



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“CARACTERIZACION DE BACTERIAS ALCALOFILAS
SULFOXIDANTES”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

I. A. Verónica Freyre Fonseca

Director
Dr. Sergio Revah Moiseev

Iztapalapa, D.F. a 30 de noviembre de 2006

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
Tesis

**“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ALCALÓFILAS
SULFOOXIDANTES”**

Que Presentó

I.A. Verónica Freyre Fonseca

Comité Tutorial:

Director: Dr. Sergio Revah Moiseev
Asesor: Dra. Keiko Shirai Matsumoto

Jurado:

Presidente: Dra. Florina Ramírez Vives

Secretario: Dra. Keiko Shirai Matsumoto

Vocal: Dra. Inés García Peña

Vocal: Dra. Sylvie Le Borgne Le Gall

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluida en el **Padrón Nacional de Posgrado del CONACYT** y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el No. De Registro 0471-O.

AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo y agradezco a todas las personas que en algún momento han creído en mí y me han apoyado (directa o indirectamente) para la realización de esta tesis.

Agradezco a CONACYT por el apoyo brindado con la beca no. 180875 para la elaboración de la maestría.

RESUMEN

En la actualidad, algunas industrias, refinerías y rellenos sanitarios, se han convertido en focos contaminantes ya que sus desechos incluyen al azufre en su composición química. Los compuestos de azufre más importantes emitidos a la atmósfera son el dióxido de azufre (SO₂), el ácido sulfhídrico (H₂S) y el disulfuro de carbono (CS₂), entre otras especies que provocan daños a la salud, lluvia ácida, malos olores y fenómenos de corrosión.

Existen bacterias capaces de disminuir los problemas causados por los compuestos azufrados. En particular, las bacterias sulfooxidantes pueden transformar compuestos reducidos de S⁰, como el H₂S y S₂O₃, en sustancias menos dañinas, como el azufre elemental, las cuales son menos contaminantes por ser insolubles en agua y, por tanto, fácilmente removibles y/o re-aprovechables por otras industrias o microorganismos sulfatoreductores.

En el presente trabajo se investigaron las condiciones ambientales ([sustrato], pH, temperatura, salinidad) que favorecen el consumo específico de O₂ (actividad metabólica) de bacterias alcalófilas previamente aisladas de diferentes zonas del lago de Texcoco. Se encontró que la concentración de tiosulfato (como modelo de H₂S) más favorecedora es de 0.1mM en adelante, el intervalo de pH más favorecedor para el aislado "B" y el consorcio es de 10 a 11, mientras que el aislado "A" mostró ser neutrófilo (pH 8), la temperatura más favorecedora es 30°C para los tres casos y el intervalo de concentración salina es de 0.5 a 1M. El consumo de O₂, la concentración de proteínas, pH y Aw fueron determinadas mediante respirometrías, pruebas de Lowry y potenciómetro.

El conocimiento de las condiciones ambientales aquí encontradas, ayudarán a la formación y mantenimiento de consorcios con capacidad sulfooxidante, aplicables a tratamientos ambientales de efluentes industriales.

ABSTRACT

Nowadays some industries, refineries and landfills have become in focus of pollution due to their waste material compounds includes sulfur in their chemical composition. The most important sulfur compounds emitted to the atmosphere are dioxide of sulfur (SO_2), the sulfhidric acid (H_2S) and the disulphide of carbon (CS_2), among others species that cause human diseases, acid rain, bad odors and corrosion phenomena.

There are some bacteria that are able to decrease the problems caused by sulfur compounds. In particular, the sulfooxidants bacteria can transform the reduced sulfur compounds, like the H_2S and S_2O_3 , into harmless substances like the elemental sulfur, which are eco-friendly because of their water insolubility, therefore, easily removable and/or re-profitable by other industries or sulfate-reductor microorganisms.

This thesis searches the environmental conditions ($[sustrate]$, pH, temperature, salinity) that favors the specific O_2 consumption (metabolic activity) of alcalophilic bacteria previously isolated from a consortium of different zones of Texcoco lake. It was found that the most favorable thiosulphate concentration (as H_2S model) is above 0.1 mM, the most favorable pH range to the isolated "B" and the consortium was from 10 to 11, while the isolated "A" shows to be neutrophile (pH 8), the most favorable temperature is near 30°C for the tree cases, and the range of saline concentration is between 0.5 to 1M. The results were obtained by respirometers, Lowry's proof, pH decrease and the activity water (A_w) mesure.

The knowledge of environmental conditions found may help the formation and manteniment of consortiums with sulfooxidant capacity, useful for environmental treatments of industrial effluents.

INDICE	
Indice	1
Indice de tablas	4
Indice de figuras	4
I. Introducción	6
I.1 Efectos de la contaminación del aire	6
I.2 Química del azufre	7
I.2.1. Azufre elemental	10
I.2.2. Dióxido de azufre	10
I.2.3. Acido sulfhídrico	12
I.2.3.1 Influencia de la temperatura y el pH en la disociación del H ₂ S	13
I.2.4. Tiosulfato	14
I.3 Microorganismos para la eliminación de contaminantes azufrados	15
I.3.1 Microorganismos extremófilos	15
I.4 Bacterias Sulfoxidantes	17
I.5 El periplasma: sitio de oxidaciones quimiolitotróficas	20
I.6 Mecanismos que suceden en el interior de las bacterias alcalófilas Sulfooxidantes	21
I.6.1 Mecanismos para la regulación del pH	21
I.6.2 Iones de sodio y transporte en membrana	22
I.6.3 Mecanismo de sulfooxidación	23

I.6.4 Ciclo de Calvin	25
I.7 Estudios realizados con organismos sulfooxidantes	26
I.7.1 Estudios realizados por Sorokin	26
I.7.2 Microorganismos alcalófilos	27
I.8 Morfología celular de los <i>Thioalcalovibrios</i>	29
II.1 Justificación	34
II.2 Objetivo general	35
II.2.1 Objetivos particulares	35
III Métodos	36
III.1 Origen de las muestras	36
III.2 Medio de cultivo	36
III.3 Pruebas Microscópicas y Macroscópicas	37
III.4 Estudios de actividad celular	37
III.5 Adición de tiosulfato como sustrato	38
III.6 Inhibición por producto (sulfato)	38
III.7 Efecto del pH	39
III.8 Efecto de la temperatura	39
III.9 Efecto de la salinidad (NaCl)	40
III.9.1 En la actividad de agua (Aw)	40
IV. Resultados	41
IV.1 Identificación de aislados (A y B) en el consorcio microbiano	41
IV.2 Adición de tiosulfato como sustrato	43
IV.3 Efecto de la Salinidad en la actividad de las bacterias	46
IV.3.1 Crecimiento por lote	46
IV.3.2 En la Actividad de agua y biomasa	47

IV.4 Inhibición por sulfato	48
IV.4.1 En la Aw	50
IV.5 Efecto del pH	52
IV.5.1 Por lote	52
IV.5.2 Estudio en respirometría	52
IV.6 Efecto de la temperatura	55
IV.6.1 En el cultivo por lote	55
IV.6.2 Estudios en respirometría	56
V. Discusión	58
VI. Conclusiones	61
Bibliografía	63
Anexos	68

INDICE DE TABLAS

Tabla I.1. -Condiciones extremas	16
Tabla I.2. -Lista de bacterias sulfooxidantes	17
Tabla I.3. Comparación entre los tres diferentes tipos de bacterias sulfooxidantes	29
Tabla I.4. -Rendimientos biomasa sustrato determinadas con diferentes bacterias y condiciones de cultivo en estudios previos.	31
Tabla III.1. -Medio mineral para bacterias alcalófilas sulfooxidantes	36
Tabla IV.1. -Características de las colonias en medio sólido.	42
Tabla IV.2. - Tasas de consumo específico de oxígeno.	45
Tabla IV.3. -Tasas de consumo de oxígeno bajo diferentes concentraciones de sulfato.	49
Tabla IV.4. - Tasas de consumo de oxígeno cambiando el pH	53
Tabla IV.5. Tasas de consumo de oxígeno de los aislados A y B y el consorcio C ₁ respecto a la temperatura de crecimiento.	56

INDICE DE FIGURAS

Figura I.1. -Ciclo biogeoquímico de azufre	8
Figura I.2. -Diagrama de distribución del sulfuro de hidrógeno	14
Figura I.3. -Mecanismo de regulación de pH	22
Figura I.4. -Mecanismo de regulación de Na ⁺	23
Figura I.5. -Mecanismo de sulfooxidación	24
Figura I.6. -Ciclo de Calvin	25
Figura I.7. - Diagrama del sistema de recirculación.	27
Figura I.8. -Morfología de una bacteria del grupo alkalivibrio creciendo a pH 10	30
Figura I.9. -Arbol filogenético de la ubicación de las bacterias.	32
Figura III.1. Fotografía de cultivo de donde se extrajeron las muestras para las mediciones de pH	39
Figura IV.1. -Fotografías de: a) Aislado A , b) Aislado B y c) consorcio C ₁	41
Figura IV.2. - Colonias de los aislados (A y B) y el consorcio (C) vistos en medio sólido.	42
Figura IV.3. - Comparación de los ajustes con el modelo de Gómpertz.	44

Figura IV.4.- Tasas de consumo de oxígeno de los aislados A y B y el consorcio C ₁ bajo diferentes concentraciones de tiosulfato.	45
Figura IV.5. - Comparación de la actividad celular entre diferentes concentraciones de NaCl. Comportamiento de los aislados A y B bajo diferentes concentraciones de sulfato como un agente inhibidor.	46
Figura IV.6. - Relación entre la producción de proteína y la actividad de agua respecto a la concentración salina	47
Figura IV.7.- Comportamiento de los aislados “A” y “B” bajo diferentes concentraciones de sulfato como un agente inhibidor.	49
Figura IV.8.- Relación entre la actividad de agua (A _w) y la producción de proteína, respecto a la concentración de sulfato presente en el medio.	51
Figura IV.9.- Efecto de la actividad de las bacterias en el pH del medio respecto al tiempo.	52
Figura IV.10.- Comportamiento de los aislados A y B y el consorcio C ₁ bajo diferentes niveles de pH de crecimiento	54
Figura IV.11.- pH	55
Figura IV.12.- Comportamiento de los aislados A y B y el consorcio C ₁ respecto al cambio de temperatura.	57
Figura 1. a) Equipo de cómputo conectado al oxímetro, b) Electrodo de Clark introducidos en pozitos con imanes de agitación y baño maría a 30°C.	69
Figura 2. Comparación de los ajustes con el modelo de Gómpertz realizado a los aislados A y B	72
Figura 3. Ajustes con el modelo de Gómpertz bajo diferentes concentraciones de sulfato de los aislados A y B , a) y b) respectivamente	73
Figura 4. Comparación de los ajustes con el modelo de Gómpertz entre los aislados A y B, y el consorcio C ₁ .	75
Figura 5. Ajustes por el modelo de Gómpertz a diferentes temperaturas de crecimiento de los aislados A y B y el consorcio C ₁ .	77

INTRODUCCION

1.1 EFECTOS DE LA CONTAMINACION DEL AIRE

El estudio de los efectos de la contaminación ambiental, ha tomado importancia en las últimas 3 décadas, debido a que ésta ha llegado a ser un verdadero problema para la salud humana. La contaminación se observó a partir de la revolución industrial, por la quema de combustibles fósiles, con la consecuente emisión de gases a la atmósfera. Sin embargo, sus efectos se deben principalmente a tres aspectos básicos: la tendencia a buscar siempre una mayor cantidad de energía para satisfacer las necesidades humanas, el incremento del tamaño de la población y la creación de los sistemas de transporte que la sociedad requiere. Entre las fuentes contaminantes se pueden distinguir las naturales, como las provenientes de mares (descomposición de material orgánico), incendios forestales y erupciones volcánicas; y las antropogénicas, divididas en móviles y fijas, a las cuales pertenece la quema de los combustibles fósiles.

En las grandes ciudades, el efecto contaminante de las actividades antropogénicas es mucho mayor que el efecto de las fuentes naturales. Un ejemplo de ello, lo reporta la ciudad de México, donde anualmente se emiten alrededor de 200 000 toneladas de dióxido de azufre (SO_2), de las cuales, menos del 0.5% proviene de fuentes naturales. Mientras que en los océanos, se liberan alrededor de 150 millones de toneladas de azufre al año, por la actividad humana (Campoblanco y col., 2000).

En Estados Unidos, anualmente se invierten billones de dólares para el control y eliminación de contaminantes. Otros países han firmado acuerdos pactados en Kyoto, por lo que se pronostica que la cantidad destinada a las medidas de prevención, control y eliminación de contaminantes se incrementará considerablemente cada año.

Parte de la contaminación la producen algunas industrias, refinerías y rellenos sanitarios, que emiten contaminantes gaseosos que incluyen al azufre en su composición química. Entre los compuestos del azufre más importantes emitidos a la atmósfera se encuentra el dióxido de azufre (SO_2), el ácido sulfhídrico (H_2S) y el disulfuro de carbono (CS_2) entre otras especies que provocan daños a la salud debido a la toxicología y problemas

respiratorios que causan estas partículas, lluvia ácida, malos olores, fenómenos de corrosión y disminución de visibilidad (Janssen y col. 1995; Lens y Kuenen, 2001).

1.2 .QUIMICA DEL AZUFRE

El azufre es uno de los elementos cuya acumulación ha sido afectada en gran medida por el hombre en los últimos 100 años, principalmente al quemar combustibles fósiles, con lo cual se libera dióxido de azufre al aire. El agua de lluvia acarrea el SO₂ disuelto en el ambiente, formando H₂SO₄, el cual llega a suelos, mares y lagos. Los efectos pueden ser graves a escala local, en las áreas industriales y por arrastre, en otras áreas en las que la cantidad de azufre es considerable.

En el suelo, del 10 al 15% del azufre se encuentra en forma de sulfato, el cual se puede lixiviar fácilmente a menos que sea adsorbido en el suelo. Gran parte del restante está en forma de materia orgánica, que es lentamente liberado durante la descomposición. Las plantas superiores dependen en gran medida de la mineralización microbiana del azufre. En suelos o microhábitats anaeróbicos, a menudo están presentes sulfuros y polisulfuros. Por lo general, la cantidad total del azufre en el suelo es de 100 a 500 mg de azufre/ kg de suelo, del cual la mitad puede ser soluble. El azufre rara vez es limitante en medios naturales, pero en la agricultura intensiva, sobre todo con niveles altos de nitrógeno como fertilizante, puede ser necesaria su aplicación.

En el aire, el azufre se encuentra principalmente en forma de SO₂ y H₂S, las concentraciones presentes son variables, pero el aire no contaminado contiene desde menos de 1 ng de azufre/ L de aire, hasta 5 ng de azufre/ L de aire de cada una de las tres formas principales, aunque puede aumentar hasta 20 ng de azufre/ L de aire en aire moderadamente contaminado. En los centros de algunas ciudades se han registrado valores hasta de 200 ng de SO₂ / L de aire, e incluso concentraciones mayores cerca de plantas industriales. El agua de lluvia, al pasar por aire relativamente limpio puede recoger 2 mg de azufre l⁻¹ de lluvia, pero nuevamente las cantidades totales varían; en una región no contaminada con pocas lluvias puede haber únicamente 1 kg/ ha año pero en las regiones industriales puede haber hasta 100 kg/ ha año (Campoblanco y col. 2000).

El azufre puede asumir nueve diferentes estados de oxidación. El equilibrio entre estas diferentes formas depende del potencial redox, el valor del pH, la temperatura y la

concentración, siendo los compuestos mas estables el sulfuro de hidrógeno (HS^-), el azufre elemental (S^0) y sulfato (SO_4) (Steudel, 2000).

El ciclo biogeoquímico del azufre (Figura I.1) se impulsa por la energía solar y/o por los compuestos inorgánicos reducidos del azufre, describe las oxidaciones y reducciones que suceden química y bioquímicamente (biosíntesis y biodegradación), de los compuestos azufrados, que se llevan a cabo en la atmósfera, la hidrósfera y la litósfera, donde el azufre experimenta cambios en su estado de oxidación de -2 (HS^-) a $+6$ (SO_4^{2-})

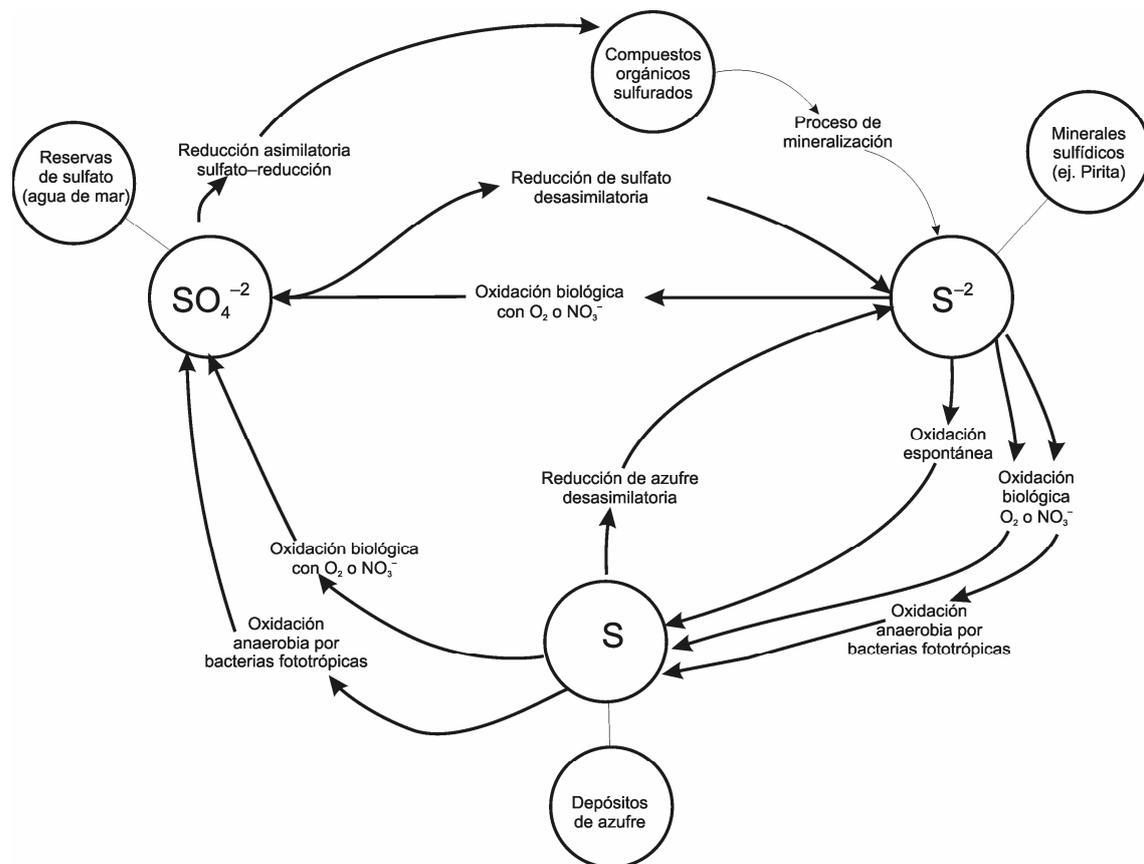


Figura I.1. Ciclo biogeoquímico del azufre (Lens y Kuenen, 2001).

El ciclo se puede resumir en dos etapas de acuerdo al tipo de reacciones de oxidorreducción que intervienen:

Etapa reductiva.- En los procesos biológicos se encuentran dos formas bioquímicas de reducción de los compuestos de azufre inorgánicos: la reducción asimilativa y la reducción

desasimilativa. La primera la presentan los eucariontes y procariontes y en ésta, el SO_4^{2-} es reducido a HS^- para la biosíntesis de compuestos que contienen azufre necesario para el crecimiento celular tales como los aminoácidos. La reducción desasimilativa la presentan los procariontes y en ella el SO_4^{2-} es reducido a HS^- por microorganismos sulfatoreductores en condiciones anóxicas, donde el SO_4^{2-} es utilizado como último aceptor de electrones. Esta reducción está acoplada con la oxidación de varios ácidos grasos volátiles, lactato y piruvato que generan ATP y poder reductor necesarios para el crecimiento celular.

Etapa oxidativa.-La segunda etapa del ciclo la constituyen las reacciones de oxidación de los compuestos reducidos de azufre, como el H_2S , el S^0 , y el $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$. Donde el producto final de la oxidación es el sulfato (SO_4^{2-}), y el número de electrones implicados desde el H_2S hasta el sulfato es de ocho. Cuando se utiliza uno de los estados intermediarios de oxidación, se dispone de menos energía. Las reacciones involucradas en este proceso son:

Reacción	Entalpía (KJ)
$\text{H}_2\text{S} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$	-798,2
$\text{HS}^- + \frac{1}{2}\text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{S}^0 + \text{H}_2\text{S}$	-204,4
$\text{S}^0 + \text{H}_2\text{O} + 1\frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$	-587,1
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$	-822,6

La oxidación del compuesto más reducido (H_2S), ocurre en fases, y el primer paso de la oxidación origina azufre elemental. Algunas bacterias oxidantes del H_2S depositan dentro de la célula el azufre elemental que se forma, el cual se convierte en una reserva de energía, que es utilizada cuando se agota el H_2S (Madigan y col. 2001).

De igual manera, esta etapa puede dividirse en reacciones de oxidación en condiciones anaerobias efectuados por microorganismos fotótrofos; y la oxidación aerobia por microorganismos litoautótrofos (Alcántara, 2000).

La importancia del ciclo del azufre se debe a tres aspectos: 1) Que los seres vivos necesitan azufre para su metabolismo celular, se ha encontrado que el 1% del peso de las bacterias es

azufre; 2) Que en la industria química existe demanda de azufre elemental para producir ácido sulfúrico el cual es un producto de interés para la síntesis de muchos compuestos orgánicos e inorgánicos; 3) Que debido a las emisiones antropogénicas de compuestos que contienen azufre orgánico e inorgánico, provoca lluvia ácida, toxicidad, corrosión y mal olor. Por ello el tratamiento de los compuestos azufrados, basado en procesos biológicos, es de interés para algunas industrias (entre otras, la petrolera) pues es un proceso alternativo a los procesos de tipo físico o químico.

1.2.1. Azufre elemental.

El azufre es un elemento químico de número atómico 16. Es el segundo elemento del grupo VI de la tabla periódica. En la naturaleza se encuentra como una mezcla de cuatro isótopos ^{32}S , ^{33}S , ^{34}S y ^{36}S . Con frecuencia se halla como elemento libre cerca de las regiones volcánicas.

Existen diferentes formas de cristalización del azufre, aunque las modificaciones que tienen en cada caso no han sido estudiadas por completo. Dentro de estas diferentes formas está el azufre alfa, también llamado azufre rómbico, el cual es un sólido amarillo, que forma cristales. Es muy poco soluble en agua ($5\mu\text{g/l}$ de S_8 a 25°C) pero es muy soluble en bisulfuro de carbono, tetracloruro de carbono y disolventes no polares análogos. Su densidad es de 2.07 g/cm^3 . También existe el azufre monocíclico, llamado también azufre prismático y azufre beta; así como el azufre fundido, el plástico o gamma y el líquido.

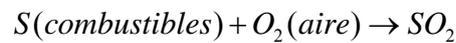
El azufre es un elemento activo que se combina con la mayor parte de los elementos conocidos. De esta manera, puede existir en estados de oxidación positivos y negativos, y puede formar compuestos iónicos así como covalentes.

Sus empleos se hallan en la vulcanización del caucho, en atomizadores para combatir parásitos en las plantas, en la manufactura de pólvora, fósforos, textiles, jabones, fertilizantes, pieles, plásticos, ciertos tipos de cemento, aislantes eléctricos, refrigerante, agentes blanqueadores, ungüentos, medicinas y tintes.

1.2.2. Dióxido de azufre

Un caso representativo de los compuestos azufrados es el SO_2 , el cual es un contaminante atmosférico primario, gaseoso, no flamable, altamente soluble en agua y tóxico, originado

durante los procesos industriales como: la calcinación de los minerales que contienen sulfuro, la refinación del petróleo, la producción de ácido sulfúrico y la de coque a partir del carbón, la quema de combustibles fósiles para la generación de electricidad y las plantas industriales. La reacción química por la cual se forma este gas es:



Por sus características fisicoquímicas, todo el dióxido de azufre que se encuentra como contaminante en el ambiente, es potencialmente aspirable y su velocidad de absorción a través de la mucosa respiratoria hacia el torrente sanguíneo, es proporcional a su concentración en la atmósfera. Cuando se deposita en los tejidos junto con partículas higroscópicas, se transforma en ácido sulfúrico y sulfatos. El sulfuro es tóxico porque se combina con el hierro en los citocromos y con otros compuestos celulares esenciales que lo contienen (Madigan y col. 2001). Las concentraciones de SO_2 en el aire, a partir de las cuales puede observarse daño en los seres humanos, oscilan de 3 a 5 ppm. El daño también depende de la actividad física que se realice, de la temperatura del aire y de la integridad del aparato respiratorio. En todos los casos, el resultado es una disminución de la capacidad respiratoria, con hipoxia (baja oxigenación) secundaria (Albert 1997).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el dióxido de azufre y la materia derivada de la combustión de fósiles son los principales componentes de la contaminación del aire en las grandes áreas urbanas.

Los sumideros descritos para el dióxido de azufre pasan por la deposición seca y húmeda, previa oxidación a sulfato. Su eliminación del aire es por conversión en ácido sulfúrico y sulfatos, y son éstos en forma de partículas los que se depositan sobre la tierra o el mar, bien junto con la precipitación del agua atmosférica o mediante sedimentación, ocasionando la contaminación de agua y suelo.

El efecto nocivo del dióxido de azufre se manifiesta a través de la lluvia ácida (se considera lluvia ácida a cualquier precipitación que posea un pH inferior a 5.6). Los óxidos de azufre son capaces de inhibir el crecimiento de algunas plantas y ser letales para otras, cuando se encuentran expuestas a concentraciones moderadas durante largos periodos, ya que penetra en forma gaseosa a través de los estomas a los espacios aéreos internos y lesiona las células epidérmicas. Los bosques de coníferas, contaminados con SO_2 ,

presentan dificultades para absorber agua y nutrientes del suelo. Si se presenta una niebla con pH ácido, ésta penetra a través de los estomas y seca el follaje, haciendo al árbol más vulnerable al ataque de plagas y enfermedades.

La única vía de exposición al SO₂ que repercute sobre la salud humana es la aérea por inhalación. En condiciones normales, el proceso de absorción se lleva a cabo en el tracto respiratorio superior y a nivel de la mucosa nasal siendo directamente proporcional a la concentración existente en el aire inspirado. Una respuesta fisiológica básica a la inhalación de dióxido de azufre es un grado leve de constricción bronquial con resistencia al flujo de aire, absorbiéndose el gas en el sistema respiratorio y pasando al torrente sanguíneo, metabolizándose y eliminándose por vía urinaria. (Arrebola y col., 2004)

1.2.3. Acido sulfhídrico (H₂S)

El H₂S es la forma mas reducida del azufre, es un gas altamente reactivo, corrosivo, tóxico, inflamable, mal oliente, y soluble en agua (aproximadamente 0.1M a 25°C, con un pK₁ 7 y un pK₂ 13), alcohol y bisulfuro de carbono. Es análogo al agua, pero es mas volátil ya que tiene una menor tendencia a formar puentes de hidrógeno. Es un compuesto generado naturalmente debido a la putrefacción de la materia orgánica, es un constituyente de cierto tipo de gas natural (“gas amargo”), se genera en las exhalaciones volcánicas, fuentes hidrotermales submarinas y se forma por bacterias sulfato reductoras (Steudel, 2000). También es emitido por un gran número de industrias como la petroquímica, producción de celofán, como resultado del tratamiento anaerobio de aguas residuales que contienen sulfato, de la extracción del gas natural y es un intermediario de la oxidación biológica de CS₂.

El mecanismo exacto de la toxicidad del H₂S, no está esclarecido aún, pero se han propuesto los siguientes (Madigan y col 1999):

- Desnaturalización de proteínas por medio de la formación de enlaces sulfuro y bisulfuro entre las cadenas polipeptídicas.
- Interferencia del H₂S con las coenzimas A y M a través de la formación de enlaces con el sulfuro, obstaculizando la vía de la acetil coenzima A para la fijación de CO₂.

- Afectación del pH intracelular.
- Combinación con el hierro de los citocromos.

El H₂S posee un característico olor a huevo podrido perceptible en el aire en concentraciones aproximadas a 0.02 hasta 100 ppm. Una exposición de 15 minutos a 100 ppm puede causar dolores de cabeza, mala memoria, náuseas, pérdida del sentido del olfato, irritación de ojos y garganta y mala función motora. La exposición a concentraciones superiores de 700 ppm puede causar parálisis del sistema respiratorio que resulta en la pérdida inmediata del conocimiento y sin un tratamiento adecuado la muerte en pocos minutos (Morgan y col., 2001). Ya que actúa en los centros metálicos de las enzimas bloqueando su funcionamiento.

Entre sus efectos ambientales, el H₂S provoca lluvia ácida; mal olor y corrosión. Sus propiedades corrosivas están relacionadas con el daño a paredes de concreto de los reactores, sistemas de drenaje, y tuberías de acero.

1.2.3.1 Influencia de la temperatura y el pH en la disociación del H₂S

La formación de complejos azufrados y la hidrólisis de iones metálicos pueden ocurrir con frecuencia, especialmente en soluciones alcalinas. Estos factores tienden a incrementar la solubilidad del HS⁻, a veces por un factor de 10⁵ o más (Butler 1964).

La solubilidad del ácido sulfhídrico (H₂S) en el agua a 20 °C y a 1 atmósfera de presión es $4.83 \times 10^{-5} \frac{C_g}{C_l}$ (Donde C_g es la concentración en fase gas y C_l es la concentración en fase líquida). Sin embargo, de acuerdo con lo reportado por Perry 1997, ésta aumenta conforme aumenta la temperatura.

En la Figura I.2, se presenta un diagrama de distribución de H₂S, donde se nota que las concentraciones de HS⁻ son apreciables sólo en soluciones muy alcalinas

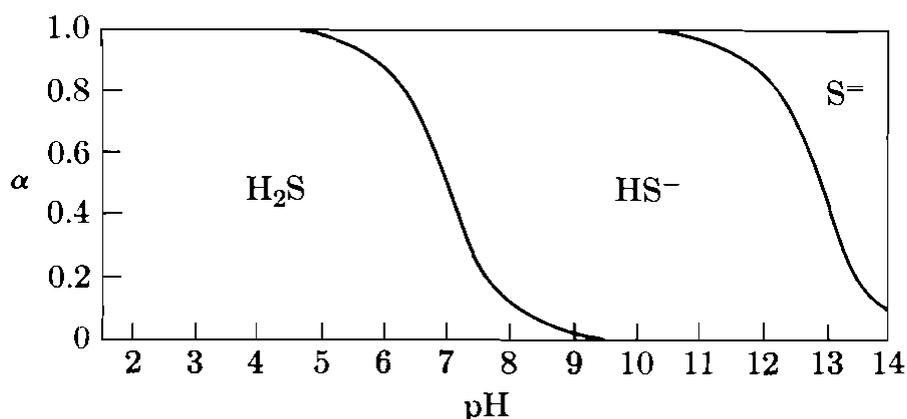


Figura I.2. Diagrama de distribución de H₂S (Tomado de Butler 1964).

α=medida de actividad

A medida que el pH se va incrementando, el H₂S se disocia con mayor facilidad en HS⁻ y S²⁻. Es por ello que se han llevado a cabo procesos de remoción de azufre en condiciones alcalinas (Janssen y col., 1995; Lens y Kuenen, 2001).

1.2.4. Tiosulfato

El tiosulfato (S₂O₃) es un anión metaestable formado por dos átomos de azufre no equivalentes que tiende a su descomposición química en soluciones acuosas. Al igual que otros compuestos del azufre, el tiosulfato es muy corrosivo. Se encuentra como contaminante en algunas aguas de desecho industriales.

El tiosulfato se ha usado como fuente de energía en estudios sobre bacterias que consumen H₂S (Alcántara, 2000), ya que el azufre en el S₂O₃ tiene el mismo estado de oxidación que en el H₂S, y es un compuesto más fácilmente manejable puede reemplazar al H₂S como fuente de energía para el crecimiento de microorganismos sulfooxidantes.

1.3 MICROORGANISMOS PARA LA ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES AZUFRADOS

Los microorganismos son utilizados, dentro de la biotecnología, en diversos campos como: la química, los alimentos, el farmacéutico y el ambiental. En este texto se reporta el uso de los microorganismos dentro del campo ambiental, para prevenir, minimizar o remediar los efectos de la contaminación. Sin embargo, la importancia de estos microorganismos no solo radica en eliminar la contaminación por medio de sus funciones vitales, sino que también pueden generar, a la par, compuestos con alto valor comercial.

La transformación de los contaminantes en productos de valor comercial, depende de las condiciones a las que se mantienen los microorganismos, ya que éstas afectan su velocidad de crecimiento y sus propiedades cinéticas. El tipo de microorganismo usado en un proceso, depende de las características de la corriente a tratar. Sin embargo, son las necesidades de los microorganismos las que determinan el diseño y tipo de procesos a utilizar (Janssen y col.1995; Morgan y col. 2001) pues es un proceso aerobio.

Las bacterias oxidadoras de H_2S pueden catalizar la oxidación de los compuestos azufrados. Sin embargo, cuando se encuentran dentro de los océanos, la oxidación ocurre solo donde el H_2S procedente de las zonas anóxicas más profundas se encuentra con el O_2 que desciende de las zonas óxicas (Madigan y col. 2001).

Uno de los factores más importantes a controlar en el cultivo de las bacterias oxidadoras de H_2S es el pH. Sin embargo, también son importantes otros factores ambientales tales como la temperatura y la concentración salina.

1.3.1 Microorganismos extremófilos

Los organismos extremófilos son los organismos capaces de vivir y crecer en condiciones extremas (Tabla 1).

Tabla I.1. Condiciones extremas de crecimiento.

Parámetro	Tipo	Condiciones de crecimiento
Temperatura	Psicrófilos	<15°C
	Termófilos	>45°C
	Hipertermófilos	>80°C
pH	Acidófilos	pH <5
	Alcalófilos	pH >9
Salinidad	Ligeramente halófilos	1 a 5% NaCl
	Moderadamente halófilos	5 a 15% NaCl
	Halófilos extremos	15 a 30% NaCl
Presión	Barófilos	1 a 400 atm
	Barófilos extremos	700 a 800 atm
Desecación	Xerófilos	Aw entre 0.750 y 0.700

(Madigan y Col, 1999)

Muchas regiones en el mundo son consideradas extremas e incluyen ambientes como geotermas, regiones polares, pozos petroleros, fuentes ácidas y alcalinas.

Los microorganismos extremófilos son de gran interés debido a que en ocasiones son taxones filogenéticamente nuevos que podrían tener aplicaciones industriales, ya que sus moléculas resisten a condiciones extremas comúnmente utilizadas en los procesos industriales, pero por lo general, no se comprenden sus mecanismos de resistencia.

Algunas bacterias, capaces de crecer a intervalos de pH extremos, son sulfooxidantes, crecen a pH de 10-11 y se conocen como bacterias sulfooxidantes alcalófilas. Tales microorganismos se encuentran en suelos y lagos altamente carbonatados. Algunas características de los lagos carbonatados son pH 9.5-10.5 y salinidad de 15 a 30% de NaCl. Por lo que, dentro de estos lagos, existen bacterias alcalófilas sulfooxidantes que también son halófilas. Las bacterias alcalófilas poseen proteasas alcalinas, útiles en la industria de los detergentes (Madigan 2001). Sin embargo, los más estudiados son hasta ahora los sulfooxidantes neutrófilos y acidófilos

I.4 BACTERIAS SULFOXIDANTES ALCALOFILAS

Existe una gran variedad de bacterias sulfooxidantes, las cuales se enlistan en la Tabla I.2.

Tabla I.2. Variedad de bacterias sulfooxidantes agrupadas de acuerdo al nivel de pH en las cuales han sido estudiadas.

Genero y especie	pH de crecimiento
<u>Bacterias Neutrófilas</u>	
<i>Thiobacillus thioparus</i>	6 a 8
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	6 a 8
<i>Thiobacillus neapolitanous</i>	6 a 8
<u>Bacterias Acidófilas</u>	
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	2 a 5
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	1.5 a 4
<i>Thiobacillus novellus</i>	6 a 8
<i>Thiobacillus intermedius</i>	3 a 7
<i>Thiobacillus concretivorus</i>	ND
<i>Beggiatoa</i>	6 a 8
<i>Thiothrix</i>	6 a 8
<i>Thermothix</i>	6.5 a 7.5
<i>Thiovolum</i>	6 a 8
<i>Acidianus</i>	1 a 5
<i>Sulfolobus</i>	1 a 4
<u>Bacterias Alcalófilas</u>	
<i>Bacillus alcalóphilus</i>	8 a 11
<i>Bacillus firmus</i>	7 a 11.4
<i>Bacillus strain YN-2000</i>	7.5 a 10.2
<i>Bacillus. halodurans C-125</i>	7 a 10.5
<i>Thioalcalimicrobium aerophilum</i> gen nov., sp	7.5 a 10.6
<i>Thioalcalimicrobium sibericum</i> sp, nov	7.5 a 10.6
<i>Thioalcalovibrio nitratis</i> sp, nov.	9 a 11
<i>Thioalcalivibrio denitrificans</i> sp. nov	9 a 11
<i>Thioalkalivibrio versutus</i> s.p. gen. nov.	9 a 11
<i>Thioalkalivibrio nitratos</i> s.p. nov	9 a 11
<i>Thioalkalivibrio thiocyanoxidans</i> sp. nov	9 a 11
<i>Thioalkalivibrio paradoxus</i> sp. nov.	9 a 11
<i>Thiialkalivibrio nitratreducens</i> sp. nov	9 a 11
<i>Thioalkalicoccus limnaeus</i> sp.gen, nov	9 a 11
<i>Thioalkalispira microaerophila</i> gen.nov. sp.	9 a 11
<i>Thioalkalimicrobium cyclicum</i> sp.nov	9 a 11
<i>Thioalkalivibrio jannaschii</i> sp.nov.	9 a 11

Madigan y col. (2001), Banciu y col. (2004), Sorokin y col. (2001, 2004).

Algunas de las bacterias sulfooxidantes encontradas en la literatura, como las estudiadas en este trabajo, son alcalófilas y halófilas.

Los halófilos son organismos que habitan en ambientes salinos e hipersalinos (Das Sarma y Arora 2001). Se pueden clasificar como halófilos extremos, moderados y ligeros de acuerdo a su necesidad de NaCl. Los halófilos ligeros crecen bien entre 0.2-0.85 mol/L (2-5%) NaCl, los moderados crecen en concentraciones entre 0.85-3.4 mol/L (5-20%) NaCl y los halófilos extremos crecen alrededor de 3.4-5.1 mol/L (20-30%) NaCl. Esta condición de alta salinidad ayuda a mantener el equilibrio osmótico entre la bacteria y el medio. Se ha encontrado que la concentración de sal intracelular es alta. Los iones de potasio se acumulan internamente a concentraciones mayores a 5mol/L y la relación sodio/potasio es alta.

Kamekura y col (1997) y Xu y col. (1999), aislaron bacterias halófilas del Tibet y las describieron como cepas Gram negativas, pleomórficas, anchas, inmóviles y aerobias estrictas. DasSarma y Arora (2001) encontraron que varias de las bacterias Gram negativas se encuentran en salmueras subterráneas asociadas con los campos petroleros.

Al mismo tiempo, Sorokin y col. (2001) afirmaron que la velocidad de crecimiento de algunas de las bacterias que ellos estudiaron es baja.

La mayoría de los alcalófilos tienen un crecimiento con un pH óptimo alrededor de 10, que es la diferencia más significativa entre éstos organismos y los neutrófilos. Sin embargo, los alcalófilos trabajan con niveles de pH internos neutros, de esta manera pueden sobrevivir en ambientes extremos (Horikoshi 1999).

Debido a la diferencia de niveles de pH interno y externo que existe en estos organismos, se sugiere que la pared celular es la clave para el mantenimiento de la célula. A diferencia de los neutrófilos, los alcalófilos contienen, en su pared, polímeros ácidos como son: el galacturónico, el glucónico, el glutámico, el aspártico y el fosfórico entre otros. Las cargas negativas en los componentes no peptidoglicánicos es lo que le da la habilidad a la superficie celular para absorber los iones de sodio e hidronio y repeler los iones de hidróxido. Como consecuencia, las células pueden crecer en medios alcalinos. (Horikoshi 1999). Pueden crecer en ausencia de oxígeno y realizar sus funciones vía reducción-desnitrificación. Entre los componentes de los alcalófilos se encuentran las vesículas gaseosas, la membrana púrpura y los carotenoides naranja-rojizo. La glucosa es oxidada

vía Entner–Doudoroff modificada y el piruvato resultante es oxidado por la piruvato oxidorreductasa y el ciclo del ácido tricarbóxico.

Recientemente se han descubierto bacterias quimiolitóautótrofas sulfooxidantes, capaces de crecer y mantenerse en ambientes extremos de alcalinidad y salinidad. Estudios realizados en Asia Central, África y Norte América han revelado la existencia de más de 100 especies de éstas bacterias (Sorokin y col. 2001, 2004) las cuales crecen a pH 10 y concentraciones salinas mayores a 0.2M.

Las fuentes de carbono utilizadas por estos microorganismos se han estudiado mediante su crecimiento en medios sintéticos. Así, se han establecido dos clases de microorganismos de acuerdo con su capacidad de crecimiento en fuentes orgánicas de carbono:

1.-Quimiolitótrofos obligados

Son bacterias altamente especializadas que requieren una fuente inorgánica como fuente de energía (H_2S y S_2O_3) y obtienen el carbono a partir de fijar CO_2 por el ciclo de Calvin. Utilizan el flujo inverso de electrones para la generación del poder reductor (NADPH) que participará dentro del ciclo de Calvin.

2.- Quimiolitótrofos facultativos

Crecen adecuadamente con una fuente inorgánica de energía y CO_2 , o bien, heterotróficamente con compuestos orgánicos que proveen de carbono mientras los compuestos inorgánicos proveen de electrones para la generación de energía. Aunque también se ha observado que pueden ocupar simultáneamente dos o más rutas metabólicas (Prosser, 1998).

Los alcalófilos constan de dos tipos fisiológicos de microorganismos; los alcalófilos y los haloalcalófilos. La diferencia entre ambos grupos es que los haloalcalófilos, además de crecer a un nivel óptimo de pH 10, necesita un elevado porcentaje de salinidad. Las bacterias alcalófilas sulfooxidantes se han encontrado en manantiales y lagos de África, Nigeria, Siberia y Estados Unidos (Horikoshi, 1999; Sorokin, 2001).

Las bacterias alcalófilas se dividen en dos grupos; aerobias y anaerobias. De éstas, se tiene especial interés en las aerobias ya que pueden coexistir con los microorganismos neutrófilos, pero también se pueden encontrar en ambientes extremos como los organismos alcalo-tolerantes. Este tipo de bacterias se pueden encontrar en mar abierto a profundidades

aproximadas a 11,000 m. Los primeros trabajos sobre las bacterias alcalófilas anaerobias fueron hechos por Nimura y colaboradores (1987), aunque no se reportaron los detalles taxonómicos. Posteriormente se separaron muchos alcalófilos formadores de esporas mediante procedimientos convencionales. La investigación de estos microorganismos ha continuado hasta la fecha.

Es conveniente conocer la forma microcelular de las bacterias alcalófilas, porque así se entenderá como son capaces de transformar a los compuestos azufrados en compuestos mas oxidados. Por ello, es que antes de describir su estructura general, se describirá el sitio clave de las oxidaciones quimiolitotróficas, es decir el periplasma.

1.5. EL PERIPLASMA: SITIO DE OXIDACIONES QUIMIOLITOTROFICAS

El periplasma (solo en bacterias Gram negativas) se encuentra situado entre la membrana citoplásmica y la membrana externa de la célula, mide aproximadamente 65 Angstroms, y puede representar 20% del volumen celular. Es una fase gel que contiene peptidoglicanos donde se localizan numerosas proteínas del transporte de electrones. La mayoría de los citocromos c se encuentran en el periplasma. El resto de los citocromos así como los acarreadores, están en la membrana citoplásmica. La reducción de oxígeno y la síntesis del ATP tienen lugar sobre la superficie interna de la membrana citoplásmica en función del movimiento de electrones y protones a través de la membrana (Braun, 1978; Hooper y DiSpirito, 1985).

Muchos de los sistemas enzimáticos para la oxidación de sustratos inorgánicos por quimiolitótrofos están localizados en el lado periplásmico de la membrana citoplásmica. Esto se ha propuesto como un principio general en bacterias que generan gradientes de protones de la oxidación de sustratos simples, incluyendo compuestos de un átomo de carbono. El sistema multienzimático de la oxidación del tiosulfato de *Thiobacillus versutus* (ahora *Paracoccus versutus*) se ha localizado completamente en el periplasma (Kelly, 1997).

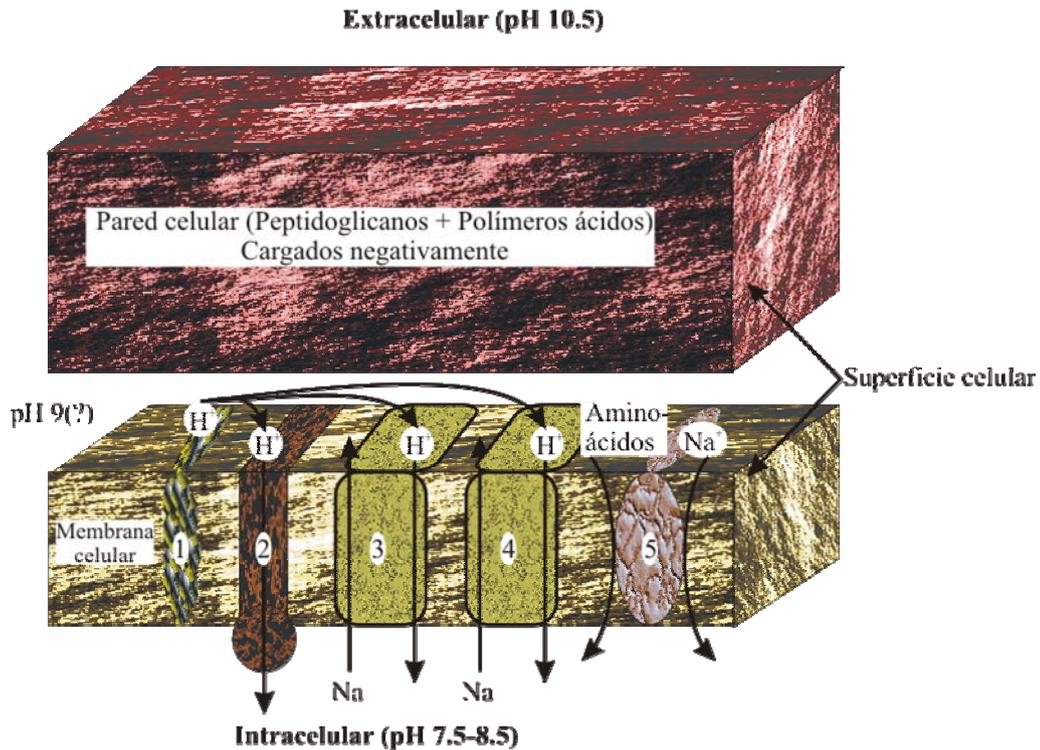
1.6 MECANISMOS QUE SE REALIZAN EN EL INTERIOR DE LAS BACTERIAS ALCALÓFILAS SULFOOXIDANTES.

Las bacterias alcalófilas sulfooxidantes tienen los siguientes mecanismos para regular sus funciones vitales y los componentes derivados del medio que podrían dañar a la célula:

- Mecanismo de regulación del pH
- Mecanismo de regulación del NaCl
- Mecanismo de sulfooxidación

1.6.1 Mecanismos para la regulación del pH

Las bacterias Gram negativas, tienen dos barreras para reducir los niveles de pH de 10.5 a 8. Estas barreras son la pared y la membrana celular. Juntas ayudan a establecer un pH cercano a la neutralidad en el interior de la célula. De una manera sencilla, este proceso se puede esquematizar en la Figura I.3. Se observa que los iones positivos, que fueron transportados por las cargas negativas de la pared celular hacia el periplasma, pasan a través de la membrana celular por medio del intercambio con los iones de sodio que ya se encontraban en el interior de la célula, usando el sistema antiportador de Na^+ / H^+ (Horikoshi, 1999).



1: Cadena respiratoria; 2:FoF1-ATPasa

3: Antiportador Na⁺/H⁺

4: Antiportador Na⁺/H⁺

5:Simportador Aminoácidos/ Na⁺

Figura I.3. Mecanismo de regulación de pH

Horikoshi (1999)

1.6.2 Iones de sodio y el transporte en membrana

Los alcalófilos crecen a pH entre 9 y 11, requieren Na⁺ en el medio para su crecimiento. De acuerdo a la teoría quimiosmótica, el protón que produce la fuerza para el desplazamiento en la célula es generado por un exceso de iones H⁺ derivados del metabolismo por la ATPasa. El ion H⁺ es intercambiado por iones de sodio mediante el sistema antiportador Na⁺/H⁺ generando una fuerza de movimiento de sodio, y regulando el pH interno (Horikoshi, 1999). Además, existen otros canales como Mrp (Sha) y NhaC

que ayudan a liberar el Na⁺ acumulado en el periplasma al exterior de la célula y promover el movimiento flagelar.

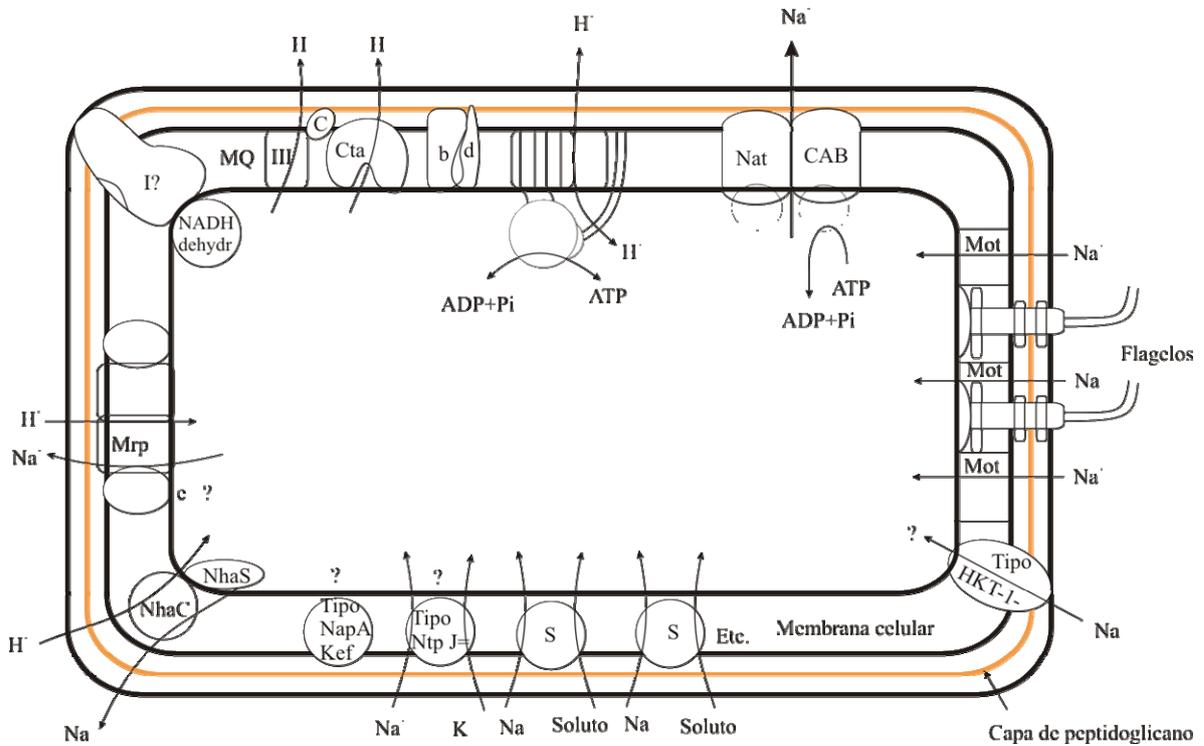


Figura I. 4. Mecanismo de regulación de Na⁺
(Krulwich y col. 2001)

Otra de las funciones importantes a las que ayuda la concentración de iones de sodio, es en la respiración, ya que puede ayudar en la reducción del NADH (Krulwich y col. 2001).

1.6.3 Mecanismo de sulfooxidación

La sulfooxidación de tiosulfato, sulfito, azufre y sulfuro de hidrógeno se realiza en el periplasma y es dependiente de la reducción de los citocromos (representados por las letras XA, B, YZ y CD en la figura I.5). Este mecanismo se encuentra altamente ligado con el proceso de respiración celular. En la Figura I.5, se observa la entrada de S-SO₃ al mecanismo de sulfooxidación, posteriormente, los citocromos XA, oxidan dicho componente convirtiéndolo en S-S-SO₃ (y liberando 2 electrones que servirán en la cadena respiratoria de la célula) el cual es convertido más tarde a SO₄ y S₃, con ayuda de los

citocromos ZY, B y H₂O del periplasma. El SO₄ es liberado al medio, mientras que el S₃ permanece dentro del mecanismo de sulfooxidación, para ser transformado en S-SO₃ con ayuda de los citocromos DC y 3H₂O (liberando 6 electrones que irán a la cadena respiratoria) y finalmente volverse a combinar con el citocromo B y H₂O, para liberar nuevamente SO₄ y generar HS⁻, que en conjunto con los citocromos XA, ayudarán al S-SO₃ entrante, a convertirse en S-S-SO₃.

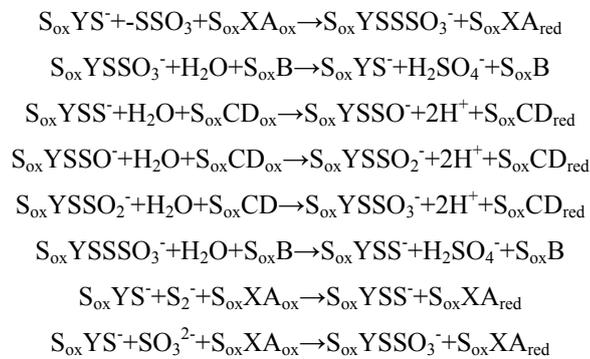
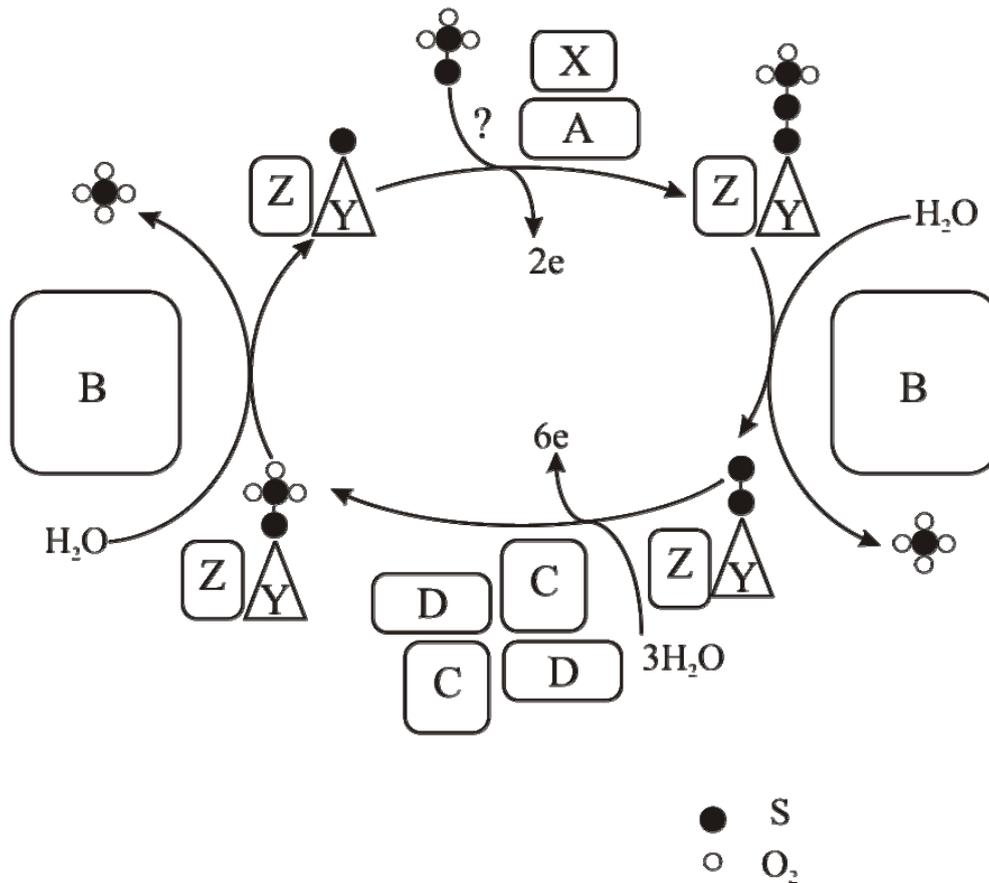


Figura I.5. Mecanismo de sulfooxidación (Cornelius y col, 2000).

El proceso completo genera una fuerza motriz de protones que origina la síntesis del ATP por ATPasas de la membrana. Los electrones para la reducción del CO₂ se obtienen por transporte inverso de electrones que suministra NADPH.

Las bacterias del azufre, cuando crecen autotróficamente, usan el ciclo de Calvin para fijar el CO₂ (Madigan y col. 2001).

I.6.4 Ciclo de Calvin

Los electrones para la reducción del CO₂ se obtienen por el transporte inverso de electrones que suministra NADPH.

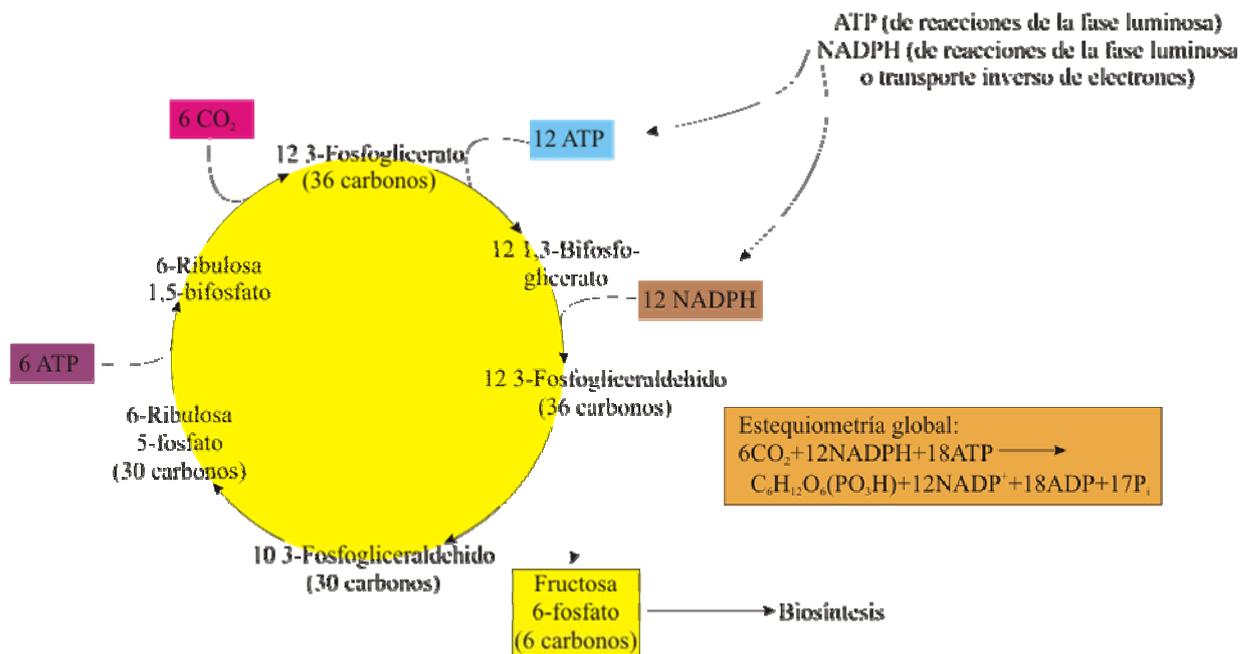


Figura I.6. Ciclo de Calvin

El primer paso en la reducción del CO₂ por el ciclo de Calvin es la reacción catalizada por la enzima Ribulosa Bifosfato Carboxilasa (RuBisCo) que supone una reacción entre el CO₂ y la ribulosa bifosfato para formar 2 moléculas de ácido 3 fosfoglicérico (PGA), uno de los cuales contiene el átomo de CO₂. Los dos pasos siguientes consisten en la reducción del PGA a nivel de oxidación del carbohidrato. En estos pasos se requiere ATP, que actúa en la reacción de la fosforilación que activa el grupo carboxilo, y NADP, que actúa en la reducción. El 3 fosfogliceraldehido se convierte en ribulosa 5 fosfato y posteriormente en

ribulosa bifosfato mediante la acción de las enzimas que reordenan pentosas-fosfato y enzimas en la ruta glicolítica (Madigan y col. 2001).

I.7 Estudios realizados con organismos sulfooxidantes

I.7.1 Microorganismos neutrófilos y acidófilos

Revah y col (1995) desarrollaron un proceso biotecnológico para la eliminación de CS_2 y H_2S con la conversión de azufre a sulfato. Utilizaron un biolavador de lecho escurrido, el cual, contenía una población mixta de microorganismos aislados de fuentes azufradas y plantas de tratamiento de aguas residuales, enriquecida por inoculaciones sucesivas. La población de bacterias mixta de organismos contenía bacterias del género *Thiobacillus*.

En ese mismo año, Janssen y col (1995) encontraron que bajo condiciones de limitación por O_2 , debajo de 0.1 mg/L, el azufre es el producto final de la oxidación del H_2S , mientras que la formación de sulfato se favoreció por concentraciones limitadas de H_2S .

Mientras tanto, Buisman y su equipo de trabajo, entre ellos Janssen (1997), siguieron trabajando y reportaron un sistema que favoreció la acumulación de S^0 de la oxidación de H_2S . Ese mismo año, Degorce-Dumas y col estudiaron la oxidación biológica del sulfuro de hidrógeno en un biofiltro empacado con sedimento de aguas residuales seco (BSE), caracterizaron la microbiología del biofiltro y estudiaron los efectos de algunos parámetros sobre la colonización y sobre la eficiencia del biofiltro. También estudiaron el efecto de la acidificación y observaron que la velocidad de la oxidación decrece cuando ocurre la acidificación del empaque seguido por la multiplicación de autótrofos acidófilos.

Mas tarde, Alcántara (2000), estudió las condiciones que favorecen la oxidación biológica del tiosulfato en azufre elemental y sulfato. Un año después, Velasco (2001), diseñó, caracterizó y evaluó el desempeño de un sistema experimental y sus condiciones de operación que permiten favorecer la oxidación parcial del tiosulfato en azufre elemental y sulfato mediante un consorcio de microorganismos sulfooxidantes. Posteriormente, Gonzáles (2002) hizo un estudio sobre bacterias acidófilas en tanques agitados. El objetivo general de ese trabajo es contribuir al desarrollo de la sulfoxidación de tiosulfato por medio del estudio de variables de control relevantes y su descripción matemática. Mantuvieron un

consorcio estable de bacterias sulfooxidantes en condiciones continuas, caracterizaron el estado que guarda el reactor continuo de oxidación parcial de tiosulfato a azufre elemental mediante el monitoreo en línea del potencial redox y oxígeno disuelto, y determinaron la tasa de transferencia de oxígeno a la fase líquida.

Posteriormente, Alcántara y col. (2004) estudiaron un consorcio de *Thiobacillus* obtenido de un biofiltro diseñado para eliminación CS y H_2S , realizando un escalamiento de dicho sistema con recirculación para separar el azufre sedimentado. En la Figura I.7, se observa el reactor que se construyó con una sección cónica para separar el azufre elemental mediante sedimentación y removerlo de la fase líquida.

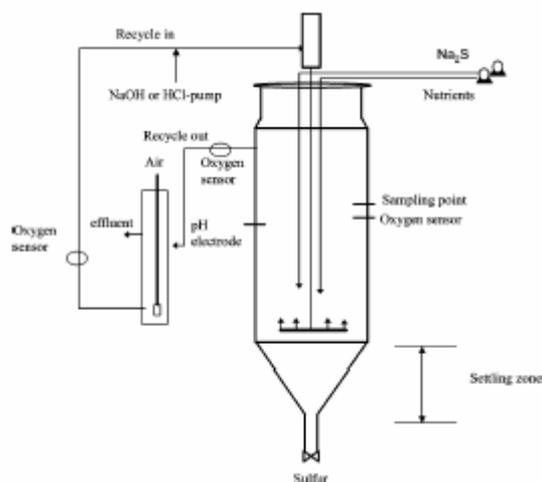


Figura I.7. Diagrama del sistema de recirculación
Alcantara y col. (2004)

I.7.2 Microorganismos alcalófilos

Sorokin y col, han trabajado con diferentes tipos de cepas, entre ellas *Thioalcalivibrio*, *Thioalcalimicrobium* y *Thioalkalispira*. Sin embargo, el interés de esta tesis es el estudio de *Thioalcalivibrio*, ya que éste genero tiene 97% de parecido con el aislado B encontrado por Espinosa (2004), el cual se estudiará en el presente trabajo. El género es representado típicamente por bacterias con un flagelo polar, resistentes al choque osmótico y pueden sobrevivir en cultivos a 40°C. *Thioalcalivibrio* forma colonias relativamente grandes (mayores a 5mm) en agar de tiosulfato. Las colonias jóvenes, usualmente son blancas y

llenas de azufre. Con el tiempo, el azufre desaparece gradualmente y las colonias cambian a amarillas y/o naranjas. El color de los *Thioalcalivibrios* se debe a que están compuestos de citocromos, principalmente citocromos b.

Los *Thioalcalivibrios* solo son capaces de crecer en medios inorgánicos, con compuestos reducidos de azufre, por lo tanto son organismos quimiolitotótrofos obligados. En el medio propuesto por Sorokin y col (2001), el mejor crecimiento de estas bacterias se dio a pH alrededor de 9-10 en cultivo por lote. Mientras que en cultivo continuo, el pH que favoreció el crecimiento fue de 10 a 10.2.

Muchas cepas *Thioalcalivibrio* son capaces de oxidar el azufre elemental en el mismo orden de actividad que el sulfuro y tiosulfato, lo hacen a través de la vía del polisulfuro. La actividad sobre el polisulfuro depende de la presencia de $NaHCO_3$ y es insensible a los inhibidores de sulfito deshidrogenasa.

Las cepas de *Thioalcalimicrobium* son Gram negativas, de forma vibroide y móvil por tres flagelos polares.

Las cepas de *Thioalcalimicrobium* son quimiolitotrofos obligados capaces de crecer en presencia de tiosulfato y sulfuro de hidrógeno. Su crecimiento es relativamente rápido en medio mineral con tiosulfato a pH 10. En cultivos batch, la bacteria crece en intervalos de 7.5 a 10.6 con un óptimo de 10. A valores de pH menores de 8 mostraron signos de autólisis. La tasa de crecimiento en cultivo batch con tiosulfato es relativamente bajo variando de 1.8 a 2.7 g proteína/ mol de tiosulfato, mientras que en el quimiostato alcanzó un valor de 3.5 g proteína/ mol de tiosulfato. Todas las cepas fueron dependientes de sodio con un requerimiento mínimo de 0.2-0.3 M de Na^+ y un máximo de 1.2-1.5 M de Na^+ . Sorokin y col. (2001) sugirieron que las cepas de *Thioalcalimicrobium* oxidaron los compuestos azufrados directamente a sulfato por un mecanismo similar al encontrado en muchas bacterias neutrófilas como *Thiobacillus versutus*.

Las cepas de *Thioalcalispira* son Gram negativas y quimiolitotótrofos sulfooxidantes. El intervalo de pH para su crecimiento está entre 8 y 10.4 con un óptimo alrededor de 10. Son moderadamente halófilas con un requerimiento total de Na^+ para el crecimiento entre 0.2 y 1.4 M (con un óptimo de 0.5 M).

Tabla I.3. Comparación entre los tres diferentes tipos de bacterias sulfooxidantes estudiadas por Sorokin y col.

GENERO	MORFOLOGIA COLONIAL	qO₂	PH	Na⁺
<i>Thioalcalivibrio</i>	Gram negativas, mayores a 5µm, amarillas y/o naranjas con 1 flagelo polar	0.2 a 5 mmol O ₂ /mg proteína min	10-10.2	1.2-1.5 M de Na ⁺
<i>Thioalcalimicrobium</i>	Gram negativas, vibroides y con flagelos polares	1.8 a 2.7 g proteína/ mol de tiosulfato,	7.5 a 10.6 óptimo 10	0.2- 1.5 M de Na ⁺
<i>Thioalkalispira</i>	Gram negativas, amarillas o naranjas y flagelo polar		8-10.4 (óptimo 10)	0.2 y 1.4 M Na ⁺ (óptimo 0.5 M)

I.8. MORFOLOGIA CELULAR DE THIOALCALIVIBRIO

El género se representa típicamente por un spirillo monoflagelar (Figura I.8). La organización estructural es similar a la del género *Alcalinimicrobium*. Sin embargo *Thioalcalivibrio* es más resistente al choque osmótico y sobrevive más tiempo en cultivos líquidos a 4 ° C.

Este género forma colonias en agar de tiosulfato alcalino. Su color es amarillento y algunas veces anaranjado. El color varía como resultado de la transformación del azufre elemental insoluble dentro de la célula.

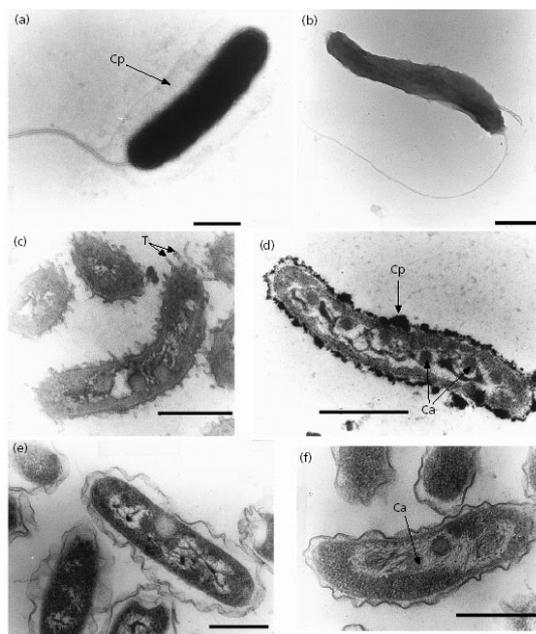


Figura I. 8. Morfología de una bacteria del grupo alcalovibrio creciendo en tiosulfato a pH 10. Sorokin y col. (2001)

Los alcalivibrios no son capaces de crecer en medios orgánicos puros sin compuestos reducidos de azufre.

Los *Thioalcalivibrio* crecen más lentamente que las *Thioalcalimicrobium*, el crecimiento máximo específico en cultivos de quimiostato es de $0.18 h^{-1}$ mientras que en cultivos por lote es de $0.1 h^{-1}$. Por otro lado, el rendimiento del crecimiento molar de tiosulfato fue alrededor de 2 veces mayor que en las cepas de *Thioalcalimicrobium*.

El género *Thioalcalivibrio*, en general, contienen mucha menor concentración de citocromos que el *Thioalcalimicrobium*. (Sorokin y col. 2001).

En el 2004, Espinosa estudió un consorcio alcalófilo sulfooxidante enriquecido de suelos alcalinos. El medio mineral usado fue el reportado por Sorokin D. y col. 2001 a pH 10 y tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$) como fuente de energía. Se cultivó en un reactor de tanque agitado de 2.5 L a 30 °C, 250 rpm y pH 10.0. Se aireó a 1 vvm para evitar la formación de S^0 . El consorcio alcalófilo sulfooxidante evaluado en cultivo continuo fue capaz de oxidar el 100% del $S_2O_3^{2-}$ alimentado. Finalmente, Espinosa (2004) aisló dos especies de bacterias alcalófilas.

Tabla I. 4. Rendimientos biomasa sustrato (tiosulfato) determinados con diferentes bacterias y condiciones de cultivo en estudios previos encontrados en la literatura
ND no determinadas

Microorganismo	μ (h ⁻¹)	Condiciones de cultivo	Y _{X/S} (gProt/mol S ₂ O ₃)	q _{O₂ max} μgO ₂ /mgProt*min	K _s mM H ₂ S	Fuente
Consorcio Sulfooxidante	----	ND	----	----	0.19	Alcántara (2000)
<i>Thioalcalimicrobium aerophilum</i>	0.33	pH: 7.5 a 10.6 sustrato: S ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ Tolerancia: Na ⁺ 0.2 a 1.5	3.5	3.0	----	Sorokin (2000)
<i>Thioalcalimicrobium sibericum</i>	0.22	pH: 7.5 a 10.6 sustrato: S ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ Tolerancia: Na ⁺ 0.2 a 1.5 M	2.7	----	----	Sorokin (2001)
<i>Thioalcalivibrio versutus</i>	0.17	pH 7.5 a 10.65 sustrato: S ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , SCN ⁻ y S ⁰ Tolerancia: Na ⁺ 0.3 a 4.3 M	5	0.7	----	Sorokin (2000)

Espinosa (2004)

La identificación de las bacterias aisladas se realizó mediante análisis del ADN ribosomal (16s) y se muestra su ubicación en el árbol filogenético (Figura I.9), donde el aislado “A” (Espinosa 2004), está representado por A815 y al aislado “B”, lo representa B815.

donde algunos autores, como Ito (2003) han encontrado microorganismos, parecidos a los reportados por Sorokin y col. (2001)

II. 1 JUSTIFICACION

En algunas industrias, refinerías y rellenos sanitarios, que trabajan en condiciones alcalinas, se desechan especies azufradas que provocan malos olores, problemas de salud, lluvia ácida y otros problemas de contaminación.

Existen bacterias capaces de disminuir los problemas causados por las mezclas azufradas. Las bacterias sulfooxidantes pueden transformar dichas especies, tales como el $S_2O_3^{-2}$, a sustancias menos peligrosas como el azufre elemental, el cual es un compuesto menos contaminante que se puede retirar más fácilmente del ambiente por ser insoluble en agua; o SO_4^{-2} , que es la forma mas oxidada de los compuestos azufrados.

En el laboratorio de Emisiones Gaseosas de la Universidad Autónoma Metropolitana-Izt, se han estudiado consorcios capaces de oxidar compuestos azufrados en condiciones neutras ó alcalófilas, desarrollando tanto investigación básica como aplicada que incluye un proceso biotecnológico para la eliminación de CS_2 y H_2S , con la obtención de S^0 , SO_4^{2-} y $S_2O_3^{-2}$. Sin embargo, es posible que algunos de los microorganismos presentes en los consorcios, tengan mayor eficacia estando aislados que dentro de un consorcio, y su estudio contribuya al mejoramiento de los tratamientos de los compuestos azufrados desechados por las actividades industriales.

La eficacia se medirá de acuerdo a la actividad sulfooxidante y respiratoria de las bacterias, la cual está determinada por las condiciones ambientales. Es por ello que en este trabajo se determinan los valores de la concentración de sustrato, pH, temperatura y salinidad que afectan la actividad sulfooxidante y respiratoria de las bacterias alcalófilas sulfooxidantes aisladas de un consorcio obtenido de la mezcla de suelos de diferentes sitios de agua carbonatada en México.

II.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones ambientales que favorezcan el crecimiento de alcalobacterias sulfooxidantes aisladas.

II.2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.-Determinar de la concentración de tiosulfato con la cual se produce mayor actividad celular (respiración).
- 2.- Estudiar del efecto del producto (sulfato) en la actividad de los aislados.
- 3.- Determinar el valor de pH en el cual se observa mayor actividad sulfooxidante y respiratoria celular.
- 4.- Evaluar el efecto de la temperatura en las tasas de consumo de oxígeno y la oxidación del medio en los cultivos de aislados y consorcio.
- 5.- Medir el efecto de la salinidad sobre la actividad de los cultivos.

HIPOTESIS

1. La actividad del consorcio y los aislados "A" y "B" dentro del medio de cultivo representa el comportamiento del medio alcalófilo de donde fue extraído el consorcio.
2. El consorcio contiene a los aislados "A" y "B".

METODOS

III.1 ORIGEN DE LAS MUESTRAS

Se utilizaron las bacterias “A” y “B” aisladas a partir de un consorcio de bacterias alcalófilas, que permanecieron congeladas en glicerol al 3%, aproximadamente 1 año y un consorcio de bacterias alcalófilas sulfooxidantes extraídas de lagos carbonatados de diferentes sitios de México, que permaneció en un reactor de tanque agitado a 30° C, pH 10 y 0.08 M de NaCl durante aproximadamente 2 años.

III.2 MEDIO DE CULTIVO

Se utilizó un medio mineral basado en el que reportaron Sorokin y colaboradores (2000). Es un medio específico para bacterias alcalófilas quimiolitotóxicas sulfooxidantes. El pH fue regulado mediante un amortiguador de carbonatos pH 10. También se utilizó NaS₂O₃ (80mM) como fuente de energía. El medio está compuesto como se describe en la Tabla I.1.

Tabla III.1. Medio Mineral para bacterias alcalófilas sulfooxidantes; utilizado por Sorokin y col. (2001).

BASE MINERAL	
Compuesto	g/L
Na ₂ CO ₃	20
NaHCO ₃	7
NaCl	5
K ₂ HPO ₄	1
Soluciones estériles	mL/L
KNO ₃	10
MgCl ₂ *6H ₂ O	1
Solución de elementos traza [♦]	2
Na ₂ S ₂ O ₃ *5H ₂ O	20

[♦] Composición (mg/L): EDTA, 5; FeSO₄ 7H₂O, 2; ZnSO₄ 7H₂O, 100; MnSO₄ 7H₂O, 30; CoCl₂ 6H₂O, 300; NiCl₂ 6H₂O, 20; NaMoO₄ 2H₂O, 30; CuCl₂ H₂O, 10; H₃BO₃, 300.

El pH final de la solución de elementos traza se ajustó a 3 con una solución diluida de HCl. El medio líquido se preparó mezclando la base mineral con las soluciones estériles, esterilizadas por separado (110°C, 20 min) para evitar la precipitación de las sales. La solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ nunca se almacenó más de una semana para evitar su oxidación.

Los cultivos se mantuvieron en una incubadora Orbital INO-650M a 30 ° C a 76 rpm, durante 5 ó 7 días y posteriormente se sembraron en medio sólido para verificar la homogeneidad de las colonias.

El medio sólido se preparó mezclando dos soluciones: la primera constituida de agar bacteriológico al 3% de peso en un volumen de agua destilada, la cual se esterilizó y la segunda constituida de medio mineral preparado (2x) estéril. Ambas soluciones se mantuvieron por separado en baño María a 45 - 50 ° C para prevenir la caramelización del agar a altos valores de pH, posteriormente se mezclaron y se vaciaron en cajas Petri (Sorokin 2001).

III.3 PRUEBAS MICROSCOPICAS Y MACROSCOPICAS

Se realizaron frotis a partir de los cultivos en medio líquido y se fotografiaron por medio de una cámara Leica DC 300, la cuál está conectada a un software.

III.4 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD CELULAR

La actividad oxidativa celular se obtuvo por respirometría, midiendo las tasas de consumo de O_2 en presencia de S_2O_3 , las mediciones se realizaron cada segundo durante un período de 8 minutos mediante el electrodo de Clark, el cual estaba conectado a un oxímetro YSI Modelo 5300, y se introdujo en pequeños reactores agitados, con capacidad de 3 a 8ml, sometidos en baño María a temperatura controlada de 30 °C. Las células utilizadas en cada prueba provenían de un cultivo en lote en un medio con tiosulfato (80mM) y pH 10.

Para eliminar el azufre que puede interferir con la respirometría, las células fueron lavadas y centrifugadas 3 veces de forma diferencial, el primero a 8,000 rpm y los últimos dos a 10,000 rpm. Entre cada lavado, los aislados fueron resuspendidos en una solución amortiguadora de carbonatos pH 10 a una concentración 0.6 M, la cual se mantuvo en aireación previa al menos durante 1 hora para evitar problemas de limitación de oxígeno.

La tasa de consumo máximo de cada experimento se obtuvo a partir de los ajustes hechos con el método de Gómpertz (en mg O₂/L) y la cuantificación de proteína fué realizada con el procedimiento de Lowry (ver anexo).

El modelo de Gómpertz utilizado en los ajustes es:

$$V_{\max} = \frac{dSc}{dt_{\max}} = -K(\alpha/e) \log((\alpha/e)/\alpha) = K\alpha/e = 0.368K\alpha$$

Donde: V_{\max} = Velocidad máxima, K =origen, α = punto máximo

III.5 ADICION DE TIOSULFATO COMO SUSTRATO

Los cultivos se realizaron en medio líquido (200mL), en matraces con tapones de algodón y gasa, dejando un espacio libre de cabeza de 45%, para un buen intercambio de O₂ y CO₂. El pH inicial de los cultivos fue 10 y se mantuvieron en una incubadora a 30 ° C durante 96 h. Posteriormente, se midió la actividad celular.

III.6 INHIBICION POR PRODUCTO (SULFATO)

Los cultivos se realizaron con el medio de cultivo descrito en la sección 1.2 a pH 10 y 30°C en medio líquido. A los 5 días se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 min y se resuspendieron en una solución amortiguadora a pH 10 en diferentes tubos Eppendorf que contenían distintas concentraciones de sulfato: 80mM, 160mM, 240mM, 320mM, 400mM y 600mM. Siete horas después (se dejó pasar todo ese tiempo para la adaptación de las células al nuevo medio), se midió la actividad celular mediante respirometría.

III.7 EFECTO DEL PH

Los cultivos se realizaron con el mismo medio de cultivo, a 30 ° C. Se les midió diariamente el pH a muestras de 3mL tomadas de cada cultivo que fueron desechadas cada vez par evitar contaminación en el cultivo.

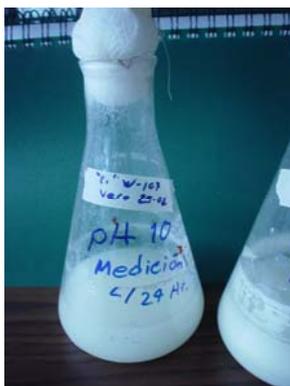


Figura III.1. Fotografía de cultivo de donde se extrajeron las muestras para las mediciones de pH

Además se realizaron otros cultivos variando el nivel de pH (8, 9,10 y 11) y se realizaron las mediciones de O₂ con el procedimiento descrito anteriormente (sección I.5) agregando 1M de tiosulfato en cada medición (sección I.6).

III.8 EFECTO DE LA TEMPERATURA

El cultivo se realizó en las mismas condiciones de nutrientes (sección 1.1), pH inicial 10 y 1M de tiosulfato. El pH se midió cada 24 h. El tratamiento consistió en variar la temperatura 10 ° C a partir de la temperatura ambiente hasta encontrar la temperatura de decaimiento (30 y 40 °C). Una disminución en el nivel de pH indica la sobrevivencia y crecimiento de colonias debido a que las bacterias son sulfoxidantes y por lo tanto acidifican el medio.

Con el propósito de comprobar que los niveles de pH alcanzados no solo se deben al buffer utilizado si no a la actividad de las bacterias, se realizaron pruebas respirométricas (ver sección I.5) a diferentes temperaturas.

III.9 EFECTO DE LA SALINIDAD (NaCl)

Los cultivos se realizaron bajo las condiciones ambientales encontradas con los experimentos anteriores (secciones I.6, I.8 y I.9), y diferentes concentraciones de NaCl (0.5, 1, 1.5 y 2M) como tratamiento.

III.9.1 EN LA ACTIVIDAD DE AGUA (AW)

Se utilizó un medidor de actividad de agua modelo CX-2, marca Decagon-Devices. Inc. Elaborado en Pullman Washington, U.S.A. que produce un error de ± 0.003 .

El equipo se calibró con 5 ml de agua desionizada a 1.000 de Aw a 24.7 ° C y se hicieron las mediciones de los cultivos (5ml) a diferentes concentraciones de NaCl. Las mediciones se hicieron por duplicado.

RESULTADOS

IV.1 IDENTIFICACION DE LOS AISLADOS (A Y B) EN EL CONSORCIO MICROBIANO

Se requiere las características celulares (forma, tamaño y color) tanto de los aislados como del consorcio, para conocer la pureza de los mismos y compararlos con los encontrados en la literatura. Es por ello que una de las pruebas que se hicieron, fue la observación al microscopio (Figura IV.1).

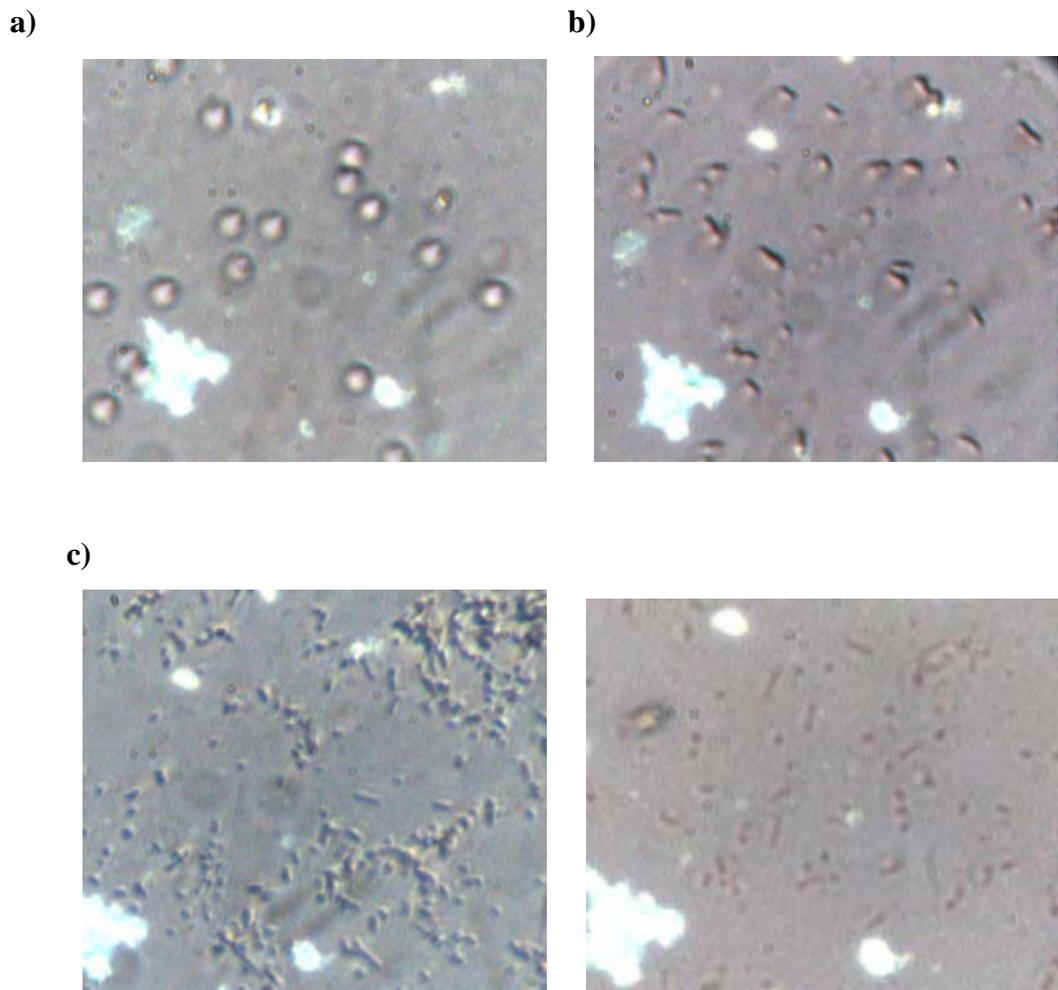


Figura IV.1. Micrografías de bacterias con tinción de Gram, tomadas con un aumento 100X: a) aislado “A”, b) aislado “B” y c) consorcio C₁

En la Figura IV.1, se pueden apreciar las diferentes morfologías microscópicas existentes en los aislados “A” y “B”. El aislado “A” presenta una estructura corta (cocos) de aproximadamente $1\mu\text{m}$ de longitud, mientras que el aislado “B” presenta una forma bacilar larga de aproximadamente $3\mu\text{m}$ de longitud. El consorcio presenta los dos tipos de morfología por lo que se sugiere la presencia de los aislados A y B en éste.

Así mismo, se observó la forma de la colonia de los aislados y el consorcio, la cual fue de forma convexa para el aislado “A”, puntiforme para el aislado “B” y ambas formas en el consorcio “C₁”. La tonalidad de las colonias cambió con el tiempo, desde transparente en las más jóvenes, hasta amarillo en las maduras pasando por tonos blancos en el que permaneció el aislado “B”, donde existieron acumulaciones de azufre (Tabla IV.1 y Figura IV.2).

Tabla IV.1. Características de las colonias de los aislados en medios superficiales.

MUESTRA	TIPO	TONALIDAD
“A”	Convexa	Amarilla
“B”	Puntiforme	Blanca
“C ₁ ”	Convexa y puntiforme	Amarillas y Blancas

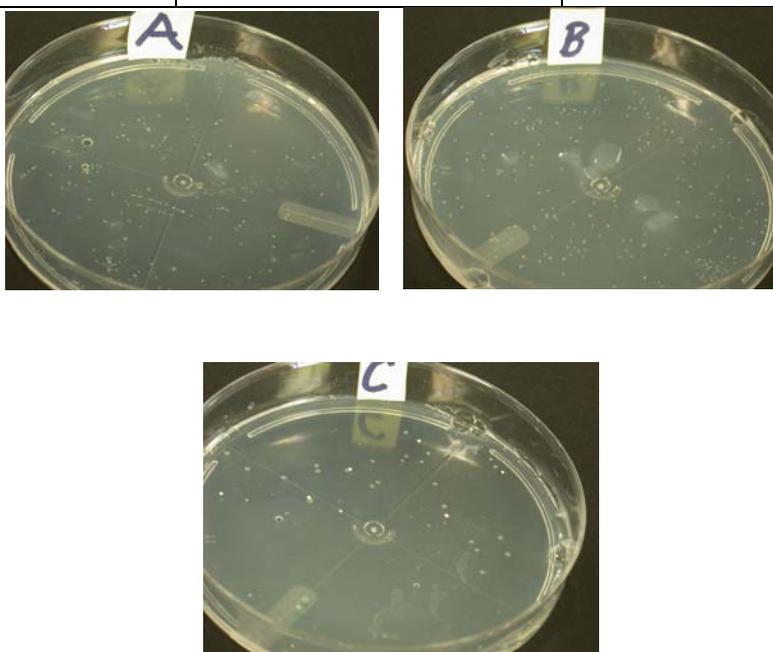


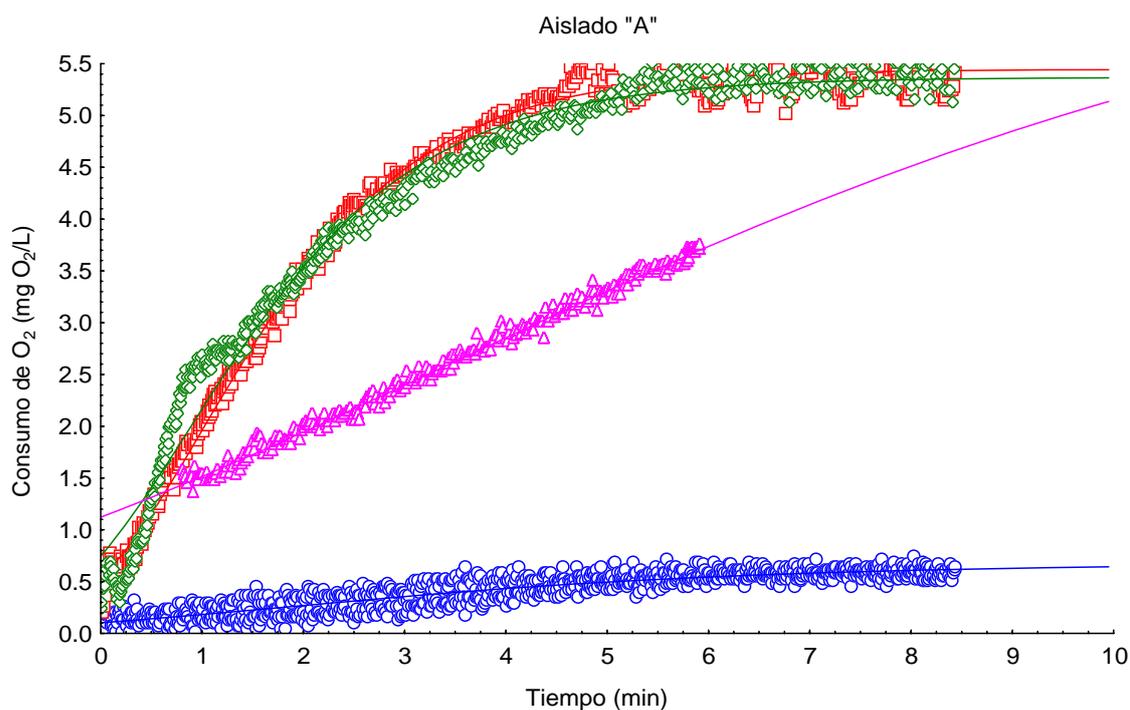
Figura IV.2. Colonias de los aislados (“A” y “B”) y el consorcio (“C₁”) vistos en medios superficiales.

IV.2 ADICION DE TIOSULFATO COMO SUSTRATO

Las bacterias estudiadas en el presente trabajo son del tipo sulfooxidante, por lo que se utilizó tiosulfato como fuente de energía dentro del medio. Para conocer las concentraciones de tiosulfato que favorecen la actividad de las bacterias, se midieron las tasas de consumo de oxígeno generadas con las diferentes concentraciones de tiosulfato.

Después de realizar las respirometrías correspondientes a esta sección por duplicado y de haber obtenido las concentraciones de biomasa (proteína), se obtuvieron las tasas específicas de consumo de oxígeno ajustando las medidas dadas por la respirometría al modelo de Gómpertz (Figura IV.3) y dividiendo las tasas de consumo de O_2 entre la masa de proteína medida (Tabla IV.2).

a)



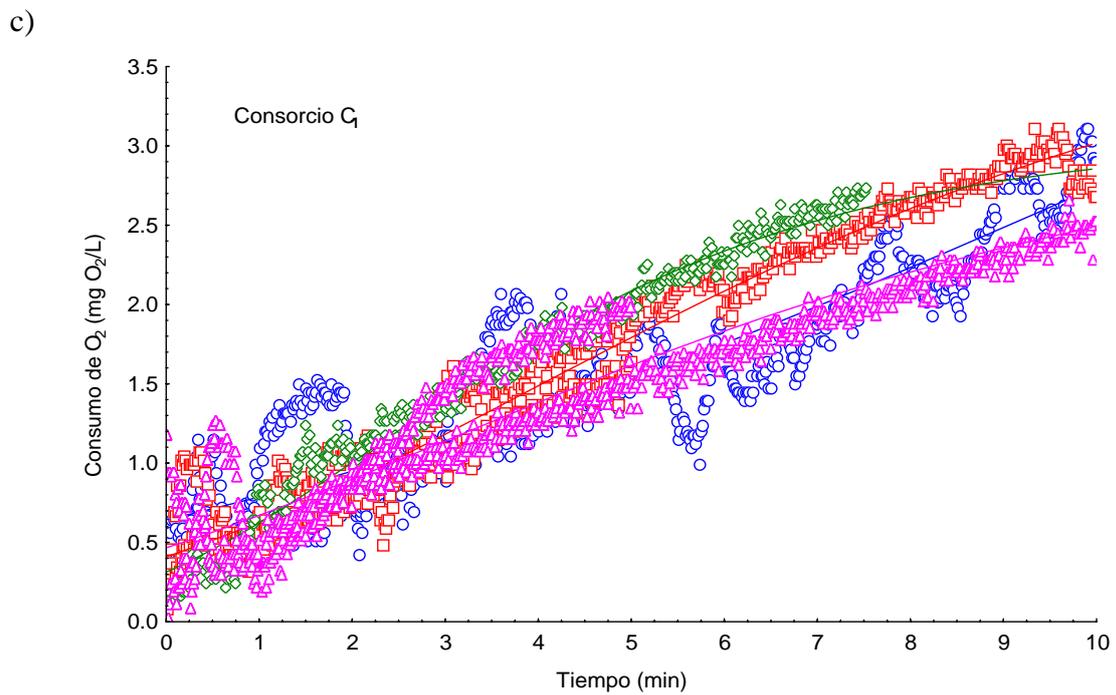
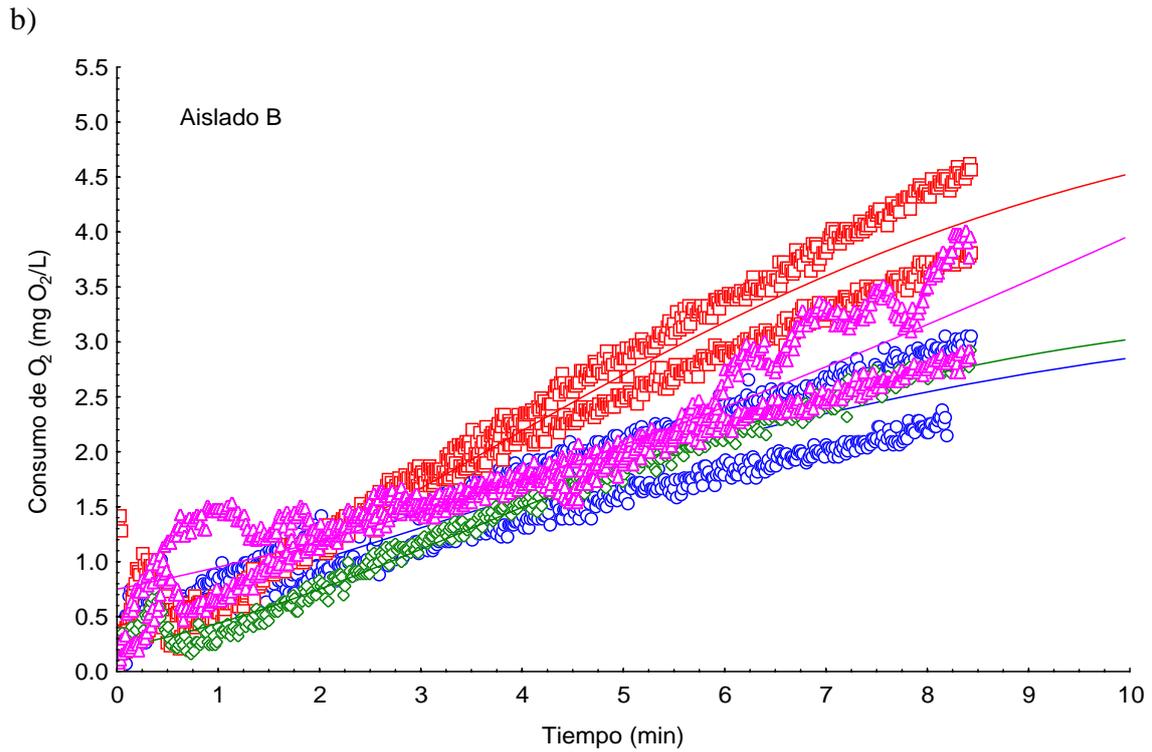


Figura IV.3. Estimación de los parámetros con el modelo estadístico de Gómpertz realizado a los aislados A y B (a) y b)) y el consorcio (C₁) en diferentes concentraciones de tiosulfato. —●— 1M, —□— 0.1M, —◇— 0.01M y —△— 0.001M.

Tabla IV.2. Parámetros encontrados con el modelo de Gómpertz y pruebas de Lowry en bacterias cultivadas con diferentes concentraciones de tiosulfato.

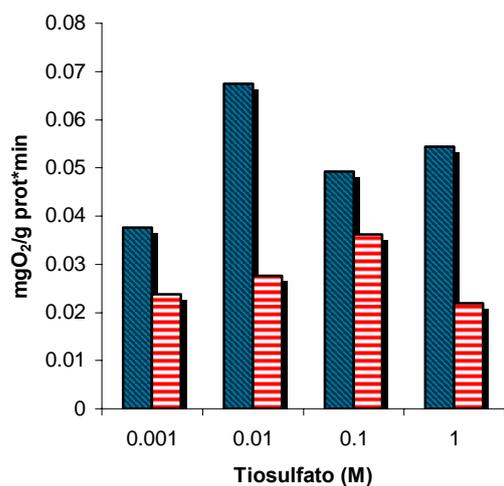
Muestra	Tiosulfato	α^a	β^a	k^a	R^2	Proteína ^b (g/L)
A	1M	0.68±0.009	1.89±0.09	0.36±0.01	0.89	5.27±0.04
A	0.1M	5.45±0.009	2.34±0.09	0.83±0.01	0.99	5.27±0.04
A	0.01M	5.37±0.009	1.97±0.09	0.78±0.01	0.98	5.27±0.04
A	0.001M	7.02±0.009	1.83±0.09	0.18±0.01	0.99	5.27±0.04
B	1M	13.18±0.144	2.87±0.2	0.09±0.01	0.89	7.57±0.03
B	0.1M	3.48±0.144	2.79±0.2	0.30±0.1	0.98	7.57±0.03
B	0.01M	5.52±0.144	2.59±0.2	0.26±0.1	0.96	7.57±0.03
B	0.001M	3.48±0.144	1.94±0.2	0.23±0.1	0.86	7.57±0.03
C	1M	3.14±1.57	1.90±2.06	0.21±0.008	0.91	11.11±0.01
C	0.1M	3.04±1.57	2.27±2.06	0.36±0.008	0.97	11.11±0.01
C	0.01M	4.01±1.57	2.28±2.06	0.21±0.008	0.96	11.11±0.01
C	0.001M	9.00±1.57	2.64±2.06	0.08±0.008	0.87	11.11±0.01

^a Parámetro estadístico ± error estándar.

^b Parámetro de tres determinaciones ± desviación estándar.

Para tener una visión clara sobre el comportamiento de las bacterias en la Figura IV.4., se separaron en dos gráficas las actividades del aislado “B” y el consorcio “C” y la actividad del aislado “A”, ya que la actividad del aislado “A” es mucho mayor que la de “B” y “C”.

a)



b)

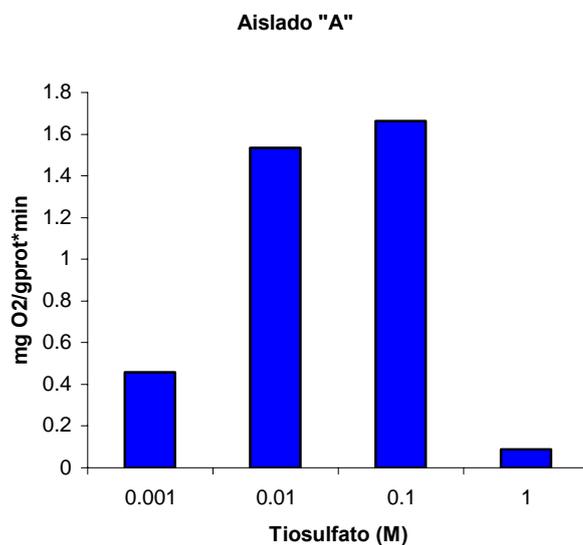


Figura IV.4. Tasas de consumo de oxígeno: a) del aislado B y el consorcio C₁, b) del aislado A bajo diferentes concentraciones de tiosulfato

De igual forma se observa que a partir de una concentración de tiosulfato de 0.1M, se puede garantizar la tasa de consumo de oxígeno más alta para el consorcio y el aislado "A". El resultado concuerda con los encontrados por Alcántara (2000) y Velasco (2001), quienes reportaron que la concentración de tiosulfato a la cual se obtiene la mayor actividad es 10 y 12 g/L respectivamente. Mientras que el aislado "B" requiere solo de 0.01M de tiosulfato. Sin embargo, es probable que la actividad de los aislados sea inhibida a concentraciones iguales o mayores a 1M.

IV.3 EFECTO DE LA SALINIDAD EN LA ACTIVIDAD DE LAS BACTERIAS

IV.3.1 Crecimiento por lote

Se presenta el grado de oxidación como medida de la actividad de las bacterias con respecto a la concentración salina.

El efecto de la concentración salina en la actividad sulfooxidante celular, fue medido indirectamente mediante la medida de pH.

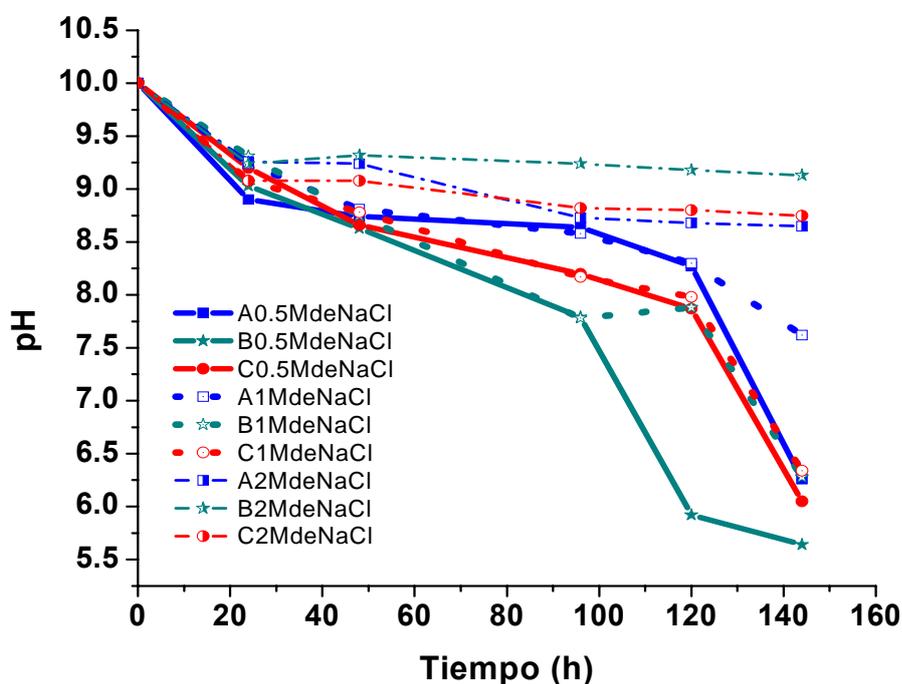


Figura IV.5: Efecto de las diferentes concentraciones de NaCl sobre la actividad celular oxidante de los aislados "A" y "B" y el consorcio "C₁" crecidos a 30°C.

La Figura IV.5 muestra que tanto el aislado “A” (líneas oscuras), como el aislado “B” y el consorcio (“C₁”) (líneas claras) presentan el mismo comportamiento. Ambos aislados presentaron su mayor actividad entre 0.5M y 1M de NaCl. Mientras que los controles no tuvieron cambios en la actividad. Comparando la salinidad de estos resultados con la Tabla I.3, estos aislados podrían pertenecer a *Thioalcalivibrio* y/o *Thioalcalimicrobium*.

IV.3.2 En la actividad de agua (Aw) y la biomasa

El efecto del aumento en la concentración salina con NaCl, al igual que en el aumento en la concentración de sulfato, fue medido en relación a los cambios en la actividad de agua del medio. Tales mediciones se presentan en la Figura IV.6, donde se observa que a medida que se aumentó la concentración salina, disminuyó la actividad de agua desde 0.98 hasta 0.92.

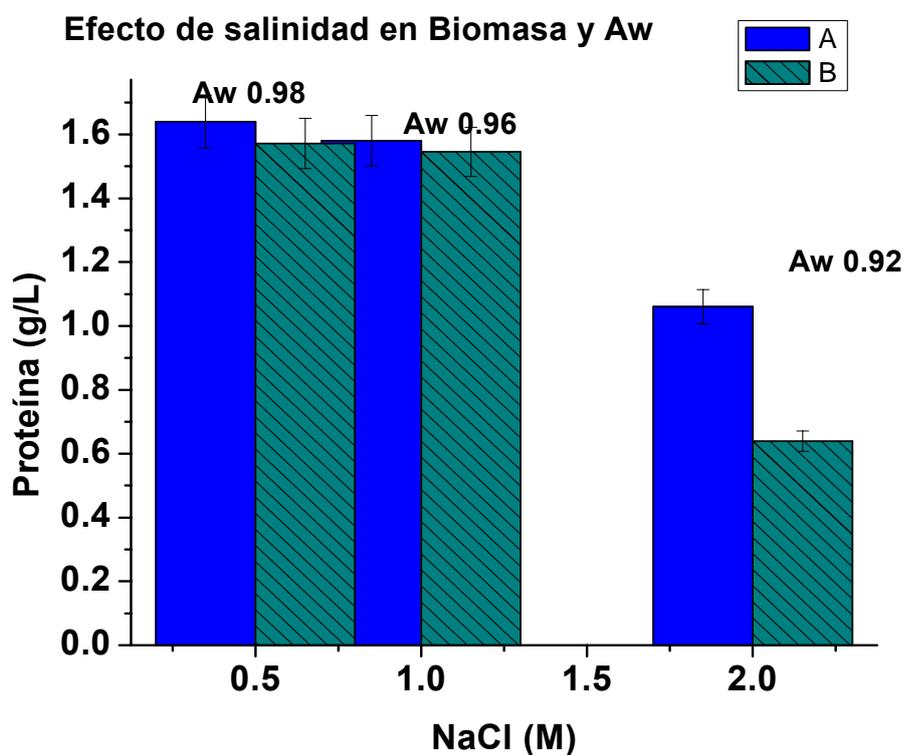


Figura IV.6. Efecto del NaCl, en la producción de proteína y la actividad de agua.

En la Figura IV.6, se observa de manera general, que la producción de proteína del aislado “A” es mayor que la producción del aislado “B”. Sin embargo, dicha producción disminuye conforme aumenta la concentración salina, probablemente debido a que disminuye su actividad de agua. Podría pensarse que es un caso similar a lo que ocurre con la concentración de sulfato.

IV.4 INHIBICION POR SULFATO

En las pruebas respirométricas para observar la inhibición por la concentración del sulfato, se apreció que el aislado “B” presenta una mayor inhibición con el aumento de sulfato, que el aislado “A”. Sin embargo, se debe considerar el aumento de la salinidad en el medio de ambos aislados debido al aumento de iones de Na, ya que para este experimento se utilizó NaSO₄. En las aguas marinas, la concentración de NaCl es de 27,273g/L, mientras que la concentración de SO₄ en compuestos marinos es de 3,781 g/L.

Al igual que en el caso del tiosulfato, las medidas tomadas por el respirómetro fueron ajustadas con el modelo de Gómpertz, de donde se obtuvieron las tasas de consumo de oxígeno. Para ver los ajustes realizados con el modelo de Gómpertz a las medidas de consumo de oxígeno, ver Figura VI.2 del anexo.

En la Tabla IV.3. Se presentan cuantitativamente las tasas máximas específicas de consumo adquiridas del ajuste, donde se obtuvieron valores de R² mayores a 0.80. Debe aclararse que las diferencias existentes entre los resultados de la Tabla IV.3 y la Tabla IV.2 se pueden deber a que los datos de la Tabla IV.3 se tomaron al 5° día de cultivo mientras que los de la Tabla IV.2 se midieron a los 3 días de cultivo.

Tabla IV.3. Parámetros de consumo de O₂ en cultivos crecidos con diferentes concentraciones de sulfato.

Muestra	Sulfato (mM)	α^a	β^a	k^a	R ²	Proteína ^b (g/L)
A	80	4.26±0.18	4.15±1.18	0.19±0.016	0.88	21.28±1.16
A	160	4.88±0.18	6.10±1.18	0.12±0.016	0.96	17.48±0.02
A	240	5.06±0.18	6.63±1.18	0.09±0.016	0.81	15.34±0.02
A	400	11.35±0.18	8.39±1.18	0.11±0.016	0.99	19.53±0.02
A	600	13.58±0.18	15.82±1.18	0.06±0.016	0.99	17.71±0.02
B	80	2.35±0.02	-0.09±0.10	0.69±0.01	0.84	8.18±0.02
B	160	4.20±0.02	5.33±0.10	0.14±0.01	0.96	8.8±0.05
B	240	3.46±0.02	7.41±0.10	0.10±0.01	0.84	9.98±0.06
B	400	1.22±0.02	1.83±0.10	0.39±0.01	0.81	6.97±0.01
B	600	6.47±0.02	7.54±0.10	0.10±0.01	0.91	19.54±0.01

^a Parámetro estadístico ± error estándar.

^b Parámetro de 3 determinaciones ± desviación estándar.

Los resultados obtenidos anteriormente fueron graficados para tener una visión más clara sobre el comportamiento de los aislados respecto a la concentración de sulfato, lo cual se presenta en la Figura IV.5.

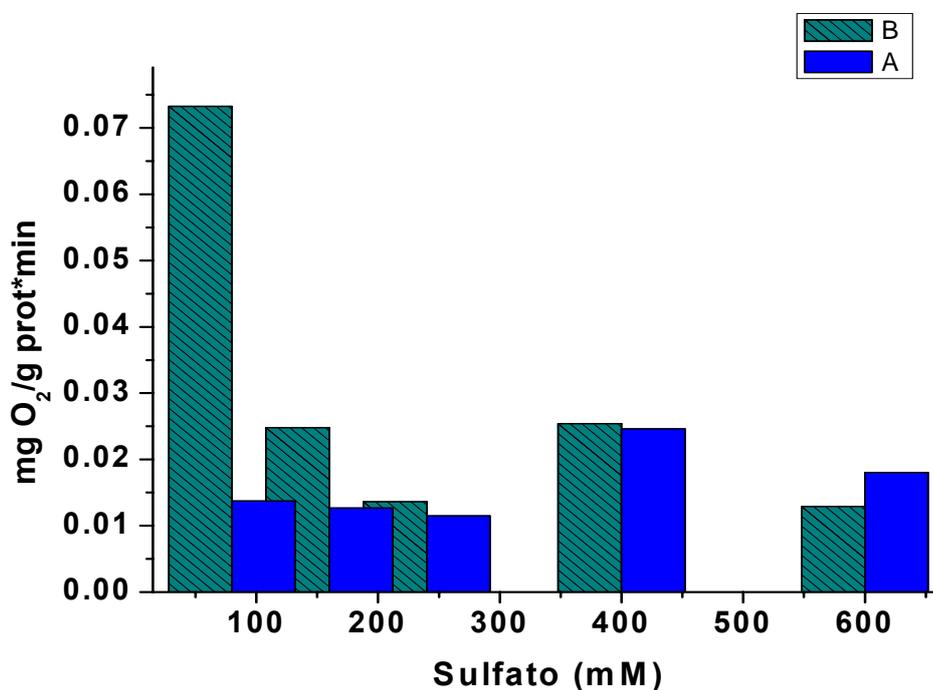


Figura IV.7. Efecto de la concentración de sulfato en las tasas de consumo de O₂.

La Figura IV.7 muestra que para ambos aislados (“A” y “B”), a las condiciones de temperatura y tiosulfato que se manejaron (30° C y tiosulfato 1M), el sulfato ocasiona un decremento en el consumo de oxígeno.

IV.4.1 Actividad de agua A_w

Se llama actividad de agua a la concentración de “agua libre” o “disponible” en un medio. La actividad es una relación entre dos magnitudes de las mismas dimensiones y por lo tanto constituye una relación de estado “Standard”; el estado Standard escogido es el agua pura (desionizada) cuya actividad se fija, como norma, igual a la unidad. Por lo que la actividad de agua (A_w) a diferentes concentraciones de sal, deberá ser por debajo de 1 y tenderá a disminuir conforme aumente la concentración salina

La inhibición observada en la Figura IV.7, al aumentar la concentración de sulfato, puede deberse al decremento en la actividad del agua por el aumento en la salinidad del medio. Es por ello que se midió la actividad de agua a los medios con diferentes concentraciones de sulfato. Los datos de actividad de agua se tomaron de cultivos en lote al 5° día con diferentes concentraciones de sulfato y 80mM de tiosulfato. Durante la determinación de la A_w , el equipo permaneció en un intervalo de temperatura de 23 a 25° C. Inmediatamente se midió el crecimiento considerando la cantidad de proteína generada por cada concentración de sulfato.

Los resultados se muestran gráficamente en la Figura IV.8.

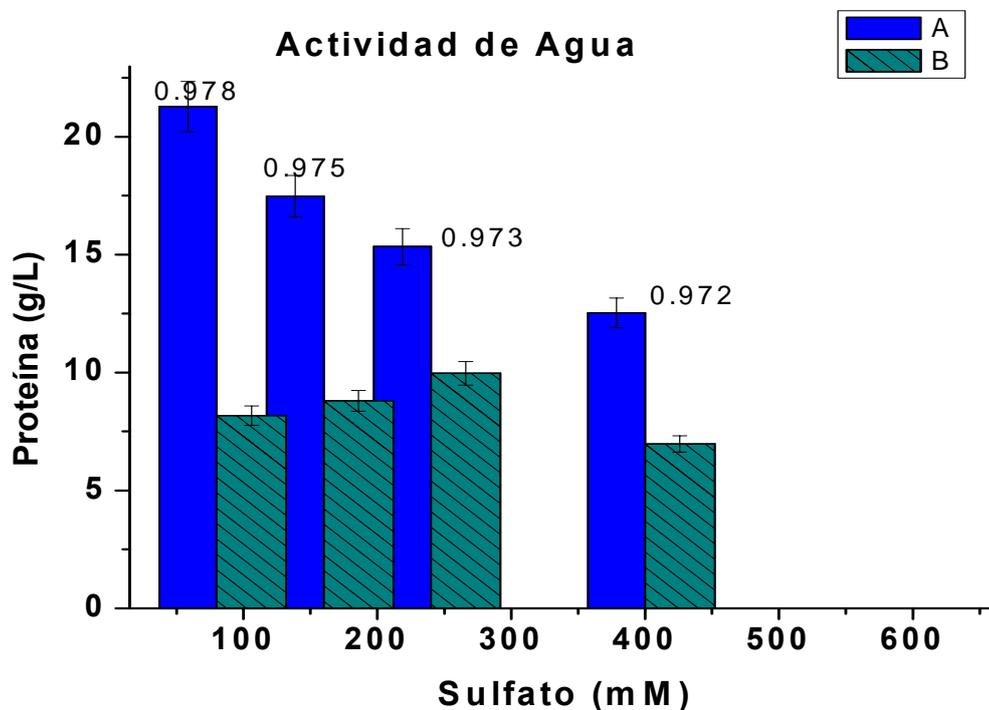


Figura IV.8. Efecto de la concentración de sulfato sobre la producción de proteína en cultivos en lote con 80mM de tiosulfato y la actividad de agua (A_w).

En la Figura IV.8 se observa que, al igual que en los casos anteriores, el aislado “A” presenta un mayor crecimiento que el aislado “B”. Así mismo, se aprecia que la actividad de agua disminuye conforme aumenta la concentración de sulfato, lo cual promueve bajas concentraciones de proteína y probablemente la disminución de la tasa de consumo de oxígeno observada en la Figura IV.5.

IV.5 EFECTO DEL pH

IV.5.1 En cultivo por lote

El comportamiento de los aislados y el consorcio sobre pH del cultivo por lote, se midió como efecto de la actividad microbiana, con el propósito de conocer hasta que niveles de pH las bacterias pierden su actividad y por lo tanto son incapaces de crecer.

Las mediciones de las muestras obtenidas diariamente fueron graficadas. Los resultados pueden apreciarse en la Figura IV.9.

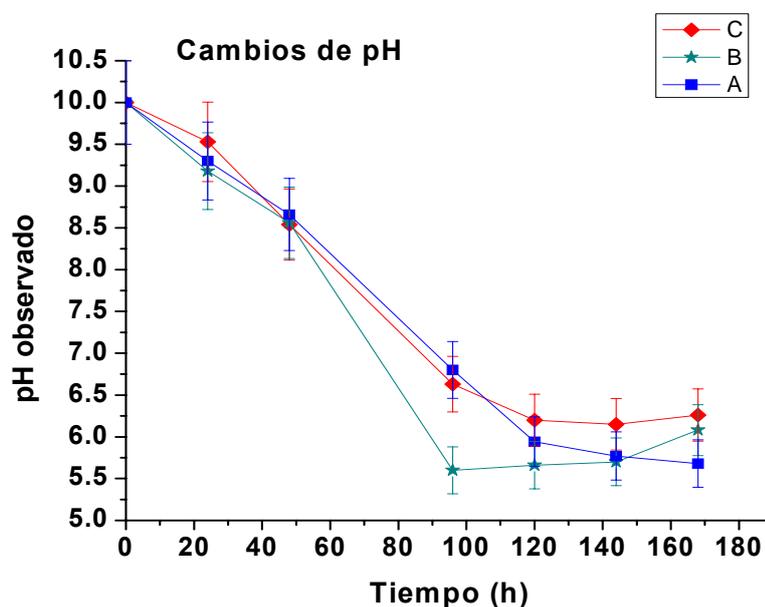


Figura IV.9. Efecto de la actividad de las bacterias en el pH del medio con 80mM de tiosulfato y crecidos a 30°C.

Como se observa, el consorcio “C₁” alcanza niveles de pH muy cercanos al que alcanzan los aislados (“A” y “B”). Sin embargo, el consorcio “C₁” (pH ~ 6.25) no llega a niveles de pH tan bajos como los aislados (pH ~ 5.5).

IV.5.2 Estudios en respirometría.

Después de 5 días de cultivo en soluciones amortiguadoras de diferentes niveles de pH, se realizaron las pruebas respirométricas en las que se observaron las tasas de consumo.

Al igual que en los experimentos anteriores, a las medidas respirométricas se les ajustó por el modelo de Gómpertz. Los resultados obtenidos de dichos procesos se encuentran representados en la Figura VI.3 del anexo.

En la Tabla IV.4. se presentan cuantitativamente las medidas específicas de las tasas de consumo de oxígeno considerando las concentraciones de biomasa.

Tabla IV.4. Parámetros, obtenidos con el modelo de Gómpertz, del consumo de O₂ de los aislados y consorcios crecidos en diferentes niveles de pH.

Muestra	pH	α^a	β^a	k^a	R ²	Proteína ^b (g/L)
A	11	1.35±0.01	2.82±0.04	0.27±0.004	0.98	12.56±0.03
A	10	0.38±0.01	1.57±0.04	0.27±0.004	0.81	19.82±0.01
A	9	2.91±0.01	1.82±0.04	0.26±0.004	0.73	3.63±0.01
A	8	1.76±0.01	15.96±0.04	1.23±0.004	0.90	2.3±0.04
B	11	6.27±0.04	2.78±0.02	0.40±0.005	0.99	17.65±0.06
B	10	1.42±0.04	2.49±0.02	0.56±0.005	0.99	20.61±0.02
B	9	1.77±0.04	2.33±0.02	0.41±0.005	0.99	20.44±0.02
B	8	7.34±0.04	2.60±0.02	0.22±0.005	0.99	20.72±0.02
C	11	4.32±0.093	2.17±0.086	0.29±0.009	0.99	10.53±0.02
C	10	7.18±0.093	2.28±0.086	0.17±0.009	0.99	8.66±0.01
C	9	2.53±0.093	1.63±0.086	0.32±0.009	0.99	19.06±0.01
C	8	1.65±0.093	1.50±0.086	0.15±0.009	0.99	5.6±0.03

^a Parámetros estadísticos ± error estándar.

^b Parámetros de tres determinaciones ± desviación estándar.

Las velocidades específicas se presentan de una manera más clara y gráfica en la Figura IV. 10., en donde se aprecia que el intervalo de mayor actividad para el consorcio y el aislado “B” se presenta entre pH 10 y 11.

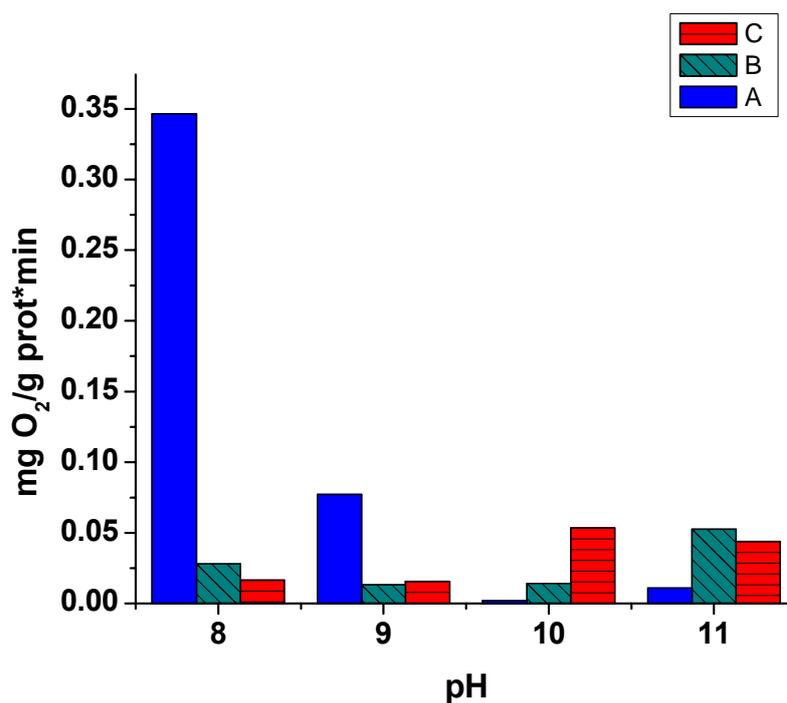


Figura IV.10. Actividad respiratoria de los aislados A y B y el consorcio C₁ bajo diferentes niveles de pH de crecimiento

Sin embargo, en el caso del aislado “A” se observa una mayor tendencia a la neutralidad, ya que obtiene su mayor tasa de consumo a pH 8. Como se observó en la Tabla I.3., *Thioalcalivibrio* tiene un pH > 10 (se presume que el aislado “B” es una cepa filogenéticamente muy cercana a *Thioalcalivibrio nitratus*) mientras que *Thioalcalimicrobium* presenta un intervalo de pH mas cercano a la neutralidad, que va de 7.5 a 10.6.

IV.6 EFECTO DE LA TEMPERATURA

IV.6.1 En el cultivo en lote

En la Figura IV.11 se observa que las velocidades de disminución de pH más altas se ven cuando los cultivos se encuentran entre 30° y 40 ° C, seguidas por las que se presentan a 50 ° C.

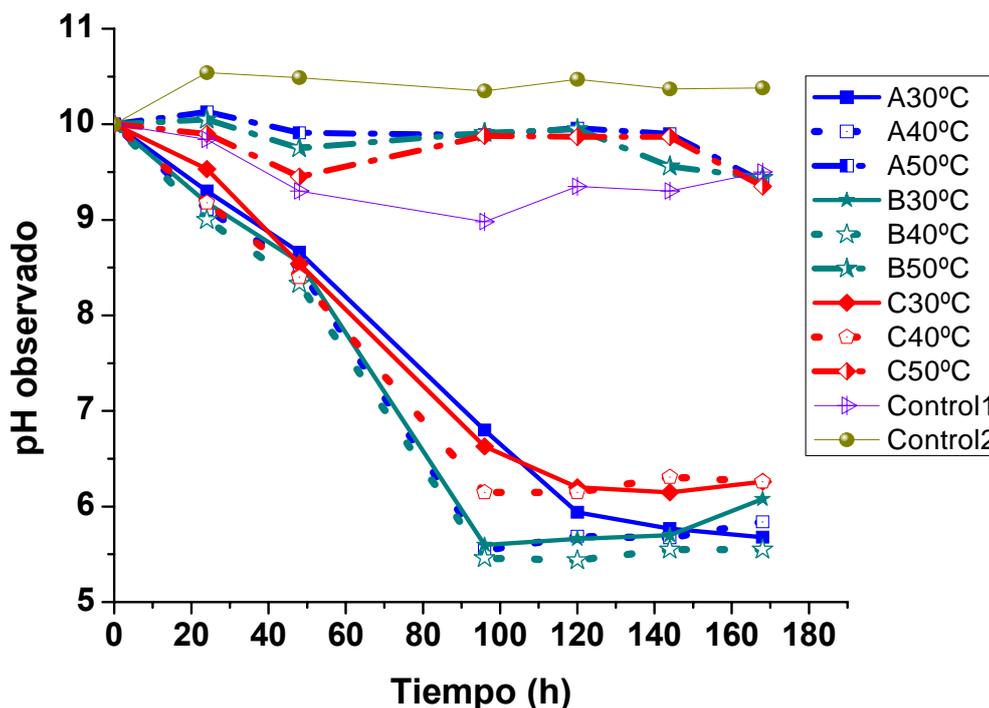


Figura IV.11. Efecto de la temperatura sobre la actividad oxidante de la célula.

Así mismo se corrieron controles químicos a diferentes temperaturas con la finalidad de asegurar que el comportamiento graficado correspondiera a la actividad oxidativa de las bacterias y se observó que era muy parecido al presentado cuando los cultivos se encontraban a 50 ° C. Lo cual puede significar que a dicha temperatura las bacterias disminuyen su actividad hasta el punto de la muerte.

En la Figura IV.11, al igual que en las Figuras IV.9 y IV.5, se observa que la actividad sulfooxidante del aislado “B” es mayor que en el aislado “A”. Sin embargo, al medir su actividad respirométrica, el aislado “A” presenta mayor actividad que “B”. Lo cual

concuera con lo dicho por Sorokin y col. 2001 quienes afirmaron que la actividad sulfooxidante es mayor en los *Thioalcalivibrios* que en los *Thioalcalimicrobium*, sin embargo tienen velocidades de respiración mas bajas que estos últimos.

IV.6.2 Estudios en respirometría.

Para corroborar los resultados obtenidos en la sección II.5.1, se realizaron las pruebas respirométricas que indican la actividad bacteriana solo en el momento de la medición bajo diferentes tratamientos.

Los resultados respirométricos se presentan en la Figura VI.4 del anexo en donde se apreciaron los tres casos (aislados y consorcio) y su comportamiento bajo las distintas temperaturas.

Hay que aclarar que en la Figura VI.12 no se representó el comportamiento a 50°C debido a que la cantidad de proteína acumulada a esa temperatura no fue suficiente para obtener resultados confiables en cuanto a su medición.

En la Tabla IV.5 se presentan los resultados de los ajustes con el modelo de Gómpertz de las tasas de consumo, considerando las concentraciones de proteína medidas por el método de Lowry (ver anexo) donde la R^2 mínima es mayor a 0.8.

Tabla IV.5. Parámetros obtenidos con el modelo de Gómpertz, de la actividad respiratoria de los aislados “A” y “B” y el consorcio “C₁” crecidos en diferentes temperaturas.

Muestra	Temperatura (°C)	α^a	β^a	k^a	R^2	Proteína ^b (g/L)
A	30	4.89±0.006	0.04±0.137	0.18±0.105	0.95	6.65±0.01
A	40	6.74±0.006	0.27±0.137	0.00±0.105	0.92	16.48±0.01
B	30	5.7±2.35	0.11±4.3	0.03±0.04	0.91	14.47±0.02
B	40	6.74±2.35	0.35±4.3	0.01±0.04	0.82	7.73±0.01
C	30	2.88±0.91	0.75±0.14	0.27±0.002	0.85	19.92±0.02
C	40	*	*	*	*	*

- No hubo suficiente crecimiento para realizar las respirometrías

^a Parámetro estadístico ± error estándar.

^b Parámetro de tres determinaciones ± desviación estándar.

No se presentó ningún tipo de actividad en los grupos estudiados a 50° C. Así mismo, las medidas por espectrofotometría fueron muy cercanas a cero, por lo que se sugiere que a dicha temperatura no hay crecimiento de bacterias.

En la Figura IV.12 se representan gráficamente las tasas específicas de consumo de oxígeno a 30 y 40 ° C.

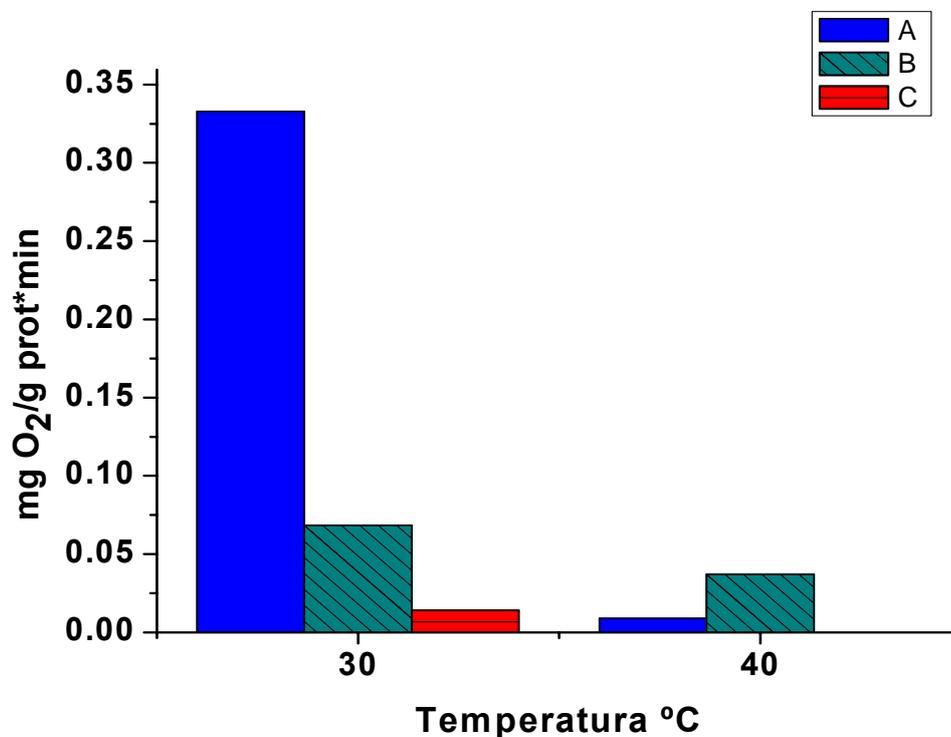


Figura IV.12. Efecto del cambio de temperatura sobre la actividad respiratoria de los aislados “A” y “B” y el consorcio “C₁”.

En la Figura IV.12 se aprecia que los aislados y el consorcio presentan el mayor consumo de oxígeno a los 30°C. Mientras que a 40°C únicamente se pudo observar el comportamiento de los aislados, donde el consumo de oxígeno es significativamente menor al presentado a 30°C.

DISCUSION

Como se observó en el capítulo de resultados, se estimaron los valores que mas favorecieron a la actividad sulfooxidante y respiratoria de los aislados "A" y "B" así como al consorcio "C₁". En esta sección se discutirán los resultados de acuerdo a lo siguiente:

1. Concentración de sustrato (Tiosulfato como modelo de H₂S).
2. Efecto de la salinidad (NaCl) en la actividad de las bacterias.
3. Efecto de la concentración de producto (sulfato) en el aumento de salinidad y actividad bacteriana.
4. Efecto del pH sobre el medio y la actividad de las bacterias.
5. Efecto de la temperatura.

1. Concentración de sustrato

Se observó que la actividad respiratoria del aislado "A" es mayor que el aislado "B" y el consorcio, lo cual puede indicar que es mejor mantenerlo aislado que dentro del consorcio. Sin embargo, existe el inconveniente de que a altas concentraciones (1M) de tiosulfato, el aislado "A", puede, bajo ciertas circunstancias, verse inhibido debido probablemente a la alta actividad que mantuvo a concentraciones menores. Es necesario destacar que, aunque la actividad del aislado "A" es mayor que la del aislado "B" y el consorcio "C₁", el crecimiento del aislado "A" (concentración de proteína) fue menor que el de los otros dos. Esto concuerda con lo reportado por Sorokin y col. (2001), quienes aseguraron que los *Thioalcalimicrobium* exhiben una alta actividad respiratoria a pesar de que tienen un lento crecimiento; y con la Tabla I.3, la cual reporta actividad respiratoria más alta para *Thioalcalimicrobium* que para *Thioalcalivibrio*.

2. Efecto de la salinidad (NaCl) en la actividad de las bacterias

En el crecimiento por lote, se observó que a 0.5 y 1M la actividad sulfooxidante fue mayor que a 2M. Se destaca que el aislado "B" tuvo una velocidad sulfooxidante mayor a la del consorcio "C₁", seguido por el aislado "A". Lo cual puede explicarse mediante lo reportado por Sorokin y Kuenen (2001, 2004), quienes encontraron que la mayor parte de los *Thioalcalivibrios* y *Thioalcalimicrobium* son tolerantes a la sal y son capaces de crecer

en concentraciones de 4 a 4.5M; pero sostienen que muchas de estas cepas crecen óptimamente en concentraciones moderadas de NaCl que van de 0.5 a 1M.

La capacidad para crecer óptimamente a dichas concentraciones salinas, a pesar de tolerar mayores concentraciones, se debe probablemente a la inhibición que sufren por la baja actividad de agua que tiene el medio. Lo cual se ve reflejado en una baja producción de proteína (crecimiento).

3. Efecto de la concentración de producto (sulfato) en el aumento de salinidad y actividad bacteriana.

En este caso, se presenta un mayor crecimiento (concentración de proteína) del aislado “A” que del aislado “B”. Sin embargo, conforme se incrementó la concentración de sulfato, dicho crecimiento se inhibió en ambos casos.

Por otro lado, la medida de la actividad respiratoria mostró que el aislado “B” es más sensible que el aislado “A” a las altas concentraciones de sulfato.

Estos resultados, en apariencia contradicen los resultados obtenidos para el NaCl. Sin embargo, se debe considerar que la estructura química del NaCl es claramente distinta a la del ión sulfato. De esta forma, es razonable suponer que la estructura del SO₄, obstruye en mayor medida el movimiento celular y por lo tanto se observa una gran inhibición a partir de 100mM de sulfato. La diferencia entre los comportamientos del aislado “A” y “B”, puede deberse de igual forma, a que la estructura celular del aislado “A” es más pequeña que la del aislado “B” y por lo tanto tiene más capacidad de desplazamiento en un medio ocupado por sulfato. Sin embargo, es necesario hacer pruebas mas detalladas para entender mejor este comportamiento.

4. Efecto del pH sobre el medio y la actividad de las bacterias.

Para el análisis de este parámetro, el trabajo se dividió en dos partes: estudio por lote y estudios en respirometría.

En el cultivo por lote se analizó la actividad sulfooxidante de los aislados y el consorcio. Al igual que en el caso de la salinidad, el aislado “B” fue mas rápido que el aislado “A” y el consorcio “C₁”. De igual forma, se observa que este último, no fue capaz de oxidar el

medio hasta el mismo nivel que los aislados “A” y “B”. Lo cual indica que no se encuentran ambos aislados dentro del consorcio.

Los estudios por respirometría mostraron diferencias entre ambos aislados, por la preferencia de pH en el medio, ya que mientras que el aislado “B” y el consorcio “C₁” presentan mayor actividad respiratoria en un rango de pH que va de 10 a 11, el aislado “A” la presenta a pH 8.

Al analizar estos resultados junto con los reportados en la Tabla I.3, se observa nuevamente que la actividad respiratoria del aislado “A” se ve favorecida a pH 8, lo cual corresponde a una característica del grupo *Thioalcalimicrobium*.

5. Efecto de la temperatura.

En la Sección IV.6 se determinó la temperatura que favorece a los aislados “A” y “B” y el consorcio “C₁”. En el estudio por lote, no se observa claramente la diferencia entre 30 y 40° C. Mientras que es claro que a 50° C, no hubo crecimiento de ninguna de las bacterias, ya que al ser comparadas con los controles químicos, fueron prácticamente iguales.

Es por eso que se realizaron estudios respirométricos, donde se observó claramente que las bacterias tuvieron mayor actividad a 30 °C. Todo esto concuerda con las características presentadas para *Thioalcalimicrobium* y *Thioalcalivibrio* en la Tabla I.3.

CONCLUSIONES

En este trabajo, se midió la actividad respiratoria y sulfooxidante del consorcio "C₁" y los aislados "A" y "B", de acuerdo a diferentes condiciones ambientales, como son la concentración de sustrato, de producto, el nivel de pH, la temperatura y la salinidad. Con ello se determinaron algunas de las características de estas bacterias y la validez de las hipótesis planteadas.

Las características morfológicas de colonias y bacterias que presentan los aislados, están presentes dentro del consorcio. Y corresponden, de acuerdo con las reportadas por otros autores, a los géneros *Thioalcalivibrio*, *Thioalcalimicrobium* y *Thioalcalispira*. Sin embargo, se deben hacer otros estudios para determinar a que género corresponde cada una.

En los Capítulos IV y V se observó que en la mayoría de los experimentos, el aislado "A" presentó mayor actividad respiratoria que el aislado "B" a pesar de tener una menor concentración de proteína. Ambos aislados son capaces de disminuir el pH al mismo nivel. Sin embargo, el aislado "B" presentó la mayor velocidad sulfooxidante en todos los casos. Esto se debe, probablemente, a que el aislado "B" tiene un metabolismo diferente al del aislado "A".

Así mismo, los resultados presentados en las pruebas respirométricas, variando la concentración de sustrato (tiosulfato) y el pH, muestran que el aislado "A" tiene una actividad respiratoria mayor a la del aislado "B" y trabaja mejor a un pH cercano a la neutralidad, lo que lleva a pensar que dicho aislado pertenece al género *Thioalcalimicrobium*.

Por otro lado, durante los experimentos se probó que el medio de cultivo que favorece la actividad de los aislados "A" y "B" y el consorcio "C₁" es de tipo alcalófilo y moderadamente halófilo. Por lo tanto, representa las características del medio de donde fue extraído el consorcio y es evidencia suficiente para aceptar la hipótesis 1.

Además, se apreció que el consorcio siempre tuvo menor actividad, no logró disminuir el pH y no creció a las mismas temperaturas que los aislados "A" y "B". De manera que, se rechaza la hipótesis 2.

Por todo esto, es recomendable continuar la labor de investigación de ambos aislados. Principalmente, el metabolismo del aislado "A", ya que es una especie no reportada en la

literatura. Además se debe determinar la manera en que pueda llevarse a cabo su aplicación industrial.

BIBLIOGRAFIA

Albert L. (1997) *Introducción a la Toxicología Ambiental*, Gobierno del estado de México, Secretaría de Ecología, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Mecatepec, estado de México.

Alcántara S. (2000) *Estudio de la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre utilizando un consorcio de microorganismos sulfooxidantes. Evaluación de los parámetros que determinan la oxidación parcial del tiosulfato en azufre elemental*. Tesis de doctorado en biotecnología, UAM-I.

Alcántara S., Velasco A., Muñoz A., Cid J., Revah S., Razo-Flores E. (2004) *Hydrogen Sulfide Oxidation by a microbial consortium in a recirculation reactor system sulfur formation under oxygen limitation and removal phenols*. Environ. Sci. Technol. **38**: 918-923.

Arrebola M. Fernández M. y Navarro L. (2004) *Aspectos sanitarios de los óxidos de azufre como contaminantes atmosféricos*. Hig. y San. Amb. **4**: 106-113.

Banciu H, Sorokin D., Klezerebezem R., Muyzer G., Galinski E., y Kuenen G. (2004) *Grow kinetics of haloalkaliphilic, sulfur oxidizing bacteria Thioalkalivibrio versutus strain ALJ 15 in continuous culture*. Extremophiles Life Under Extreme Conditions. Spring Verlag.

Butler J.N.(1964) *Ionic Equilibrium: A mathematical Approach*. Addison-Wesley Publishing Company. U.S.A.

Braun V. (1978) *Structure function relationship of the gram-negative bacterial cell envelope relations between-structues end function*. In R.Y. Stainer, H.J. Rogers, and B.J. Ward (ed.), Relations between structure and functions in the prokaryotic cell. Cambridge University Press. Cambridge.

Campoblanco D. y Gomero T. (2000) *Mareas rojas o purgas químicas asociadas a niños tectónicos*. Rev. Ins. Investig. Fac. Minas metal. Cienc. Geogr. **3** (6):51-54.

Campbell R. (2005) *Ecología microbiana*. Limusa, 94. México.

Cornelius G. Friedrich, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A., Fisher J. (2001) *Oxidation of Reduced Inorganic Sulfur Compounds by bacteria: Emergence of a Common Mechanism?*. Appl. Environ. Microbiol., **67**: 2873-2882.

Das Sarma S. y Arora P. (2001) *Halophiles*. In Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing group. London. 1-9.

Espinosa J. (2004) *Oxidación Biológica de Tiosulfato en condiciones de alta alcalinidad*. Tesis de Maestría en Biotecnología, UAM-I.

González A. (2002) *Operación, caracterización y modelado de un sistema de oxidación biológica de tiosulfato en azufre elemental*. Tesis de maestría en Ingeniería Química, UAM-I.

Grant W.D. y Tindall B.J. (1980) *The isolation of alkalophilic bacteria*. In Gould G.W., Corry JEL (eds.). Microbial Growth in Extreme Environments. Academic Press, 27-36.

Hooper A. y DiSpirito A., (1985) *Bacteria which grow on simple reductants generation of a proton gradient involves extracytoplasmic oxidation of substrate*. Microbiol. Rev., **49**: (2), 140-157.

Horikoshi K. (1971) *Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms*. II. Alkaline protease produced by Bacillus No. A-40-2. Agric. Biol. Chem. **35**: 1783-1791.

Horikoshi K. (1999) *Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology*. Microbiol. and mol. biol. reviews, **63** (4): 735–750.

Huxtable J. (1986) *Biochemistry of sulfur*. Plenum Press. New York, 15.

Ito Mashiro. (2003) *Alkaliphilic microorganisms*. In Encyclopedia of Environmental Microbiology, John Wiley and Sons. New York.

Janssen A. y Webb C. (1995) *Treatment of H₂S - Containing gases: A review of microbiological alternatives*. Enzyme Microbiol. Technol., **17** : 2-10.

Janssen A. y Ma S. Lens P., Letinga G (1997) *Performance of a sulfide-oxidizing expanded bed reactor supplied with dissolved oxygen*. Biotechnol. Bioeng **55**:32-40.

Kamekura M. y M.L. (1997) *Diversity of alkaliphilic halobacterias: proposals for transfer of Natronobacterium vacuolatum, Natronobacterium magadii and Natronobacterium pharanois to Halorubium, Natrionalba and Natromonas gen. nov., respectively*, Int. J. Syst. Bacteriol. **47**: 853-857.

Kruwlich, T.A, Ito, M., Guffanti, A.A. (2001) *The Na⁺ dependence of alkaliphily in Bacillus*. Biochim. Biophys. Acta. **1505**: 158-168.

Kelly D. (1997) *Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds of bacteria*. Antonie van Leeuwenhoek. **71**: 195-107.

Lens P.N.L. y Kuenen G.J. (2001) *The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology*. Water Sci. tech., **44** (8): 57-66.

Lowry OH., Rosebrough NJ, Farr AH. y Randall RJ. (1951) *Protein measurements with the Folin phenol reagen*. J. Biol. Chem **193**: 265-275.

Madigan T., Martinko M. y Parker (2001) *Biología de los Microorganismos*. Prentice Hall Iberia. España.

Morgan J., Revah S. y Ergos S. (2001) *Changes in physical of compost biofilter treating hydrogen sulfide*. Air waste manag. Assoc. **53**: 1011-1021.

Perry (1997) *Perry's chemical engineer's handbook*. Mc. GrawHill, New York, 7a. Ed. 2-127.

Prosser, J. (1989) *Autothrophic nitrification in bacteria*. Adv. Microbiol. Phys., **30**: 125-177.

Revah S. (1995) *Air biodesulfuration from viscose plants: Carbon disulfide elimination, conference on biofiltration (an Air Pollution Control Technology)*, Los Angeles, California, Oct. 5-6.

Robertson L. y Kuenen J. (1991) *The colorless sulfur bacteria*, En: Balows A y col. (eds) The prokaryotes, Springer, Berlin Heidelberg New York.

Studel, R. (2000) *The chemical sulfur cycle*. Environmental Technologies to treat sulfur pollution-principles and engineering. Int. Water Asocc. , London.

Sorokin D. , Lysenko A., Mityushina L.,Tourova T., Jones B., Rainey F., Robertson L. y Kuenen G. (2001) *Thioalkalimicrobium aerophilum* gen. nov., sp.nov. and *Thioalkalimicrobium sibericum* sp.nov., and *Thioalkalivibrio versutus* gen. nov.,sp. nov., *Thioalkalivibrio nitratis* sp. nov. and *Thioalkalivibrio denitrificans* sp. nov., novelobligately alkaliphilicand obligately chemolithoautotrophic *sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes*, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**: 565–580.

Sorokin D. y Kuenen J. (2004) *Haloalkalophilic sulfur-oxidizing bacteria in soda lakes*. FEMS Microbiology Reviews. **29**: 685-702.

Velasco J.A. (2001) *Evaluación de los parámetros que determinan la oxidación biológica de Tiosulfato en azufre elemental*. Tesis de Maestría en Ingeniería Química, UAM-I.

Xu. Y., Zhou P. J. y Tian X.Y. (1999) *Characterization of two novel haloalkaliphilic archaea *Natronorubrum bangense* gen.nov., sp. nov., *tibetense* gen.nov., sp. nov.* Int. J.Syst. Bacteriol. **49**: 261-266.

ANEXOS

USO DEL OXÍMETRO PARA REALIZAR LAS RESPIROMETRÍAS

Para llevar a cabo los estudios realizados por respirometría (tasas de qO_2), se utilizó un oxímetro conectado a un electrodo de Clark (Figura IV.1). El cual se introdujo a pequeños reactores agitados por imanes que tienen una capacidad de 3 a 8ml. Los pasos para realizar los estudios fueron los siguientes:

1. Encender el equipo (oxímetro) y asegurar la temperatura a la que circulará el baño de agua.
 2. Encender la computadora
 3. Crear una carpeta para almacenar los datos
 4. Entrar en el programa correspondiente
 5. Registrar las condiciones en las que se hará el estudio (tiempo en las mediciones)
 6. Introducir, dentro de los pequeños reactores, las muestras a medir y sumergir el electrodo hasta el nivel indicado, asegurando que no queden burbujas de aire entre la muestra y el electrodo.
 7. Crear, dentro de la carpeta de almacenamiento, el archivo donde se guardará la medición con la terminación xls (para que los datos aparezcan en excell).
 8. Encender el agitador de imanes.
 9. Correr el programa.
 10. Recuperar los datos en un disco.
-

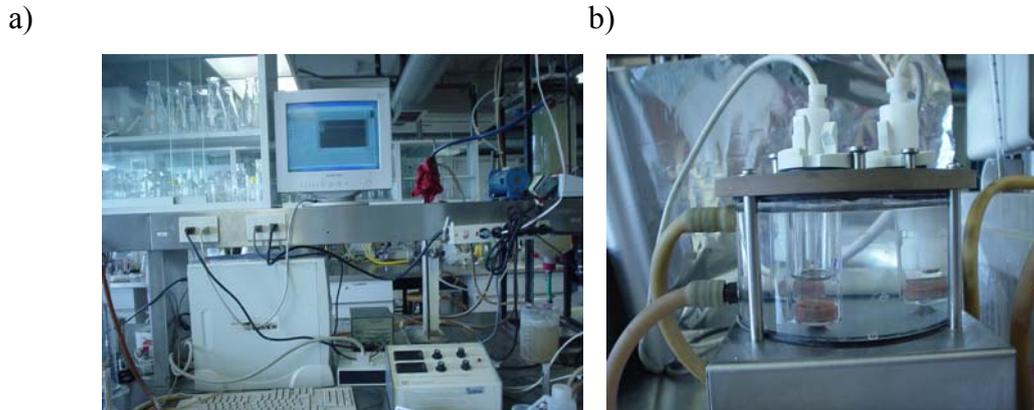


Figura 1. a) Equipo de cómputo conectado al oxímetro, b) Electrodo de Clark introducidos en pozitos con imanes de agitación y baño maría a 30°C.

Debido a la sensibilidad del equipo, se recomienda medir en tiempos no menores a 5 minutos. Los datos obtenidos representan el voltaje que obtiene el electrodo desde la muestra. Por lo que hay que transformarlos en mgO_2/L . Para lograr esto, se deben multiplicar los datos por la corrección dependiente de la solubilidad del oxígeno bajo las condiciones a las que fueron hechas las mediciones (presión, temperatura, salinidad), para conocer la solubilidad, se deben revisar las tablas que se encuentran en el manual del equipo y realizar los cálculos propuestos en el mismo.

Posteriormente, los datos deben graficarse (mgO_2/L Vs tiempo en minutos), y ajustarse al modelo de Gómpertz o por regresión lineal, para obtener de ésta forma, los datos cinéticos como $q\text{O}_2$.

AJUSTES POR EL MODELO DE GOMPERTZ

El modelo de Gompertz (Draper y Smith, 1981) es una manera estadística de ajustar los datos, es una ecuación de la forma:

$$Sc = \alpha \exp\{-\beta e^{-kt}\}$$

Que se obtuvo de la ecuación diferencial:

$$\frac{dSc}{dt} = -KSc \log \frac{Sc}{\alpha}$$

La obtención de la segunda derivada permite identificar la tasa de cambio del consumo de sustrato:

$$\frac{d^2Sc}{dt^2} = K \left(\log \frac{Sc_0}{\alpha} + 1 \right) \frac{dSc}{dt}$$

Donde $Sc = \alpha/e$ en el punto de inflexión $\frac{d^2Sc}{dt^2} = 0$ que corresponde al valor máximo de $\frac{dSc}{dt}$ o a la tasa máxima de sustrato. $qO_{2\max}$ puede obtenerse sustituyendo Sc por α/e

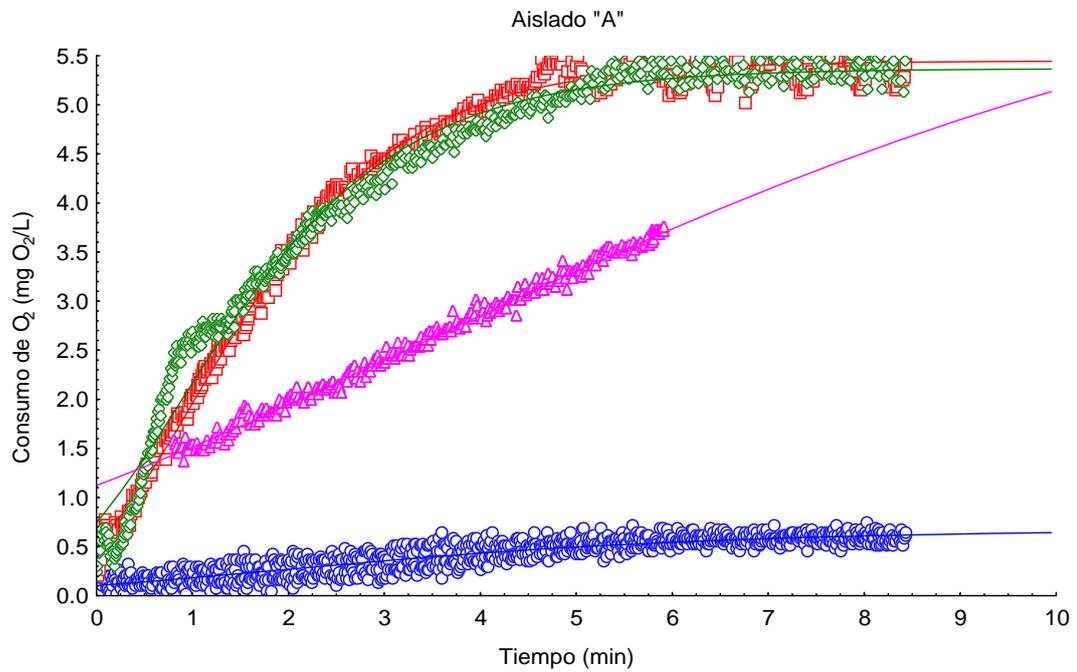
$$qO_{2\max} = \frac{dSc}{dt_{\max}} = -K \left(\frac{\alpha}{e} \right) \log \left(\left(\frac{\alpha}{e} \right) / \alpha \right) = K \frac{\alpha}{e} = 0.368K\alpha$$

La ventaja de usar el modelo de Gómpertz es que reduce el error de tratar de ajustar con una línea recta los datos experimentales para obtener la tasa de consumo. Volke y col. Todo esto es posible realizarlo utilizando programas comerciales como, por ejemplo, Kaleida, Origin, Statistica, NCSS y Excell.

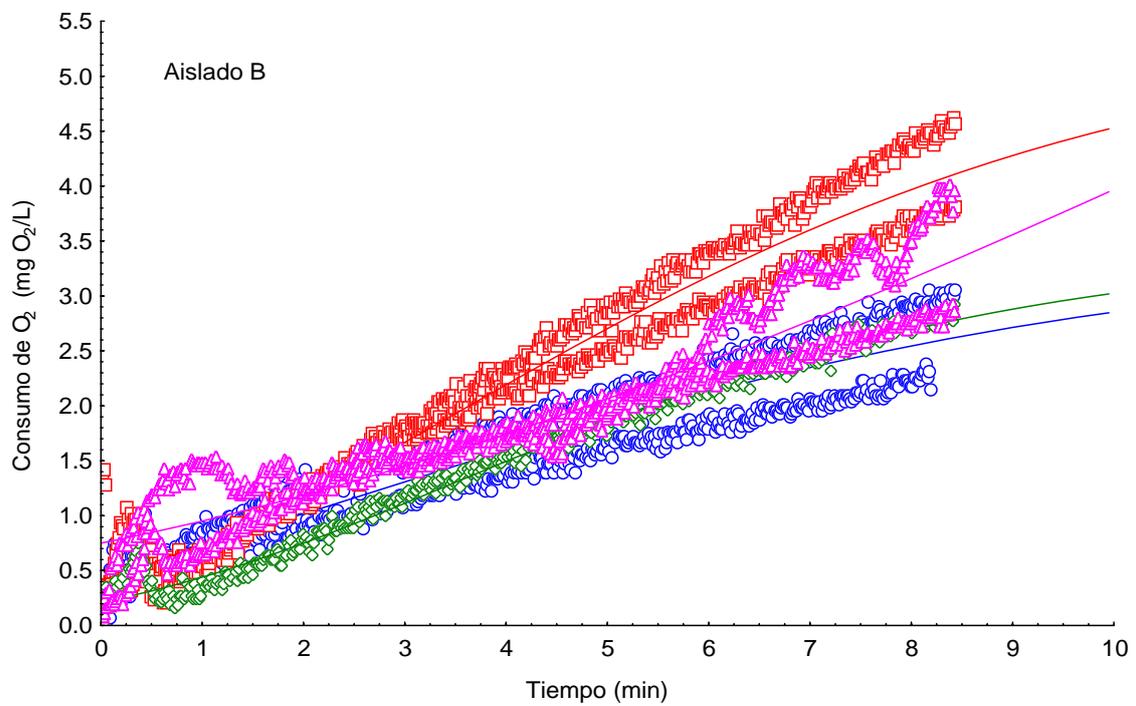
A continuación se presentan los ajustes obtenidos para los diferentes experimentos, a partir de los cuales se obtuvieron las $qO_{2\max}$.

Efecto del tiosulfato

a)



b)



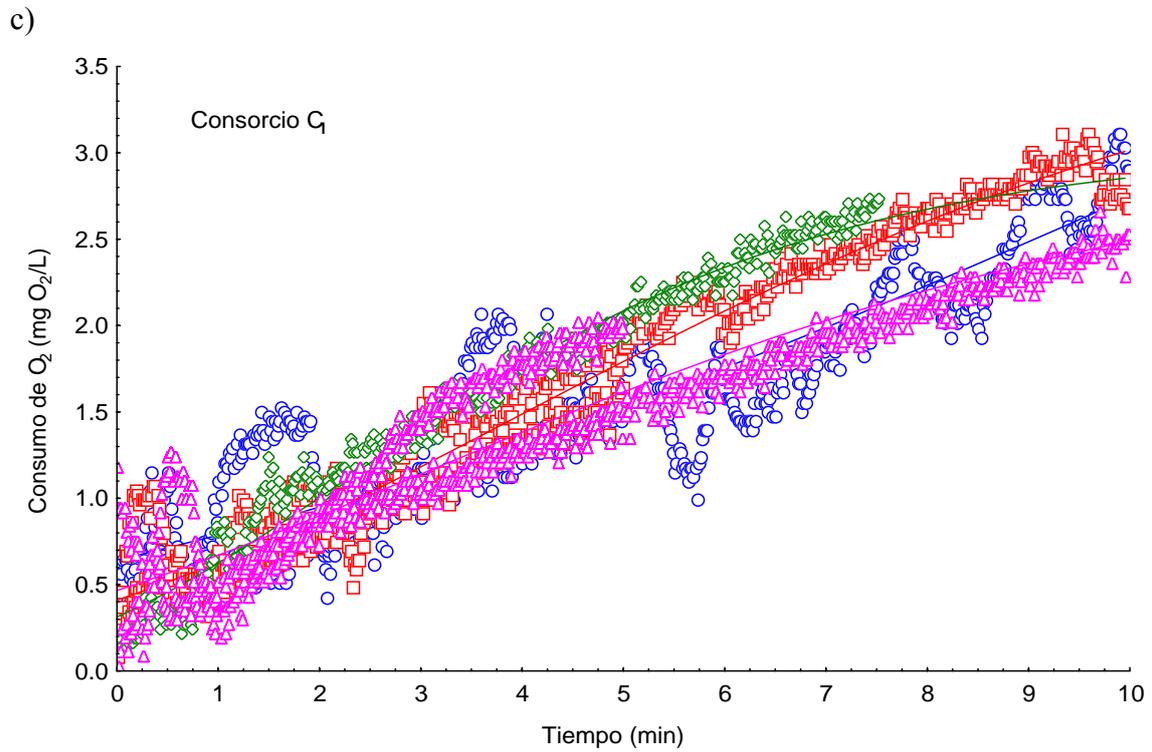
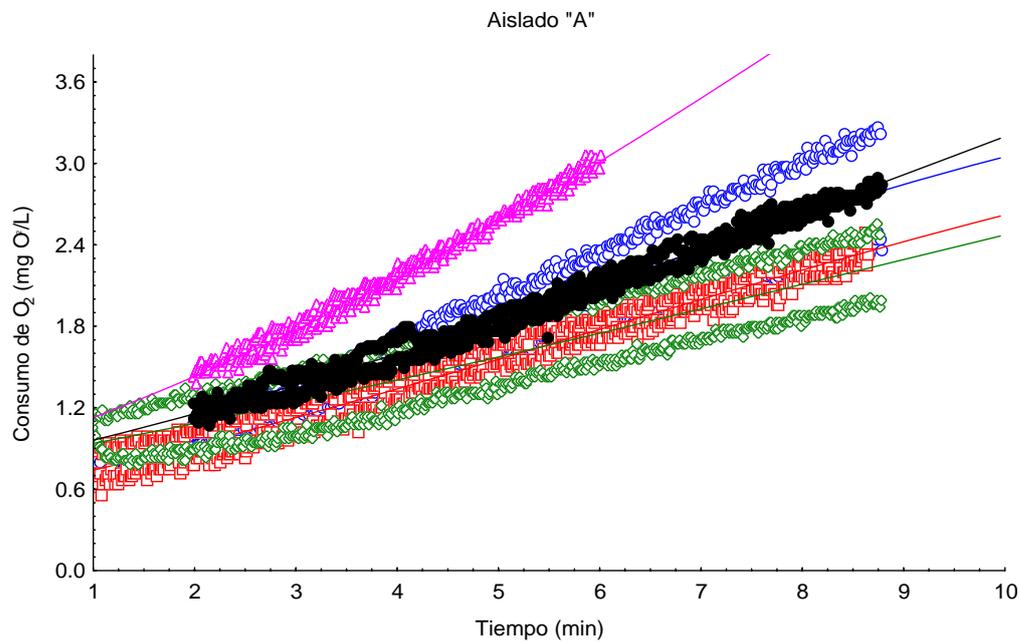


Figura 2. Estimación de parámetros obtenidos con el modelo de Gómpertz realizado a los aislados A y B (a) y b)) y el consorcio (C)) con diferentes concentraciones de tiosulfato.

—○— 1M, —□— 0.1M, —◇— 0.01M y —△— 0.001M.

Efecto del sulfato

a)



b)

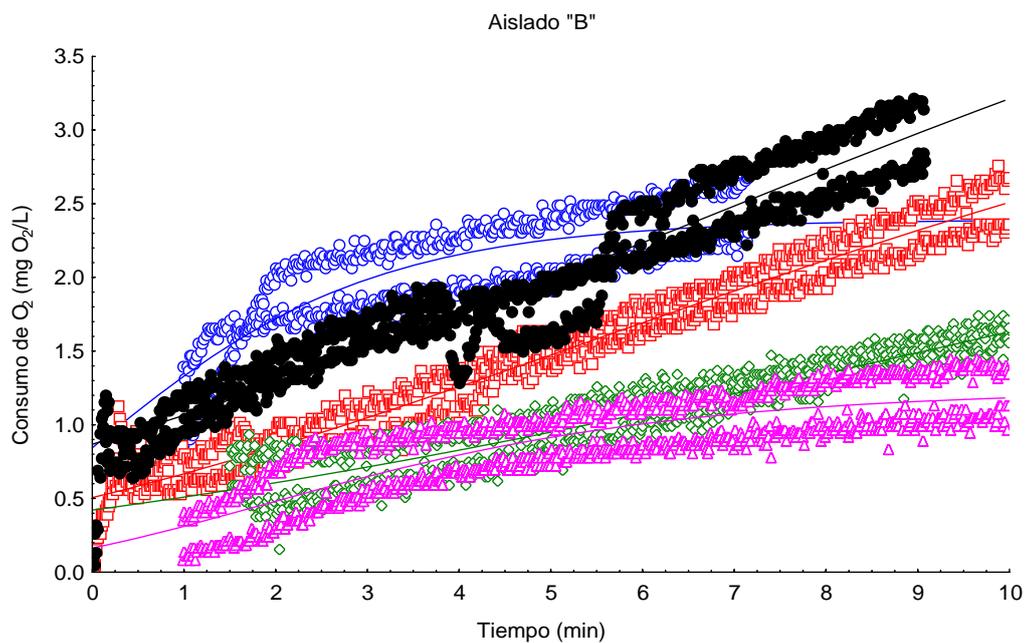
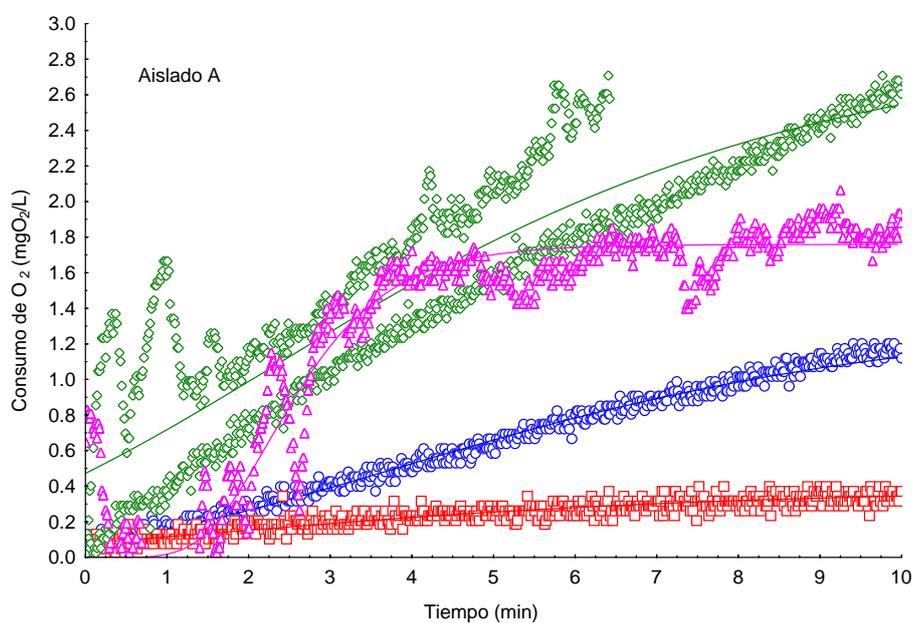


Figura 3. Estimación de parámetros con el modelo de Gómpertz bajo diferentes concentraciones de sulfato, en los aislados A y B , a) y b) respectivamente. Donde \circ 80mM, \square 160mM, \triangle 240mM , \triangle 400mM y \bullet 600mM.

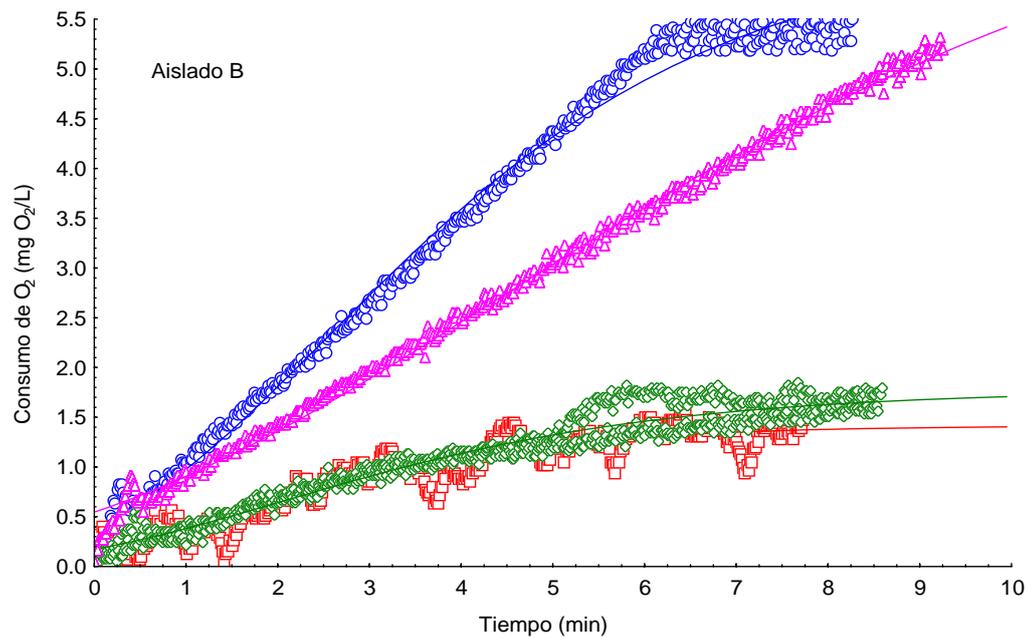
La Figura 3. representa la diferencia de presencia de oxígeno entre la saturación y el consumo del mismo. Sin embargo, en dicha figura aún no se consideran las distintas concentraciones de proteína que alcanzan los cultivos, por lo que únicamente sirven para realizar los ajustes por el modelo de Gómpertz para obtener los valores de las pendientes y así las tasas de consumo.

Efecto del pH

a)



b)



c)

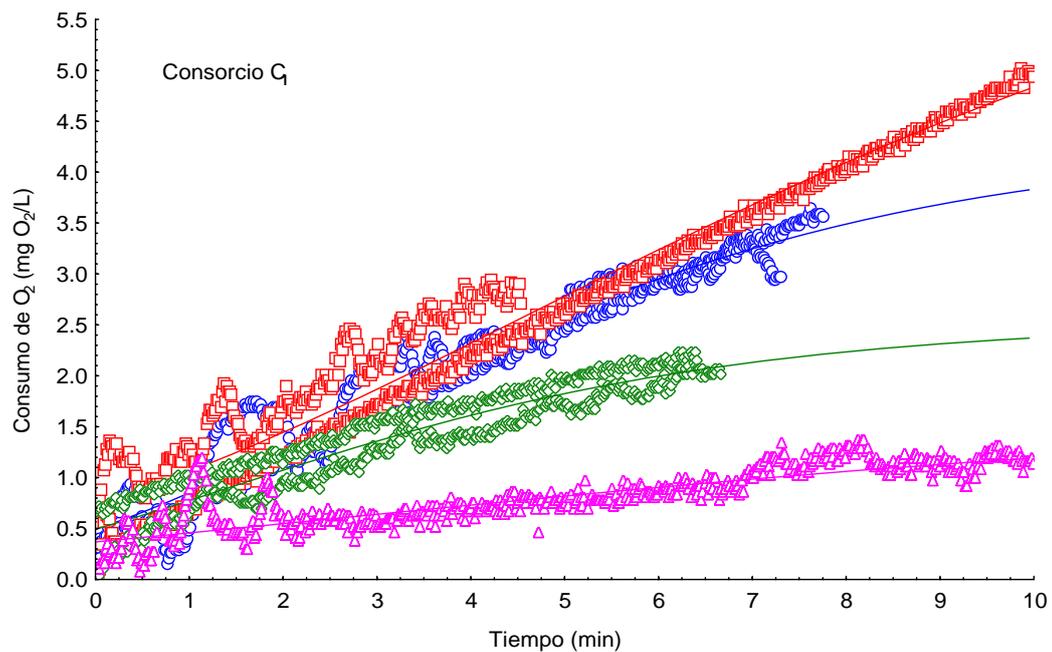


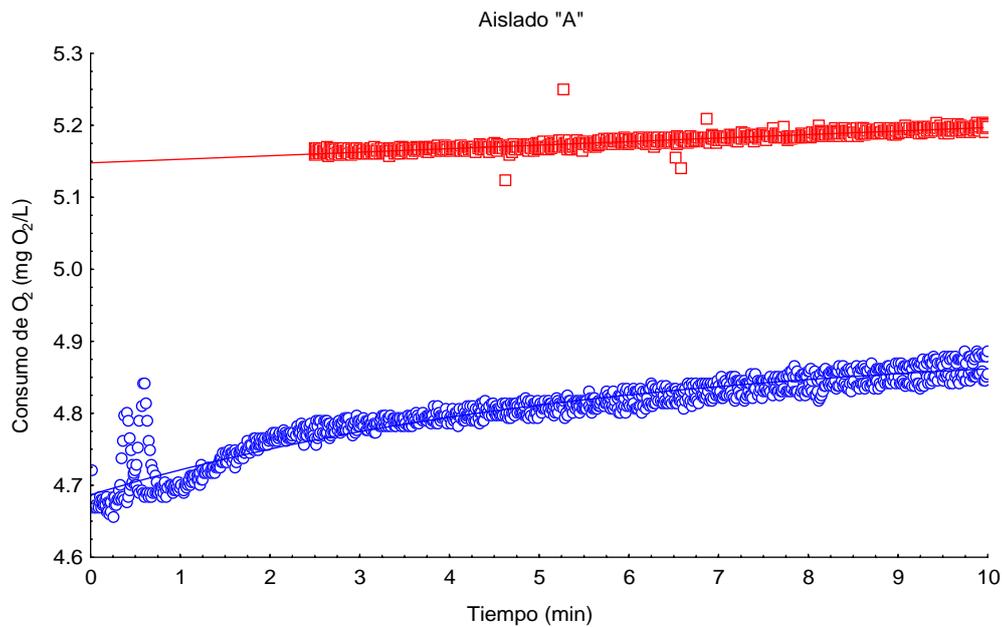
Figura 4. Estimación de los parámetros mediante el modelo de Gómpertz entre los aislados A y B, y el consorcio C_1 , variando el nivel de pH. Donde --- 11, --- 10, --- 9 y --- 8.

En la Figura 4, así como en todas las figuras que muestran los ajustes con el modelo de Gómpertz, se presentan todas las medidas y repeticiones realizadas para cada experimento.

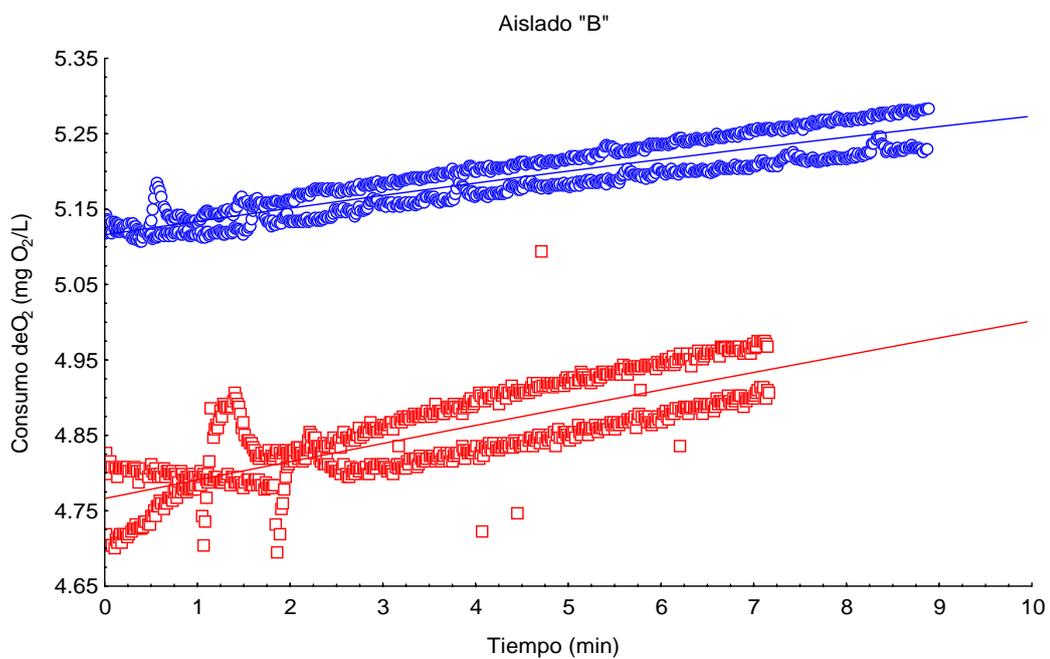
Sin embargo, las medidas presentadas no son aún específicas, por lo que puede ser que las medidas se vieran afectadas por las diferentes concentraciones bacterianas en los cultivos.

Efecto de la temperatura

a)



b)



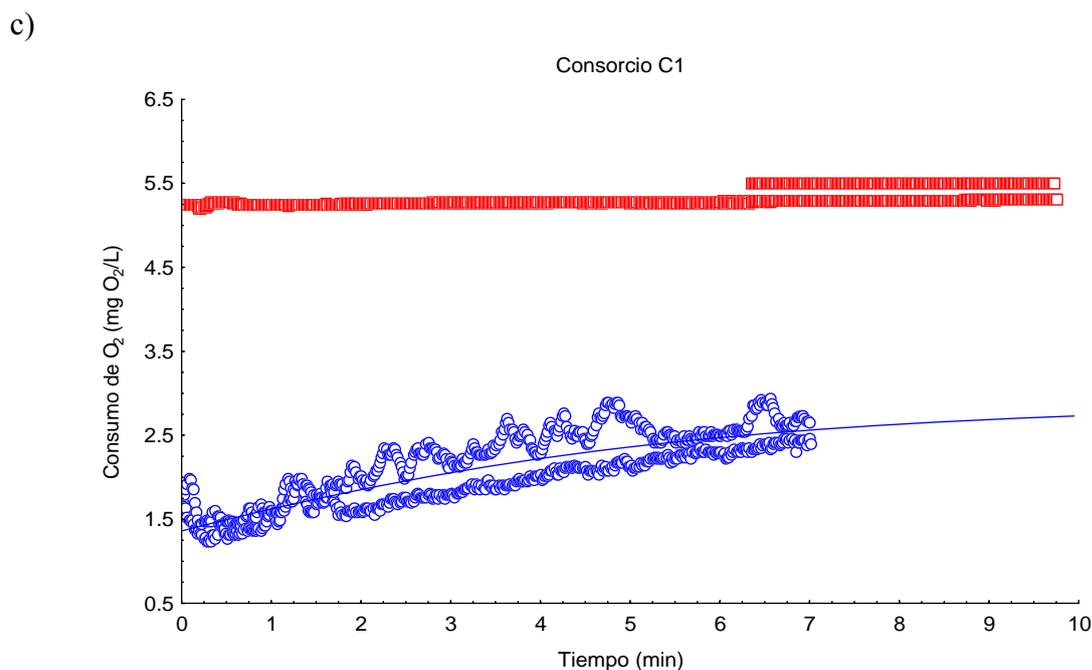


Figura 5. Estimación de parámetros mediante el modelo de Gómpertz a diferentes temperaturas de crecimiento de los aislados A y B y el consorcio C₁. Donde \circ 30°C, \square 40°C.

En la Figura 5 se observan diferentes comportamientos a las temperaturas de 30 y 40 °C. Sin embargo se debe recordar que las tasas de consumo aún no se encuentran específicas, por lo que las medidas pueden ser engañosas hasta considerar las concentraciones de proteína acumuladas.

PRUEBA DE DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA (LOWRY)

Se utilizó un kit comercial de Bio-Rad Dc Proteín Assay, que incluye a las soluciones A y B, (el reactivo A está formado de sulfato de cobre 0.5% en tartrato 1%, de carbonato sódico al 2% en NaOH 0.1N; mientras que el reactivo B se puede preparar a partir de wolframato sódico, molibdato sódico, ácido fosfórico y HCl concentrado).

Procedimiento

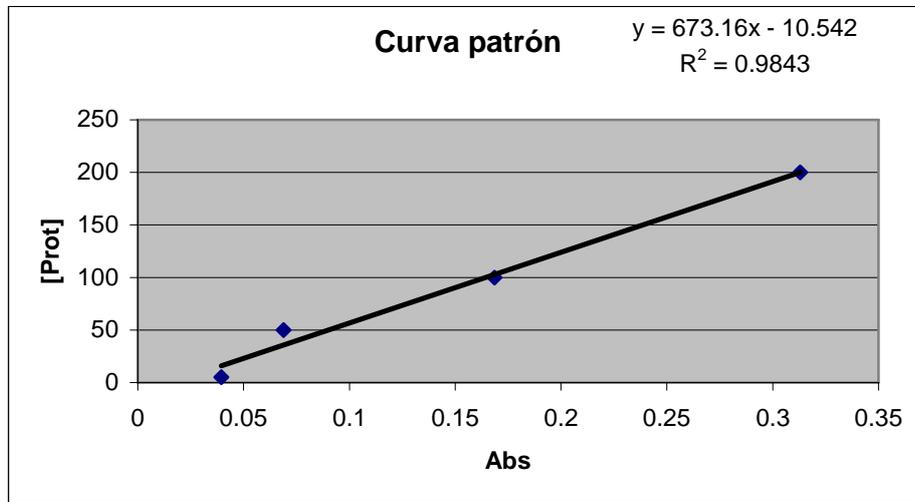
Antes de empezar la primera medida de proteína, es necesario hacer una curva patrón que permita encontrar los valores de biomasa producida durante las cinéticas realizadas.

La curva se obtiene preparando muestras que contengan una cantidad conocida de proteína (albúmina), cada una en diferente concentración, como se muestra a continuación:

C1 (mg/L)	V1(μL)	C2(mg/L)	V total (μL)	V agua (μL)
1000	25	5	5000	4975
1000	50	10	5000	4975
1000	250	50	5000	4750
1000	500	100	5000	4500
1000	1000	200	5000	4000
1000	1250	250	5000	3750

- 1.-Se centrifuga 1mL de muestra a 13 000 rpm (hacer 2 repeticiones).
- 2.-Se retira el sobrenadante y se guarda para análisis de CIA (Capilar Ion Analyzer).
- 3.-Al sedimento (pellet) se agrega 1000μl de NaOH 0.2, se agita hasta disolver el pellet completamente.
- 4.-Se somete a baño María en agua hirviendo, por 15 min.
- 5.-Se deja enfriar
- 6.-Tomar 200μl de muestra obtenida
- 7.-Se adicionan 100μl de reactivo (Bio-Rad, Dc Protein Assay, Reagent A, Catalog 500-0113) y agitar
- 8.-Se adicionan 800μl de reactivo (Bio-Rad, Dc Protein Assay, Reagent B, catalog 500-0114) y agitar
- 9.-Se deja reposar por 15 minutos en la oscuridad
- 10.-Se lee a $\lambda = 750$ nm.

Nota: Es muy importante la preparación de un blanco que permita calibrar el espectrofotómetro, el cual se prepara con 200μl de agua destilada y siguiendo los pasos descritos a partir del punto 3.

Curva Patrón para proteína.

Esta curva servirá para conocer posteriormente la concentración de proteína correspondiente a cada absorbancia que tome, siguiendo el mismo procedimiento, de los experimentos realizados.

AJUSTES CON EL MODELO DE MONOD

El modelo de Monod describe la curva de crecimiento para los microorganismos. Con la siguiente ecuación puede predecirse el comportamiento del crecimiento:

$$\mu = \frac{(\mu_{\max})k_s}{k_s + S}$$

Donde μ representa la velocidad de crecimiento (en este caso la velocidad de consumo de O_2 , (qO_2)), μ_{\max} es la velocidad máxima alcanzada y k_s es el grado de afinidad del microorganismo por el sustrato representado por S.

TINCIÓN DE GRAM

La tinción de Gram es un método realizado para distinguir a las bacterias con pared celular de las que no la tienen. Los pasos para realizar dicha tinción, son los siguientes:

1. Tomar una asada y ponerla en el portaobjetos y diluirla con agua destilada.
2. Poner 1 gota de cristal violeta (tinción de Gram) durante 1 minuto.
3. Enjuagar con agua destilada.
4. Poner 1 gota de lugol durante 1 minuto.
5. Enjuagar, nuevamente, con agua destilada.
6. Limpiar con decolorante (Acetona 50% y etanol 50%) hasta lavar todo el tinte.
7. Enjuagar una vez mas con agua destilada.
8. Poner una gota de safranina durante 1 minuto
9. Enjuagar con agua destilada.

Iztapalapa, D.F. a 30 de noviembre de 2006

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
Tesis

**“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ALCALÓFILAS
SULFOOXIDANTES”**

Que Presentó

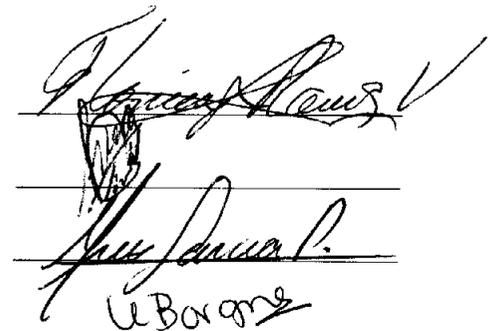
I.A. Verónica Freyre Fonseca

Comité Tutorial:

Director: Dr. Sergio Revah Moiseev
Asesor: Dra. Keiko Shirai Matsumoto

Jurado:

Presidente: Dra. Florina Ramírez Vives
Secretario: Dra. Keiko Shirai Matsumoto
Vocal: Dra. Inés García Peña
Vocal: Dra. Sylvie Le Borgne Le Gall



Handwritten signatures of the jury members on a lined background. The signatures are written in black ink and are positioned above horizontal lines. The first signature is the most prominent and appears to be 'Florina Ramirez Vives'. Below it, there are two more signatures, one of which is partially obscured by the first. The second signature from the top is 'Inés García Peña' and the third is 'Sylvie Le Borgne Le Gall'.