con halo transparente
Lactato + Tiosulfato A	10 ⁻¹¹	0.150	10 ⁻¹⁴	0.198	10 ⁻¹¹	0.329	Colonias negras
					10 ⁻¹²	0.316	Colonia negra
Lactato + Tiosulfato B	10 ⁻¹²	0.194	10 ⁻¹⁵	0			Colonias blancas
Lactato + Tiosulfato B	10 ⁻¹¹	0.312	10 ⁻¹⁵	0			Colonias blancas

A y B corresponden al duplicado de las series

3.2.2 Reinoculación en medio líquido

Para comenzar a realizar la caracterización fenotípica, se reinocularon las 5 cepas aisladas en tubos Hungate con medio líquido en doce diluciones en lactato (20 mM) como sustrato y tiosulfato (20 mM) como aceptor de electrones.

Se asignó arbitrariamente una numeración del 1 al 5 a las cepas que se aislaron en los cultivos de lactato + tiosulfato (ver la tabla 3.2). Los resultados muestran que después de reinocular las cepas, sólo crecieron la 3 y la 5, por lo tanto sólo se caracterizaron estas cepas.

Tabla 3.2 Producción de H₂S en cultivos en medio líquido con lactato y tiosulfato

1a. Inoculación			2a. Inoculación	
Cepas	Dilución	H ₂ S mM	Dilución	H ₂ S mM
1	10 ⁻¹	0		
2	10 ⁻¹	0		
3	10 ⁻¹²	10.67	10 ⁻⁹	9.86
4	10 ⁻¹	0		
5	10 ⁻³	12.29	10 ⁻⁵	12.50

3.3 PRUEBAS DE PUREZA

3.3.1 Observación al microscopio

Para observar la morfología de las bacterias aisladas así como para comprobar su pureza, se hicieron observaciones (100x) con un microscopio compuesto Olympus (Figura 3.6). Concluyendo que en ambas cepas se observó una morfología homogénea. En la cepa 5 se observaron vibrios mientras que en la cepa 3 se observaron bacilos aislados y formando cadenas.

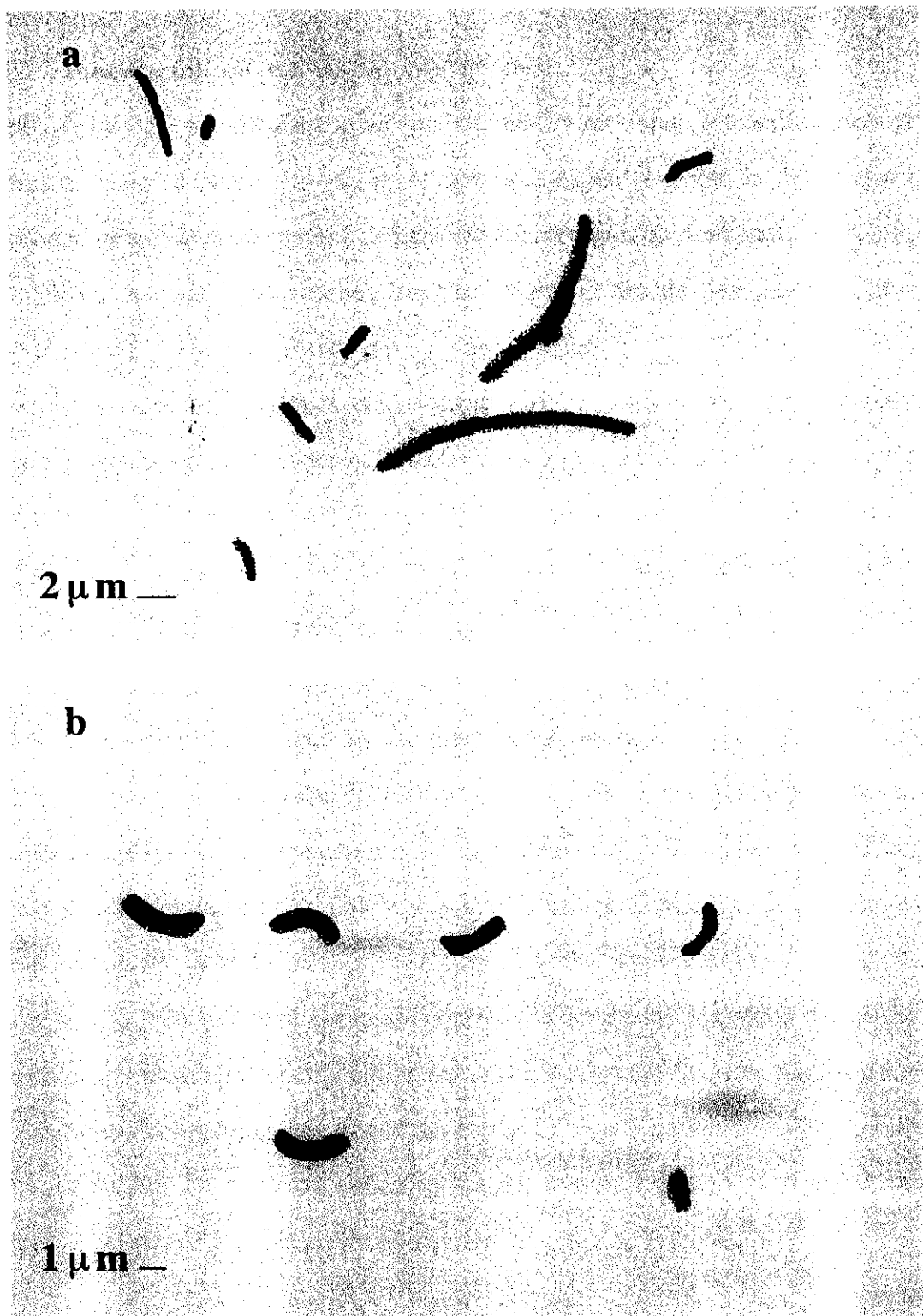


Figura 3.6 Bacterias sulfato reductoras (100x). (a) Ceba 3 bacilos aislados y formando cadenas; (b) Ceba 5 vibrios

3.3.2 Inoculación en un medio con glucosa

Dado que las BSR no utilizan este sustrato en ausencia de sulfato o tiosulfato, esta prueba es confirmativa de su pureza ya que el crecimiento indicará la presencia de algunas bacterias fermentativas son capaces de crecer en glucosa sin aceptores de electrones.

Se hicieron inoculaciones en tubos Hungate en medio líquido con glucosa (20 mM) sin sulfato o tiosulfato para confirmar la pureza de las cepas.

Una vez confirmada la pureza de las cepas aisladas, se continuó con algunas pruebas bioquímicas, para conocer mejor su metabolismo y lograr así una identificación preliminar.

3.4 CARACTERIZACIÓN

3.4.1 Utilización de aceptores de electrones: sulfato y tiosulfato

Para comprobar si las cepas aisladas en lactato + tiosulfato eran capaces de crecer en sulfato, se inocularon dos series consecutivas de doce diluciones cada una en tubos Hungate con medio líquido con lactato (20 mM) y se midió de manera indirecta el crecimiento expresado como producción de H₂S.

En la tabla 3.3 se muestran comparativamente los resultados obtenidos del crecimiento en ambos aceptores de electrones al mismo tiempo de incubación. Indican que los dos aceptores de electrones fueron utilizados, por ambas cepas. La cepa 3 presentó una baja producción de H₂S similar para los dos aceptores, mientras que la cepa 5 presentó una mayor producción con el tiosulfato, debido a la mayor proporción de azufre en la molécula.

Tabla 3.3 Prueba de utilización de aceptores de electrones de las cepas aisladas de BSR en lactato

Cepas	Aceptor de electrones	1a. Inoculación		2a. Inoculación	
		Dilución	H ₂ S _L mM	Dilución	H ₂ S _L mM
3	Sulfato	10 ⁻⁴	1.80	10 ⁻⁶	1.55
	Tiosulfato	10 ⁻¹⁰	3.32	10 ⁻⁴	1.63
5	Sulfato	10 ⁻¹	3.27	10 ⁻¹	2.14
	Tiosulfato	10 ⁻¹	7.95	10 ⁻¹	11.60

H₂S_L = H₂S disuelto

3.4.2 Utilización de sustratos

Se hizo una selección de los sustratos reportados para BSR, para hacer la caracterización de las cepas aisladas. Cada cepa se inoculó con cada uno de los sustratos tanto en sulfato como en tiosulfato, en tubos con medio líquido.

Se hicieron por triplicado tres inoculaciones consecutivas. En la tabla 3.4 se presentan los promedios de la absorbancia y producción de H₂S de la tercera reinoculación.

Los cultivos se incubaron a 35°C. Se tomaron dos criterios para considerar el crecimiento: la absorbancia que se midió a 580 nm hasta alcanzar la fase estacionaria y la producción de H₂S gaseoso medido en la fase estacionaria para determinar si las cepas crecieron debido a la oxidación de los sustratos por reducción del sulfato o tiosulfato. Para que un sustrato sea considerado como usado por las cepas, la absorbancia deberá ser mayor que la presentada por los testigos y la producción de H₂S positiva. En algunos casos, se observó un aumento en la absorbancia pero sin producción de H₂S, lo cual indica que la utilización de estos sustratos se hizo por vías diferentes a la sulfato reducción. Algunas especies tienen la habilidad de crecer fermentativamente en ausencia de sulfato o tiosulfato en sustratos orgánicos tales como piruvato, fumarato, malato y lactato (Hansen, 1993).

Tabla 3.4 Utilización de diferentes sustratos expresada como crecimiento en las cepas aisladas de BSR en los dos aceptores de electrones

Testigos	Absorbancia 580 nm			
	cepa3 tio	cepa3 sul	cepa5 tio	cepa5 sul
Testigos	0.09 +	0.08-	0.06 +	0.03 -
Carbohidratos				
D-Manitol	0.100 +	0.095 +	0.04	0.010
L-Ramnosa	0.125 +	0.200	0.005	0.040
Galactosa	0.135 +	0.100 +	0.470 +	0.020
Maltosa	0.145 +	0.120 +	0.040	0.025
D-Fructosa	0.095 +	0.100 +	0.025	0.020
D-Ribosa	0.095 +	0.125 +	0.025	0.040
D-Xilosa	0.06	0.095	0.040	0.000
L-Xilosa	0.115 +	0.110 +	0.030	0.000
Manosa	0.135 +	0.110 +	0.475	0.030
Sacarosa	0.160 +	0.100 +	0.040	0.025
Lactosa	0.0750	0.120 +	0.025	0.020
Glucosa	0.08	0.085	0.035	0.010
Acidos Carboxílicos:				
Alifáticos				
Acético	0.083		0.023	0
Propiónico	0.095 +	0.115 +	0.035	0.050 +
Butírico	0.065	0.095	0.030	0.040
Fórmico	0.175 - *	0.170 - *	0.050	0.000
Aromáticos				
Benzoico	0.06	0.070	0.045	0.050
Acidos Dibásicos				
Succínico	0.140 - *	0.03	0.045	0.000
Oxálico		0.03		
Hidrocarburos aromáticos				
Tolueno	0.05	0.09	0.045	0.015
Compuestos nitrogenados				
Aminas				
Anilina	0.11 -	0.06	0.035	0.025
Aminoácidos				
Casaminoácidos	0.160 -	0.140 -	0.040 -	0.040 -
Alcoholes y Fenoles				
Etanol	0.39 +	0.320 +	0.26 +	0.30 +
Fenol	0.03	0.09	0.06	0.045
Polifenol				
Catecol	0.025	0.06	0.06	0.010
Oxiácidos				
Málico	0.190 -	0.09	0.195 -	0.000
Láctico	0.37 +	0.06 +	0.40 +	0.40 +
Cetonas				
Acetona	0.085	0.096	0.025	0.030
Mezcla de Gases				
H ₂ /CO ₂	0.295 +	0.03 +	0.20 +	0.19 +

+ H₂S positivo, - H₂S negativo, * turbios debido al sustrato

Resultados y discusión

Los resultados en negritas indican la utilización de los sustratos ya que la absorbancia es mayor que la del testigo y los asteriscos indican la presencia de turbiedad debida al sustrato.

Como se muestra en la tabla 3.4 las cepas aisladas de BSR además de presentar diferencias morfológicas, mostraron diferencias metabólicas ya que cada una utilizó diferentes sustratos. Sin embargo algunos como el etanol, el lactato y el H_2/CO_2 , fueron utilizados en común.

La utilización del H_2/CO_2 , mostró su capacidad para crecer por autotrofia, característica común entre las BSR.

Se pudo observar también que hubo diferencia en la utilización de los sustratos, dependiendo del aceptor de electrones involucrado.

Las cepas aisladas mostraron tener características poco frecuentes entre las BSR como son: la utilización de gran variedad de azúcares y de aminoácidos como sustratos.

La utilización de azúcares, no es común, sólo pocas especies de BSR han sido reportadas como capaces de utilizar los carbohidratos como sustratos. Es particularmente el caso de algunas especies de *Desulfatamaculum*: *Dtm. nigrificans* y *Dtm. geothermicum* que pueden utilizar fructosa y *Dtm. antarcticum* la glucosa; mientras que en especies de *Desulfovibrio* se ha observado utilización de glucosa en *Dv. salexigens* y fructosa en *Dv. fructosovorans*.

La cepa 3 correspondiente a *Desulfotamaculum*, logró la utilización de la mayoría de los azúcares probados, en presencia de tiosulfato utilizó: el manitol, la ramnosa, la galactosa, la maltosa, la manosa y la sacarosa mientras que en presencia de sulfato utilizó: la ramnosa, la galactosa, la maltosa, la fructosa, la ribosa, la xilosa, la manosa, la sacarosa y la lactosa. Lo cual revela características especiales en la cepa. Sólo se conoce una especie aislada de una termita: *Desulfovibrio termitidis*, que tiene la habilidad para utilizar varios carbohidratos. (Widdel, 1988; Hansen, 1993).

Por otra parte la cepa 5 que correspondiente a *Desulfovibrio*, creció en presencia de tiosulfato en la galactosa y la manosa carbohidratos, que no han sido reportados como sustratos para BSR.

Aún cuando algunas especies de BSR tienen la capacidad metabólica para oxidar los aminoácidos en general no se obtiene un buen crecimiento. Algunas especies de *Desulfovibrio* pueden utilizar varios aminoácidos entre ellos la cisteína, la alanina, la serina, la glicina, el aspartato, la treonina, el glicerol y especies de *Desulfotomaculum* como *Dtm. ruminis*, *Dtm. thermoacetoxidans* pueden utilizar alanina. *Desulfococcus niacini* usa glutamato (Widdel, 1988; Hansen, 1993)

La cepa 5 perteneciente al género *Desulfovibrio* no pudo utilizar los casaminoácidos como sustratos. Sin embargo se observó que la cepa 3 perteneciente al género *Desulfotomaculum* sí utilizó los casaminoácidos como sustrato.

En algunas especies de BSR se ha reportado la utilización del ácido málico como aceptor de electrones. En la cepa 3 se observa la utilización del ácido málico, pero sin producción de H₂S, lo cual indica que no hubo sulfato reducción. Por lo tanto, en este caso, el ácido málico pudo haberse usado como aceptor de electrones y no como sustrato.

El formiato o el propionato se sabe que pueden ser oxidados por algunas especies hasta acetato y CO₂, la cepa 3 *Desulfotomaculum*, mostró crecimiento en estos sustratos.

3.4.3 Identificación preliminar

En la tabla 3.5 se compararon los resultados de las cepas aisladas con los datos reportados en la literatura. Se llegó a la conclusión de que las características de las cepas 3 y 5 coincidían con las características de los géneros *Desulfotomaculum* y *Desulfovibrio* respectivamente (Holt *et al.*, 1994).

Tabla 3.5 Características de las cepas aisladas de BSR

Características	Cepa 3	Cepa 5
Morfología de las colonias	Colonias negras brillantes cóncavas con borde continuo	Colonias negras brillantes cóncavas con borde continuo
Morfología de los microorganismos	Bacilos	Vibrios
Utilización de sustratos con tiosulfato	D-Manitol L-Ramnosa Galactosa Maltosa L-Xilosa Manosa Sacarosa Casaminoácidos Etanol Málico Láctico H ₂ /CO ₂	Galactosa Manosa Etanol Málico Láctico H ₂ /CO ₂
Utilización de sustratos con sulfato	L-Ramnosa Galactosa Maltosa D-Fructosa D-Ribosa L-Xilosa Manosa Sacarosa Lactosa Casaminoácidos Etanol	Etanol Láctico H ₂ /CO ₂
Oxidación de compuestos orgánicos	Incompleta	Incompleta
Reacción Gram	+	+
Motilidad	+	+
Similitud con géneros reportados	<i>Desulfotomaculum</i>	<i>Desulfovibrio</i>

4. BACTERIAS TIOSULFATO REDUCTORAS QUE NO REDUCEN SULFATO

Las BTSR pueden utilizar el tiosulfato y el azufre elemental con excepción de algunas especies, pero no el sulfato como aceptores finales de electrones en reacciones de óxido - reducción con sustratos.

En esta segunda parte se presenta el aislamiento de las BTSR del lodo analizado con tiosulfato. El aislamiento se divide en dos etapas: medios líquidos de enriquecimiento para propagación y medios sólidos en tubo rodado para lograr una separación física de las colonias. Se hizo una caracterización de las cepas aisladas con base en los aceptores de electrones.

4.1 AISLAMIENTOS DE BTSR EN MEDIO LÍQUIDO

Esta etapa tiene como primer objetivo obtener cultivos enriquecidos de BTSR que hagan la dismutación del tiosulfato o que lo respiren. Como segundo objetivo se pretende detectar la capacidad autotrófica de algunas bacterias.

Para incrementar el número de microorganismos deseados y adaptarlos a las nuevas condiciones, se hicieron dos aislamientos consecutivos en medio líquido de enriquecimiento usando casaminoácidos, porque se ha encontrado que éstos al igual que las proteínas son los sustratos de predilección para las BTSR no sulfato reductoras.

En los aislamientos con medio líquido de enriquecimiento, se manejaron dos concentraciones en los sustratos, para identificar el proceso metabólico involucrado:

-Respiración de los casaminoácidos: los casaminoácidos (5.0 g/L) actúan como donadores de electrones mientras que el tiosulfato actúa como el aceptor.

-Dismutación del tiosulfato: En este caso el tiosulfato actúa como donador y aceptor de electrones mientras que los casaminoácidos (0.1 g/L) sólo proporcionan el carbono necesario para el crecimiento celular.

4.1.1 Primer aislamiento de BTR en medio líquido de enriquecimiento: utilización de casaminoácidos + H₂/CO₂

Se hizo un primer enriquecimiento con la mezcla de H₂/CO₂ + casaminoácidos. es conveniente agregar al medio compuestos que permitan potenciar la propagación de las bacterias de interés ya que al inicio del proceso de aislamiento, los microorganismos se están adaptando a las nuevas condiciones de laboratorio y su población es todavía minoritaria.

En los resultados de la figura 4.1, se observa que se obtuvo un buen crecimiento utilizando además de los casaminoácidos una fuente de energía adicional como es el H₂/CO₂.

Como no se observaron diferencias en el crecimiento en las dos concentraciones de casaminoácidos, se realizó un segundo enriquecimiento, utilizando únicamente a los casaminoácidos como fuente de carbono y energía y comparándolo con los cultivos de casaminoácidos + H₂/CO₂.

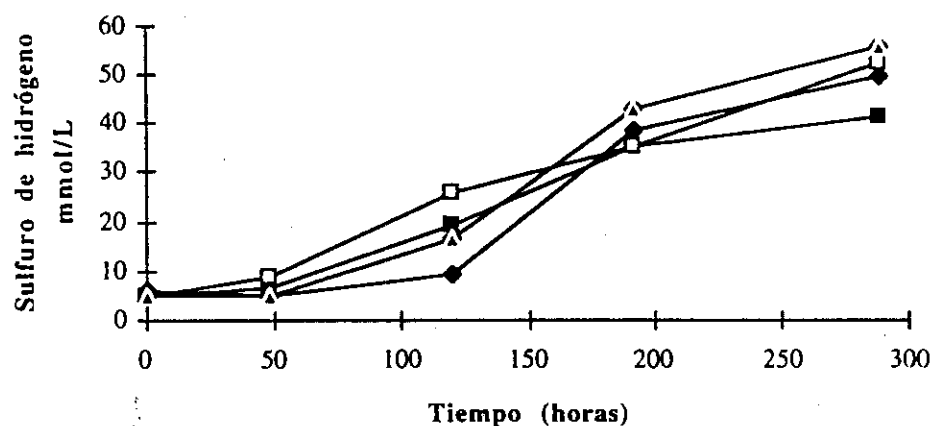


Figura 4.1 Producción de H₂S de los cultivos del primer enriquecimiento para BTSR, utilizando tiosulfato como aceptor de electrones. T=35°C pH=7. ■,□ Casaminoácidos 0.1g/L + H₂/CO₂; ◆,◇ Casaminoácidos 5 g/L+ H₂/CO₂

4.1.2 Segundo aislamiento de BTSR en medio líquido de enriquecimiento: utilización del tiosulfato por respiración de casaminoácidos o por dismutación

Se hizo un segundo enriquecimiento para determinar si en el cultivo había bacterias con la capacidad de utilizar los casaminoácidos como única fuente de carbono y energía, sin fuentes de energía adicional.

Los resultados de la figura 4.2, dan evidencia de que sí hay bacterias capaces de utilizar los casaminoácidos (5 g/L) como única fuente de carbono y energía por el proceso de respiración.

Aparentemente la adición del H₂/CO₂ favoreció la utilización de los casaminoácidos por las BTSR ya que se observó mayor producción de H₂S con respecto a los cultivos que no lo tenían.

No se observó la dismutación del tiosulfato en los cultivos con casaminoácidos (0.1 g/L).

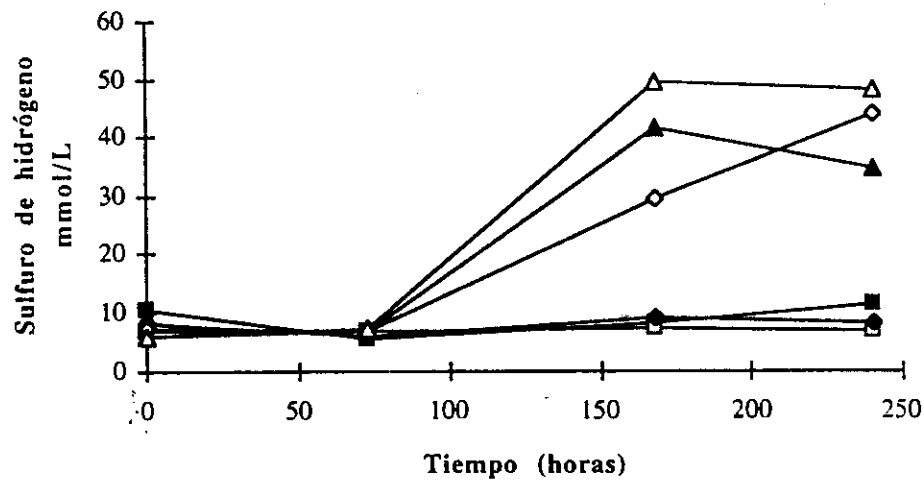


Figura 4.2 Producción de H_2S de los cultivos del primer enriquecimiento para BTSR, utilizando tiosulfato como aceptor de electrones. $T=35^\circ C$ $pH=7$. ■, □ Casaminoácidos 0.1 g/L; ◆, ◇ Casaminoácidos 5 g/L; ▲, △ Casaminoácidos 5 g/L + H_2/CO_2

Finalmente se puede decir que con la serie de medios líquidos de enriquecimiento, se pudo determinar que en los cultivos existían bacterias con la habilidad para utilizar los casaminoácidos (5 g/L) como donadores de electrones y el tiosulfato como aceptor en el proceso de respiración.

Aparentemente el H_2/CO_2 tiene un efecto positivo en la utilización de los casaminoácidos porque potencia el crecimiento de las bacterias, ya que actúa como fuente de energía adicional en el cultivo; sin embargo como no es un cultivo puro, se trata todavía de un consorcio microbiano, es difícil determinar si el incremento en la producción de H_2S no es el resultado de la reducción del tiosulfato con el H_2 de otras bacterias.

En los cultivos con casaminoácidos (0.1 g/L) no se observó la dismutación del tiosulfato.

4.2. AISLAMIENTOS DE BTSR EN MEDIO SÓLIDO

4.2.1 Inoculación en tubo rodado

A partir de los cultivos del segundo aislamiento en medio líquido de enriquecimiento, se inocularon tres series consecutivas en tubo rodado, realizándose 12 diluciones cada vez para cada cultivo.

En la tabla 4.1 se presentan los resultados correspondientes a la dilución más alta de cada serie, en donde la producción de H_2S haya sido la mayor y se resumen las características de las colonias aisladas; cada inoculación se incubó durante 30 días a $35^\circ C$ haciendo un total de 90 días de incubación para cada cepa aislada.

Tratándose de medios selectivos, se observó que en algunos cultivos, a través de las reinoculaciones ya no se presentó crecimiento, probablemente debido a que las colonias originalmente no eran exclusivamente de BTSR o bien a que la proporción de éstas no era representativa y se perdieron en las reinoculaciones por la manipulación.

Finalmente se observa en los resultados que se lograron aislar tres colonias de los cultivos con casaminoácidos y H_2/CO_2 y cinco colonias de los cultivos con casaminoácidos. Sólo se continuó el aislamiento y la caracterización con estas últimas cinco cepas.

Tabla 4.1 Aislamientos de BTSR

Sustratos	<u>1er aislamiento</u>		<u>2o. aislamiento</u>		<u>3er aislamiento</u>		Colonias
	Dilución	H ₂ S y (fracc mol)	Dilución	H ₂ S y (fracc mol)	Dilución	H ₂ S y (fracc mol)	
Casaminoácidos + H ₂ /CO ₂ A	10 ⁻⁹	0.136	10 ⁻⁴	0.275	10 ⁻¹²	0.038	Sin crecimiento
			10 ⁻¹⁰	0.206	10 ⁻¹⁰	0.211	Colonias negras
Casaminoácidos + H ₂ /CO ₂ B	10 ⁻⁶	0.093	10 ⁻⁶	0.292	10 ⁻⁹	0.251	Colonias negras
					10 ⁻⁴	0.180	Colonias negras
Casaminoácidos A	10 ⁻¹⁰	0.202	10 ⁻¹¹	0.136	10 ⁻⁹	0.136	Colonias negras
			10 ⁻⁹	0.275	10 ⁻⁷	0.183	Colonias negras
	10 ⁻⁸	0.270	10 ⁻¹²	0.220	10 ⁻⁸	0.160	Colonias negras
			10 ⁻¹¹	0.198	10 ⁻¹²	0.034	Sin crecimiento
Casaminoácidos B	10 ⁻¹⁰	0.150	10 ⁻¹⁰	0.093	10 ⁻¹⁰	0.150	Colonias negras
	10 ⁻⁹	0.257	10 ⁻³	0.189	10 ⁻¹⁰	0.147	Colonias negras

A y B corresponden al duplicado de las series

4.2.2 Reinoculación en medio líquido

Para comenzar a realizar la caracterización fenotípica, se reinocularon las 5 cepas aisladas en tubos Hungate en medio líquido en doce diluciones sucesivas con casaminoácidos (5 g/L) como sustrato y tiosulfato (20 mM) como aceptor de electrones. Se asignó arbitrariamente una numeración de I a V a las cepas aisladas (Tabla 4.2).

Tabla 4.2 Diluciones correspondientes a las máximas absorbancias en los cultivos líquidos de las cepas aisladas con tiosulfato

Cepas	1a. Inoculación		2a. Inoculación	
	Dilución	Absorbancia	Dilución	Absorbancia
I	10 ⁻¹	0.15	10 ⁻¹¹	0.14
II	10 ⁻⁶	0.09	10 ⁻¹²	0.05
III	10 ⁻³	0.13	10 ⁻⁹	0.10
VI	10 ⁻³	0.13	10 ⁻¹⁰	0.09
V	10 ⁻²	0.12	10 ⁻⁹	0.26

4.3 PRUEBAS DE PUREZA

4.3.1 Observación al microscopio

Se hicieron observaciones de los cultivos líquidos en un microscopio compuesto Zeiss, con un objetivo de 100x (Figura 4.3).

Se decidió continuar la caracterización sólo con las cepas I y III que se encontraron puras.

Se realizó una prueba complementaria para confirmar la pureza de estas dos cepas.

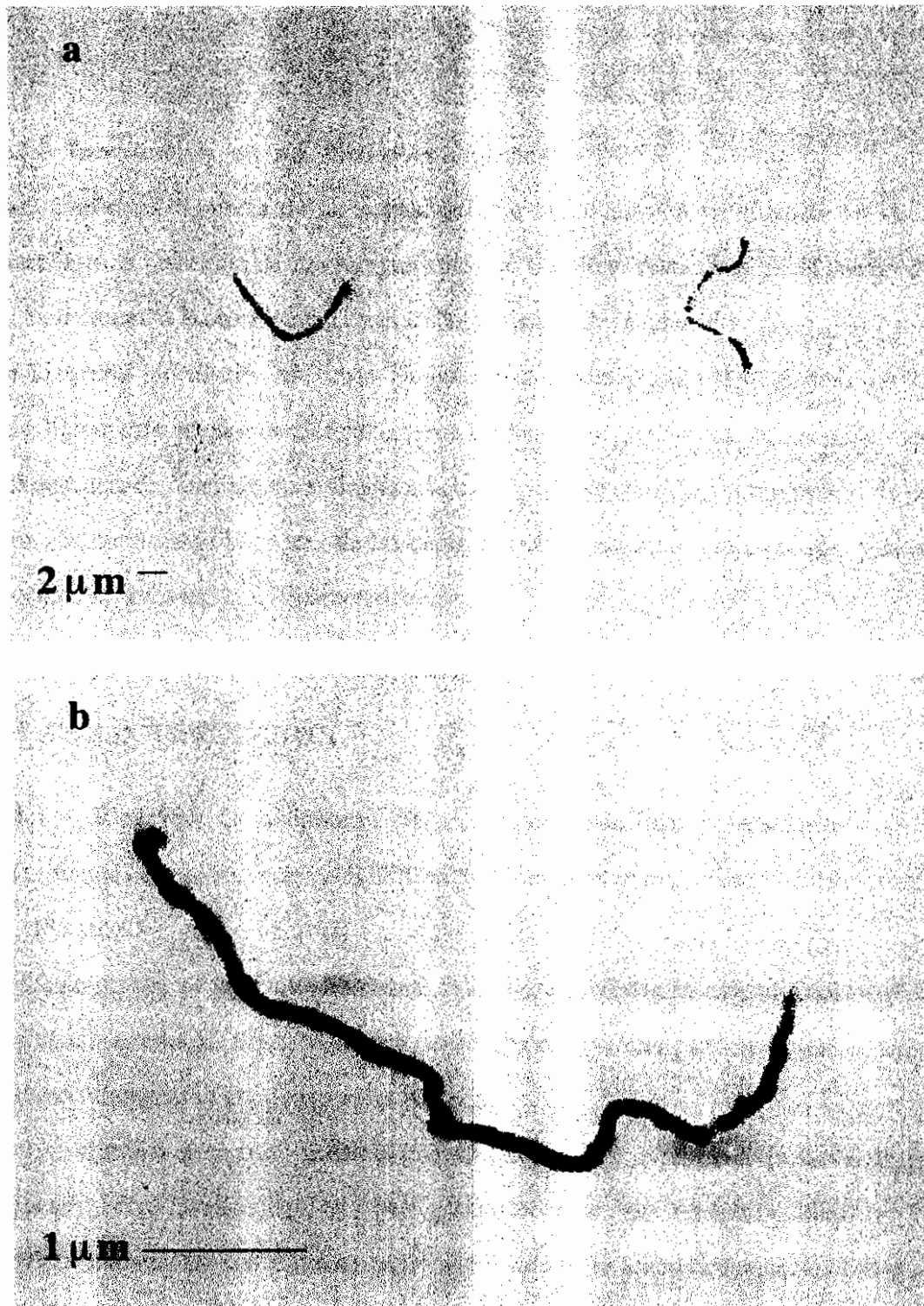


Figura 4.3 Bacilos formando cadenas (100x). (a) Cepa I; (b) Cepa III

4.3.2 Inoculación en un medio con glucosa

Para confirmar la pureza de las cepas, se hace la inoculación en glucosa, ya que pone de manifiesto la presencia de microorganismos no tiosulfato reductores en el medio de cultivo cuando aumenta la absorbancia después de un tiempo de incubación.

Se hizo una inoculación en tubos Hungate con medio líquido con glucosa (20 mM) sin tiosulfato u otro aceptor de electrones; para evidenciar la presencia de bacterias fermentativas.

La ausencia de crecimiento al finalizar la incubación, se consideró como prueba de pureza.

Una vez confirmada la pureza de las cepas por observaciones al microscopio y la prueba de glucosa, se comenzó con la caracterización.

4.4 CARACTERIZACIÓN

4.4.1 Utilización de aceptores de electrones: sulfato y tiosulfato

La principal característica de las BTSR es la incapacidad para utilizar el sulfato como aceptor de electrones.

Con esta prueba se pretende determinar si las cepas aisladas en casaminoácidos y tiosulfato son efectivamente BTSR o si se trata de BSR con capacidad para crecer en casaminoácidos sustrato raramente utilizado por estas bacterias.

Para discriminar el tipo de metabolismo de las cepas se inocularon en tubos Hungate por triplicado con medio líquido con casaminoácidos en ambos sulfato y tiosulfato respectivamente para comparar su capacidad para utilizar ambos compuestos como aceptores finales de electrones. Se midió la absorbancia (Tabla 4.3).

Tabla 4.3 Prueba de utilización de sulfato y tiosulfato como aceptores de electrones en las cepas aisladas en casaminoácidos

Cepas	Aceptor de electrones	Absorbancias 580 nm	
		t (0 h)	t (48)
I	Sulfato	0.05	0.15
		0.04	0.17
		0.05	0.15
	Tiosulfato	0.05	0.17
		0.05	0.16
		0.04	0.07
III	Sulfato	0.04	0.11
		0.04	0.10
		0.06	0.09
	Tiosulfato	0.04	0.10
		0.04	0.08
		0.04	0.15

Los resultados de la tabla 4.3 muestran, que las cepas I y III, redujeron el sulfato y el tiosulfato en presencia de casaminoácidos.

De acuerdo con estos resultados, se puede considerar que se trata de cepas BSR, que son capaces de oxidar los casaminoácidos en presencia de tiosulfato o de sulfato como aceptores de electrones. Esta característica no es frecuente y sólo se ha reportado en algunas especies (Hansen, 1993).

Finalmente podemos señalar que de acuerdo con los resultados obtenidos, en el lodo anaerobio no se encontraron BSR tiosulfato reductoras que no reducen sulfato.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

A partir del lodo de un reactor UASB, se siguieron dos líneas de aislamientos en paralelo, una dirigida hacia las BSR y la otra hacia las BTSR.

En el aislamiento de las BSR en medio líquido de enriquecimiento, se hicieron varias observaciones, destacando la capacidad de las bacterias del grupo I para utilizar el lactato como donador de electrones en presencia de un aceptor como sulfato o tiosulfato.

En los cultivos no se observaron bacterias del grupo II que utilizaran el acetato como donador de electrones, pero sí se observó crecimiento en los cultivos, que además de acetato contaban con una fuente de energía adicional como es el caso del acetato + H_2/CO_2 . Sin embargo se sabe que la utilización del H_2/CO_2 como fuente de energía inorgánica, es muy común entre las BSR, por lo tanto en este caso es posible que el crecimiento se deba a la utilización de éste.

En los cultivos para BSR, no se observó dismutación del tiosulfato.

Después de dos series consecutivas en medio líquido y tres en medio sólido, se hizo una preidentificación de las 2 cepas aisladas de BSR con base en la utilización de aceptores de electrones y sustratos, se compararon sus características con las de los géneros reportados y se concluyó que se trataba de *Desulfotomaculum* y *Desulfovibrio*.

Ambas cepas presentaron capacidad para crecer por autotrofia en H_2/CO_2 , entre otros sustratos en común.

Sin embargo es importante destacar que en el caso de *Desulfotomaculum*, se observaron características muy poco frecuentes entre las especies de BSR hasta ahora conocidas, como fue la capacidad para utilizar una gran variedad de carbohidratos y casaminoácidos como sustratos, lo que podría indicar que se trata de una nueva especie.

Además *Desulfovibrio*, utilizó como sustratos dos carbohidratos no comunes, que son la galactosa y la manosa, lo cual revela una característica interesante en esta cepa.

En cuanto al aislamiento para BTSR, se observó la utilización de casaminoácidos como donador de electrones con tiosulfato como aceptor .

Los cultivos con H_2/CO_2 + casaminoácidos, presentaron mayor crecimiento que los correspondientes con casaminoácidos, por lo que se deduce que su presencia favorece la utilización de éstos.

En los cultivos de BTSR no se observó dismutación del tiosulfato.

Después de realizar dos series de aislamientos en medio líquido de enriquecimiento y tres en medio sólido, se hizo una caracterización por utilización de aceptores de electrones para comprobar que realmente se trataba de BTSR. Sin embargo en los resultados, se pudo comprobar que no se trataba de BTSR, sino de BSR con capacidad para crecer en casaminoácidos como donador de electrones y tiosulfato o sulfato como aceptores.

Es necesario señalar que la capacidad de las cepas de BSR para crecer en casaminoácidos, no es común, por lo tanto esta característica es de interés y con mas estudios fenotípicos y genotípicos podría determinarse si se trata de especies nuevas.

No se encontraron BTSR, no obstante que las características que se seleccionaron para su aislamiento fueron adecuadas. Sin embargo se encontraron especies con características poco comunes entre las BSR hasta ahora conocidas.

Las perspectivas de este experimento son sin duda interesantes, se trata de un trabajo pionero, ya que no hay hasta el momento suficiente información sobre las especies de bacterias que utilizan el tiosulfato en los reactores anaerobios y es muy posible que las cepas aisladas

REFERENCIAS

6. REFERENCIAS

Aeckersberg F., Bak F. y Widdel F. (1991). "Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium". *Arch. Microbiol.*, 156: 5-14.

Atlas R. M. (1984). "Microbiology fundamentals and applications". Macmillan Publishing company. New York. pp. 785.

Bak F. y Cypionka H. (1987). "A novel type of energy metabolism involving fermentation of inorganic sulphur compounds". *Nature*, 326: 891 - 892.

Bak F. y Pfennig N. (1987). "Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio sulfodismutans* sp. nov. by disproportionation of inorganic sulfur compounds". *Arch. Microbiol.*, 147: 184 - 189.

Balch, W. E., Fox G. E., Magrum L. J., Woese, C. R. y Wolfe, R. S. (1979). "Methanogens: reevaluation of a unique biological group". *Microbiol. Rev.*, 43: 260 - 296.

Badziong W. y Thauer R. K. (1978). "Growth yields and growth rates of *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg) growing on hydrogen and sulfate and hydrogen and thiosulfate as sole energy sources". *Arch. Microbiol.*, 117: 209.

Brock T. D., Smith D. W. y Madigan M. T. (1987). "Microbiología". Prentice Hall. México. pp. 906.

Cord - Ruwisch R. (1985). "A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate - reducing bacteria". *J. Microbiol. Methods*, 4: 33 - 36.

Faudon C., Fardeau M. L., Heim J., Patel B., Magot M. y Ollivier B. (1995). "Peptide and amino acid oxidation in the presence of thiosulfate by members of the genus *Thermoanaerobacter*". *Cur. Microbiol.*, 31: 152 - 157.

Fardeau M. L., Cayol J. L., Magot M. y Ollivier B. (1993). "H₂ oxidation in the presence of thiosulfate, by a *Thermoanaerobacter* strain isolated from an oil- producing well". *FEMS Microbiol. Lett.*, 113 : 327 - 332.

Fardeau M. L., Faudon C., Cayol J. L., Magot M., Patel B. K. C. y Ollivier B. (1996). "Effect of thiosulfate as electron acceptor on glucose and xylose oxidation by *Thermoanaerobacter finnii* and a *Thermoanaerobacter* sp. isolated from oil field water". *Res. Microbiol.*, 147: 159 - 165.

Fardeau M. L., Patel B. K. C., Magot M. y Ollivier B. (1997). "Utilization of serine, leucine, isoleucine and valine by *Thermoanaerobacter brockii* in the presence of Thiosulfate or *Methanobacterium* sp. as electron acceptors". *Anaerobe* , 3: 405 - 410.

Garcia J. L. (1982). "Relations between acidogenesis and the utilization of lactate, sulfate, nitrate during anaerobic digestion". Memorias del segundo simposio panamericano de combustibles y productos químicos vía fermentación "Avances en digestion anaerobia". Ruíz C., Calzada F.J., de León R. Mircen de Biotecnología Instituto Centroamericano de Investigaciones y Tecnología Industrial (ICAITI) México D. F. del 25 al 27 de octubre de 1982. pp. 20 - 30.

Gibson G. R., (1990). "Physiology and ecology of the sulphate - reducing bacteria". *J. Appl. Bacteriol.*, 69: 769 - 797.

Hamilton W. (1998). "Microbiology and microbial ecology of sulphate reducing bacteria". En: TMR summer school programme. The biological sulphur cycle: Environmental science and technology. Wageningen, Holanda. pp. 1 - 40.

Hansen T. A. (1993). "Carbon Metabolism of Sulfate - Reducing Bacteria". En: The sulfate - reducing bacteria: contemporary perspectives. Odom J. M. y Singleton R. Jr. (eds). Brock Springer series in Contemporary Bioscience. New York pp. 21- 40.

Hespell R. B. (1990). "Isolation of anaerobic microorganisms". En: Isolation of biotechnological organisms from nature. Labeda D. P. (ed) Mc Graw-Hill. New York. pp: 125 - 126.

Holt J. G., Krieg N.R., Sneath P. H. A., Staley J. T. y Williams S. T. (1994). "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". Hensyl W. R. (ed). Williams & Wilkins. London. pp. 335 - 346.

Hungate R. E. (1969). "A roll tube method for cultivation of strict anaerobes". En: *Methods in Microbiology*. Vol. 3B. Norris J .R. and Ribbons D. W. (eds). Academic Press Inc., New York. pp. 117 - 132.

Jorgensen B. B. (1990). "A thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments". *Science*, 249: 152 - 154.

Jorgensen B.B. y Bak F. (1991). "Pathways and microbiology of thiosulfate transformations and sulfate reduction in a marine sediment (Kattegat, Denmark)". *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (3): 847 - 856.

Kelly D. P. (1987). "Sulphur bacteria first again". *Nature*, 326: 830.

Krämer M. y Cypionka H., (1989). "Sulfate formation via ATP sulfurylase in thiosulfate - and sulfite - disproportionating bacteria". *Arch. Microbiol.*, 151: 232 - 237.

Kuever J., Kulmer J., Jannsen S. Fischer U. y Blotevogel K. H. (1993). "Isolation and characterization of a new spore-forming sulfate-reducing bacterium growing by complete oxidation of catechol". *Arch. Microbiol.*, 159: 282 - 288.

Lovley D. R. y Phillips E. J. P. (1994). "Novel processes for anaerobic sulfate production from elemental sulfur by sulfate-reducing bacteria". *Appl. Environ. Microbiol.*, 2394 - 2399.

Referencius

Ljungdahl L. G. y Wiegel J. (1986). "Working with anaerobic bacteria". En: Manual of industrial microbiology and biotechnology. Demian A. L. y Solomon N. A. (eds). American Society for Microbiology. Washington D. C. pp. 84 -95.

Macarie H. (1992). "Traitment anaérobie des effluents d'une usine pétrochimique produisant un composé aromatisé, l'acide téréphtalique". Tesis doctoral de la Universidad de Aix en Provence, pp: 26 - 27. Marsella, Francia.

Macy J. M., Snellen J. E. y Hungate R. E. (1972). "Use of syringe methods for anaerobiosis". *Am. J. Clin. Nut.*, 25: 1318 -1323.

Magot M., Ravot G., Campaignolle X., Ollivier B., Patel B. K. C., Fardeau M. L., Thomas P., Crolet J. L. y 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.

Miller T. L. y Wolin M. J. (1974). "A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes". *Appl. Microbiol.*, 27 (5): 985 - 987.

Mohn W. W. y Tiedje J. M. (1990). "Catabolic thiosulfate disproportionation and carbon dioxide reduction in strain DCB-1, a reductively dechlorinating anaerobe". *J. Bacteriol.*, 2065 - 2070.

Ollivier B. (1996). "Découverte d'un métabolisme ancestral chez les procaryotes". Fiche d'actualité scientifique no 24. IRD Francia.

Referencias

Oude Elferink S. J. W. H., Maas R. N., Harmsen H. J. M. y Stams A. J. M. (1995). "Desulforhabdus amnigenus gen. nov. sp. nov., a sulfate reducer isolated from anaerobic granular sludge". *Arch. Microbiol.*, 164: 119 - 124.

Oude Elferink S. J. W. H. (1998). "Sulfate - reducing bacteria in anaerobic bioreactors". En: TMR summer school program The biological sulphur cycle: environmental science and technology. Wageningen, Holanda. pp.130 - 132.

Peck H. D. Jr. (1993). "Bioenergetic strategies of the sulfate-reducing bacteria". En: The sulfate-reducing bacteria: Contemporary perspectives. Odom J. M. y Singleton R. Jr. (eds). Brock Series in Contemporary Bioscience. New York.

Postgate J. R. (1979). "The sulphate - reducing bacteria". Cambridge University Press. Cambridge. 151 pp.

Ravot G., Ollivier B., Magot M., Patel, B. K. C., Crolet J. L., Fardeau M. L. y Garcia J. L. (1995 a). "Thiosulfate reduction, an important physiological feature shared by members of the order *Thermotogales*". *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (5): 2053 - 2055.

Ravot G., Magot M., Fardeau M. L., Patel B. K. C., Prensier G., Egan A., García J. L. y Ollivier B. (1995 b). "*Thermotoga elfii* sp. nov., a Novel Thermophilic Bacterium from an African Oil Producing Well". *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45 (2): 308 - 314.

Ravot G., Ollivier B., Fardeau M. L., Magot M. y García J. L. (1996 a). "La réduction du thiosulfate par les bactéries anaérobies thermophiles et hyperthermophiles" En: "Colloque: Microbiologie industrielle et environnement". 18 - 19 avril. Narbonne. Francia .

Mónica Bonilla Salinas

Referencias

Ravot G., Ollivier B., Fardeau M. L., Patel B. K. C., Andrews K. T., Magot M. y García J. L. (1996 b). "L- Alanine Production from glucose fermentation by hypertermophilic members of the domains Bacteria and Archea: a remnant of an ancestral metabolism?" *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (7): 2657 - 2659.

Ravot G., Fardeau M. L., Magot M., Patel B. K. C., García J. L. y Ollivier B. (1997). "Nouvelles Approches Microbiologiques de la Thiosulfato - Reduction en Milieu Pétrolier". En: Memorias del Segundo Curso Internacional de Biotecnología Industrial en la Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa. México D.F.

Singleton R. Jr. (1993). "The sulfate-reducing bacteria: an overview". En: The sulfate - reducing bacteria: Contemporary perspectives. Odom J. M. and Singleton R. Jr. (eds). Springer Verlag. New York. pp. 1 - 19.

Smith D. W. (1993). "Ecological actions of sulfate - reducing bacteria". En: The sulfate - reducing bacteria: Contemporary perspectives. Odom J. M. and Singleton R. Jr. (eds). Springer Verlag. New York. pp. 161 - 187.

Thamdrup B., Finster K., Hansen J. W. y Bak F. (1993). "Bacterial disproportionation of elemental sulfur coupled to chemical reduction of iron or manganese". *Appl. Environ. Microbiol.*, 59 (1): 101 - 108.

Widdel F. (1988). "Microbiology and ecology of sulfate-and sulfur-reducing bacteria". 469 - 585. En: Biology of anaerobic microorganisms. Zehnder Alexander J. B. (eds). John Wiley & sons. New York. pp. 872.