



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA
SALUD**

**“ESTUDIO DEL CRECIMIENTO Y RESPIRACIÓN
DE *Thiobacillus* sp.”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
BIOTECNOLOGÍA
PRESENTA**

ING. MIGUEL ANGEL CANCINO CÁRDENAS

México, Distrito Federal

Resumen.

Los compuestos reducidos del azufre tienen gran importancia por los daños e impacto ambiental que ocasionan ya que están asociados con la producción de lluvia ácida, mal olor, corrosión y en general daños a los ecosistemas naturales.

En el presente trabajo se estudió parte de la regulación de la cadena respiratoria de un microorganismo perteneciente al género *Thiobacillus* sp. el cual fue aislado de un consorcio de microorganismos sulfoxidantes utilizado en un biolavador de lecho escurrido para la eliminación de bisulfuro de carbono. Para estos análisis se utilizaron inhibidores específicos de la cadena de transporte de electrones probados con dos sustratos con diferente potencial de óxido-reducción que permitieron determinar la región dónde posiblemente cada uno de estos diferentes sustratos donan sus electrones, asimismo se probaron 3 diferentes fuentes energía a 2 diferentes niveles de concentración para seleccionar la fuente dónde se presenta el mejor crecimiento y finalmente se utilizó la fuente de energía seleccionada del diseño factorial, para probarse en diferentes niveles de concentración de extracto de levadura.

Indice	página
Resumen	
Abstract	
I Introducción	
I.1 Antecedentes	3
I.1.1 Generalidades de la química del azufre	3
I.1.2 El azufre elemental	3
I.1.3 Sulfuro de hidrógeno	4
I.1.4 Tiosulfato	4
I.1.5 Contaminantes de azufre de mayor importancia por su emisión a la atmósfera	6
I.1.6 Compuestos orgánicos volátiles de azufre	7
i.1.7 Ciclo biológico del azufre	8
I.1.8 La importancia del ciclo biológico del azufre	10
I.1.9 Procesos biológicos para la eliminación de los comp. Azufrados	11
I.1.9.1 Oxidación anaerobia por bacterias fotosintéticas	12
I.2 Generalidades de las bacterias oxidativas del azufre	15
I.2.2 El sistema de transporte de electrones en <i>Thiobacillus</i>	17
I.2.4 Rutas bioquímicas de la oxidación de algunos compuestos Reducidos del azufre	18
I.3 Rutas de oxidación de los compuestos reducidos del azufre	21
I.4 Bacterias Quimiolitotótroficas	23
I.4.1 Quimiolitótrofos facultativos	24
I.4.2 Quimiolitótrofos obligados	24
I.5 Estructura de la envoltura celular de las bacterias gram (-)	24
I.6 Mecanismo de fijación del CO ₂	26
I.6 .2 Reacciones del ciclo de Calvin	26
I.7 Cadena respiratoria	28
I.8 Acoplamiento energético	33
I.9 Citocromos	33
I.10 Producción de energía por el acoplamiento entre el transporte De electrones, la fijación de CO ₂ y ATP	34
II Objetivos	
II .1 Objetivos generales	42
II .2 Objetivos particulares	42
II .3 Hipótesis	43
III Materiales y métodos	
III .1 Material biológico	44
III .2 Medio de cultivo	44
III .3 Inóculo	45

III .4	Metodología para la separación de azufre elemental	45
III .5	Medición de la actividad respiratoria	46
III .5 .1	Medición de la Actividad sulfoxidativa	49
III .5 .2	Actividad sulfoxidativa en presencia de inhibidores y D	49
III .6	Crecimiento microbiano en condiciones quimiolitotróficas	50
III .7	Efecto del extracto de levadura en el crecimiento quimiolitotrófico	51
III .8	Análisis de muestras	52
III .8 .1	Biomasa	52
III .8 .2	Determinación colorimétrica de azufre elemental	53
III .8 .3	Cuantificación indirecta de sulfato	53
IV	Resultados y discusiones	
IV .1	Actividad sulfoxidativa de compuestos reducidos de azufre en la respiración	54
IV .2	Actividad sulfoxidativa en presencia de inhibidores y Desacoplantes	59
IV .3	Efecto de diferentes concentraciones y fuentes de energía en el crecimiento de la cepa de <i>Thiobacillus</i> sp	64
IV .3 .1	Determinación de azufre en las cinéticas de crecimiento	73
IV .4	Importancia del extracto de levadura en el crecimiento del microorganismo	76
V	Conclusiones	83
	Anexos	85
VI	Bibliografía.	88

I Introducción

Los procesos fisicoquímicos de eliminación de compuestos reducidos del azufre enfocados a solucionar los problemas de contaminación han encontrado una alternativa y complemento en los procesos biotecnológicos.

Este proyecto de investigación se ha propuesto con la finalidad de reforzar el conocimiento fundamental de la fisiología microbiana de las oxidaciones del azufre y favorecer con ello los esfuerzos de la investigación tecnológica.

En particular, se pretende estudiar la fisiología de la cadena respiratoria de un cultivo axénico de un microorganismo sulfoxidativo, del género *Thiobacillus*, estableciendo cuales son las especies inorgánicas que sirven de fuente de electrones para su cadena respiratoria. Ya que contribuyendo al entendimiento del funcionamiento de la cadena respiratoria de estas bacterias se podrá desarrollar mejores métodos de control de su metabolismo en reactores de posible aplicación industrial.

Consecuentemente, es necesario aplicar mediciones respirométricas de la cadena respiratoria de cultivos axénicos de bacterias sulfoxidativas, evaluando su actividad metabólica, sujetos a distintos estímulos fisiológicos:

Para estos estudios, será necesario crecer un cultivo de *Thiobacillus sp.* en medios definidos, así como medir la actividad sulfoxidativa durante la actividad respiratoria, estudiando los patrones de activación e inhibición con niveles cambiantes de esas especies inorgánicas, buscando posibles interacciones que pudieran tener entre sí, y asociarlos con las velocidades de consumo de oxígeno en la presencia y ausencia de inhibidores y desacoplantes para finalmente tratar de formular un modelo del funcionamiento de la cadena respiratoria.

Es decir, se requiere estudiar la sección terminal de la cadena respiratoria de una cepa de *Thiobacillus* sp, haciendo uso de la respirometría, midiendo el consumo de oxígeno como una medida del grado de oxidación de los sustratos reducidos utilizados, siendo el oxígeno el aceptor final de la cadena de transporte de electrones acoplada a la asimilación de CO₂; mecanismo por el cual las bacterias quimiolitotróficas obtienen la energía necesaria para su crecimiento y elaboración de material celular.

Asimismo, se ensayará un medio mineral en el cual se variará la fuente de energía (sulfuro, sulfito y tiosulfato) para observar en primera instancia cual es la fuente de energía en la cual se presenta un mejor crecimiento seleccionándose esta fuente para realizar los ensayos posteriores.

Finalmente se utilizará extracto de levadura para suplementar el medio mineral con la fuente de energía en la cual se haya presentado un mejor crecimiento, para observar cual es su efecto en el crecimiento de la cepa de *Thiobacillus* sp.

I.1 Antecedentes

I.1.1 Generalidades de la química del azufre.

El azufre se encuentra en la naturaleza en diferentes estados de oxidación, formando diferentes compuestos que se intercambian por procesos químicos o biológicos de óxido-reducción constituyendo el ciclo biogeoquímico del azufre (Robertson y Kuen, 1991; Takakuwa, 1992)

<i>FÓRMULA</i>	<i>NOMBRE</i>	<i>ESTADO DE OXIDACIÓN</i>
SO_4^{2-}	Sulfato	+6
$\text{S}_2\text{O}_6^{2-}$	Ditionato	+5
SO_3^{2-}	Sulfito	+4
$\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$	Disulfito	+4
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$	Ditionito	+3
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	Tiosulfato	+2
S^0	Azufre	0
S^{2-}	Sulfuro	-2

Tabla I.1: Diferentes especies oxido-reducidas del azufre.

De la tabla anterior podemos observar que los principales estados de oxidación del azufre son -2, 0, +4 y +6, lo que permite encontrar muchas especies del azufre (Alcántara, 2000), donadores de electrones hacia la cadena respiratoria de los microorganismos. De ahí que resulte útil conocer mejor las propiedades físicas y químicas de los compuestos azufrados más abundantes en la naturaleza.

I.1.2 El azufre elemental.

Se encuentra en la segunda posición dentro del grupo VI de los elementos de la tabla periódica, en conjunto con el oxígeno, selenio, telurio y polonio. Se localiza normalmente como una mezcla de cuatro isótopos ^{32}S , ^{33}S , ^{34}S y ^{36}S ; siendo la abundancia natural de 95.1%, 0.74%, 4.2% y 0.016% respectivamente (Cotton y col. 1998).

Es un sólido amarillo, insoluble en agua ($5\mu\text{g/L}$ de S_8 a 25°C) pero muy soluble en solventes orgánicos como el bisulfuro de carbono, tetracloruro de carbono y disolventes no polares análogos; a partir de estas disoluciones se puede obtener cristales ortorrómbicos perfectamente formados, los cuales se funden a 112.8°C formando un líquido rojo pajizo.

I.1.3 Sulfuro de hidrógeno.

Es análogo al agua, pero debido a su menor tendencia de formar puentes de hidrógeno es mucho más volátil teniendo un punto de ebullición de -60.7°C y un punto de fusión de -85.6°C .

Esta especie, es la más reducida de todas las formas del azufre. Es muy tóxico, flamable y altamente hidrosoluble (0.1M a 25°C), presentado 2 valores de pK: pK1 aproximado a 7 y pK2 de 13.

Las sales de este ácido son los sulfuros, muchos de los cuales se encuentran en la naturaleza y constituyen minerales importantes como la galena, PbS ; blenda de cinc, ZnS ; cinabrio, HgS y calcocita, CuS (Alcántara, 2000).

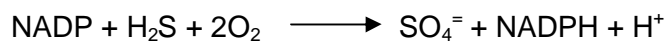
I.1.4 Tiosulfato.

Tiene dos átomos de azufre no equivalentes, es decir, es un ión sulfato (SO_4^{2-}) en el que uno de los átomos de oxígeno fue desplazado por un azufre. El átomo central de azufre tiene un número de oxidación de +6 y el átomo de azufre unido, tienen un número de oxidación de -2 (Suzuki, 1999).

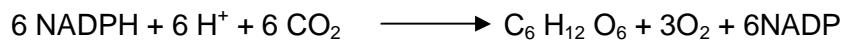
Es pertinente recordar que el azufre es necesario para el metabolismo celular de los seres vivos, ya que forma parte de los aminoácidos cisteína y metionina. Asimismo el 1% del peso de las bacterias es azufre que lo incorporan por una reacción de reducción asimilativa del sulfato (Lee y col, 1995).

Además, hay bacterias litotróficas que pueden obtener su energía metabólica de la oxidación del azufre, para reducir a los coenzimas que después permitirán la síntesis de la biomasa por la reducción de CO₂.

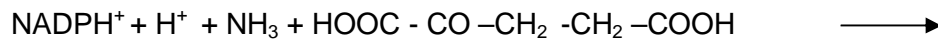
Por ejemplo, los *Thiobacilli* pueden oxidar el H₂S hasta sulfato:



Para después reducir el CO₂ y producir hidratos de carbono



o para reducir el NH₃ y producir ácido glutámico



De esa manera, los microorganismos litotróficos, utilizan el poder rédox de los sulfuros, para producir materia orgánica a partir de CO₂ y NH₃.

I.1.5 Contaminantes de azufre de mayor importancia por su emisión a la atmósfera:

I.1.5.1 Óxidos de azufre. (SO_2 y SO_3)

Estos dióxidos y trióxidos junto con sus ácidos y correspondientes sales son contaminantes comunes en atmósferas urbanas industriales e incrementan los problemas de partículas respirables y de visibilidad por la formación de sulfato y la aglomeración con otros gases y partículas con las cuales reaccionan. Asimismo originan la formación de lluvia ácida por medio de reacciones químicas en la atmósfera.

Los dióxidos de azufre no son inflamables y son percibidos por los humanos en concentraciones menores de 0.1 ppm. En concentraciones superiores de 0.3 ppm se puede detectar por el sabor y a niveles de 1 ppm produce malestar fuerte en la nariz. Este compuesto es emitido en cantidades considerables por algunos procesos de refinación del petróleo, producción de ácido sulfúrico y transformaciones del plomo y zinc (Alcántara, 2000).

I.1.5.2 Ácido Sulhídrico. (H_2S)

Se emite al ambiente por industrias como las curtidurías, petroquímica, producción de viscosa y celofán, como resultado del tratamiento anaerobio de aguas residuales que contienen sulfato, de la extracción de gas natural y es un intermediario de la oxidación biológica del CS_2 . Sus propiedades corrosivas se relacionan con el daño a las paredes de concreto, sistemas de drenaje y tuberías de acero. Su emisión al ambiente genera olores desagradables y lluvia ácida. En el aire fresco puede percibirse el olor característico a huevo podrido en diluciones de 1 ppm de aire (Revah y col. 1995; Torres y col. 1993). En la Tabla I.2 se exponen algunos niveles de toxicidad y su efecto en la salud.

CONCENTRACIÓN DE H₂S	EFEECTO
1 ppm	Mal olor (olor a huevo podrido)
10 ppm	Máxima exposición permitida en áreas de trabajo por 8h.
20 ppm	Se requiere de equipo de protección.
100 ppm	Puede causar dolor de cabeza y náusea, pérdida del sentido del olfato de 2 a 15 min.
200 ppm	Rápida pérdida del sentido del olfato, ardor de ojos y tráquea.
500 ppm	Pérdida de equilibrio y de razonamiento, insuficiencia respiratoria en 200 min.
700 ppm	Inconsciencia inmediata, sin un tratamiento adecuado para respiratorio y muerte.

Tabla I.2. Niveles de toxicidad del H₂S y su efecto en la salud (Alcántara, 2000)

I.1.5.3 Tiosulfato. (S₂O₃²⁻)

Este anión metaestable tiende a su descomposición química en soluciones acuosas. Es, junto con otros compuestos de azufre, altamente corrosivo. Se encuentra como contaminante de las aguas de desecho de las industrias del papel, fotografía, farmacéutica y del petróleo, por el impacto ambiental que provoca su oxidación biológica o química o bien su reducción biológica en condiciones anaerobias (Suzuki, 1999).

I.1.6 Compuestos orgánicos volátiles de azufre.

El compuesto orgánico más abundante en la naturaleza es el dimetil sulfuro (H₃C-S-CH₃), originado en ambientes marinos como producto de la degradación del propionato de dimetil sulfonato, principal osmoregulador de algas marinas. Este producto es generado aproximadamente en más de 45 millones de toneladas anuales y debido a que experimenta una oxidación fotoquímica produce ácido metanosulfónico (CH₃SO₃⁻) según Madigan y col. (1998).

Los compuestos orgánicos volátiles de azufre son producidos por la descomposición de la materia orgánica y por los aminoácidos metionina y cisteína.

El bisulfuro de carbono también es un compuesto azufrado de importancia industrial ya que se utiliza en la fabricación de viscosa (precursor de rayón y esponjas) y celofán así como en la producción de fertilizantes (Estrada, 1998).

I.1.7 Ciclo biológico del azufre.

Las transformaciones biológicas que ocurren en el ciclo del azufre son de gran importancia ambiental porque, la acumulación atmosférica de los óxidos de azufre es la causa principal de la lluvia ácida que resulta nociva para grandes áreas boscosas y de plantas cultivadas.

Por ende, la bio-remediación de los compuestos azufrados resulta ser de gran interés para el desarrollo sustentable de la industria petrolera pues es un proceso alternativo a los procesos de remediación de tipo físico o químico.

El azufre se encuentra en la naturaleza en diferentes estados de oxidación, formando diferentes compuestos que se intercambian por procesos químicos o biológicos de oxidación-reducción constituyendo el ciclo biogeoquímico del azufre (Robertson y Kuen; 1991 Takakuwa, 1992).

Debido a su estabilidad sólo 3 son los estados de oxidación que presentan mayor relevancia (-2) sulfhidrilo R-SH y sulfuro HS^- , (0) azufre elemental, S^0 y (+6) sulfato (SO_4^{2-}).

Como podemos observar en el esquema de la figura I.1, en este ciclo se pueden distinguir 2 fases de acuerdo al tipo de reacción de óxido-reducción que intervienen en el mismo,

-Fase de Reducción

-Fase de Oxidación

En los procesos biológicos de la fase reductiva, se encuentran 2 formas bioquímicas de reducción de los compuestos de azufre inorgánicos.

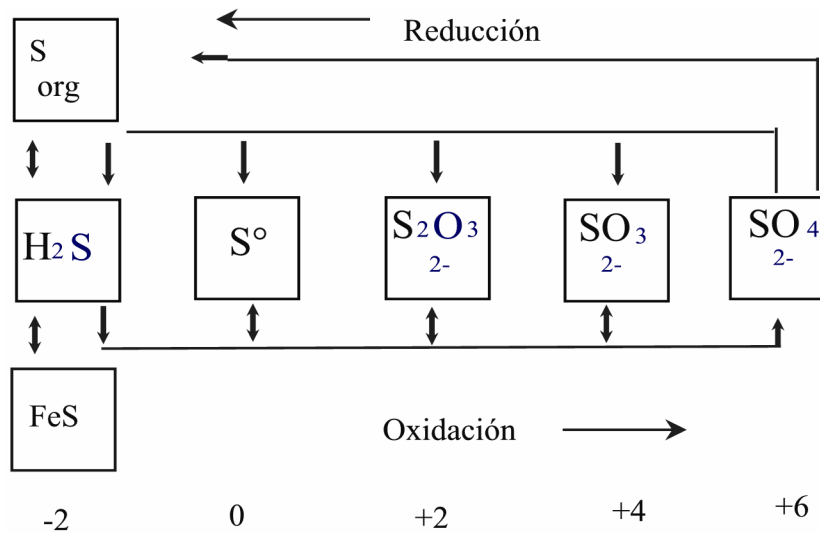


Figura I. 1 Ciclo biológico del azufre. (Fenchel et Blackburn, 2000)

La reducción asimilativa y desasimilativa:

La etapa asimilativa de la reducción, la llevan a cabo todos aquellos microorganismos (eucariontes y procariontes) capaces de reducir el sulfato a sulfuro mediante el catabolismo de compuestos que contienen azufre y que son necesarios para el crecimiento celular.

La etapa desasimilativa de reducción, la realizan principalmente organismos procariontes en donde el sulfato es reducido a sulfuro en condiciones anaeróbicas, utilizando al sulfato como aceptor final de electrones, acoplándose a la oxidación de ácidos grasos volátiles, piruvato, lactato; generando así, ATP y el poder reductor necesario para el crecimiento celular (Alcántara, 2000).

Las reacciones de oxidación de los compuestos reducidos de azufre pueden subdividirse en 2: reacciones de oxidación en condiciones anaerobias efectuadas por microorganismos fotótrofos (Cork y col. 1983) y facultativos (Sublette, 1987) y en la presente investigación nos enfocaremos a la oxidación aerobia por microorganismos del género *Thiobacillus* (Kelly, 1982; Buisman y col. 1989; Kelly, 1990; Alcántara y col. 1999).

Dentro de este ciclo biogeoquímico del azufre, que incluye tanto el nivel óxico como anóxico, el sulfuro puede presentar las siguientes reacciones, tanto en forma espontánea o con la ayuda de microorganismos asociados al azufre:

- Oxidación biológica con O_2 o NO_3^- $S^2 \longrightarrow SO_4^{2-}$
 - Reducción desasimilatoria de SO_4^{2-} \longleftarrow
 - Oxidación espontánea $S^{2-} \longrightarrow S^0$
 - Oxidación biológica con O_2 o NO_3^- $S^{2-} \rightarrow S^0 \longrightarrow SO_4^{2-}$
 - Oxidación por bacterias fototróficas
 - Anaeróbicas $S^{2-} \rightarrow S^0 \longrightarrow SO_4^{2-}$
- (Estrada, 1998)

I.1.8 La importancia del ciclo biológico del azufre

La importancia del ciclo del azufre está relacionada con los siguientes aspectos:

Nutriente de los seres vivos.- Es necesaria la presencia del azufre para la elaboración de algunos compuestos celulares como son la cisteína y metionina, que pueden llegar a constituir hasta el 1% del peso de bacterias que lo incorporan por reacciones de reducción asimilativa.

Económico.- La industria, principalmente la química, presenta un gran requerimiento de azufre elemental para la producción de ácido sulfúrico, importante para la síntesis de compuestos orgánicos e inorgánicos.

La contaminación ambiental.- El deterioro ambiental a causa de las emisiones antropogénicas de compuestos reducidos de azufre orgánico e inorgánico provocan la lluvia ácida, mal olor, toxicidad y corrosión (Alcántara, 2000).

I.1.9 Procesos biológicos para la eliminación de los compuestos azufrados.

Las emisiones al ambiente de los compuestos azufrados, han sido tratadas por procesos fisicoquímicos y biológicos, pero en general, los procesos fisicoquímicos requieren de grandes flujos de energía y representan un alto costo. Por estas razones, se ha considerado la factibilidad de los procesos biológicos, ya que en la naturaleza existen microorganismos capaces de oxidar los compuestos reducidos del azufre que son de interés por los problemas de contaminación que generan.

Se ha observado, que en bajas concentraciones de contaminantes, los procesos biológicos presentan ventajas económicas y de eficiencia de eliminación (Groenestijn y Hesselink, 1993).

Los procesos biológicos para el tratamiento de efluentes contaminados con compuestos de azufre, tienen aplicación diversificada ya que se han utilizado en el tratamiento de corrientes acuosas contaminadas con sulfuros, sulfatos y tiosulfato, asimismo las corrientes de aire contaminadas con sulfuro, bisulfuro y compuestos orgánicos volátiles de azufre (Sublette, 1987; Jensen y Webb, 1995).

Los métodos biológicos utilizados en la eliminación de los compuestos reducidos de azufre se clasifican:

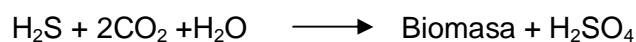
- Oxidación anaerobia por bacterias fotosintéticas.
- Oxidación anaerobia por microorganismos desnitrificantes.
- Oxidación por un proceso químico-biológico.
- Oxidación aerobia por bacterias incoloras del azufre.

(Alcántara, 2000)

I.1.9.1. Oxidación anaerobia por bacterias fotosintéticas.

El uso de *Chlorobium limicola* var. *thiosulfatum*, microorganismo anaerobio fotosintético, permitió a Cork y col. (1983) proponer la importancia de controlar las velocidades de entrada del gas y las cantidades de luz en un biorreactor, ya que estos factores son determinantes para la optimización de la eliminación del compuesto.

Con los trabajos de inmovilización de células de *Chlorobium limicola* var. *thiosulfatum*, en un soporte inerte para oxidar H₂S en azufre elemental, citados por (Alcántara, 2000), reportan que la acumulación de sulfato fue debido a la siguiente reacción:



Así también la acumulación de azufre o sulfato está en función de la energía lumínica y la velocidad de la alimentación de H₂S.

Alcántara, (2000) citó que en 1996, Khana y col, utilizan bacterias fotótrofas y bacterias sulfato reductoras, en un proceso para la recuperación de azufre elemental producido a partir de la oxidación de tiosulfato contenido en aguas amargas.

Este proceso permitió la oxidación del tiosulfato por la bacteria *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum*, en azufre elemental el cual es recuperado mientras que el sulfato es reducido a sulfuro por la bacteria sulfato reductora: *Desulfovibrio desulfuricans*.

La principal desventaja del uso de bacterias fotosintéticas a gran escala es por sus requerimientos de energía radiante y por lo tanto requieren de una gran superficie de contacto.

I.1.9.2. Oxidación por microorganismos desnitrificantes

Sublette y Silvestre (1987), reportaron el crecimiento de *Thiobacillus denitrificans*, microorganismo autótrofo estricto y con respiración facultativa el cual en condiciones anaerobias utiliza el nitrato como el aceptor final de electrones reduciendo el nitrógeno molecular, con el tiosulfato, azufre elemental y el ácido sulfhídrico como fuentes de electrones con la oxidación a sulfato.

De esta investigación, observaron que las variables más importantes para la maximización de la desulfuración del gas son: la concentración de la biomasa y las condiciones ambientales del proceso anóxico. Asimismo la presencia de organismos heterótrofos no tuvo efecto importante en el crecimiento del microorganismo *T. denitrificans*, por lo tanto no es necesario la esterilización del cultivo.

I.1.9.3. Oxidación por un proceso químico-biológico.

El proceso de eliminación de H_2S por medio de un proceso químico-biológico en presencia de una solución férrica y el microorganismo *Thiobacillus ferrooxidans*, fue propuesto por Imazumi (1986), citado por Alcántara, (2000).

En el primer paso, el H_2S es inyectado en la solución férrica con la consecuente producción de un precipitado de azufre elemental:



Posteriormente, el azufre elemental se separa y recupera de la solución reducida de sulfato ferroso. Mientras tanto, el sulfato férrico $Fe_2(SO_4)_3$ se regenera a partir de la solución de sulfato ferroso por la oxidación biológica, en un biorreactor aireado, efectuada por *Thiobacillus ferrooxidans*

Finalmente, la solución oxidada se recicla para repetir el proceso. La eficiencia reportada para la eliminación del sulfhídrico en aplicación industrial es del 99%.

I.1.9.4. Oxidación por bacterias incoloras del azufre

Los microorganismos sulfoxidantes llamados bacterias incoloras del azufre: *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Sulfolobus*, *Thermothrix*, *Thiovulum*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thiospira* y *Thioploca*, los cuales utilizan la oxidación de compuestos reducidos de azufre para obtener energía, pueden ser utilizados para la eliminación del H₂S.

Es importante, considerar si estas bacterias almacenan dentro o fuera de la célula, el azufre elemental generado por la oxidación parcial de los compuestos reducidos de azufre.

Las bacterias a utilizarse, deberán ser seleccionadas con la característica de que el azufre producido sea excretado al medio como *Thiobacillus* ya que especies del género *Beggiatoa*, *Thiothrix* y *Thiospira*, acumulan el azufre elemental dentro de la célula, por lo que para recuperar el azufre elemental es necesario la eliminación de una gran cantidad de biomasa.

Alcántara, (2000), citó las investigaciones realizadas por los siguientes autores:

Buisman y col, 1989; Lizama y Sankey, 1993 Y Koniski y col, 1994, desarrollaron respectivamente, procesos biotecnológicos para la oxidación del sulfuro de hidrógeno a azufre elemental utilizando microorganismos del género *Thiobacillus*.

Lyric y Suzuki en 1969 y 1970, estudiaron y aislaron las enzimas relacionadas con la oxidación del tiosulfato en el microorganismo *Thiobacillus thioparasus*.

Chang y Suzuki en 1993 y 1994, establecieron la oxidación estequiométrica de sulfuro a azufre, estudiando la oxidación de tiosulfato por *Thiobacillus thiooxidans* crecido en azufre elemental.

Todos los procesos biológicos mencionados hacen uso de bacterias sulfatoreductoras o sulfoxidativas, pero en este proyecto nos enfocaremos a la oxidación aerobia por bacterias sulfoxidativas específicamente el género *Thiobacillus*.

El principal antecedente del presente proyecto es el desarrollado por Torres-Cardona, Revah S, y col, 1993, (U.S pat. No. 5,236,677) mediante el cual inventaron un proceso biológico para la eliminación de compuestos de sulfuro presentes en mezclas de gases produciendo azufre elemental. Este proceso consiste del uso de un reactor continuo para la oxidación parcial del tiosulfato por el crecimiento de un consorcio microbiano limitado en oxígeno. El objetivo de este reactor fue emplearlo para precipitar las sales de azufre parcialmente oxidado en forma de azufre elemental y así remover un agente contaminante en diversas descargas de origen industrial como las refinerías petroleras, los procesos de sulfitación en la fabricación de celulosa.

En todos estos procesos, se prefiere la formación de azufre elemental (S^0) ya que éste, es insoluble en el agua y por lo tanto puede separarse de la corriente acuosa que lo contiene, purificándose y reutilizarlo dándole un valor agregado al proceso, evitando la acumulación de sulfatos que tienen efectos negativos sobre la oxidación (Alcántara, 2000).

I. 2 Generalidades de las bacterias oxidativas del azufre

I.2.1 Bacterias sulfatoxidativas.

Son aquellas bacterias capaces de utilizar compuestos reducidos de azufre como única fuente de energía para su crecimiento. Los compuestos más comunes que utilizan las bacterias sulfoxidantes son el sulfuro de hidrógeno, el azufre elemental y el tiosulfato; en condiciones adecuadas de crecimiento el producto final de la oxidación es el sulfato. Sin embargo, en el caso del sulfuro y del tiosulfato, bajo ciertas condiciones de cultivo, es posible observar azufre elemental como producto de la oxidación parcial de estos compuestos (Alcántara, 2000).

Hay una gran variedad de bacterias sulfoxidantes con diferentes propiedades morfológicas, ecológicas y fisiológicas, asimismo con diferentes requerimientos ambientales para su crecimiento. En la tabla I.3 se citan algunos microorganismos con capacidad sulfoxidativa.

<i>PH</i>	<i>DONADOR DE ELECTRONES</i>	<i>GÉNERO Y ESPECIE</i>
6-8	H ₂ S, S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻	<i>Thiobacillus thioparus</i>
6-8	H ₂ S, S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻	<i>Thiobacillus denitrificans</i>
6-8	H ₂ S, S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻	<i>Thiobacillus neopolitanus</i>
2-5	S ⁰	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
1.4-4	S ⁰ , H ₂ S, Fe ²⁺ , Sulfuros metálicos	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>

Tabla I.3 Diferentes especies del Género *Thiobacillus* (Madigan y col. 1998)

La mayor parte de los conocimientos fisiológicos de estos microorganismos proviene del estudio de un número limitado de géneros. Los Thiobacilli, son los mas estudiados debido a que pueden cultivarse fácilmente en el laboratorio.

El género *Thiobacillus*, está integrado por microorganismos aerobios y anaerobios facultativos. Siendo bacterias Gram-negativas con forma de bacilos pequeños que miden de 0.3 µm de ancho por 1-3 µm de largo. Llegan a ser móviles por la presencia de un flagelo polar sencillo. No son microorganismos formadores de esporas y crecen entre los 25-35°C; algunas especies son capaces de vivir en ambientes altamente ácidos.

Pueden utilizar el hierro como una fuente alternativa de energía y algunas son capaces de llevar a cabo la desnitrificación y utilizar al nitrato como último aceptor de electrones.

I.2.2 El sistema de transporte de electrones en *Thiobacillus*

Los microorganismos quimiolitotróficos, pertenecientes al género *Thiobacillus* contienen todos los componentes del transporte de electrones para enlazar el NAD(P) al oxígeno, debido a que su metabolismo endógeno básico es similar al de cualquier otra bacteria.

En el sistema de transporte de electrones de los Thiobacilli se ha encontrado que las oxidaciones del azufre no reducen directamente el NAD⁺ y que la reducción de este, requiere de un flujo de electrones dependiente de energía, desde los citocromos hasta el NAD.

Los electrones de las oxidaciones de azufre entran a la cadena respiratoria a nivel del citocromo c en Thiobacilli aerobios, pero en *Thiobacillus denitrificans* entran a nivel de la flavina o del citocromo b.

Algunos experimentos como los de Kelly (1982), señalan que posiblemente por cada par de electrones transportados, existen dos sitios para el acoplamiento de la síntesis de ATP en *Thiobacillus denitrificans* y solamente uno para los Thiobacilli aerobios. Sugiriendo que el crecimiento es mayor para *Thiobacillus denitrificans* que para los Thiobacilli aerobios (Alcántara, 2000).

Las observaciones importantes de los experimentos de Kelly (1982) respecto al sistema de transporte de electrones del metabolismo de tiosulfato en *Thiobacillus denitrificans* se pueden señalar:

- El uso de inhibidores del transporte de electrones y mediciones directas de la reducción de citocromos indican que la reducción de nitrato se da por una reductasa dependiente de sulfito, mientras que la oxidación de sulfuro hacia el poli azufre unido a membrana, esta enlazado al citocromo c vía citocromo c₅₅₁ de nitrato reductasa; no ha sido establecido un mecanismo para el transporte de electrones durante la oxidación de poli azufre a sulfito.

- La nitrito reductasa puede transferir alternativamente electrones al oxígeno.
- Se propuso que la ATP sulfurilasa, más que la ADP sulfurilasa, es la enzima terminal de la ruta.

I.2.4 Rutas bioquímicas de la oxidación de algunos compuestos reducidos de azufre.

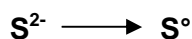
Kelly y col. (1997), sostienen que posiblemente existen 2 procesos básicos de oxidación de compuestos reducidos de azufre (azufre, sulfuro y tiosulfato):

- Un mecanismo involucra la formación de politionatos, presente en todos los Thiobacilli que son quimiolitotróficos obligados y otros Thiobacilli verdaderos como *Thiobacillus acidophilus*.
- El segundo mecanismo, no involucra la formación de politionatos observado en *Paracoccus sp.*, *Thiobacillus versutus* y posiblemente *Thiobacillus novellus* y *Thiobacillus tepidarius*. Es probablemente que la ruta encontrada en *Paracoccus* prevalezca en los heterótrofos facultativos tales como *Paracoccus sp.*

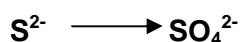
I.2.4.1 Sulfuro (H₂S).

De las diferentes vías reportadas para la oxidación de sulfuros se pueden dividir en 2 tipos de reacción:

- a) La generación de azufre elemental como producto



- b) La generación de sulfato como producto



La oxidación de H₂S se presenta extracitoplásmicamente, Hooper y DiSpirito (1985), ya que se observa la precipitación de azufre elemental en el medio de crecimiento.

La sulfuro oxidasa en el caso de Thiobacilli, se localiza en la fracción de membrana, confirmándose que las condiciones ambientales son determinantes para la oxidación parcial de sulfuro de azufre en azufre elemental por la oxidación biológica aerobia del sulfuro (Janssen, 1997).

El sulfuro puede ser oxidado directamente a sulfito y este a su vez a sulfato:



La enzima que lleva a cabo este tipo de oxidación es una sulfito reductasa, purificada de *Thiobacillus denitrificans* (Schedel y Trüper, 1979), sin embargo su sitio de localización es incierto ya que esta reacción origina 6 protones al agua, por lo que se ha propuesto que se encuentra en el periplasma (Hooper y DiSpirito, 1985).

1.2.4.2. Azufre

Este compuesto es oxidado a sulfato por vía del sulfito:



Se creía que el tiosulfato y los politionatos podrían ser los productos finales o intermediarios de la oxidación, pero en la actualidad se sabe que estos compuestos son resultado de reacciones químicas entre el azufre y un intermediario como el sulfito. Para la oxidación del azufre es necesario el contacto directo entre las células y las partículas sólidas de azufre. Por lo tanto el mecanismo de adhesión de las bacterias a los gránulos de azufre, involucra la presencia de grupos tioles en la envoltura celular, esto se ha observado en la presencia de compuestos que pueden inhibir esta adhesión, como el bisulfuro de carbono, provocando la disminución de la oxidación del azufre.

El sistema enzimático involucrado con la oxidación del azufre se ha clasificado de acuerdo a su localización intracelular, su requerimiento de cofactores y sensibilidad al oxígeno:

- a) Enzimas solubles del tipo oxigenasas (azufre oxidasas) reportadas en *Thiobacillus teoparus*, *T. Novellus* y *T. thiooxidans* .

b) Un Sistema multienzimático de membrana, reportado en *T. ferrooxidans*.

Las enzimas del tipo oxigenasas, contienen hierro. Cuando están solubles, requieren de glutatión reducido para su actividad.

En el sistema multienzimático, se identificaron 3 fracciones necesarias para la oxidación: una fracción de membrana, una fracción soluble y un cofactor piridin nucleótido (Corbett y col, 1987).

1.2.4.3 Tiosulfato.

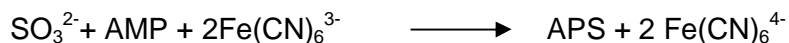
Las enzimas involucradas en la oxidación del tiosulfato han sido llamadas sistema multienzimático de tiosulfato TOMES (Por su siglas en ingles), caracterizado bioquímicamente permitiendo aclarar el sistema de oxidación del tiosulfato, Kelly, 1997.

Dicho sistema multienzimático, esta compuesto por una enzima que se une al tiosulfato (Proteína A, 16 KDa), la cual se une a una mol de enzima por una mol de tiosulfato, interactuando con una segunda enzima (Proteína B, 61 kDa) y citocromos c_{551} (260 kDa) conteniendo 4 ó 5 grupos hemo y c_{552} (56 kDa, conteniendo 3 grupos hemo) para llevar a cabo la producción estequiométrica de sulfato a partir de tiosulfato. Es necesario la presencia de los 4 componentes del sistema para la oxidación del tiosulfato y cada uno de los componentes comprende del 1 al 2 % del total de la proteína celular.

1.2.4.4 Sulfito

Asimismo, se ha encontrado que 2 sistemas enzimáticos catalizan la oxidación del sulfito a sulfato. La sulfito oxidasa es una molibdo-proteína ligada a la membrana y transfiere electrones al citocromo c, además la enzima APS-reductasa (Adenosina 5-fosfosulfatasa) dependiente de AMP, presente en muchas bacterias del azufre, presenta funciones de citocromo como aceptor de electrones; el APS formado es convertido favorablemente en sulfato y ADP.

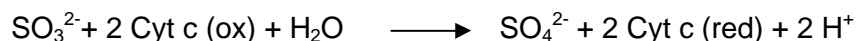
La oxidación del sulfito a sulfato vía APS es acompañado por la fosforilación a nivel de sustrato AMP-ADP y generalmente es medida por la reducción dependiente de AMP de ferrocianuro o ferrocitocromo c en presencia de sulfito:



El potencial redox de la segunda reacción ($E_0=60$ mV), es suficiente para reducir tanto el ferrocianuro como el ferricitocromo c, aunque no se conoce el aceptor fisiológico de electrones. (Lyric y Suzuki, 1970).

I.2.4.4.1 Oxidación de Sulfito libre de AMP

El sulfito, puede ser oxidado sin requerir AMP: La enzima reduce, estequiométricamente, ferrocianuro o citocromo c por la oxidación de sulfito de acuerdo a la siguiente reacción.



Lyric y Suzuki, 1970, demostraron que el citocromo c_{551} es parte integral de la enzima ya que la separación de este citocromo de la enzima purificada, provocó la pérdida completa de la actividad, confirmando, que los electrones son transferidos del sulfito al oxígeno molecular a través de la reductasa sulfito-citocromo c, c_{550} (Yamanaka y col. 1981).

I.3. Rutas de oxidación de compuestos reducidos de azufre.

Las bacterias del azufre pueden utilizar sulfuro, azufre elemental o tiosulfato como donadores de electrones. Las rutas por las cuales se lleva a cabo la oxidación hasta sulfato se muestran en la figura 1.2

Reacciones indicadas en la Figura 1.2:

- 1) Oxidación del sulfuro a polisulfuro de azufre | S |
- 2) Conversión del azufre elemental (S^0) a polisulfuro de azufre | S |
- 3) Oxidación de tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$), por un complejo multienzimático, hasta SO_4^{2-} .
- 4) Sulfuro oxidasa (|S| \rightarrow SO_3^{2-})
- 5) Sulfito oxidasa (SO_3^{2-} \rightarrow SO_4^{2-})
- 6) APS reductasa (SO_3^{2-} \rightarrow AMP)
- 7) ADP- sulfurilasa (AMP \rightarrow SO_4^{2-})
- 8) Rutas de transferencias de electrones (secc. I.2.2.)

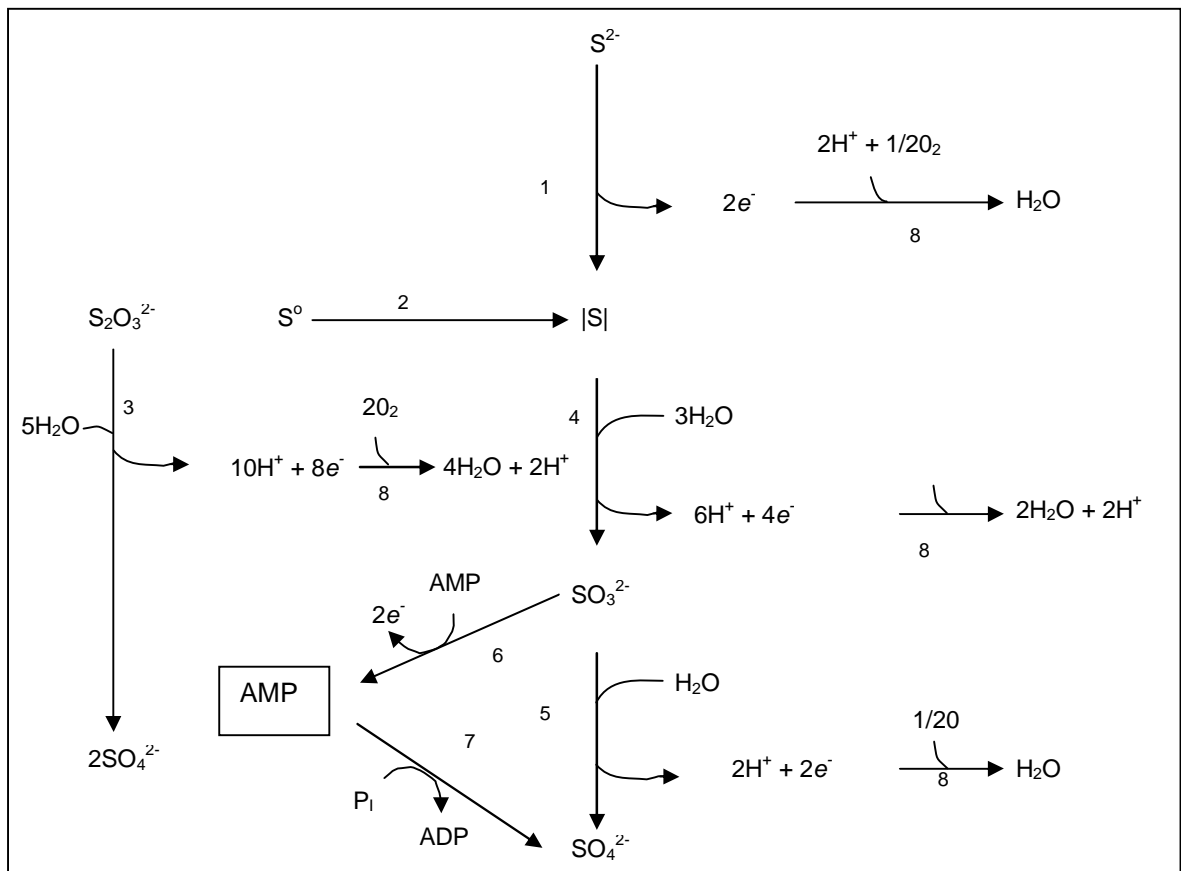


Figura I.2 Rutas de oxidación de compuestos reducidos de azufre en organismos quimiolitotróficos (Gottschaik, 1985).

El aceptor de electrones en Thiobacilli aerobios, es un citocromo *c* y para los Thiobacilli facultativos es una flavoproteína que está ligada al citocromo *c* vía citocromo *b*.

Los Thiobacilli facultativos presentan un mayor crecimiento que los aerobios, debido a que estos, pueden tomar ventaja de una extracción adicional de protones debido a que presentan un sitio adicional entre la flavoproteína y el citocromo *c*.

Generalmente, los Thiobacilli crecen bien con tiosulfato como fuente de energía y la forma en que el tiosulfato es incorporado a la ruta de oxidación del azufre es por medio de la **rodanasa** ya que ésta enzima, rompe el tiosulfato en azufre elemental y sulfito; la acción de la enzima reductora del tiosulfato produce sulfito y sulfuro (recientemente se ha descrito un complejo multienzimático oxidativo del tiosulfato), originando 2 sulfatos sin la acumulación de intermediarios libres (Gottschalk, 1986).

Existe una clasificación de microorganismos, dependiendo de la fuente de carbono orgánica que utilicen:

I.4. Quimiolitotróficas.

Se denomina así, al grupo de bacterias que tienen la capacidad de crecer en medios minerales utilizando como fuente de energía al sulfuro y otros compuestos reducidos de azufre produciendo sulfato y usando al oxígeno como aceptor final de electrones en condiciones aerobias y el nitrato como aceptor final de la cadena de transporte de electrones en condiciones anaerobias.

Obtienen energía por la fosforilación en el transporte de electrones y el CO₂ lo fijan a través del ciclo de Calvin, utilizándolo para generar material celular, el NADPH necesario para la fijación del CO₂ es formado por el transporte de electrones en reversa.

La oxidación de compuestos reducidos de azufre origina una alta producción de protones y el incremento en la concentración de estos provoca la disminución del pH del medio por lo tanto el medio es acidificado y los H^+ reaccionan con el SO_4 del medio formando H_2SO_4 durante el crecimiento llegando, en el caso de ciertas especies de *Thiobacillus* a valores de pH menores que 1 (Kelly y 1997).

I.4.1 Quimiolitótrofos facultativos.

Son aquellos microorganismos que tienen la capacidad de crecer con una fuente inorgánica de energía y CO_2 como única fuente de carbono, o bien heterotróficamente con compuestos orgánicos que les proporcionan carbono, mientras que a partir de los compuestos inorgánicos obtienen electrones para la generación de energía (mixotrofia) En algunas ocasiones, pueden utilizar simultáneamente dos o más rutas metabólicas para la obtención de energía y del carbono, perdiendo en algunos casos la capacidad quimiolitótrofa.

I.4.2 Quimiolitótrofos obligados.

Bacterias altamente especializadas, que requieren de compuestos inorgánicos como fuente de energía y obtienen su carbono a partir de fijar CO_2 por medio del ciclo de Calvin; utilizando para ello el flujo inverso de electrones para la generación de poder reductor NADPH (Prosser, 1989).

I.5. Estructura de la envoltura celular de las bacterias gram-negativas.

Presentan una membrana extra alrededor de la capa de peptidoglicanos (Figura I.3) que se sitúa entre la membrana externa y la membrana citoplasmática, llamada espacio periplasmico, muy similar a aquella de la membrana lisosomal de eucariontes; este espacio periplasmico tiene un papel vital para el crecimiento celular y puede representar entre el 20 y 40% de la masa celular (Ferguson, 1991).

El periplasma, mide aproximadamente 150 Å; éste, se presenta como una fase gel que contiene peptidoglicanos y es ahí dónde se localizan numerosas proteínas que están relacionadas con el transporte de electrones. **Casi todos los citocromos se encuentran en el periplasma.** Los citocromos *b*, *a*, *aa₃*, otras oxidasas y otros acarreadores de electrones y protones, enzimas como la ATP-asa, están localizados en la membrana citoplasmática.

La membrana externa confina las enzimas periplasmicas y las estructuras proteínicas del periplasma (proteínas del transporte de electrones, proteínas de la fosforilación oxidativa); asimismo, proporciona canales específicos y no específicos para aquellos nutrientes y iones requeridos para el crecimiento, los cuales son transportados por difusión pasiva ya que todos los sistemas confina de transporte activo de nutrientes están localizados en la membrana citoplasmática.

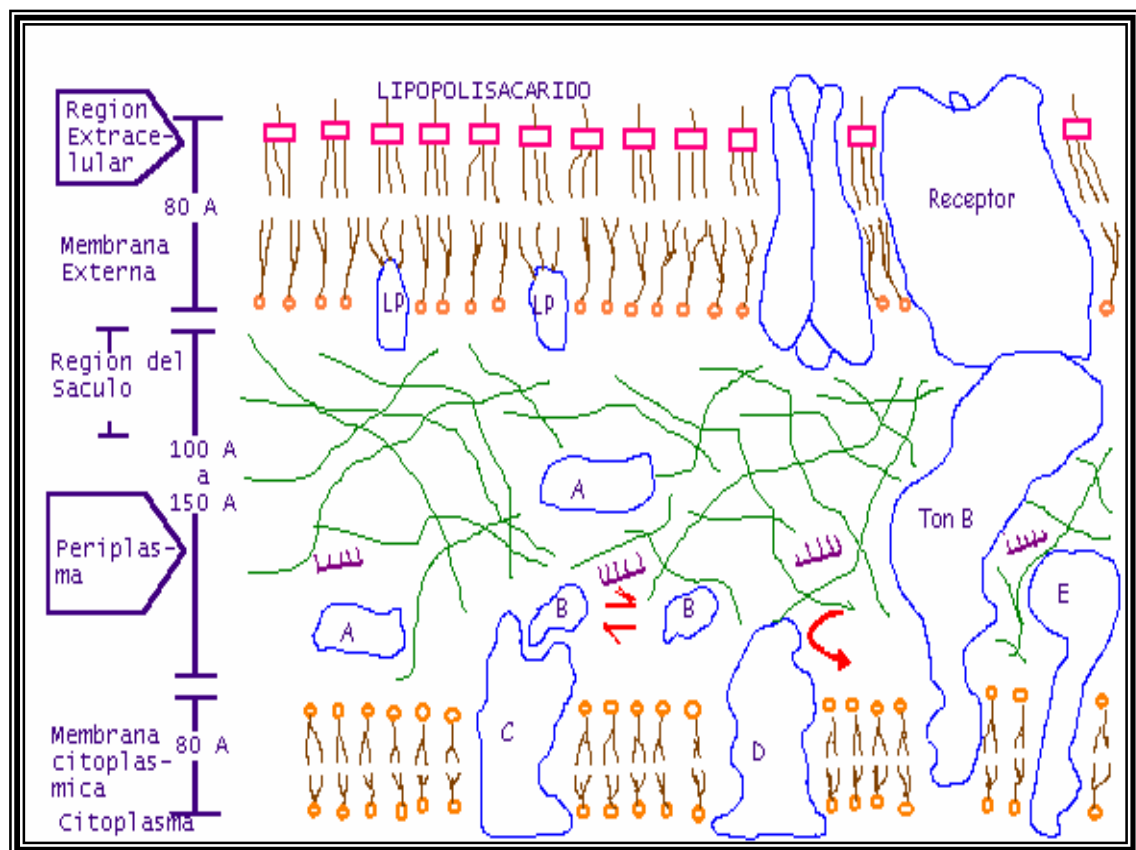


Figura I.3 Estructura celular de Thiobacilli (Alcántara, 2000).

Esta membrana, está compuesta principalmente por lipopolisacáridos que se encuentran exclusivamente en esta membrana, cuya función además de prevenir la entrada de ciertos compuestos, es desempeñar un papel importante en la interacción con el ambiente de la célula.

La energía necesaria para llevar a cabo sus funciones la obtienen de la oxidación de uno o más compuestos reducidos de azufre.

I.6 Mecanismo de Fijación de CO₂

I.6.1 Asimilación de CO₂.

Las bacterias quimiolitotróficas, como los Thiobacilli utilizan la energía derivada de la oxidación de compuestos inorgánicos como el azufre para producir ATP y por su hidrólisis pueden fijar CO₂ que es reducido. Los coenzimas que aceptaron electrones de los substratos inorgánicos oxidados, convierten así el CO₂ asimilado, en material celular.

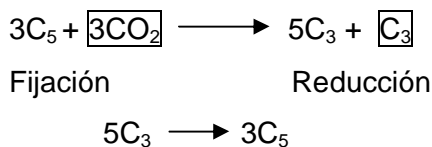
Estos microorganismos, también son llamados C-autótrofos, cuando utilizan al CO₂ como única fuente de carbono. El mecanismo por el cual llevan a cabo la fijación del CO₂ es el ciclo de Calvin.

I.6.2 Reacciones del ciclo de Calvin.

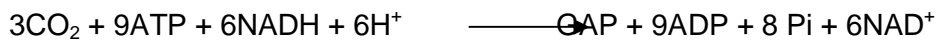
La reacción de fijación del CO₂ es por medio de la enzima **ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa** formándose como producto primario el 3-fosfoglicerato. Un grupo carbonilo de las 2 moléculas del 3-fosfoglicerato formado es originado del CO₂. Las siguientes 2 reacciones que se llevan a cabo sirven para reducir el grupo carboxilo del 2-fosfoglicerato, transformándose en aldehído. Las enzimas involucradas son **fosfoglicerato cinasa y gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa**.

El proceso de fijación y reducción de CO_2 , conlleva la conversión de 1 molécula de ribulosa-1,5- difosfato en 2 moléculas de gliceraldehído-3-fosfato; si al final el CO_2 es únicamente usado para la biosíntesis, el proceso de fijación podría sufrir un paro debido a un déficit de ribulosa-fosfato, por tanto un tercer proceso deberá seguir: la regeneración del aceptor del CO_2 , esto involucra una serie de reacciones en las cuales, primero parte del gliceraldehído 3 fosfato es convertido en fructosa 6 fosfato por acción de las enzimas triosa fosfato isomerasa, fructosa 1-6 bisfosfato aldolasa y la fosfatasa; entonces, la 1 fructosa 6 fosfato, 2 gliceraldehído 3 fosfato y 1 dihidroxiacetona fosfato, reaccionan uno con otro para producir 2 xilulosa-fosfato y 1 ribosa fosfato.

El balance de carbono del ciclo completo puede describirse:



La cantidad de ATP y NADH necesario para la formación de un gliceraldehído-3-fosfato (GAP) de CO_2 son aparentemente como en la siguiente ecuación:



Observar la figura 1.4 dónde se propone un diagrama para la asimilación del CO_2 acoplada a la oxidación del tiosulfato.

(Gottschaaik, 1985)

La respiración puede ser aerobia o anaerobia, dependiendo del aceptor final de electrones. En la cadena de transporte de electrones, los electrones son transferidos al aceptor final a través de complejos multienzimáticos ligados a la membrana los cuales pueden limitar dicha cadena de transporte; la energía generada durante el transporte de electrones produce un gradiente electroquímico de protón que se establece a través de la membrana citoplasmática. La ATP-sintetasa, una enzima integral de la membrana, sintetiza ATP por medio del gradiente electroquímico de protón.

Después de varios años de investigación se logró determinar que el transporte de electrones, el crecimiento de las bacterias quimiolitotróficas y la oxidación de compuestos reducidos del azufre están relacionados, (Kelly y col, 1997) .

Cuando se utilizan algunos compuestos que funcionan como inhibidores de la cadena respiratoria, se afecta el crecimiento microbiano como resultado de la inhibición del sistema de transporte de electrones. Al saturarse el sistema de transporte de electrones, la oxidación de los compuestos reducidos se lleva a cabo a menor velocidad permitiendo la acumulación de azufre elemental. Gracias a estos efectos, varios autores, entre los que destacan Lyric y Suzuki (1970) lograron establecer la ruta bioquímica de la oxidación del sulfito y tiosulfato.

Existen inhibidores que bloquean el transporte electrónico entre la NADH y la ubiquinona como son: la piercicina, el amital y la rotenona; estos inhibidores posiblemente actúan sobre la NADH-deshidrogenasa. Otro inhibidor característico es la antimicina A, que bloquea el transporte de electrones entre el citocromo b y el citocromo c. Una última clase de inhibidores, bloquea el transporte electrónico desde el citocromo aa₃ hacia el oxígeno, en este grupo se encuentra el cianuro, el sulfuro de hidrógeno y el monóxido de carbono (Lehninger, 1983, Madigan y col. 1998) por lo tanto el cianuro es un inhibidor de cadena respiratoria en la etapa final del transporte de electrones.

I.7 Cadena respiratoria.

Intervienen 5 complejos:

I.7.1 Complejo I

NADH (UBIQUINONA ÓXIDO-REDUCTASA)

Este complejo, cataliza la transferencia de electrones del NADH a la ubiquinona y homólogos artificiales (ferricianuro). Sé le conoce como sitio I de acoplamiento, debido a que la reducción de la ubiquinona está acoplada a la translocación de protones.

I.7.2 Complejo II.

SUCCINATO: UBIQUINONA ÓXIDO-REDUCTASA

Está compuesta por dos subunidades: la succinato deshidrogenasa (SDH) y un citocromo tipo b.

A diferencia de los complejos I, III y IV de la cadena oxidativa, éste complejo no es capaz de translocar protones sino que únicamente transfiere electrones, es decir, este es el único complejo de la cadena que no está acoplado a la formación del gradiente de protones. Éste complejo, cataliza la transferencia de electrones de succinato a la ubiquinona.

I.7.3 Ubiquinona y Complejo III

UBIQUINOL: CITOCROMO c ÓXIDO-REDUCTASA.

La ubiquinona es un transportador rédox móvil que conecta los complejos I y II con el complejo III por su rápida difusión en la membrana. Es altamente insoluble en agua.

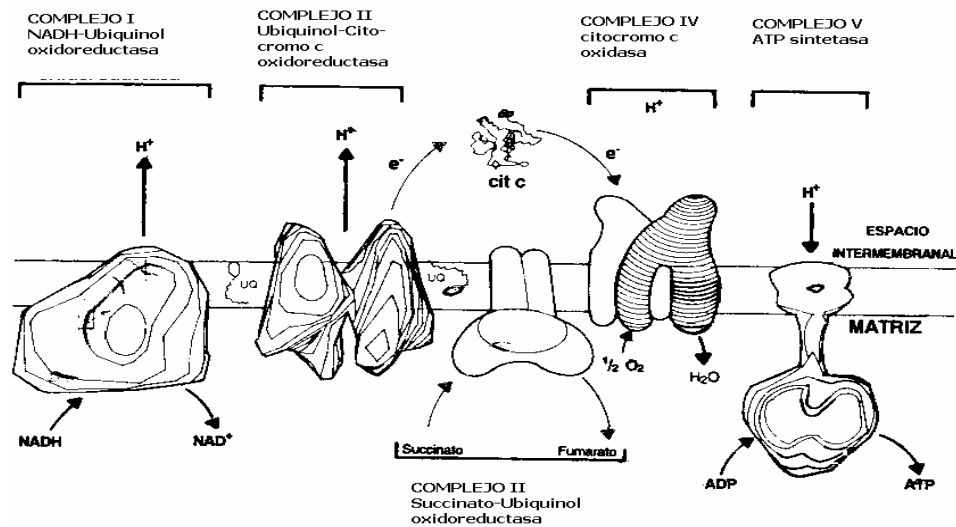


Figura 1.4 Complejos membranales que intervienen en la cadena respiratoria

Gonzalez-Halphen 1990.

El complejo bc_1 cataliza la oxidación del ubiquinol (UQH_2 o QH_2) y la reducción del citocromo c . Observar la figura 1.5

A este sitio de la cadena respiratoria se le denomina **sitio II de acoplamiento** debido a que la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo c está acoplada a la translocación de protones a través de la membrana, lo que genera un gradiente electroquímico de protones.

La transferencia de electrones se realiza desde un donador de $2 e^-$ y $2 H^+$ hasta un aceptor de $1 e^-$.

I.7.4 CITOCROMO C

Funcionan como acarreadores de electrones, debido a que son proteínas solubles que tienen unido un grupo hemo.

La superficie del citocromo c es positiva. Posiblemente la transferencia de electrones se realice cuando los grupos hemo del citocromo c y los de citocromo c_1 del complejo III o la subunidad II de la citocromo oxidasa, estén en la orientación y proximidad adecuadas. Por lo tanto, las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas juegan un papel muy importante. La velocidad con que la oxidación del citocromo c se lleve a cabo depende de la facilidad con que el citocromo c pueda llegar al sitio donde va a ser oxidado.

I.7.5 Complejo IV CITOCROMO C OXIDASA.

Los conocimientos que se han obtenido sobre la estructura y función de esta enzima son todavía muy controversiales.

Es una hemo y Cu-proteína, que cataliza la reducción de una molécula de oxígeno hasta agua, reacción acoplada a la formación de un gradiente electroquímico de protones.

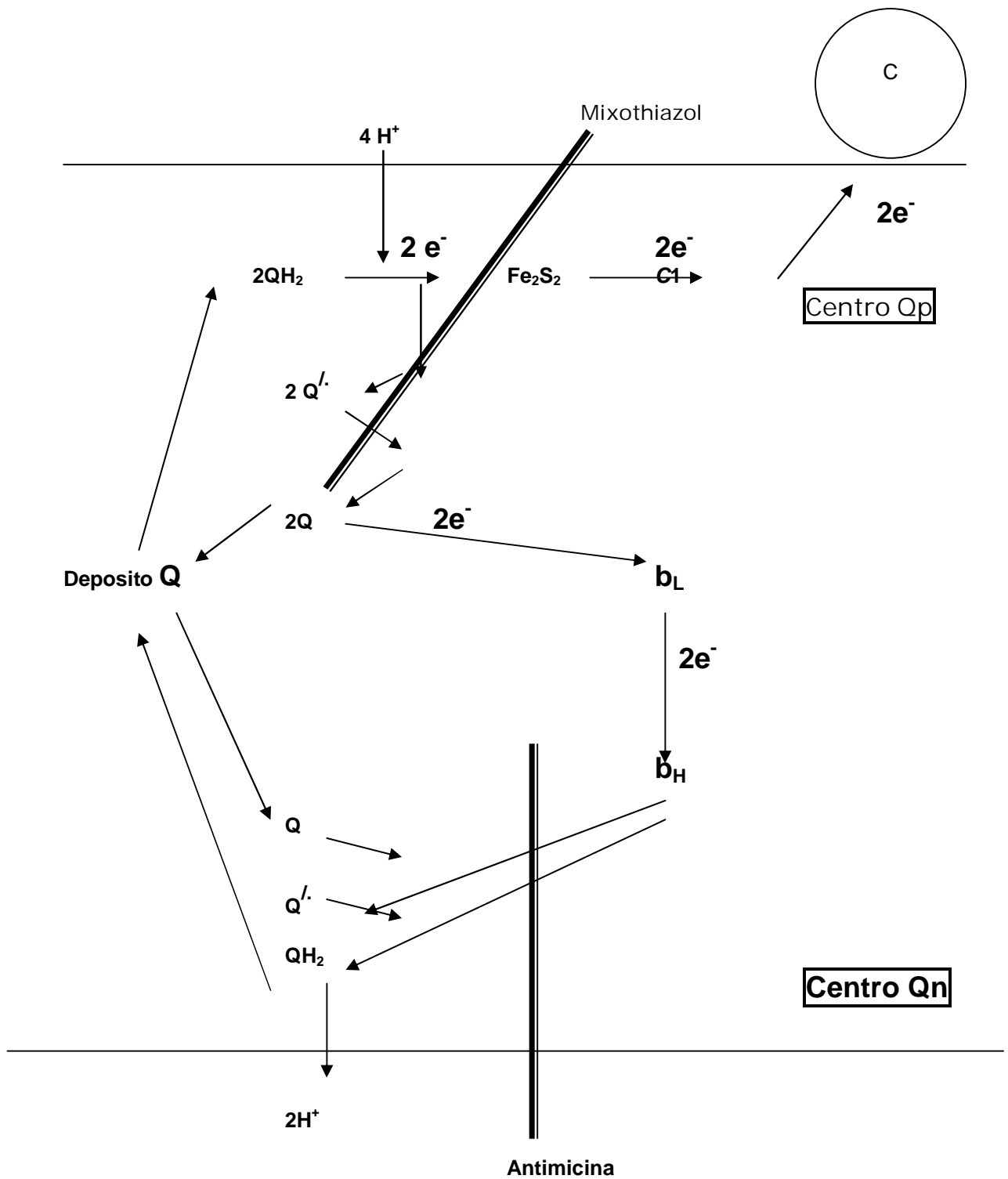


Figura 1.5 Esquema del ciclo Q de transferencia de electrones en el complejo III
Link T.A. y col. (1993)

La citocromo *c* oxidasa de procariontes es más sencilla, ya que sólo posee tres subunidades (I, II y III) homólogas a las subunidades codificadas en la mitocondria de eucariontes.

El complejo IV es la enzima que oxida al citocromo *c* y termina la cadena respiratoria reduciendo al oxígeno hasta agua. Además genera un gradiente electroquímico de protón, por que se le considera el sitio III de acoplamiento.

Los cuatro pasos que reducen al oxígeno involucran un electrón a la vez; y esta reducción está acoplada al bombeo de protones.

Existen buenas razones para pensar que la citocromo *c* oxidasa debe estar bajo un estricto control celular, ya que de todo el proceso de la cadena oxidativa, el complejo IV es el que cataliza el único paso esencialmente irreversible.

I.7.6 Complejo V ATP-SINTETASA

También llamada complejo F_0-F_1 o bomba de protones ATP-asa, no forma parte de la cadena oxidativa, sino que está acoplada a los anteriores complejos para llevar a cabo la fosforilación oxidativa; es decir, no realiza reacciones de óxido-reducción, sino que utiliza la energía del gradiente electroquímico de protón generado por la cadena respiratoria, para sintetizar ATP a partir de ADP y P_i . Esta enzima se ubica en la membrana plasmática.

Se le conoce como osmoenzima y realiza su actividad en dos partes:

- Actúa como fosfotransferasa, transfiriendo un grupo fosforilo del ATP a un ácido aspártico en algún lugar del sitio catalítico.
- Actúa como fosfohidrolasa con respecto al aspartil fosfato interno.

Los desacoplantes colapsan el potencial electroquímico de protón generado por la cadena oxidativa interfiriendo con la síntesis de ATP.

I.8 Acoplamiento energético

En la cadena respiratoria, los complejos I al IV, únicamente se encargan de transferir electrones desde el NADH hasta el O₂ y de translocar protones de la matriz hacia el espacio intermembranal y que el complejo V se encarga de sintetizar al ATP a partir de ADP y fosfato y que de ninguna manera dicha síntesis está acoplada al funcionamiento de los cuatro complejos que lo preceden.

I.9 Citocromos

Son un importante constituyente de los sistemas de transferencia de electrones.

Son hemoproteínas cuya función esta relacionada con el cambio de valencia del hierro. Diferentes tipos de grupos hemo son llamados grupos prostéticos de los citocromos.

Las diferentes propiedades de los citocromos dependen de los diferentes grupos hemo, haciendo necesario conocer la estructura y propiedades de los hemos en cada caso.

Los hemos son complejos porfirínicos de hierro y estos son de diferente tipo, los cuales tienen diferentes cadenas de porfirinas alineadas.

Los grupo hemo de citocromos ya conocidos son: hemo a, protohemo IX, hemo c, variante del hemo c, hemo d, hemo d₁ y hemo o.

Para determinar de que tipo de citocromo se trata se puede hacer uso del espectro de absorción ya que la posición del pico λ del hemocromo es característico de cada hemo, lográndose identificar el tipo de hemo (hemoproteína) definiendo la posición del pico α de la piridina ferrohemocromo.

1.10 Producción de energía por el acoplamiento entre el transporte de electrones, la fijación de CO₂ y la generación de ATP

(Aleem, M.I.H. 1977)

Elsden y Bauchop (1960) concluyeron que la cantidad de crecimiento de un microorganismo es proporcional a la cantidad de ATP que puede ser obtenido de la mineralización de la fuente de energía en el medio de crecimiento.

Asimismo, postularon el coeficiente Y_{ATP} , definiéndolo **como la cantidad de gramos de peso seco producido por mol de ATP.**

El Y_{ATP} es influenciado por las condiciones de crecimiento, la composición del medio de crecimiento y la presencia o ausencia de factores de crecimiento.

1.10.1 Relación entre la energía de mantenimiento y el Y_{ATP} .

El crecimiento de las bacterias como el de todos los organismos vivos, requiere de una cierta cantidad de energía para el mantenimiento de los procesos vitales. La energía de mantenimiento es necesaria para el ciclo de constituyentes celulares, la conservación de la composición adecuada de la fuerza iónica y el pH intracelular así como el mantenimiento de un conjunto de metabolitos intracelulares contra un gradiente de concentración.

Pirt (1965), postuló una ecuación relacionando el rendimiento de crecimiento molar y la velocidad específica de crecimiento, asumiendo que durante el crecimiento, el consumo de la fuente de energía es por una parte dependiente del crecimiento y por la otra independiente de él:

$$1/Y = m_s/\mu + 1/Y^{MAX} \quad (1)$$

Dónde:

Y es el rendimiento del crecimiento molar por sustrato.

m_s es el coeficiente de mantenimiento (mol de sustrato por gramos de peso seco h^{-1}).

μ es la velocidad específica de crecimiento.

Y^{MAX} es el rendimiento de crecimiento molar por sustrato corregido con la energía de mantenimiento.

La cantidad de fuente de energía usada independientemente del crecimiento es llamada por definición el **coeficiente de mantenimiento**.

Frecuentemente los estudios de los valores del rendimiento Y graficados no presentan un comportamiento lineal esperado, debido a que este comportamiento es afectado directamente por la velocidad específica de crecimiento μ y la producción de ATP por el organismo en estudio; por lo tanto si en la ecuación (1) se reemplazan Y y Y^{MAX} por Y_{ATP} y $Y^{MAX-ATP}$ y multiplicando estos cambios por μ se obtiene:

$$q_{ATP} = \mu/Y_{ATP} = \mu/Y^{MAX-ATP} + m_e \quad (2)$$

En esta ecuación

$Y^{MAX-ATP}$ es el rendimiento del crecimiento por mol de ATP corregido por la energía de mantenimiento;

q_{ATP} es la velocidad específica de producción de ATP (mol de ATP por gramo de peso seco por h^{-1}).

m_e es el coeficiente de mantenimiento (mol ATP por gramo de peso seco h^{-1}).

De la ecuación 2 podemos observar que q_{ATP} es una función lineal de μ y que Y_{ATP} es dependiente de la velocidad de crecimiento. Es importante considerar la naturaleza de la fuente de carbono necesaria para la elaboración del material celular ya que esto influye en el valor teórico de $Y^{MAX-ATP}$ (Stouthamer, A.H. 1977).

De los experimentos realizados en condiciones aerobias (Vries y col. 1970; Watson, 1970; Hempfling y Mainzaer 1975), se ha observado que los valores de Y_o (gramo de peso seco por gramos de átomos de oxígeno consumidos durante el crecimiento).

Son muy pequeños cuando el medio de crecimiento utilizado contiene sustratos simples, como sales minerales, en comparación con los valores obtenidos para medios de crecimiento dónde el sustrato es glucosa.

Esta diferencia puede ser explicada por los altos requerimientos de ATP para la formación de material celular y debido a que con sustratos simples esta producción de ATP es relativamente baja, el crecimiento se ve afecta por la relación que se da entre la producción de ATP y el consumo de este por la energía de mantenimiento.

1.10.2 Energía de mantenimiento, teórica y experimental acoplada a la energética.
(Aleem, M.I.H. 1977)

En la mayoría de los casos experimentales (Stouthamer A.H. 1977), se ha presentado una gran discrepancia entre los valores experimentales y los valores teóricos de $Y^{MAX-ATP}$, y esta discrepancia es resultado de que en muchos casos no todo el ATP producido en el catabolismo puede ser utilizado por los requerimientos de ATP para la síntesis de material celular.

La relación entre los valores experimentales y teóricos, la hicieron Stouthamer y Bettenhausen, (1975) con la ecuación siguiente:

$$q_{ATP} = \mu/Y^{MAX-ATP} + m_e = \mu/(Y^{MAX-ATP})_{teo} + m_s\mu + m_e \quad (3)$$

dónde:

$(Y^{MAX-ATP})_{teo}$ es el valor teórico.

$Y^{\text{MAX-ATP}}$ y m_e es la velocidad de crecimiento dependiente de energía requerida para otros propósitos como la formación de nuevo material celular.

Por lo tanto, esto sugiere que el valor de Y^{ATP} es alto en medios complejos en comparación con medio mínimos.

Senez (1962) , introdujo el término “ crecimiento desacoplado” para describir que bajo algunas condiciones el rendimiento del crecimiento es mucho menor que el esperado sobre la base de la producción de ATP. El crecimiento desacoplado ocurre bajo las siguientes condiciones:

- a) en un medio mínimo,
- b) en la presencia de compuestos inhibitorios,
- c) en medios que contienen cantidades mínimas de factores de crecimiento,
- d) por un exceso de la fuente de energía,
- e) Temperaturas por arriba de la óptima.

Por lo tanto, durante el crecimiento en un medio complejo, m_s es mucho menor que durante el crecimiento en un medio mínimo. Consecuentemente una gran proporción de la fuente de energía es usada por el mantenimiento de ciertos propósitos.

Esto indica que es un desbalance entre la velocidad de producción de ATP por el catabolismo y la velocidad de la utilización de ATP por el anabolismo bajo muchas condiciones de crecimiento. Evidentemente la capacidad de cada bacteria para regular los procesos celulares son insuficientes para regular la velocidad del catabolismo exactamente a las necesidades del anabolismo.

I.10.3 Acoplamiento de la producción de energía y la transferencia de electrones en bacterias quimiolitotróficas.

(Aleem, M.I.H. 1977)

Este tipo de bacterias tienen la capacidad de crecer en medios minerales de sales inorgánicas, conteniendo como sustratos, los donadores de electrones específicos, pequeñas cantidades de fosfato, magnesio, fierro, una fuente de nitrógeno como sulfato de amonio y dióxido de carbono o bicarbonato para que elaboren material celular.

En la mayoría de los casos el oxígeno molecular funciona como el último aceptor de electrones de la cadena respiratoria.

El conjunto de componentes celulares son formados del dióxido de carbono el cual es asimilado por el ciclo de la ribulosa-bifosfato carboxilasa involucrando dos enzimas llamadas **fosforibulocinasa y ribulosa-bifosfato carboxilasa**. La presencia de estas 2 enzimas caracteriza y diferencia a los quimiolitotróficos de los organismos heterotróficos.

La forma principal por la cual los organismos quimiolitotróficos generan su energía es a través de la fosforilación oxidativa aunque la fosforilación a nivel de sustrato puede contribuir significativamente a la sobreproducción de energía bajo condiciones quimiolitotróficas en compuestos inorgánicos de azufre.

La biosíntesis endergónica basada en el dióxido de carbono en quimiolitotróficos es ligeramente acoplada a las reacciones exergónicas de oxidación de compuestos inorgánicos, responsable de la generación de energía a través de la cadena de transporte de electrones, la eficiencia a la cual parece estar bajo el control directo del dióxido de carbono es una asimilación reductiva. Estos procesos están dirigidos a expensas de ATP y NADH, los cuales son generados dentro de la cadena de transporte de electrones durante la transferencia de electrones de un donador de electrones inorgánico al aceptor final de electrones, el cual preferentemente es el oxígeno bajo condiciones aerobias.

Los potenciales de oxidación-reducción de los sustratos son los que evidentemente determinan el número de moléculas de ATP producidas por par de electrones transferidos al oxígeno molecular. En todos los casos la reducción de NAD^+ por el sustrato donador de electrones es dependiente de energía e involucra una secuencia de fosforilación oxidativa en sentido contrario, a nivel de citocromos o flavo proteínas, dependiendo del sustrato.

Obviamente la función de la cadena de transporte de electrones con respecto hacia el frente y reversa del flujo de electrones es regulada por el estado de fosforilación de los nucleótidos de adenina y la relación del estado oxidado-reducido de los nucleótidos de piridina.

En las reacciones de oxidación de tiosulfato llevadas a cabo por bacterias pertenecientes al género *Thiobacillus*, Kelly y Syrett (1963 y 1966) observaron que la formación de ATP acoplada a la oxidación de tiosulfato tuvo un rendimiento en relación P/O de 0.8 en *T. neapolitanus* y de 0.9 para *T. novellus* .

Asimismo, observaron que la oxidación de tiosulfato acoplada a la fosforilación no fue afectada por inhibidores de la flavina o sitio 2 tales como la antimicina, concluyendo que solamente el sitio terminal de la cadena de transporte de electrones esta involucrada con la generación de energía ya que los electrones producidos por la oxidación del tiosulfato **entran a nivel del citocromo c para *T. neapolitanus*.**

Cole y Aleem, 1973, observaron que el mecanismo de oxidación del sulfuro en Thiobacilli puede estar acoplada a la formación de ATP con un rendimiento relativamente alto con una relación P/O de 1.4 en *T. novellus*.

1.10.4 Poder reductor.

(Aleem M.I.H. 1977)

Ya que la oxidación del tiosulfato en muchos de los Thiobacilli ocurre a nivel del citocromo C y el sulfuro y sulfito a nivel de la flavina, estos organismos tienen que generar poder reductor en la forma de NADH por una energía guiada en reversa de la transferencia de electrones. Los requerimientos de energía para la reducción de NAD⁺ por mol de tiosulfato es de 2.5 ATP equivalentes por equivalente de NAD⁺ reducido en *T. neapolitanus*, pero solamente un ATP equivalente en *T. novellus*.

De todos los datos obtenidos de la investigación bibliográfica se propone el siguiente diagrama de flujo donde se presenta la oxidación de tiosulfato acoplada a la asimilación de CO₂ y generación de ATP.

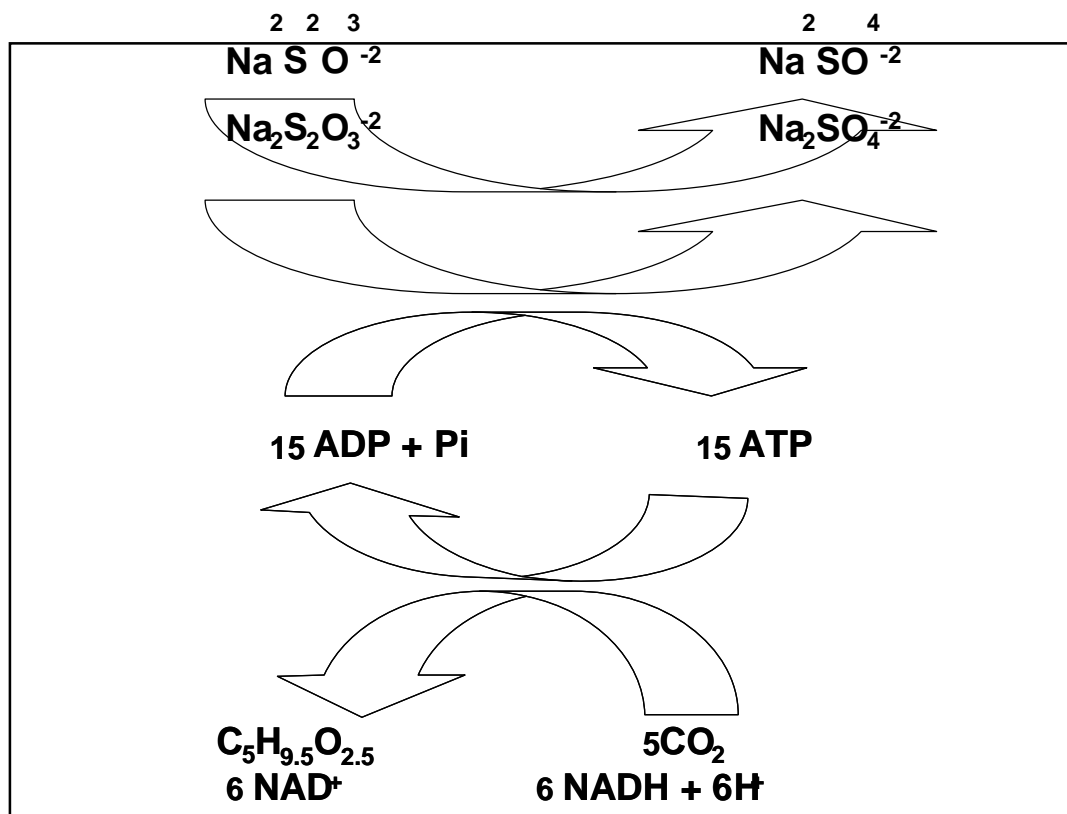


Figura 1.5 Diagrama del acoplamiento de la oxidación del tiosulfato con la generación de ATP y la asimilación del CO₂.

La figura es propuesta a partir de los datos obtenidos de:

Stouthamer A.H. y Gottschaik, G. 1985.

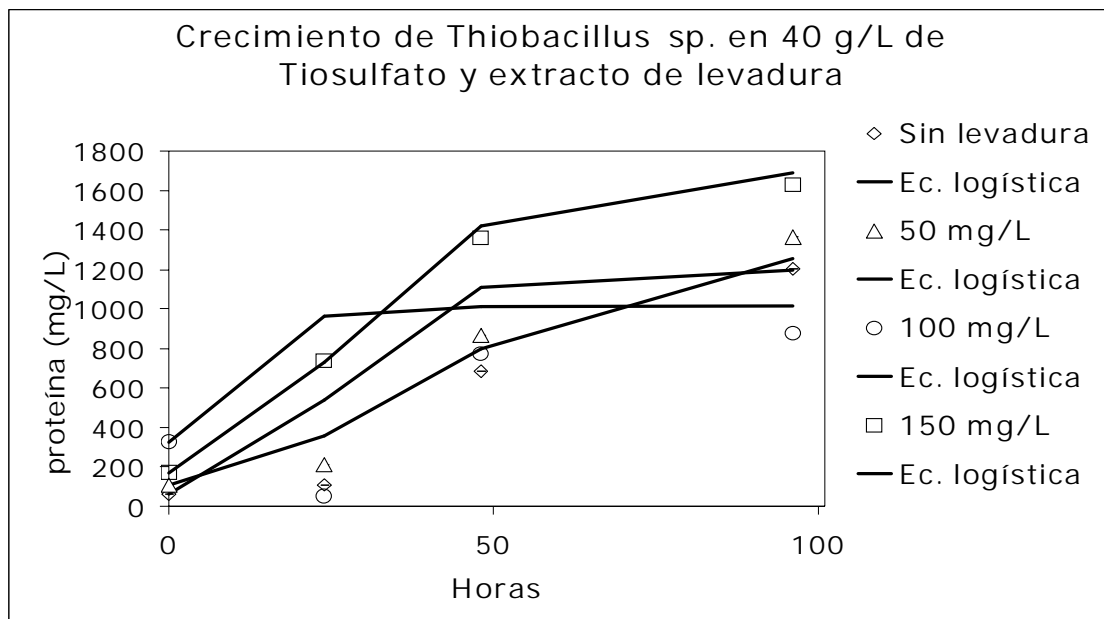


Gráfico 1 se presentan los datos ajustados con la ecuación logística.

II. Objetivos

II .1 Objetivos Generales

- Estudiar la cadena respiratoria de la cepa de *Thiobacillus* sp, en suspensiones celulares con diferentes velocidades de oxidación de compuestos reducidos de azufre en presencia de inhibidores y desacoplantes.
- Estudiar la oxidación de los compuestos reducidos de azufre en condiciones quimiolitotróficas usando un cultivo axénico de *Thiobacillus* sp.
- Estudiar el crecimiento en condiciones quimiolitotróficas utilizando un medio mineral en el cual se varía la fuente de energía y posteriormente suplementarlo con extracto de levadura.

II .2 Objetivos particulares

- Evaluar las tasas de oxidación biológica de tiosulfato, sulfito y sulfato, utilizando la técnica de respirometría.
- Evaluar la influencia de los inhibidores y desacoplantes de la cadena respiratoria durante la oxidación biológica de tiosulfato, sulfito y sulfuro.
- Evaluar el efecto de las diferentes fuentes de energía sobre el crecimiento del cultivo axénico.
- Evaluar el efecto del extracto de levadura sobre el crecimiento de *Thiobacillus* sp.

II .3 Hipótesis

1. El crecimiento de la cepa de *Thiobacillus* sp estará relacionada con su capacidad de oxidar a diversas especies de azufre (sulfuro, sulfito, y tiosulfato) dependiendo del potencial de óxido-reducción de cada una de dichas especies de azufre así como de la habilidad especializada del microorganismo para la oxidación del tiosulfato por el origen ecológico.
2. La acción fisiológica de distintos inhibidores y desacoplantes de la cadena respiratoria podría aclarar la zona de inserción de electrones de los sustratos de dicha cadena respiratoria.
3. La cepa de *Thiobacillus* sp requerirá de factores nutricionales complejos por haberse especializado para crecer en un consorcio microbiano y sus rendimientos máximos podrán explicarse en función de la oxidación del azufre.

III Materiales y Métodos

III .1 Material Biológico.

La cepa de *Thiobacillus* sp. fue aislada de un consorcio de microorganismos sulfoxidantes, que se tiene en un biolavador de lecho escurrido utilizado para la eliminación de bisulfuro de carbono y ácido sulfhídrico que ha estado en operación desde 1996, en condiciones aerobias y sin esterilidad.

De los estudios realizados por KAWASAKI L. 2001-2002 se sabe que esta cepa presenta características similares a las de *T. neapolitanus*, tiene una mayor facilidad para oxidar tiosulfato aunque también presenta actividad con sulfuros siempre y cuando se lleve a cabo un período previo de adaptación a este compuesto.

III .2 Medio de cultivo.

El medio de cultivo utilizado para crecer y propagar a los microorganismos es el descrito por Sublette (1987).

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN G/L
Na ₂ HP0 ₄	1.2
KH ₂ P0 ₄	1.8
MgSO ₄ -7 H ₂ O	0.1
NH ₄ Cl	0.5
CaC ₁₂	0.03
MnSO ₄	0.02
FeCl ₃	0.02
¹ NaHCO ₃	1.0

Tabla III.1 Composición del medio de cultivo.

¹* El NaHCO₃, se esteriliza por filtración y se adiciona cuando el medio de cultivo ya está frío.

Los microorganismos se crecieron en el medio de cultivo descrito en la tabla III.1, al cual se adicionaron las 3 diferentes fuentes de energía probadas (Sulfuro de sodio, en concentraciones de 0.5 y 1 g/L , mientras que para Tiosulfato de sodio y Sulfito de sodio se probaron concentraciones de 20 y 40 g/L).

El MnSO_4 y el MgSO_4 por encontrarse en forma oxidada (sulfatos), no aportan energía para el crecimiento de la cepa.

III .3 Preparación del Inóculo.

Los microorganismos se tomaron de una caja de Petri y se inocularon con un asa, en un matraz Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml del medio descrito, utilizando tiosulfato, ($\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$), como fuente de energía, debido a que esta cepa ya se encuentra adaptada para crecer con tiosulfato. El pH del medio fue de 6.5 a 6.7; se colocó dentro de un fermentador agitado marca “Environ” con control de temperatura y agitación; se mantuvo a una temperatura de 30°C y una agitación constante de 180 rpm. Se monitoreó el pH tomando muestras cada 12 horas hasta que el pH del medio de cultivo llegó a 3.

Posteriormente el contenido del matraz se colocó en una botella de 250 mL para centrífuga y el contenido fue centrifugado durante 20 min a 9 000 x g en una centrífuga marca Beckman J2-HS. El precipitado formado se resuspendió en medio mineral estéril o en solución salina 0.85% estéril y se midió la densidad óptica; si el valor de la densidad óptica es mayor a 1 se deben de seguir haciendo diluciones hasta alcanzar este valor o volver a centrifugar y repetir esta operación hasta alcanzar el valor deseado de D.O. = a 1.

III .4 Metodología para la separación del azufre elemental de la biomasa.

Para la determinación de proteína se necesitó eliminar la cantidad de S^0 (azufre amorfo) presente en la muestra, desarrollándose un procedimiento, el cual consistió de 4 etapas:

- i) La muestra fue centrifugada a 500 X g durante 10 minutos,
- ii) Cuidadosamente se separó el sobrenadante del precipitado formado,
- iii) El sobrenadante se sonicó durante 15 minutos y

- iv) Se volvió a centrifugar a 500 X g durante 10 minutos.
- v) Se recuperó el sobrenadante como en ii y se procedió a cuantificar el contenido proteico del sobrenadante por el método de Bradford (1976) Utilizándose una curva patrón con albúmina bovina de 0 a 500 mg/L.
- vi) Con observaciones al microscopio se comprobó la presencia de bacilos gram negativos y la ausencia de material amorfo del azufre.

III.5 Mediciones de la actividad respiratoria.

El microorganismo fue crecido en condiciones quimiolitotróficas en el medio mineral indicado (Sublette y col. 1987), suplementado con 20 g/L de tiosulfato de sodio como fuente de energía y 1 g/L de NaHCO₃ adicionado como ya se indicó previamente; se incrementaron las revoluciones de agitación a 250 rpm para disminuir la formación de azufre elemental y favorecer la producción de biomasa al incrementarse la oxigenación del medio de cultivo (Alcántara, 2000).

Las células del microorganismo, se tomaron en fase de crecimiento exponencial para obtener la mejor respuesta de la respiración; esta fase se presenta cuando el pH del medio se encuentra aproximadamente entre 4 y 5.

El contenido de los matraces Erlenmeyer se centrifugó como ya fue indicado; el precipitado se resuspendió en medio mineral estéril sin fuente de carbono y sin fuente de energía y se utilizó un volumen celular de 200 a 350 µL como máximo para medir con un electrodo de Clark, la actividad respiratoria endógena, con la finalidad de observar si las células se encuentran en óptimas condiciones para proceder con los siguientes experimentos.

Las mediciones se hicieron con un detector de oxígeno marca YSI-500 y un electrodo de oxígeno Clark, el volumen final del reactor es de 1500 µL, el tiempo de análisis ajustado fue de 4 minutos, tomándose lecturas cada 0.55 segundos con el programa de software llamado Biocrom instalado y conectado al detector YSI-500.

Se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos a pH de 6.5 ya que se observó que este valor es el que favorece las reacciones bioquímicas involucradas en la transferencia de electrones durante la respiración del microorganismo (Alcántara, 2000).

El consumo de oxígeno fue calculado en la base de 8.36 $\mu\text{g O}_2/\text{ml}$ de aire saturado x minuto (estos datos fueron obtenidos de la tabla adjunta al manual de operación del equipo, considerando la solubilidad de oxígeno en el agua, la corrección por presión a la altura de la ciudad de México, la temperatura y el volumen del reactor)

Los cálculos se hicieron:

- Se grafica tiempo vs. Consumo de oxígeno.
- Se aplica el modelo de regresión lineal para obtener el valor de la pendiente.
- Este valor, es una velocidad que esta expresada en unidades de %/min.
- Se divide por 1000, por la escala de oxímetro (10) y porque es porcentaje (100).
- Multiplicar por 8.36 $\mu\text{g O}_2$ (De la tabla 1 del manual de oxímetro, se tiene que 5.48 $\mu\text{l O}_2 /\text{ml}$ a 1 atm en agua destilada saturada, este valor se multiplica por la densidad 1.43 $\mu\text{g/ml}$ a 0°C (tabla 5))

$$5.48 \mu\text{l O}_2 /\text{ml}[(1.43 \mu\text{g} /\text{ml})/1 \mu\text{l O}_2 /\text{ml}] = \mathbf{7.83 \mu\text{g O}_2 /\text{ml}}$$

- Multiplicar por el volumen de reacción que se utilizó (1.5 mL)

$$\mathbf{11.745 \mu\text{g O}_2}$$

- Corregir por Temperatura

$$11.745[(273/303)] = \mathbf{10.58 \mu\text{g O}_2}$$

- Corregir la Altitud (Tabla 6 del manual del oxímetro)

$$10.58 * 0.79 = 8.36 \mu\text{g O}_2$$

- Dividir por la proteína para obtener la velocidad específica $\mu\text{g O}_2 / \text{mg Prot. Min.}$
- expresar como: $\text{g O}_2 / \text{g Prot.} * \text{H}$

El procedimiento seguido para medir la actividad respiratoria es el siguiente:

- En botellas de DBO se colocó por separado el medio de cultivo sin fuente de energía y fuente de carbono, agua destilada y solución buffer de fosfatos a pH 6.5 y se airearon durante 45 minutos para asegurar la saturación de oxígeno.
- Con el agua destilada aireada se procedió a calibrar el electrodo del equipo. Ajustándolo a 100% de la escala (saturación del agua aprox. 6 mg O₂ /ml)
- La botella de DBO con el medio mineral saturado de oxígeno fue inoculada con 10% v/v de las células de *Thiobacillus* sp tomadas en la fase exponencial, lavadas, centrifugadas y resuspendidas en solución salina 0.85% estéril o en medio mineral sin fuente de energía y carbono estéril.
- Se procedió a cuantificar la respiración endógena, midiendo el consumo de oxígeno respecto al tiempo sin adicionar la fuente de energía a probar.
- Posteriormente se evaluó la oxidación química de los sustratos. Para ello, el medio mineral aireado exento de células fue suplementado con cada uno de los sustratos determinando el consumo de oxígeno respecto al tiempo.
- La temperatura, agitación y pH fueron controlados durante todo el tiempo de experimentación.
- Se midió el consumo de oxígeno respecto al tiempo para cada uno de los sustratos a las diferentes concentraciones probadas.
- Se calculó la tasa de consumo de oxígeno ($\mu\text{gO}_2/\text{min}$) por medio de la pendiente del consumo respecto al tiempo.
- Se calcularon las velocidades de oxidación de sustratos (mg sustrato azufrado/mg prot. Min) de acuerdo a la estequiometría global de la reacción de oxidación de los compuestos reducidos de azufre considerando la biomasa y la corrección por la respiración endógena.

III .5 .1 Medición de la actividad sulfoxidativa

Primero se probaron tres sustratos con diferente nivel de oxido-reducción (tiosulfato, sulfito y sulfuro de sodio) en concentraciones crecientes de 1 a 9 mM.

Para el experimento realizado con sulfito de sodio, la actividad respiratoria debe de ser medida cuidadosamente, ya que la oxidación de este compuesto ocurre espontáneamente cuando se encuentra en solución; para evitar este problema, se preparó una solución fresca de sulfito de sodio parcialmente estabilizada con 5mM de etilendiaminotetraacetato (EDTA) Beffa y col. (1992).

III .5 .2 Actividad sulfoxidativa en presencia de Inhibidores y Desacoplantes.

Posteriormente se procedió a probar inhibidores y desacoplantes de la cadena respiratoria, en concentraciones crecientes de 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, y 0.9 mM, utilizando una concentración constante de 0.3 mM de los compuestos reducidos de azufre. Estas concentraciones fueron seleccionadas según lo publicado por (Tatsuo y col. 1997) debido a que concentraciones mayores de sulfuro actúan como veneno para el electrodo de Clark ocasionando que las determinaciones realizadas con concentraciones superiores sean poco confiables.

Las mediciones del efecto de los inhibidores y desacoplantes se llevaron a cabo por dos métodos:

- 1) Las células fueron preincubadas 3 minutos con el inhibidor o el desacoplante previamente a la adición del sustrato, y
- 2) El inhibidor fue adicionado después del sustrato.

La actividad respiratoria fue medida como un descenso constante durante el tiempo de prueba (4 min) graficándose los datos obtenidos y ajustándose con el modelo de regresión lineal, el valor de la pendiente obtenido es considerado como la velocidad de consumo, este valor debe ser multiplicado por la base de 8.36 $\mu\text{g O}_2/\text{ml}$ de aire saturado x minuto.

Asimismo debe de corregirse por temperatura de análisis y se debe dividir entre la cantidad de proteína para poder expresar la velocidad específica de consumo de oxígeno.

Los substratos, desacoplantes e inhibidores probados se presentan en la Tabla III. 2

SUBSTRATOS	INHIBIDORES	DESACOPLANTES
Tiosulfato	Rotenona	2-4 Dinitrofenol
Sulfuro	Antimicina A	CCCP
Sulfito	Mixothiazol	

Tabla III.2 Substratos, inhibidores y desacoplantes utilizados para determinar la actividad sulfoxidativa de la cepa de *Thiobacillus* sp.

III .6 Crecimiento microbiano en condiciones quimiolitotróficas.

Se llevó a cabo un diseño de experimento factorial, utilizándose las 3 fuentes de energía indicadas a 2 distintos niveles de concentración (20 y 40 g/L para tiosulfato y sulfito y de 0.5 y 1.0 g/L para el sulfuro de sodio).

Para evaluar el efecto del tiosulfato, sulfito y sulfuro en el crecimiento de la cepa de *Thiobacillus* sp. el cultivo se dejó crecer hasta obtener un valor de pH de 3, posteriormente, se colocó en botellas de 250 mL para centrifuga y en una centrifuga marca Beckman J2-HS, se centrifugó a 9,000 x g 20 min. se separó el sobrenadante y el precipitado formado se resuspendió en solución salina estéril 0.85% o en medio mineral estéril, sin fuente de energía y de carbono.

Se procedió a leer la D.O. y cuando se tuvo de 1 se llevó a cabo la inoculación de los matraces Erlenmeyer de 250 mL con un mililitro de inóculo y que contenían el 20% del volumen del medio mineral y las 2 concentraciones diferentes de cada uno de los compuestos reducidos de azufre seleccionados, iniciándose las cinéticas de crecimiento.

El experimento fue realizado con matraces por triplicado para cada una de las diferentes concentraciones y compuestos reducidos de azufre señalados. Se tomaron muestras de 5 mL por duplicado cada 12 horas para monitorear la concentración de proteína y el pH, la producción de azufre elemental y se ajustó el pH del medio con una solución de NaOH 1N, para cuantificar indirectamente la producción de sulfato, durante el crecimiento.

Se hicieron los procedimientos de separación de proteína del contenido de azufre elemental como se indicó en la sección III.4

Observaciones microscópicas de la suspensión celular final confirmaron la ausencia de cristales o partículas de azufre elemental.

III .7 Efecto del extracto de levadura en el crecimiento quimiolitotrófico.

Para observar el efecto del extracto de levadura sobre las cinéticas de crecimiento, se realizó como se indicó en el párrafo anterior; seleccionándose la fuente de energía y la concentración en la cual se obtuvo un mejor crecimiento microbiano, para utilizarse como modelo para los experimentos posteriores suplementando el medio de cultivo con 4 diferentes concentraciones de extracto de levadura (0, 50, 100 y 150 mg/L)

Para estos análisis se utilizaron nuevamente matraces Erlenmeyer de 250 mL con 20% del volumen total con medio mineral ya mencionado, utilizando 40 g/L de tiosulfato de sodio como fuente de energía y ajustando el pH a 6.5, bajo las mismas condiciones de crecimiento ya indicadas.

El tiempo de crecimiento fue en promedio de 96 horas, tomándose como muestras, duplicados de alícuotas de 5 ml cada 24 horas. Las muestras fueron analizadas inmediatamente.

III .8 Los análisis realizados a las muestras fueron:

III. 8 .1 Biomasa.

Se determinó por el método de Lowry (1951), utilizándose una curva patrón con albúmina bovina de 0 a 500 mg/L. Este, es un método indirecto ya que se cuantifica el contenido de proteína.

También se cuantifico la proteína con el método de Bradford (1976), elaborando la curva patrón como se mencionó con el método de Lowry.

Las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo con un analizador de Elisa marca Bio-tek instruments inc. Modelo EL_x 808 _{UI} ultra microplate reader, a una longitud de onda de 595 nm. en una placa de 96 pozos con 200 µL de volumen cada uno.

Para evitar la interferencia del azufre elemental en las cuantificaciones de proteína, se llevó a cabo el pretratamiento ya mencionado.

III .8 .1 .1 Reactivos

Fenol Folin

Tartrato de Sodio y Potasio al 2%

Carbonato de sodio al 2% en Hidróxido de sodio 0.1 N

Reactivo de Bradford

III .8 .2 Determinación colorimétrica de Azufre elemental.

El azufre elemental fue cuantificado por espectrofotometría (Bartlett y Skoog 1954; Alcántara, 2000) esta metodología se basa en la reacción de cianuro de sodio o potasio con azufre elemental para formar tiocianato. La reacción se lleva a cabo en una solución de acetona, presentándose la reacción del azufre con el cianuro en forma rápida y cuantitativa originando el complejo tiocianato; este último, puede ser determinado colorimétricamente por la adición de acetona con cloruro férrico. Este método es sensible para concentraciones de 2 ppm de azufre elemental. Los peróxidos, sulfuros, bisulfuros y mercaptanos no interfieren cuando están presentes en grandes cantidades, alcanzándose una precisión del 98-99% .

La curva patrón se hace con una muestra conocida de azufre elemental de 5 a 50 ppm.

III .8 .2 .1 Reactivos

- **Solvente de acetona.**- Diluir 50 mL de agua destilada en 1 L de acetona grado reactivo.
- **Solución de cianuro de sodio.**- Disolver 0.3 g de cianuro de sodio o potasio en 300 mL de solvente de acetona. Cuando la solución se prepara aparece muy turbia, pero quedará clara después de unas horas.
- **Solución de cloruro férrico.**- Disolver 0.8 g de cloruro férrico hexahidratado en 200 mL del solvente de acetona. La precipitación hidrolítica del fierro ocurre brevemente después de la preparación; se deja reposar 24 horas y posteriormente se decanta, la solución resultante es estable por unas cuantas semanas.
- **Solución patrón de azufre elemental.**- Disolver 50 mg de azufre en polvo exactamente en 1 L de éter de petróleo.

Las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro marca Beckman modelo DU 640 a la longitud de onda indicada.

III .8 .3 Cuantificación indirecta de SO_4^{2-}

El sulfato fue determinado en forma indirecta por titulación del medio de cultivo con una solución de NaOH 2N, monitoriándose cada 24 horas durante el tiempo de cinética de crecimiento. Utilizándose la ecuación $C_1V_1 = C_2V_2$.

IV. Resultados

IV.1 Actividad sulfoxidativa de compuestos reducidos de azufre en la respiración de *Thiobacillus* sp.

Para poder cuantificar las velocidades específicas de oxidación de tiosulfato, sulfito y sulfuro de sodio y determinar la actividad oxidativa de los compuestos reducidos de azufre, durante la respiración de la cepa de *Thiobacillus* sp. utilizando la técnica de respirometría; se ensayaron concentraciones crecientes de cada uno de los compuestos mencionados controlándose la temperatura de análisis a 30° C, agitación constante y pH de 6.5, presentándose los resultados en la figura IV.1A

En la figura IV.1A, podemos observar el perfil de las velocidades de oxidación de los 3 diferentes compuestos reducidos de azufre, observándose que la cepa de *Thiobacillus* sp tiene una alta afinidad por la oxidación de tiosulfato de sodio, el cual presenta una curva clásica de consumo de sustrato; esta curva fue ajustada con la ecuación de Monod obteniéndose un valor de K_s de 2.3 mM y un q_{O_2} máximo de 0.06 g O_2 /g prot * h. Pero no presenta oxidación de sulfuro ni de sulfito, para las concentraciones crecientes de 1 a 9 mM ensayadas.

Esta mayor actividad oxidativa en tiosulfato puede ser resultado del hecho de que la cepa de *Thiobacillus* sp. esta adaptada desde hace muchas generaciones a crecer en tiosulfato, por lo tanto sus enzimas y metabolismo son más activos para utilizar este compuesto.

Takakuwa, (1992) y Kelly y col. (1997), purificaron y propusieron el mecanismo de acción del sistema multienzimático localizado en la región periplasmica, encargado de llevar a cabo la oxidación del tiosulfato hasta sulfato. Por lo tanto este compuesto es fácilmente oxidado convirtiéndose en politionatos o sulfito y azufre elemental como intermediarios, hasta llegar a sulfato obteniendo un mayor aporte energético.

Beffa y col. (1991) Observaron que *T. versutus* oxida tiosulfato a sulfato por un complejo multienzimático localizado en la región periplásmica sin la formación de azufre elemental o de otros intermediarios; asimismo que las enzimas que intervienen en este proceso están muy ligadas entre sí (La enzima sulfito deshidrogena, las enzimas que oxidan S° y las que oxidan sulfuro a sulfato se localizan en la región del periplasma) y que también no tuvo la capacidad para crecer en condiciones quimiolitotróficas cuando utilizaron sulfito como una fuente de energía.

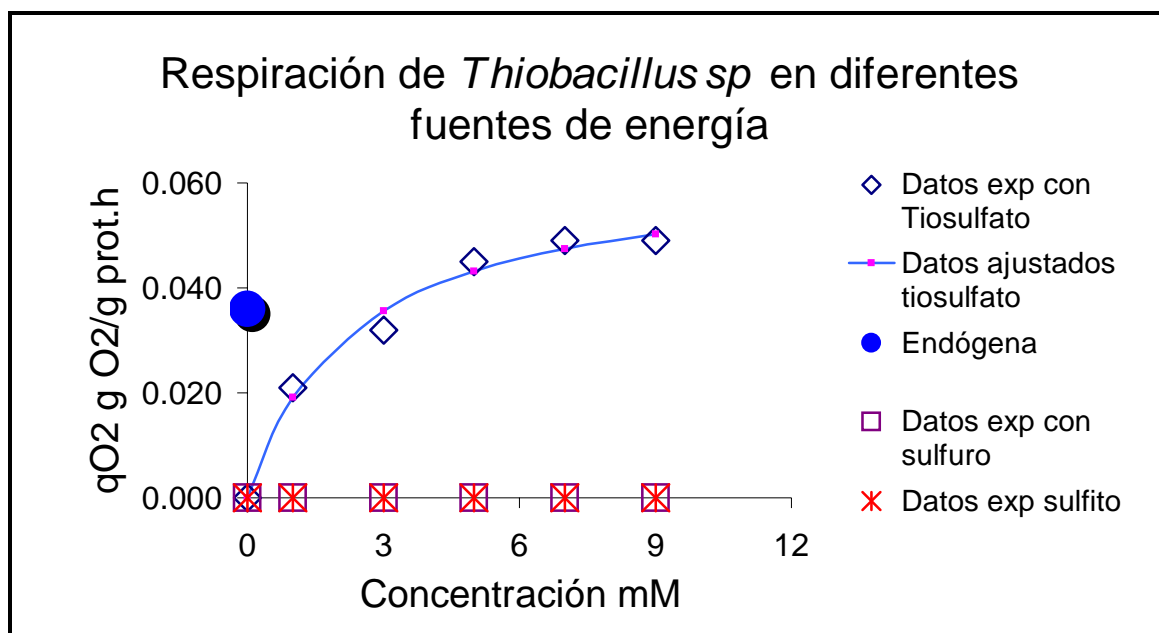


Figura IV.1 A) Velocidades de oxidación de concentraciones crecientes de Tiosulfato, Sulfuro y Sulfuro de sodio medidas por respirometría durante la respiración de *Thiobacillus* sp. Con una respiración endógena de 0.037gO₂/gprot*H.

En la figura IV.1. A podemos observar la ausencia de la actividad respiratoria de la cepa cuando se utiliza sulfuro de sodio como fuente de energía, por lo que no se llevó a cabo ningún ajuste ya que no se tuvieron resultados positivos.

Estos resultados nos sugieren la interferencia del sulfuro en la capacidad del electrodo de Clark en las condiciones utilizadas para los ensayos así como la ausencia de oxidación de sulfito de sodio utilizado como fuente de energía.

Los resultados obtenidos y presentados en la figura IV.1A para la actividad sulfoxidativa utilizando sulfito de sodio como fuente de energía nos indican la ausencia de esta actividad, es decir que el sulfito de sodio puede estar inhibiendo directamente la enzima citocromo oxidasa o que la cepa de *Thiobacillus* sp carece de las enzimas necesarias para poder utilizar el sulfito de sodio como sustrato.

Como lo indicó Alcántara, (2000), el sulfito puede ser oxidado por dos rutas:

- ⊕ Oxidación de sulfito dependiente de AMP, catalizado por la enzima Adenosina-5-fosfosulfatasa (APS) y

- ⊕ Oxidación de sulfito independiente de AMP catalizado por la sulfito-citocromo c oxidoreductasa o bien por la sulfito-férrica oxidoreductasa.

Por lo que se puede sugerir que esta cepa no cuenta con estas enzimas o que el citocromo c_{551} parte integral de la actividad de estas enzimas, no está activo por lo que esta cepa no puede oxidar el sulfito para obtener la energía que requiere.

Tatsuo y Lundgren (1977), indicaron que el sulfuro en concentraciones mayores a 1 mM es un veneno del electrodo de Clark utilizado para cuantificaciones respirométricas, recomendando utilizar concentraciones en un intervalo de 0.1 a 0.9 mM; por lo que los resultados presentados en el gráfico IV.1 A, para la oxidación del sulfuro fueron considerados poco confiables, procediéndose a repetir estos análisis en las concentraciones recomendadas. Estos resultados se presentarán en la figura IV.1 B.

Al observar la figura IV.1 B donde se presentan los datos de los experimentos utilizando tiosulfato y sulfuro de sodio a concentraciones crecientes de 0.1 a 0.9 mM, podemos decir:

Para el tiosulfato podemos observar que al ajustar con la ecuación de Monod, presenta un comportamiento creciente directamente proporcional con la concentración del sustrato, similar al que se observa con concentraciones crecientes de 1 a 9 mM.

Además podemos notar una clara tendencia de mantener constante la actividad al incrementar las concentraciones hasta 0.9 mM ya que a partir de 1 mM se presentó efecto de inhibición y un posterior descenso en esta actividad. Para tiosulfato los valores de K_s y q_{O_2} máx. respectivos son:

1.9 mM y 0.06 g O₂/g prot*h.

Los datos obtenidos de los experimentos realizados con sulfuro de sodio a concentraciones menores (presentados en la figura IV.1B), no pudieron ajustarse con la ecuación de Monod debido a que nuevamente se observa una inhibición de la actividad respiratoria directamente proporcional con el incremento de la concentración del sustrato (sulfuro de sodio), comprobándose nuevamente la interferencia de la concentración del sustrato en la actividad del electrodo (es decir, esta actuando como un veneno del electrodo).

Janssen y col. 1997, observaron que durante la oxidación biológica del sulfuro en condiciones aeróbicas, las condiciones ambientales son determinantes para la oxidación parcial del sulfuro a azufre elemental.

Por lo tanto aunque el sulfuro es el estado más reducido y su total oxidación hasta sulfato produce la mayor cantidad de energía necesaria para el metabolismo y crecimiento del microorganismo, su velocidad de oxidación se puede ver afectada por la presencia de los cristales de azufre elemental, ya que este compuesto para poder ser oxidado, las células deberán adsorberse sobre los cristales para que pueda actuar la enzima azufre-oxidativa o bien, por medio de una reacción química deberá de reaccionar con el sulfito que esté presente en el medio, formando tiosulfato o algún politionato el cual puede ser metabolizado con mayor velocidad.

Hooper y DiSpiritio (1985), sugirieron que el H_2S se oxida en la región periplásmica debido a que observaron la acumulación de cristales de azufre elemental en el medio de cultivo.

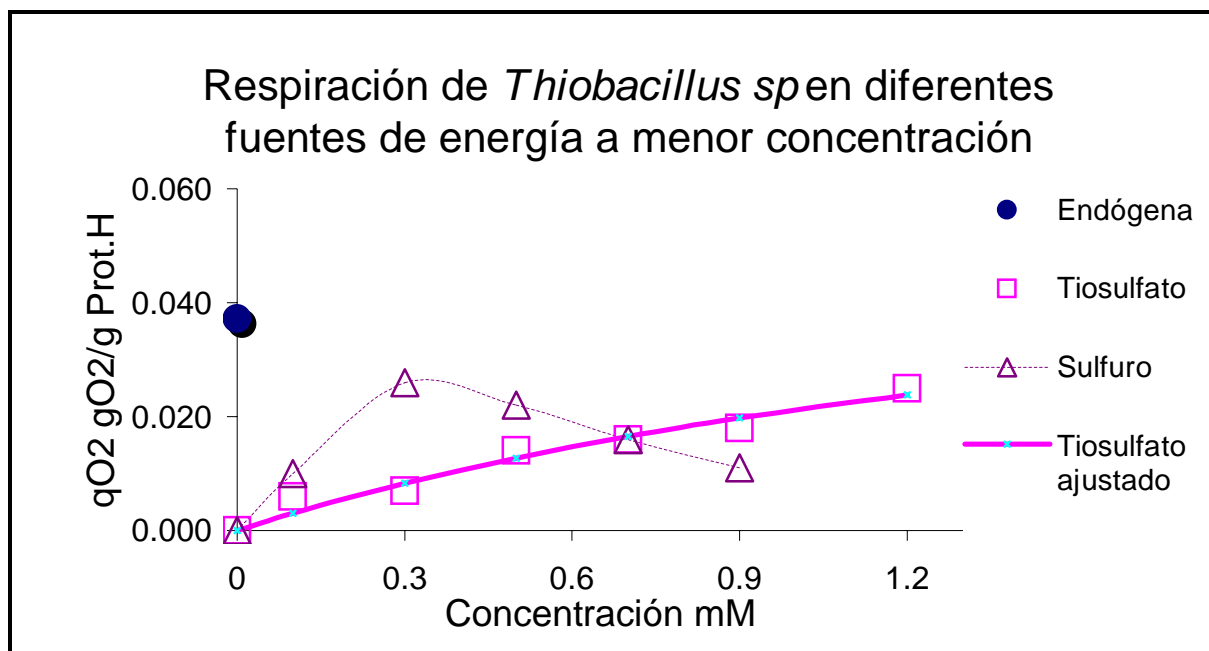


Figura IV.1 B) Velocidades específicas de oxidación de concentraciones menores de tiosulfato y sulfuro durante la respiración de *Thiobacillus sp*.

Al comparar los gráficos presentados en las figuras IV.1.A y B podemos observar que para los ensayos realizados con tiosulfato de sodio, los valores presentados para qO_2 son aproximados (0.021 y 0.025 respectivamente) para las concentraciones entre 1 y 1.2 mM

Para el sulfuro de sodio, aunque como ya se mencionó no se realizó ningún ajuste debido a que se observa una clara tendencia a inhibir la actividad respiratoria, proporcionalmente con el aumento de la concentración del sustrato a diferencia de los resultados obtenidos en concentraciones mayores a 0.9 mM.

No se presentan los datos obtenidos para estas concentraciones utilizando sulfito de sodio ya que no hubo ninguna actividad sulfoxidativa durante la respiración.

IV .2 Actividad sulfoxidativa de los compuestos reducidos de azufre en presencia de inhibidores y desacoplantes de las diferentes regiones de la cadena respiratoria de *Thiobacillus* sp.

Para poder sugerir la región de la cadena respiratoria en la cual cada uno de los compuestos reducidos de azufre (Tiosulfato y Sulfuro de sodio) donan sus electrones, se procedió a evaluar las velocidades específicas de consumo de oxígeno de las células de *Thiobacillus* sp en presencia de inhibidores y desacoplantes específicos de las distintas complejos que forman parte del sistema de transporte de electrones.

Para estos análisis se fijo una concentración 0.3 mM constante de tiosulfato de sodio y posteriormente se hizo el mismo experimento pero ahora utilizando la mismo concentración de sulfuro de sodio como fuente de energía y concentraciones crecientes de cada uno de los inhibidores desde 0.1 hasta 0.9 mM. (Tatsuo y Lundgren, 1997)

Los resultados graficados para cada uno de los sustratos se presentan en las figuras IV.2.1 y IV.2.2.

En la figura IV.2.1 se observa para el tiosulfato de sodio, la actividad sulfoxidativa va incrementando directamente proporcional con la concentración del sustrato, este efecto también se observó cuando se determinó la velocidad específica de consumo de oxígeno en concentraciones mayores de 1 mM.

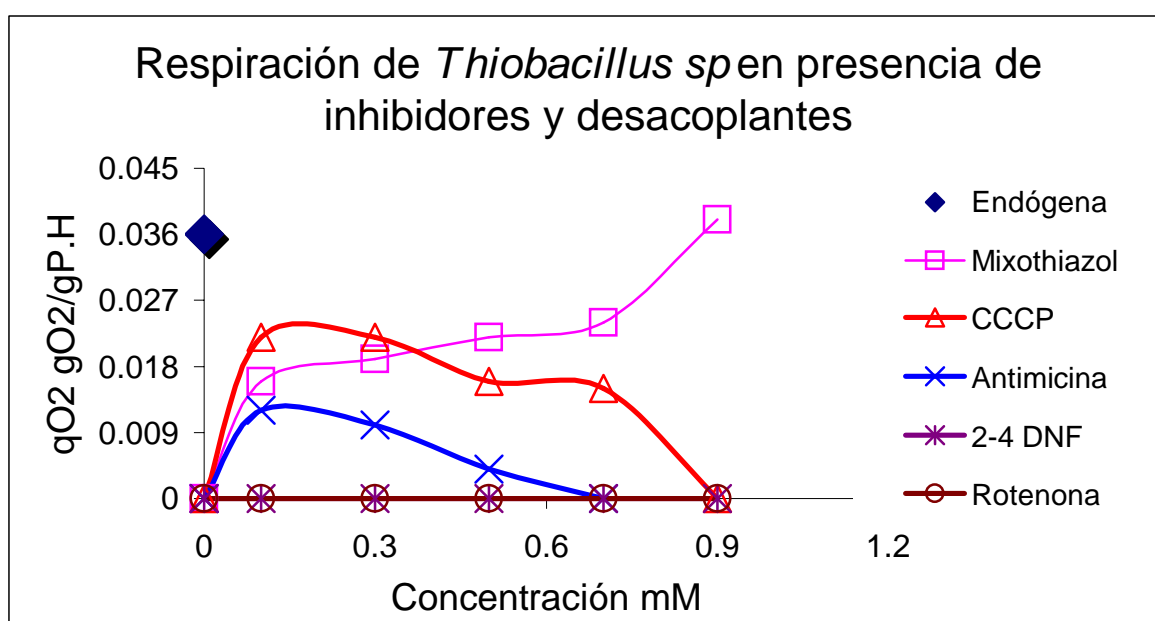


Figura IV.2.1 Actividad sulfoxidativa de las células de *Thiobacillus sp*, utilizando Tiosulfato como fuente de energía, en presencia de inhibidores y desacoplantes de la cadena respiratoria.

Cuando se fijó la concentración de tiosulfato a 0.3mM y se ensayo el **Mixothiazol**, por ambos métodos (adición previa y posterior del inhibidor al sustrato) en ambas pruebas realizadas por triplicado; no se presentó ninguna diferencia obtenida entre ambos métodos; los resultados presentados en la figura IV.2.A (adición del inhibidor previa al sustrato) se observa que existe un incremento en la transferencia de electrones proporcional con el aumento de la concentración de este inhibidor.

Estos resultados están sugiriendo la presencia de un transporte de electrones en sentido inverso, cuando se utiliza tiosulfato como fuente de energía y que por lo tanto los 2 electrones generados son transportados hacia la reducción del oxígeno con la consecuente formación de agua.

La tendencia fue de incrementar la velocidad específica de consumo de oxígeno hasta un valor superior al de la respiración endógena cuando se utilizó la concentración mayor (0.9 mM), por lo tanto este compuesto no está presentando inhibición en la transferencia de electrones.

Link y col. (1993) plantearon que el Mixothiazol es un potente inhibidor del sitio Q_p (es la parte que da al espacio intermembranal) del ciclo Q que se lleva a cabo en la ubiquinona, la cual es un transportador redox móvil que conecta los complejos I y II con el complejo III de la cadena de transporte de electrones, gracias a su rápida difusión en la membrana.

Beffa y col. (1992) observaron de sus experimentos con *T. tepidarius*, que el Mixothiazol es un inhibidor de la región citocromo b-quinona. Esta región es localizada en el sitio III de la cadena de transporte de electrones.

Como se sabe, la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo *c* mediada por el complejo III está acoplada a la translocación de protones a través de la membrana generando un gradiente electroquímico de protones (Königsber 1992)

Cuando se procedió a ensayar la concentración fija de tiosulfato en presencia de concentraciones crecientes de **CCCP** (carbonil-cianuro-m-clorofenilhidrazona) compuesto con actividad desacoplante que actúa alterando el potencial de membrana, según Beffa y col. (1992); se observó un efecto inhibitorio de la actividad sulfoxidativa, es decir el transporte de electrones no fue similar al de la respiración endógena, esto sugiere que el estado del potencial de membrana juega un rol importante durante la oxidación de tiosulfato.

El ensayo con **Antimicina A** nos indica un efecto de inhibición directamente proporcional con el incremento de la concentración de este compuesto hasta llegar a una concentración de 0.7 mM dónde se observa una inhibición total.

De los estudios de Link y col. (1993) sabemos que la Antimicina A bloquea el paso de electrones a nivel del centro reductor quinona (Q_N del ciclo Q; semiubiquinona localizado en el lado interno de la membrana) que se lleva a cabo durante la transferencia de electrones en la región III (ubiquinol: citocromo c óxido-reductasa)

De nuestros ensayos utilizando Mixothiazol y Antimicina A podemos decir que aunque se observa inhibición con Antimicina A, este efecto es mucho mayor en comparación con el Mixothiazol; acorde con las observaciones de Link y col. 1993, donde ellos notaron que la reducción del citocromo c_1 solamente es bloqueada o inhibida por inhibidores del sitio QP, mientras que inhibidores del sitio QN no inhiben esta reacción.

La **Rotenona** es un inhibidor clásico del complejo I (NADH: ubiquinona óxido-reductasa, Elbehti y col. 2000) y el efecto observado en nuestros ensayos con este compuesto nos demuestra que está inhibiendo el transporte de electrones en la región inicial de la cadena de transporte de electrones.

El **2-4 Dinitro fenol** es otro desacoplante que actúa igual que el CCCP; en este ensayo se observó un efecto similar en ambos desacoplantes. Es decir, ambos desacoplantes están actuando como inhibidores de la actividad respiratoria al alterar el potencial de membrana relacionado con la transferencia de electrones y la actividad oxidativa de compuestos reducidos del azufre.

Para poder comparar el comportamiento de la actividad sulfato oxidativa en tiosulfato y sulfuro se probaron en sulfuro al igual que en tiosulfato.

En la figura IV.2.2, observamos la actividad sulfoxidativa con sulfuro de sodio a una concentración constante de 0.3 mM y concentraciones crecientes de los inhibidores y desacoplantes utilizados en los ensayos con tiosulfato de sodio.

Cuando utilizamos concentraciones crecientes de sulfuro de sodio, la actividad sulfoxidativa sólo se incrementa a 0.3mM ya que con las otras concentraciones probadas permanece sin cambios representativos.

En el ensayo con Mixothiazol observamos una inhibición total, este compuesto inhibe el transporte en la región Q_P del ciclo Q en el ubiquinol. Por lo tanto, se está llevando a cabo la inhibición de la reducción del citocromo *c*.

Con el ensayo con Antimicina A se incrementa la actividad sulfoxidativa, a las concentraciones de 0.1 a 0.5 mM y las concentraciones mayores se observa una disminución muy marcada de esta actividad sulfoxidativa, manteniéndose constante en las concentraciones de 0.7 y 0.9 mM; recordando que este compuesto inhibe el transporte de electrones a nivel del sitio Q_N del ubiquinol.

Este comportamiento nos sugiere que los electrones producidos por la oxidación del sulfuro de sodio, pueden estar entrando en la cadena de transporte de electrones en la región III o en la región IV.

Para este ensayo, con ambos compuestos desacoplantes se presentó un comportamiento similar al presentado cuando utilizamos tiosulfato ya que el CCCP y el 2-4 DNF están inhibiendo totalmente el transporte de electrones y la actividad sulfoxidativa abatiendo el potencial de membrana.

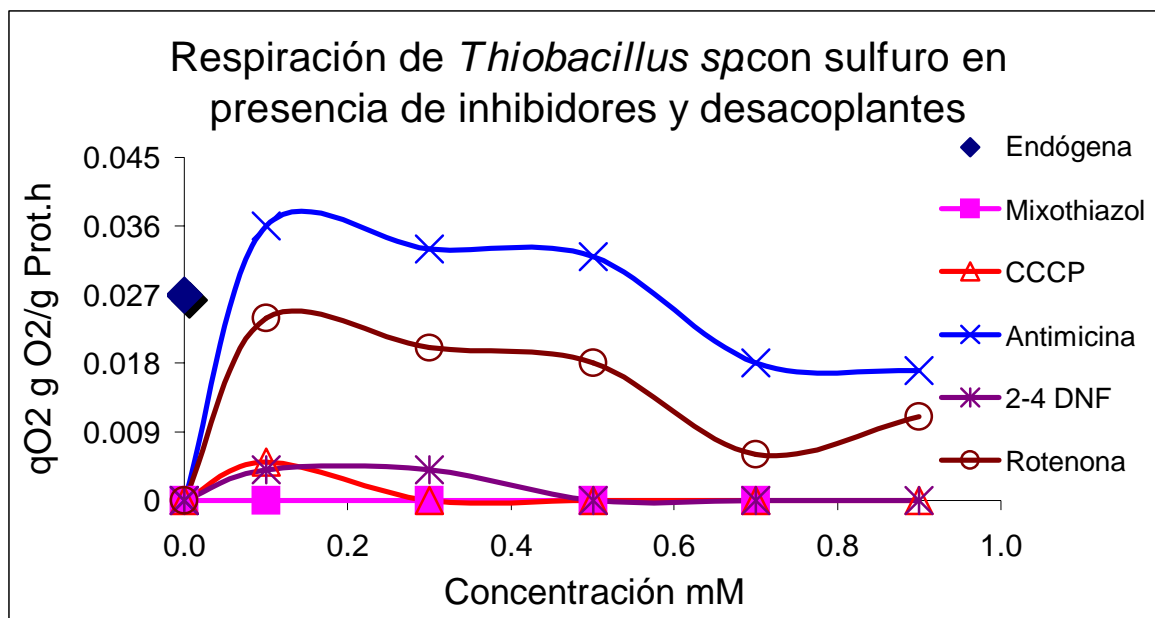


Figura IV.2.2 Actividad sulfoxidativa de *Thiobacillus sp* utilizando sulfuro de sodio como fuente de energía.

La Rotenona presentó un efecto de inhibición, directamente proporcional con el incremento de la concentración de dicho compuesto, por lo tanto suponemos que los electrones producidos por la oxidación del sulfuro no entran a la cadena de transporte de electrones en la región I.

IV.3 Efecto de diferentes concentraciones y fuentes de energía en el crecimiento de la cepa de *Thiobacillus sp*.

Con la finalidad de observar los efectos que puede tener la concentración y la fuente de energía sobre el crecimiento de la cepa crecida en condiciones quimiolitotróficas, se diseñó un experimento factorial probando 3 sustratos con 2 diferentes concentraciones, 20 y 40 g/L para tiosulfato y sulfito de sodio y de 0.5 y 1 g/L para el sulfuro de sodio.

De los ensayos de Alcántara (2000) observamos que es importante tener un control sobre la oxigenación del medio ya que una mala oxigenación conlleva la acumulación de azufre elemental en el medio. Todos estos parámetros controlados: agitación a 150 rpm, temperatura constante de 30°C, 20% del volumen total del medio mineral en los matraces Erlenmeyer y pH inicial de 6.5 nos permitió observar el comportamiento del cultivo axénico. Los resultados se presentan en la figura IV.3.1 A

En esta figura podemos observar específicamente el comportamiento de la cepa creciendo con mayor facilidad en tiosulfato que en sulfuro, los resultados para sulfuro no fueron graficados en esta figura debido a que el crecimiento fue mínimo y no se aprecia en la escala utilizada para el tiosulfato por lo tanto el crecimiento en sulfuro y sulfuro son presentados en otras figuras.

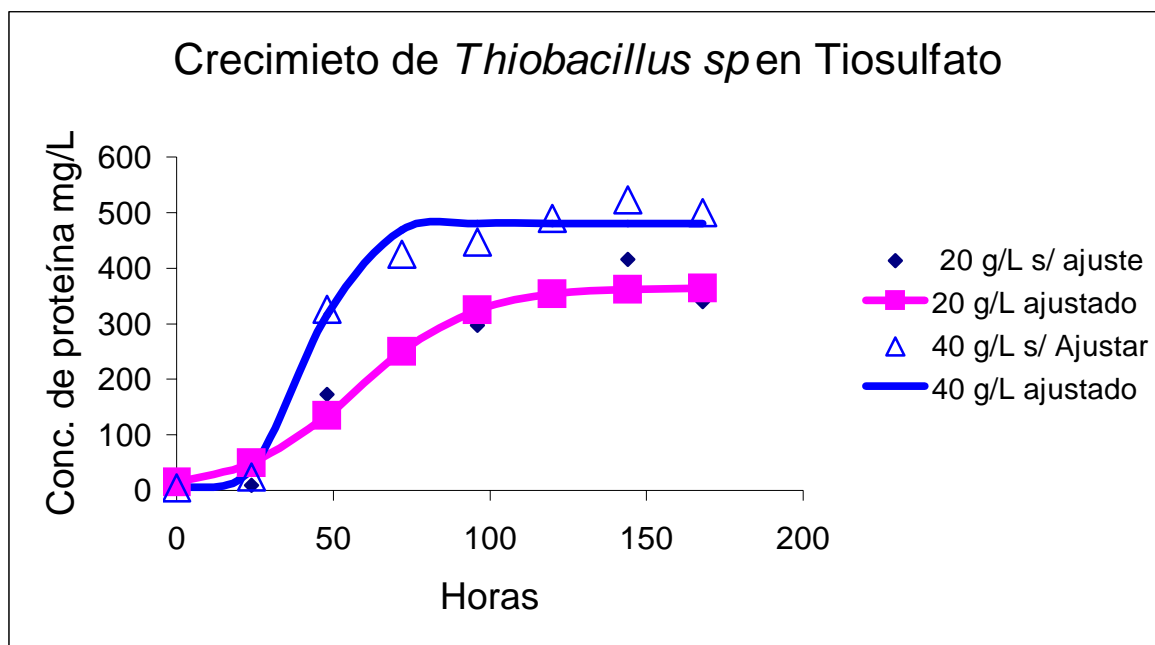


Figura IV. 3 1 A) Efecto de las diferentes concentraciones y fuentes de energía en el crecimiento en condiciones quimiolitotróficas de *Thiobacillus sp*.

Asimismo, podemos observar que la fase de crecimiento exponencial con el tiosulfato se presentó durante las primeras 48 horas de crecimiento y además que al incrementar al doble la concentración de este sustrato se incrementó en 2 veces su valor.

Los valores ajustados de μ fueron de 0.05 h^{-1} y 0.13 h^{-1} y los valores máximos de proteína fueron 365 y 485 mg/L respectivamente (estos datos fueron obtenidos por el ajuste de los valores experimentales con la ecuación logística).

Para conocer el perfil del comportamiento del pH durante la cinética de crecimiento con tiosulfato de sodio, se hicieron mediciones de este parámetro cada 12 horas, presentándose los resultados en la figura IV.3.1 B.

La progresiva acidificación del medio es consecuencia del incremento de la concentración de sulfato; la disminución del pH como observamos en la figura IV.3.1 B no se ve afectada por la concentración de tiosulfato, es decir se esperaría que al aumentar al doble la concentración de tiosulfato el tiempo de disminución del pH debería ser directamente proporcional con esta concentración, sin embargo los datos observados nos indican que la velocidad de acidificación no es resultado la concentración de sustrato como lo señala Alcántara (2000) dónde ensayó concentraciones de 10 a 50 g/L e indica que en las concentraciones mas bajas el pH llegó a 3 en menos tiempo comparado con las concentraciones altas.

De los datos obtenidos por Alcántara, (2000) se espera que a estas concentraciones utilizadas se espera una producción al doble de sulfato sin embargo esto no fue así. Por lo tanto podemos sugerir que el efecto del sulfato es independiente del efecto del pH.

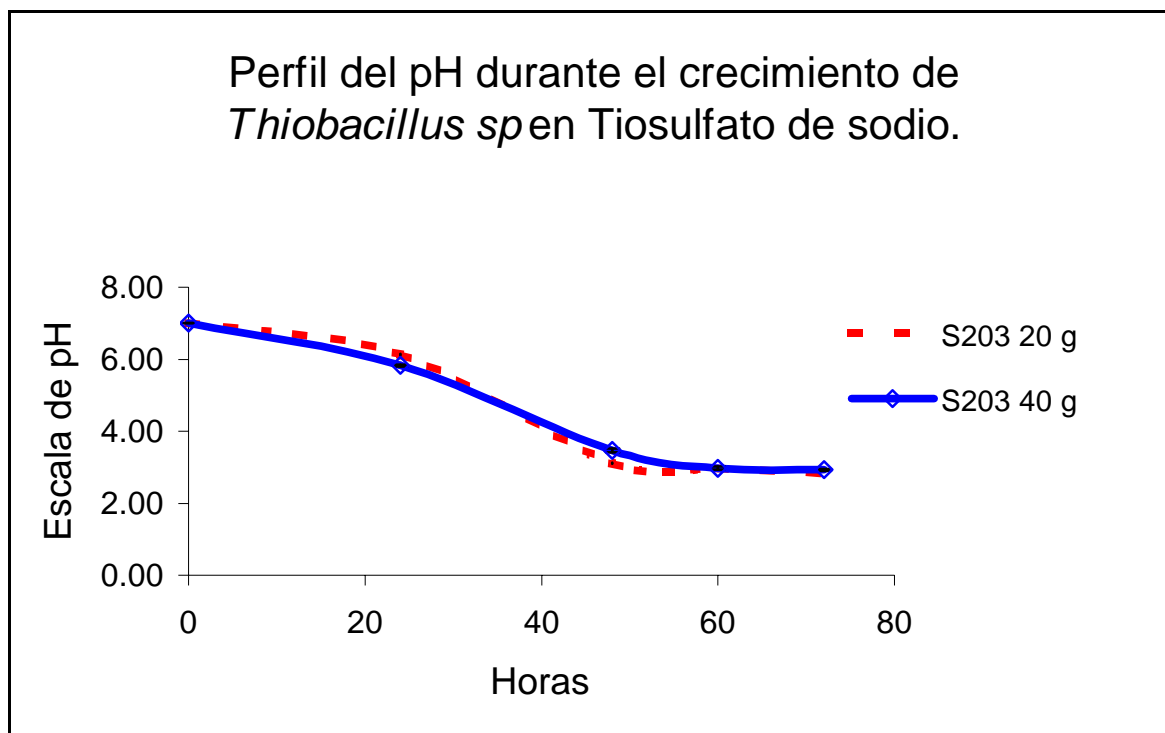


Figura IV. 3.1. B) Comportamiento del pH durante el crecimiento de la cepa de *Thiobacillus* en 20 y 40 g/L de tiosulfato de sodio.

Del ensayo con ambas concentraciones de tiosulfato se observó acumulación de azufre elemental en el medio.

Debido a que en la figura IV.3.1. A los valores utilizados para reportar la cantidad de proteína producida por la cepa cuando crece en tiosulfato no permite observar el comportamiento con sulfuro de sodio, se procedió a hacer otra figura en la cual se disminuye la escala para poder presentar el comportamiento del microorganismo en esta fuente de energía ensayada.

En la figura IV.3.2 A se presentan los resultados obtenidos del crecimiento de la cepa de *Thiobacillus sp* utilizando sulfuro de sodio como fuente de energía.

El ajuste de los datos experimentales se hizo con la ecuación de crecimiento ajustado con el modelo exponencial.

Como se observa, el incrementar al doble la concentración del sustrato no favoreció en gran medida el crecimiento microbiano ya que los niveles máximos de proteína alcanzados son mucho menores que los que se obtuvieron con tiosulfato por lo que se separaron los gráficos para poder analizar estos datos.

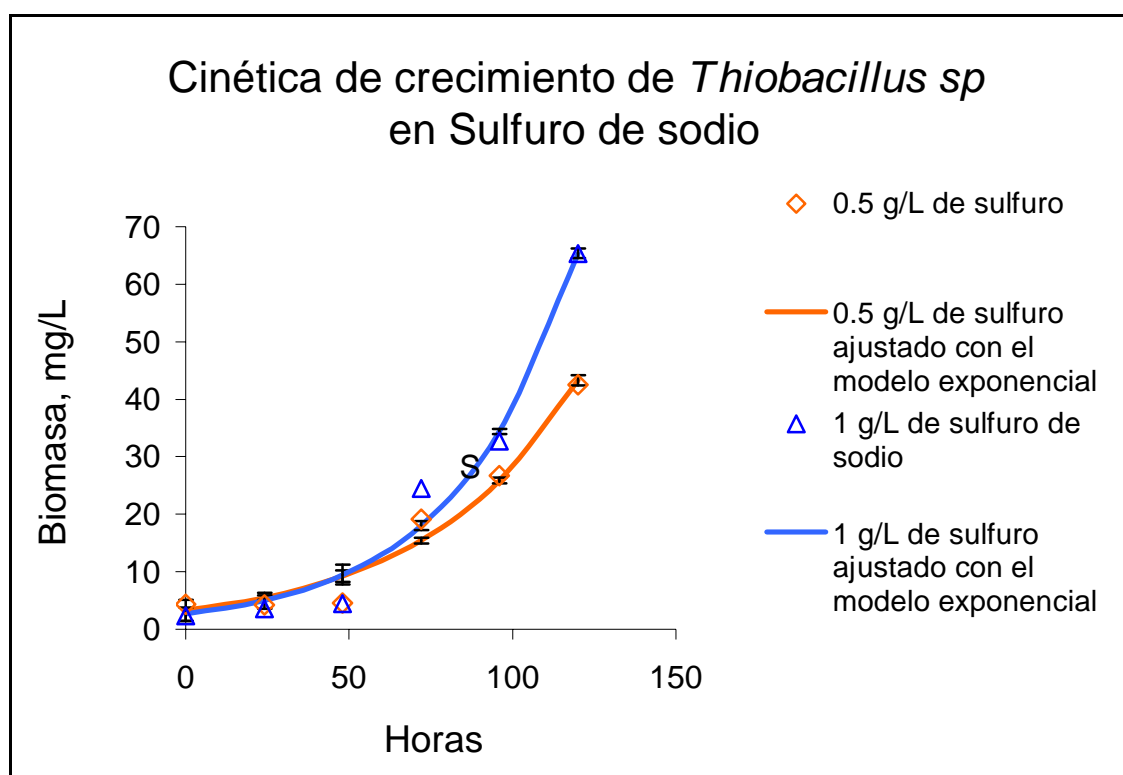


Figura IV.3.2 A) Cinéticas de crecimiento de *Thiobacillus sp* en sulfuro de sodio

La μ para ambas concentraciones ensayadas fue 0.021 y 0.026 h^{-1} y la proteína máxima fue de 0.650 y 0.425 g/L respectivamente.

Estos resultados nos indican que al microorganismo le está costando más trabajo utilizar este sustrato como fuente de energía aunque se espera que este sustrato por presentar un nivel de reducción mayor en comparación con los otros 2 sustratos tenga un mayor aporte energético.

El microorganismo requiere de sistemas mas especializados que le permitan obtener más energía, asimismo, el incrementar la concentración de sustrato provoca un estrés metabólico que está reduciendo la producción de biomasa sin que la velocidad específica de crecimiento sea diferente entre ambas concentraciones ensayadas.

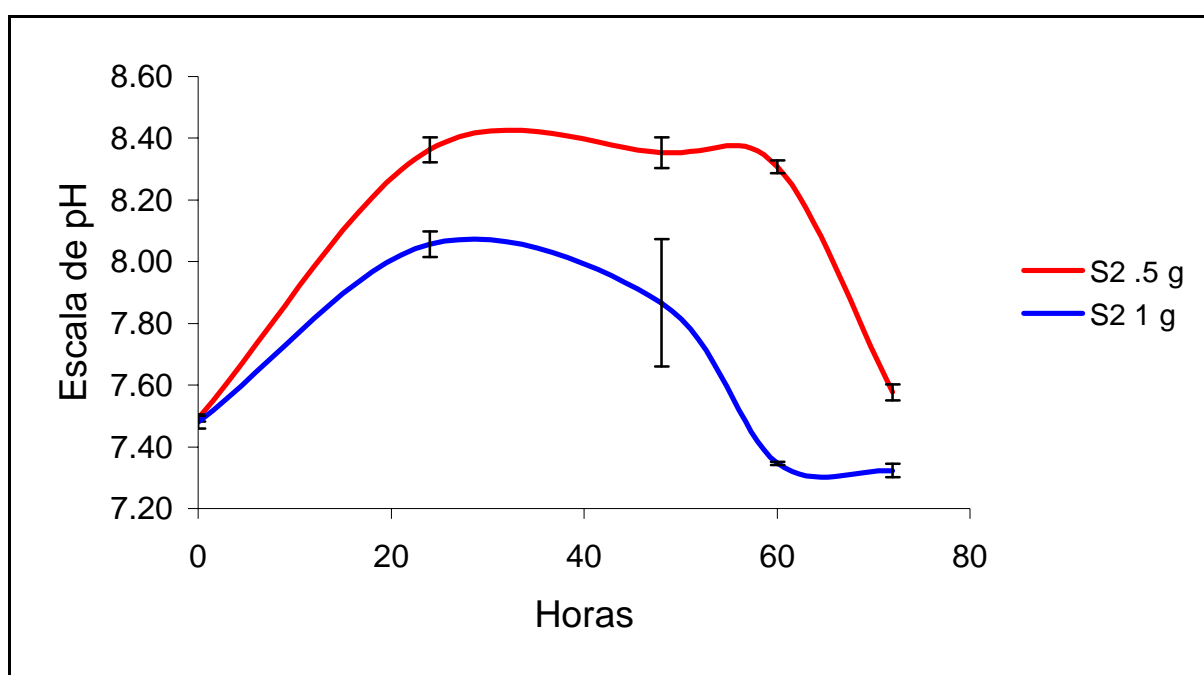
Estos resultados confirman las ideas propuestas por Hooper y DiSpirito (1985) respecto a la localización en la región periplásmica de las enzimas relacionadas con la oxidación del sulfuro además de que en el primer paso de la oxidación del sulfuro se produce azufre elemental en forma de cristales los cuales para poder ser oxidados se requiere que los microorganismos cuenten con sistemas de adhesión para poder adsorberse sobre éstos; retrasando la velocidad de oxidación y la utilización de este sustrato para obtener energía para su crecimiento.

Al utilizar este sustrato se observó una mayor acumulación de azufre en el medio de crecimiento en comparación con el medio cuando se creció la cepa con tiosulfato.

La oxidación del sulfuro hasta sulfato formando como intermediario sulfito y tiosulfato conlleva la formación de tetrionato este intermediario ocasiona un incremento del pH del medio aumentando la velocidad de oxidación de sulfito por efecto de polimerización (formación de politionatos) Chan y Suzuki (1994).

En la figura IV.3.2 B observamos que para ambas concentraciones de sulfuro de sodio probadas, se presentó un incremento en el valor del pH manteniéndose en condiciones alcalinas y volviendo a disminuir al pH inicial.

Cabe destacar que se midió el pH del medio mineral estéril sin sustrato teniéndose un valor de 6.5 y después de agregar el sustrato este se incremento a 7.5 observándose un incremento en un orden de magnitud de este valor. Por lo tanto se sugiere que el incremento del pH se debe a la acumulación y posible formación de politionatos como lo indicaron Chan y Suzuki (1994).



Figuras IV.3.2 B) perfil del comportamiento del pH durante el crecimiento de *Thiobacillus* sp utilizando sulfuro de sodio como sustrato.

En la figura IV.3.3 B, notamos en este gráfico un comportamiento muy inestable del pH durante el tiempo de la cinética de crecimiento pero con una clara tendencia a incrementarse por arriba del pH neutro manteniéndose así para la concentración de 40 g/L, mientras que para la concentración de 20 g/L presenta fluctuaciones entre los valores de 7.40 y 7.80.

Sugiriéndose este comportamiento como resultado de la inestabilidad y la alta reactividad del sulfito de sodio y su clara facilidad a formar politionatos. Los resultados experimentales de estos ensayos no fueron ajustados con ningún modelo debido a que no hubo crecimiento.

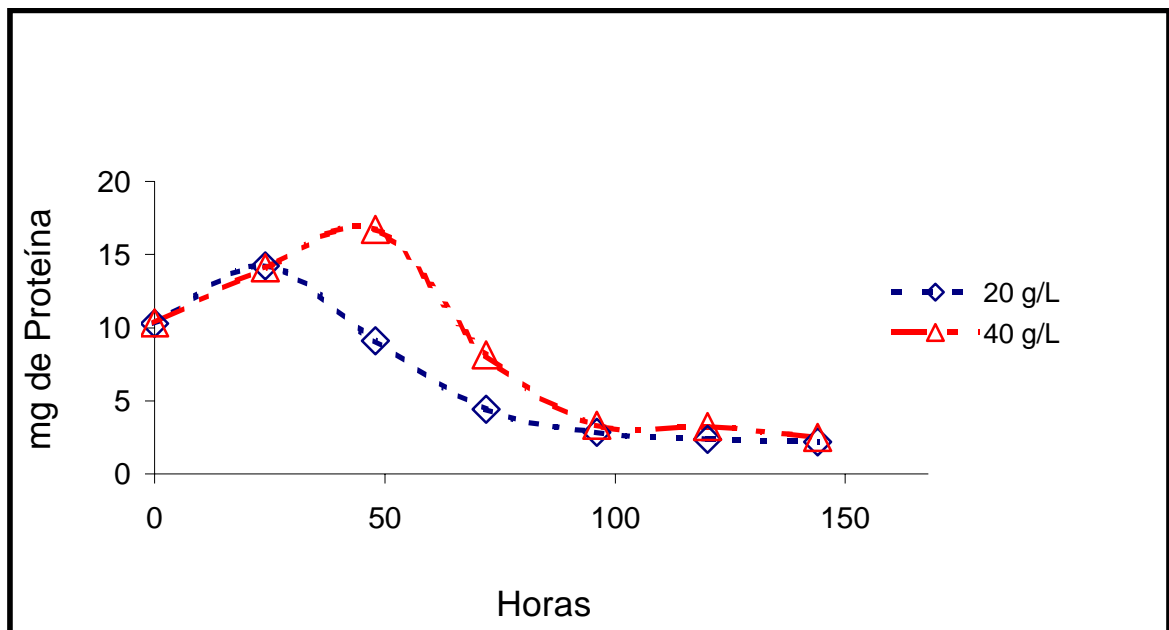


Figura IV.3.3. A) Crecimiento de *Thiobacillus* sp en sulfito de sodio.

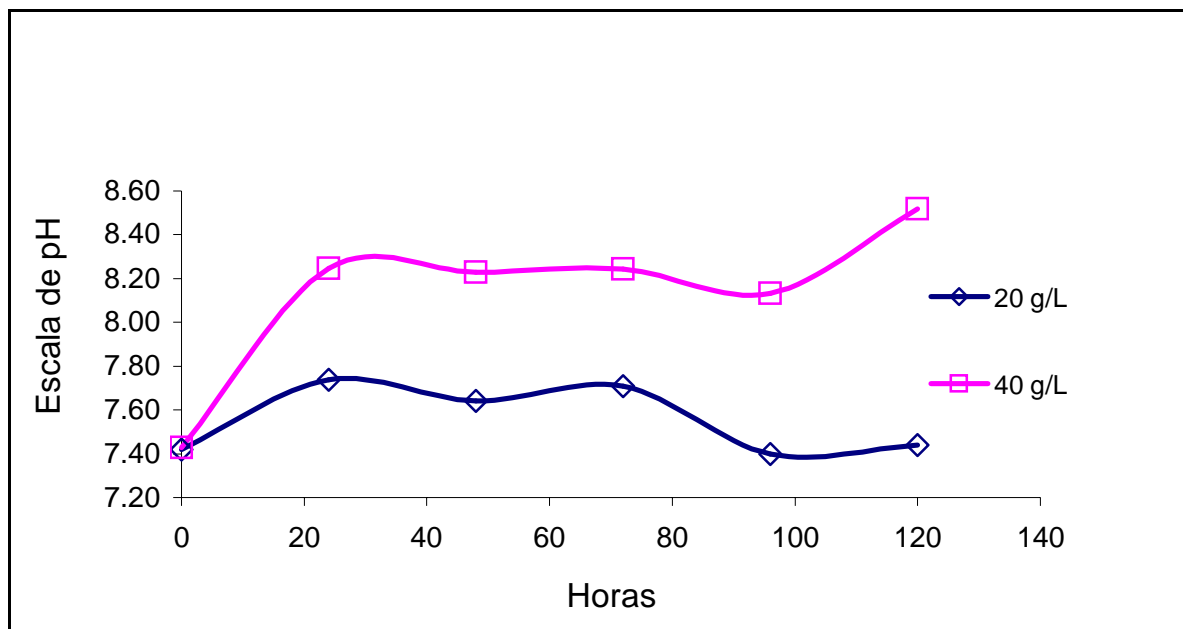


Figura IV. 3.3. B) Comportamiento del pH durante el crecimiento de *Thiobacillus* sp en sulfito de sodio.

Es importante aclarar que para poder observar, comparar y analizar los resultados de los ensayos con tiosulfato, sulfuro y sulfito se utilizaron diferentes escalas para presentar los datos experimentales de concentración de proteína en mg/L.

Beffa y col. (1991) utilizaron *T. versutus* creciéndolo en medio mineral suplementado con tiosulfato y azufre elemental; cuando utilizaron tiosulfato notaron la ausencia de actividad sulfoxidativa y no hubo conversión de sulfito dependiente de AMP (adenosin-5-fosfosulfatasa). Estos resultados coinciden con los de la presente investigación.

IV.3.1 Determinación de azufre elemental en las cinéticas de crecimientos con diferentes sustratos.

Para observar el comportamiento de la cepa respecto al metabolismo de cada uno de los sustratos utilizados en el experimento factorial, se procedió a realizar las determinaciones de azufre elemental en el medio de cultivo con las 3 diferentes fuentes de energía, estos resultados se presentan en la figura IV.3. 4 A y B.

En esta figura podemos observar que durante el crecimiento en el medio de cultivo a 20 y 40 g/L de tiosulfato, se obtuvieron valores semejantes a lo obtenido por Alcántara (2000) ya que observamos que cuando utilizó concentraciones altas de tiosulfato de sodio (30 y 50 g/L) logró cuantificar 0.6 y 0.8 g azufre/L cuando realizó sus experimentos con el consorcio microbiano, mientras que para nuestro experimento las cantidades de azufre elemental fueron de 0.49 y 0.53 g de azufre/L respectivamente.

Al hacer las mediciones de la cantidad de azufre elemental formado durante el crecimiento de la cepa utilizando sulfuro de sodio como sustrato, los resultados obtenidos se presentan en la figura IV.3.4.B, observándose que la producción de azufre elemental fue de 0.065 y 0.090 g de azufre/L respectivamente.

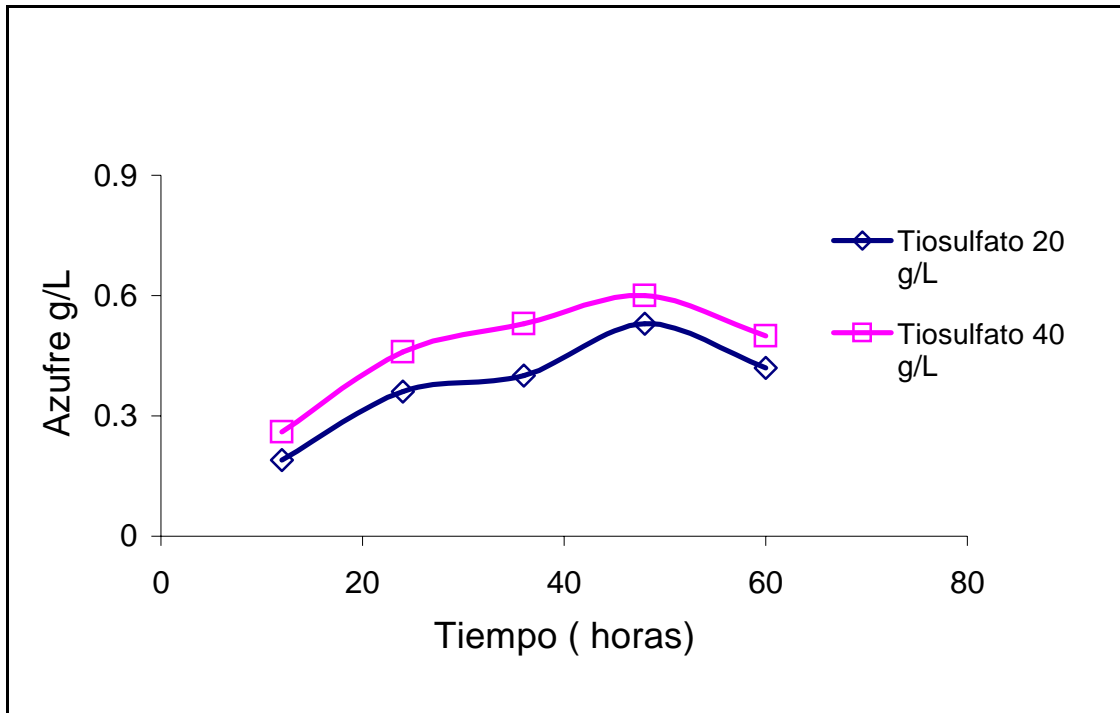


Figura IV.3.4 A Producción de azufre elemental durante el crecimiento de *Thiobacillus* sp.

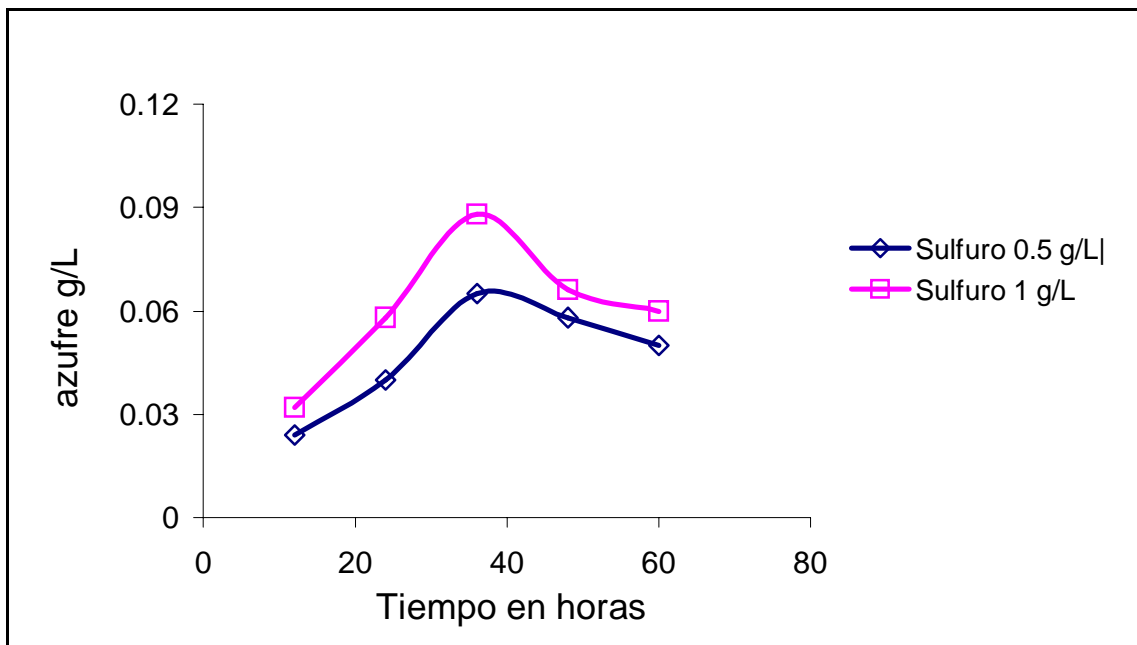


Figura IV.3.4.B Producción de azufre elemental por la cepa crecida en sulfuro de sodio

En las dos figuras anteriores, IV.3.4 A y B se observa una disminución de las concentración de azufre, considerándose que lo que esta sucediendo es que se presenta un mayor acumulación de cristales de azufre en las paredes del matraz Erlenmeyer.

Cuadro comparativo de los parámetros medidos durante el crecimiento de *Thiobacillus* sp en las diferentes fuentes de energía utilizadas:

Tabla IV.4.3.2. Parámetros cinéticos del crecimiento relacionados con la actividad sulfoxidativa de los diferentes sustratos utilizados en los ensayos con la cepa de *Thiobacillus* sp.

<i>F.de energía</i>	X máx	μ Máx	pH final	<i>Rendimiento</i>
G/L	G/L	h^{-1}		$Y_{x/s}$
NaS ₂ ⁻² 0.5	0.00425	0.021	7.6	0.09
NaS ₂ ⁻² 1	0.00650	0.026	7.10	0.065
Na ₂ S ₂ O ₃ ⁻² 20	0.365	0.05	3	0.018
Na ₂ S ₂ O ₃ ⁻² 40	1.058	0.13	3	0.012

De los resultados presentados en el cuadro anterior, podemos observar claramente el comportamiento de la cepa en ambos sustratos y como presenta mayor afinidad por el tiosulfato.

IV .4 Importancia del extracto de levadura en el crecimiento de la cepa de *Thiobacillus* sp.

De los resultados del experimento factorial probando 3 diferentes fuentes de energía a 2 distintos niveles se obtuvo un mejor crecimiento en tiosulfato a 40 g/L por lo que se fijo este sustrato a esta concentración probándose 3 distintos niveles de concentración de extracto de levadura (0, 50, 100 y 150 mg de extracto/L de medio). Estos experimentos fueron realizados para observar y probar la hipótesis planteada respecto a la capacidad de los distintos microorganismos hacia la evolución y adaptación después de muchas generaciones de crecer en condiciones constantes, volviéndose especialistas para realizar funciones específicas y perdiendo habilidades para otras funciones como pueden ser los mecanismos por los cuales producen factores de crecimiento como son vitaminas. Los resultados se presentan en la figura IV.4 .1 A.

En esta figura podemos observar en el gráfico A una clara tendencia de incrementar el crecimiento microbiano a las concentraciones mas altas de extracto de levadura, presentando la fase exponencial en las 48 horas de cinética, al ajustar los crecimientos con el modelo de ecuación logística, se obtuvieron los valores de máximos de proteína y μ presentados en la tabla IV.5.1. Estos resultados sugieren que debido a que esta cepa fue aislada de un consorcio en el cual interactuaban con hongos, levaduras y bacterias (Alcántara, 2000), su metabolismo pudo haber evolucionado volviéndose especializado en algunas funciones y perdiendo la capacidad para otras funciones por lo que al crecer en condiciones axénicas requiere que el medio de cultivo sea suplementado de vitaminas u otros compuestos como factores de crecimiento que en este experimento fueron proporcionados por el extracto de levadura, favoreciendo ampliamente el crecimiento.

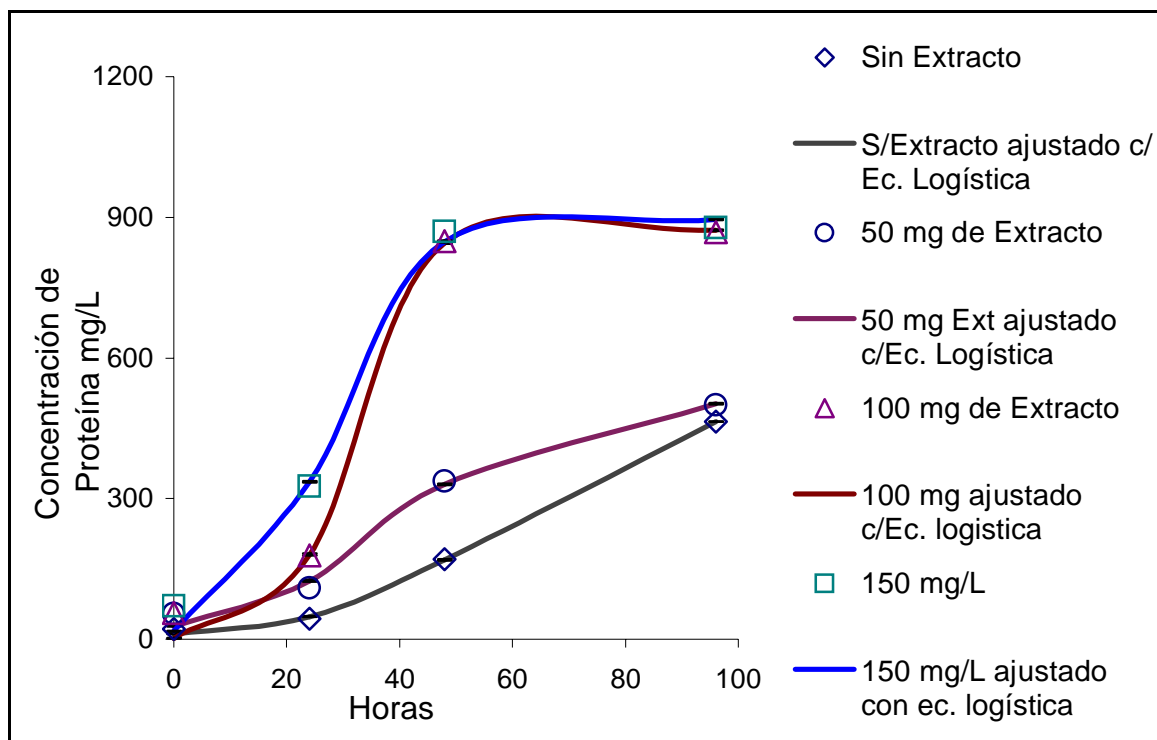


Figura IV. 4.1 A. Crecimiento de *Thiobacillus sp* en 40 g/L de tiosulfato de sodio y diferentes concentraciones de extracto de levadura.

Por lo tanto observamos que de 0 mg/L a 50 mg/L de extracto, el crecimiento se incrementó en 1.01 veces su valor y con 100 mg/L su valor se incrementó en 1.73 veces su valor y con 150 mg/L el incremento fue de 1.78 veces su valor.

En la figura IV.4.1 A. se observa que la biomasa producida a las 50 horas es igual con 100 y con 150 mg de extracto de levadura.

Para poder observar mas claramente el efecto de las diferentes concentraciones de extracto de levadura suplementando el medio de cultivo de la cepa de *Thiobacillus sp.* se presenta en el siguiente gráfico los datos de rendimiento respecto al sustrato ($Y_{x/s}$)

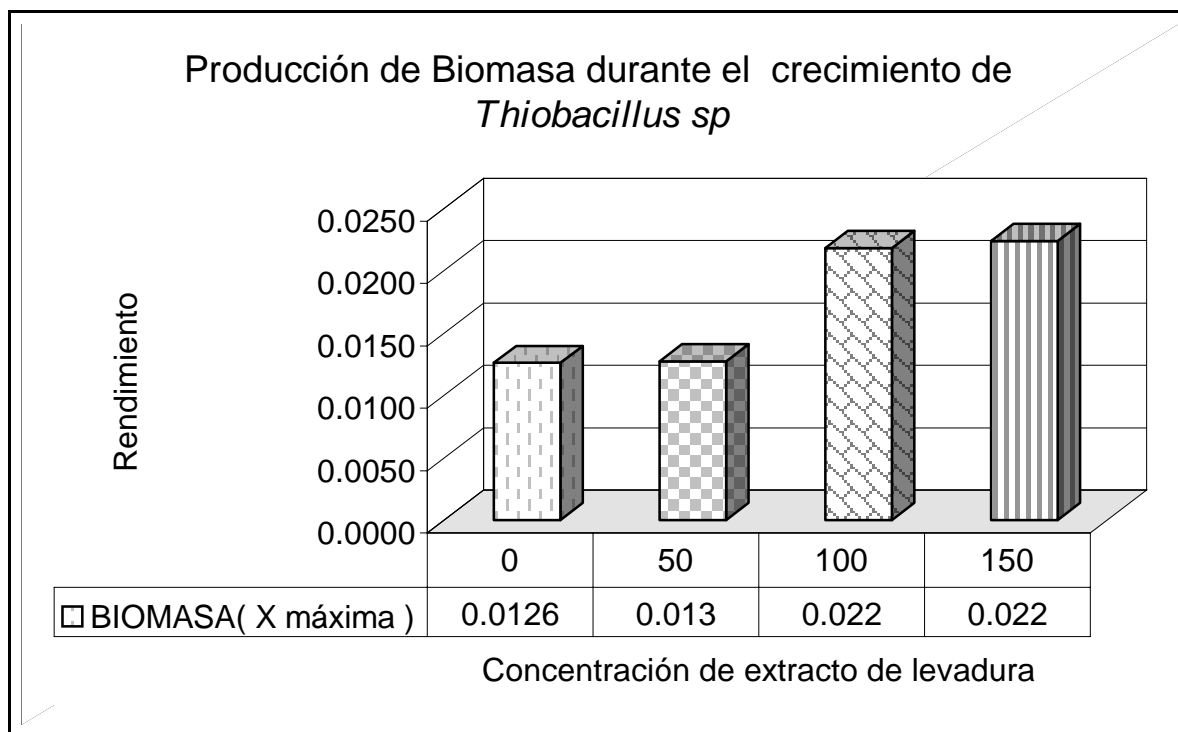


Figura IV.4 1.B. Rendimiento del crecimiento de *Thiobacillus sp* durante las cinéticas de crecimiento.

En este gráfico podemos observar objetivamente el efecto favorable para el crecimiento microbiano al suplementar en el medio de cultivo, extracto de levadura y utilizar como sustrato tiosulfato de sodio a una concentración de 40 g/L.

El comportamiento del pH presentado en la figura IV.4.2, nos indica que durante las cinéticas de crecimiento fue el mismo que se observó cuando se creció el microorganismo en tiosulfato sin suplementar, es decir después de que termina el crecimiento exponencial, el pH llega a 3 y se mantiene constante durante las últimas horas de la cinética.

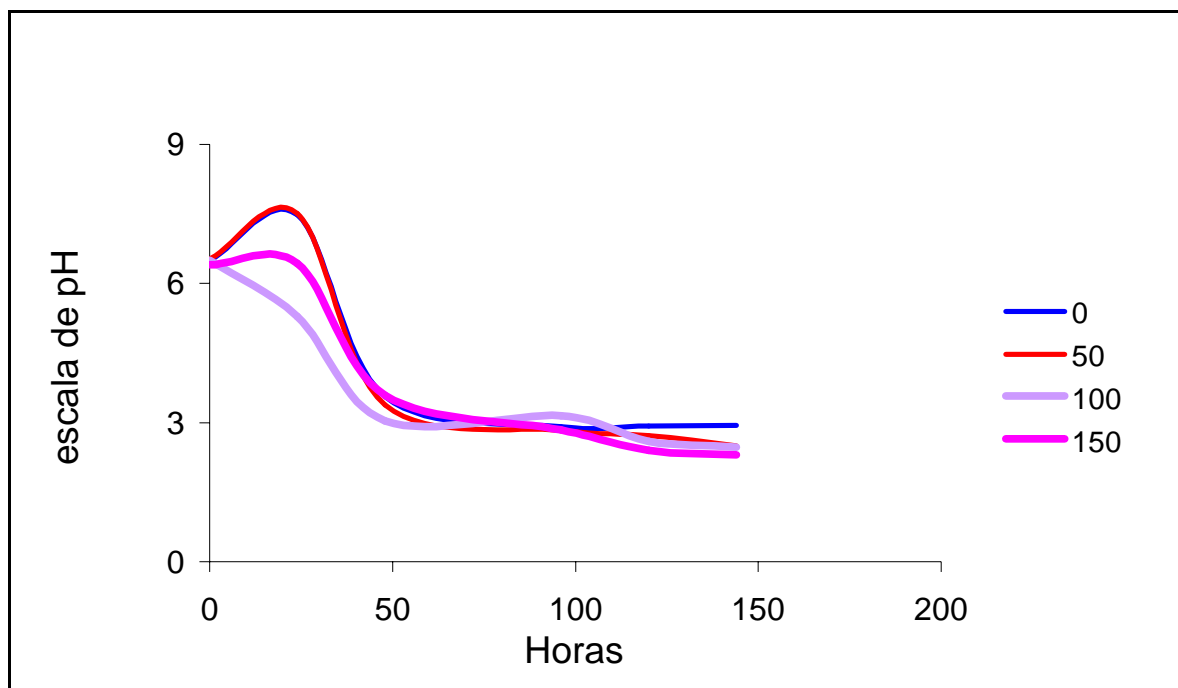


Figura IV.4.2 Comportamiento del pH durante el crecimiento de *Thiobacillus* sp en tiosulfato suplementado con diferentes concentraciones de extracto de levadura

En la tabla IV.4.1, se presentan los datos obtenidos de las cinéticas de crecimientos utilizando tiosulfato a 40/L suplementado con diferentes niveles de extracto de levadura.

Tabla IV.5.1 Parámetros cinéticos calculados con la ecuación logística y la minimización de la suma de los errores cuadrados.

<i>mg de extracto/l de medio</i>	μ <i>h⁻¹</i>	$X_{MÁX}$ <i>g de prot/l</i>	$Y_{X/S}$
0	0.065	0.504	0.0126
50	0.07	0.510	0.0128
100	0.20	0.872	0.0218
150	0.14	0.895	0.0223

Esto sugiere que el extracto de levadura no está afectando la actividad sulfoxidativa de la cepa únicamente favorece su crecimiento posiblemente incrementando la capacidad para fijar CO₂ del medio, necesario para elaborar el material celular.

Cuadro de los parámetros cinéticos comparando con los parámetros obtenidos de la actividad respiratoria:

Tabla IV.4.2 Resultados de las determinaciones de la actividad sulfoxidativa del *Thiobacillus* sp durante su crecimiento.

<i>F.de energía</i>	<i>qO₂</i>	<i>μ Máx</i>	<i>Rendimiento</i>
<i>g/L</i>	<i>gO₂/gProt.H</i>	<i>h⁻¹</i>	<i>Y_{μ/qO₂}</i>
Na ₂ S ₂ O ₃ ⁻²	0.025	0.029	1.12

En la tabla anterior, podemos observar la relación entre los parámetros cinéticos obtenidos del crecimiento “μ” con los parámetros de la actividad respiratoria “qO₂”, únicamente para tiosulfato ya que como se ha mencionado para el sulfuro, sulfito y sulfato de sodio no se presentó ninguna actividad.

El comportamiento en cada uno de los sustratos fue diferente ya que se obtuvo un mayor crecimiento y una mayor actividad en tiosulfato mientras que en sulfuro se necesitó de un tiempo mayor para que la cepa se adaptara al sustrato antes de poder presentar algún crecimiento.

Asimismo en la actividad respiratoria, casi no se obtuvo respuesta alguna. La diferencia obtenida fue de un orden de magnitud entre cada sustrato ensayado.

Considerando el diagrama propuesto en la sección de introducción, en dónde se presenta el acoplamiento de la cadena respiratoria (transferencia de electrones) con el proceso de asimilación de bióxido de carbono para elaborar material celular, en condiciones quimiolitotróficas se puede observar:

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 40 g/L se obtuvo una X máx. = 0.504 g/L

$$Y_{X/S} = 0.504/40^{**} = 0.0126$$

$$= 12.6$$

PM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ = 158 g/mol

$(25.2 \text{ mg } X) * (158 \text{ g/mol}) = 3.98$ aprox. 4 g Biomasa/mol $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

$Y_{X/ATP} = 4/15 \text{ gATP} = 0.26$ aprox. 0.3 g biomasa /mol ATP.

Mientras que un microorganismo heterotrófico, obtiene aproximadamente 2.36 g de Biomasa por mol de ATP.

Al relacionar los datos velocidad específica de consumo de oxígeno con los de rendimiento en relación con el crecimiento tenemos:

* Considerando que todo el sustrato fue consumido.

$$Y_{X/S} \text{ exp} = 0.0126$$

$$q_s = \mu / Y_{X/S}$$

Sustituyendo:

$$q_s = 0.025$$

$$\mu = 0.029$$

$$Y_{X/S} = 0.029 / 0.025 = 1.16$$

Como podemos observar existe una gran diferencia entre los datos calculados utilizando solamente los datos obtenidos con el crecimiento con los resultados obtenidos de la relación con los datos de respiración.

Generalmente para microorganismos que crecen en condiciones quimiolitotróficas y aerobias, los resultados experimentales no concuerdan con los resultados estequiométricos; esta variación es debida como ya lo han reportado previamente muchos autores, porque existen diferentes rutas metabólicas que no han sido estudiadas y porque la energía de mantenimiento influye de manera directa con el crecimiento.

Kurosawa y col. (1994) reportaron un $Y_{X/S} = 12.5$ mg biomasa/g Tiosulfato. (Experimentos realizados con *T. ferrooxidans*)

Nakamura y col. (1990) reportaron un $Y_{X/S} = 21$ mg/g de tiosulfato. Para *T. ferrooxidans*

Mientras que en el presente experimento el valor de

$Y_{X/S} = 12.6$ para la cepa de *T. sp.*

Recordando los resultados de los casos experimentales de Stouthamer A.H. (1977), dónde observo una gran discrepancia entre los valores experimentales y los valores teóricos para el rendimiento de la biomasa respecto al ATP puede ser resultado de que el ATP producido por el catabolismo puede ser utilizado por los requerimientos ATP para la síntesis de material celular.

V. Conclusiones

- La cepa de *Thiobacillus* sp resultó ser un organismo especializado para utilizar el tiosulfato de sodio suplementado con factores nutricionales, con poca o nula afinidad por el sulfuro y el sulfito, esto indica el pobre crecimiento en sulfuro y nulo con sulfito y el crecimiento y actividad respiratoria medible con tiosulfato.
- No se pudo comprobar la hipótesis de la relación entre el potencial electroquímico de los substratos y el crecimiento microbiano, porque:
 - La formación de cristales de azufre por la oxidación del sulfuro disminuye su crecimiento, pues las células se adhieren al material sólido formado.
 - El sulfito de sodio no fue oxidado por la cepa de *Thiobacillus* sp.
- Con el sulfuro de sodio no se logró saturar el proceso oxidativo pues el organismo mostró muy poca afinidad por este substrato.
- Los electrones producidos por la oxidación del sulfuro de sodio posiblemente están entrando en el complejo III; asimismo se observó una posible transferencia de electrones en sentido inverso el cual se favoreció al utilizar antimicina (inhibidor de la región Q_N)
- La falta de actividad sulfoxidativa del sulfito de sodio en las mediciones con la técnica de respirometría y durante las cinéticas de crecimiento indica que esta cepa no tiene las enzimas necesarias para oxidar el sulfito de sodio y/o que este compuesto inhibe fuertemente la actividad citocromo oxidasa, por lo tanto requieren de otro mecanismo como la formación de politionatos para oxidar los diferentes compuestos reducidos de azufre hasta sulfuro.
- Debido a que esta cepa está muy adaptada a tiosulfato, requiere de algún mecanismo de activación para poder presentar actividad sobre el sulfito de sodio.

- Los 2 desacoplantes utilizados en los ensayos presentaron actividad inhibitoria debido a que están abatiendo el potencial de membrana el cual está directamente relacionado con la cadena de transporte de electrones e interviene en los procesos oxidativos incrementando o reduciendo la velocidad de la actividad sulfoxidativa.
- La forma de los intermediarios producidos durante la oxidación influyen en la velocidad de la actividad sulfoxidativa ya que presencia de cristales de azufre elemental formados en la primera etapa de oxidación de sulfuro de sodio, disminuyó la velocidad de la actividad sulfoxidativa porque las células tienen que adherirse a los cristales para poder oxidarlos para obtener energía.
- Durante el crecimiento quimiolitotrófico, la cepa presenta una mayor eficacia en tiosulfato de sodio a una concentración de 40 g/L ya que es en esta fuente dónde se presenta un mayor crecimiento y actividad sulfoxidativa.
- Se observó que la disminución del pH está relacionada con la generación de protones, provocada como resultado de la oxidación de los compuestos reducidos de azufre así como de la producción de sulfatos; esta disminución es independiente de la concentración de sustrato hasta ciertos niveles.
- El extracto de levadura a una concentración de 0.05 g/L no presentó ningún efecto en la actividad sulfoxidativa de la cepa, mientras que a las concentraciones de 0.1 y 0.15 g/L aunque no se observa ninguna diferencia entre estas concentraciones, sí favorecieron el crecimiento microbiano, por tanto la cepa crecida en condiciones axénicas requiere la presencia de factores de crecimiento proporcionados por el extracto de levadura ya que se ha vuelto un microorganismo especializado.
- Durante el crecimiento de la cepa con sulfuro de sodio como sustrato se presentó una mayor formación de cristales de azufre elemental en comparación con tiosulfato de sodio.

-
- Alcantara S. 2000. Estudio de la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre utilizando un consorcio de microorganismos sulfoxidantes. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. 135 p.
- Bard A.J, Parsons R, Jordan J. 1998, Standard Potentials in Aqueous solution, IUPAC, Marcel Dekker, inc. pp 93-106.
- Beffa T., C. Fischer, M. Aragno. 1992. Respiratory oxidation of reduced sulfur compounds by intact cells of *Thiobacillus tepidarius* (type strain). *Arch Microbiol.* 158: 546-458.
- Blake R.C and Shute E.A. 1994, Respiratory enzymes of *Thiobacillus ferrooxidans*. Kinetic properties of an acid-stable iron: Rusticyanin oxidoreductase, *Biochemistry*, 33:9220-9228.
- Brugna M, Nitschket W, Asso M, Guigliarelli B, Lemesle-Meunier D and Schmidt C. 1999, Redox components of cytochrome bc-type enzymes in acidophilic prokaryotes, *The journal of biological chemistry*, 24:16766-16772.
- Buonfiglio V, Polidoro M, Soyer F, Valenti P and Shively J. 1999, A novel gene encoding a sulfur-regulated outer membrane protein in *Thiobacillus ferrooxidans*, *Journal of Biotechnology* 72: 85-93.
- Corbett C, Ingledew W. (1987). Is $\text{Fe}^{3+/2+}$ cycling an intermediate in sulphur oxidation by Fe^{2+} grown *Thiobacillus ferrooxidans*? *FEMS Microbiol. Lett.* 41, 1-6
- Cork D, Garnas R, Saijad A. 1983 *Chlorobium lumicola* forma *Thiosulfatophilum*: Biocatalyst in the production of sulfur and organic carbon from a gas stream containing H_2S and CO_2 , *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (3), 913-918
- Cotton F.A and Wilkinson K.G, (2001). *Química Inorgánica Básica*, Ed. Limusa, p 647.
- Donovan P.K, 1999, thermodynamic aspects of energy conservation by chemolithotrophic sulfur bacteria in relation to the sulfur oxidation pathways, *Arch Microbiol*, 171: 219-229.
- Duncan K.E., K.L. Sublette, P.A. Rider, A. Stepp, R.R. Beitle, J.A. Conner and R. Kolhatkar. 2000, Analysis of a microbial community oxidizing inorganic sulfide and mercaptans, *American chemical society and American of chemical engineers*, p.100-107
- Elbehti A and Lemesle-Meunier D. 1996 Identification of membrane-bound c-type cytochromes in an acidophilic ferrous ion oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*, *FEMS Microbiology Letters* 136: 51-56.
- Elbehti A, Brasseur G, and Lemesle-Meunier D. 2000, First evidence for existence of an uphill electron transfer through the bc1 and NADH-Q oxidoreductase complexes of the acidophilic obligate chemolithotrophic ferrous ion-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*, *Journal of Bacteriology*, 182 (12) 3602-3606

Elbehti A, Nitschke W, Tron P, Michel C and Lemesle-meunier D. 1999, Redox components of cytochrome bc-type enzymes in acidophilic prokaryotes (Characterization of the cytochrome bc₁-type complex of the acidophilic ferrous ion-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*), *The journal of biological chemistry*, 24: 16760-16765.

Estrada I (1998), Aspectos microcinéticos de la oxidación de los compuestos azufrados. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México. 60 p.

Ferguson S,J. (1991). The periplasma. In *Prokaryotic Structure and function*. Ed. Mohan C.D. and Coles J.A. pp. 310-339.

Gottschalk, G. 1985, *Bacterial metabolism*, second edition, Springer-verlag. N.Y inc., pp 283-318.

Groenestijn J y Hesselink P (1993). *Biotechniques for air pollution control*. Biodegradation 4, 283-301.

Guidici-Ortoni, M.T, Guerlesquin F, Bruschi M and Nitschke W. 1999, Interaction-induced Redox Switch in the Electron Transfer Complex Rusticyanin-Cytochrome c₄, *The Journal of biological chemistry*, 274 (43), 30365-30369.

Hofacker, I., and K. Schulte. (1998). Oxygen and proton pathways in cytochrome c oxidase. *Proteins* 30: 100-107.

Hooper y Dispirito A.(1985). In bacteria which grow on simple reductants, generation of a proton gradient involves extracytoplasmic oxidation of substrate. *Microbiol. Rev* 42, (2) 140-157.

<http://www.enviromine.com/ard/Microorganism/releofhtm>. The role of micro-organisms in the sulphur cycle. P: 7

<http://www.geocities.com/RainForest/Vines/7050/index2.html>. *Thiobacillus*, Soil-microbiology.

Ingledeu, W.J., and J.G. Copley. 1980. A potentiometric and kinetic study on the respiratory chain of ferrous iron grown *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochim. Biophys. Acta* 590: 141-158.

Janssen A. Mas. Lens P. Lettinga G.(1997). Performance of a sulfide-oxidizing expanded-bed reactor supplied with dissolved oxygen. *Biotechnol. Bioeng* 53, 32-40.

Jensen A, Webb C.(1995). Treatment of H₂S containing gases: A review of microbiological alternatives. *Enzymic microbiol. Technol.* 17, 2-10.

Johnson D.B, Jean H.M Macvicar and Rolfe S.1987, A new solid medium for the isolation and enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* and acidophilic heterotrophic bacteria, *Journal of Microbiological Methods* 7: 9-18.

-
- Kawasaki, L., Alcantara, S., Rios, M. y Revah, S. Isolation and characterization of a sulfoxidizing bacterium isolated from a microbial consortium adapted to sulfides. (manuscrito en preparacion).
- Kelly D. Shergill J, Lu W, Wood A.(1997). Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 71, 195-197.
- Kelly D.(1982). Biochemistry of the chemolithotrophic oxidation of inorganic sulfur. *Phil. Trans R. soc. Lond.* 238, 499-528.
- Kelly P.1990. Energetics of Chemolithotrophs in the bacteria, vol XII, ed T.A. Krulwich, Academic Press, Inc USA pp 479-501.
- Kelly, D.P., Shergill, I.K., Lu, W-P, and A.P. Wood. 1997. Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71: 95-107.
- Kurosawa, H, Maeda, K, Yamamoto E, Nakamura K, Amano Y.(1994) . Grow of *Thiobacillus ferrooxidans* utilizad thiosulfate throught the oxidation route with iron recycling. *J. of general ang App. Microbiol.* 40, (6), 491-498.
- Lee M, Senios J. Grossman M. (1995). Sulfur-specific microbial desulfurization of stencally hidered analogs of O.benzothipeno. *App. Environ. Microbiol.* 61, 4362-66.
- Lehninger, A.L.1982. Bioquímica, Ediciones Omega, 2^A edición 116p.
- Lytic R M, Suzuki I, 1970, Enzymes involved in the metabolism of thiosulfate by *Thiobacillus thiooparus*. III. Properties of thiosulfate-oxidizing enzyme and proposed pathway of thiosulfate oxidation. *Can. J. Biochem.* 48, 355-363.
- Lytic R. M, Suzuki I. (1970). Enzymes involved in the metabolism of thiosulfate by *Thiobacillus thiooparus*. III. Properties of thiosulfate-oxidizing enzyme and proposed pathway of thiosulfate oxidation. *Can. J. Biochem.* 48, 355-363.
- Madigan M, Martinko J, Parker J. (1998). Diversidad metabólica de los microorganismos. En: *Biología de los microorganismos*. Prentice Hall Iberia, pp. 473-531.
- Nakamura K, Miki H, Amano Y.(1990). Cell growth and accumulation of *Thiobacillus thiooxidans* S3 in a pH-controlled thiosulfate médium.*J. Gen. Appl. Microbiol.* 36,(6), 639-676.
- Robertson L, K. 1991, The colorless sulfur bacteria, In : Balows A, Trüper H, Dworkin M, Harder H, Schleifer K (eds) *The prokaryotes*, vol 1, Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 385-413.
- Schauder R and Kröger A. 1992 Bacterial sulphur respiration, Minireview, *Arch. Microbiology* p: 159-291.

-
- Sublette K, Silvestre N.(1987). Oxidation of hydrogen sulfide by mixed cultures of *Thiobacillus denitrificans* and heterotrophs. *Biotechnol. Bioeng.* 29, 759-761.
- Sublette K. 1987. Aerobic oxidation of hydrogen sulfite by *thiobacillus denitrificans*, *Biotech. Bioeng.* 29, 690-695.
- Sublette K.L. 1986, Aerobic oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus denitrificans*, *Biotechnology and bioengineering*, Vol. XXIX: 690-695.
- Suzuki I, 1999, Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions, *Can J. Microbiol.* 45: 97-105.
- Suzuki I, Key J. 1977, Isolation and characterization of a membrane-associated thiosulphate-oxidizing system of *Thiobacillus novellus*, *Journal of General Microbiology*, 99, 397-412.
- Takakuwa S, Fujimori S. 1979, Some properties of cell-sulfur adhesion in *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 25, 21-30
- Takakuwa S. (1992). Biochemical Aspects of microbial oxidations of inorganic sulfur compounds. In : *Organic sulfur chemistry: Biochemical Aspects*. Eds. Oae. S. Okuyama 7 CRS Press. USA. Pp 1-44.
- Tano T and Lundgren D.1977, Sulfide oxidation by spheroplasts of *Thiobacillus ferrooxidans*, *Applied and environmental microbiology*, p: 1198-1205.
- Torres C.M, Revah S, Hinojosa M. A, Paez M, F. Morales V.(1993) Biological process for the elimination of sulphur compounds present in gas mixture. U.S. Patent 5,236,677.
- Yamanaka T, Fukumori S, 1995, Molecular aspects of the electron transfer system which participates in the oxidation of ferrous ion by *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Rev.* 17, 401-413.
- Yamanaka T, Yoshioka T, Kimura K, 1981, Purification of sulphite cytochrome c reductase of *Thiobacillus novellus* and reconstitution of its sulphite oxidase systems with the purified constituents. *Plant Cell Physiol.* 22, 613-619.
- Yamanaka, T., T. Yano, M. Kai, H. Tamegai, A. Sato, and Y. Fukumori. 1991. The electron transfer system in an acidophilic iron-oxidizing bacterium, p. 223-246.