

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE  
MICROORGANISMOS OBTENIDOS DE REACTORES  
SULFOXIDANTES**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas

**P R E S E N T A**

**M. en C. BEATRIZ MÓNICA PÉREZ IBARRA**

**Comité tutorial:**

**Tutor: Dr. Martín García Varela**

**Asesor: Dra. Julia Pérez Ramos**

**Asesor: Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez**

Noviembre/2007

**“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma  
Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrado de Excelencia del  
CONACyT, además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio  
PFP-20-93”**

**El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó**

**Beatriz Mónica Pérez Ibarra**

**El día \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del año de \_\_\_\_\_**

**Comité Tutorial:**

**Firma**

Tutor: Dr. Martín García Varela

\_\_\_\_\_

Asesor: Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez

\_\_\_\_\_

Asesor: Dra. Julia Pérez Ramos

\_\_\_\_\_

Sinodal: Dra. Nathalie Cabirol Gilles

\_\_\_\_\_

Sinodal: Dr. Felipe Martínez Orta

\_\_\_\_\_

Sinodal: Dr. Francisco José Fernández  
Perrino

\_\_\_\_\_

## **Dedicatorias**

*A ti, Carlitos J. Román dedicó este trabajo fruto de un gran esfuerzo del que tu eres parte, ya que junto a mi viviste las adversidades y las alegrías durante su realización. Finalmente, todo esto me ha fortalecido y reafirmado como ser humano, para continuar adelante en la realización de mis sueños.  
Soy afortunada por tenerte a mi lado.*

*A ti, mamá donde quiera que te encuentres, tu recuerdo y ejemplo siempre me acompañaran.*

*A ti, papá por apoyarme incondicionalmente en esta aventura de vivir.*

*A mi hermano, Francisco por tus enseñanzas y por compartir las alegrías de la infancia, tu recuerdo siempre estará conmigo.*

*A mis hermanos Susana y Javier, por compartir conmigo las aventuras y enseñanzas que nos brinda la vida.*

*A mis sobrinos Naxelli, Andrés, Jaritzi y Baruch, por que ellos y sus hijos logren alcanzar todos sus sueños.*

## **Agradecimientos**

**Agradezco profundamente al Dr. D.P. Kelly por su profesionalismo, sencillez y generosidad durante la revisión del artículo, sus valiosas aportaciones hicieron posible, florecer todo mi esfuerzo.**

**Agradezco al Dr. J. Murrell y árbitros por sus valiosas aportaciones y profesionalismo.**

**Agradezco con mucho cariño al Dr. R. Ortega-Martínez por sus sabios consejos, su amistad y generosidad, al brindar un espacio en su laboratorio de Óptica No Lineal CCADET-UNAM, factores importantes que me permitieron, sacar adelante, el presente trabajo.**

Agradezco a la Dra. Carmen Márquez-Marcos por su colaboración en los análisis del contenido de G+C y estudios de hibridación DNA-DNA así como también, por su comprensión y profesionalismo.

A la Dra. Reyna Fierro Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biológicas por su profesionalismo, comprensión, generosidad y sensibilidad, importantes cualidades para desempeñar una excelente labor.

Con profundo cariño agradezco a M en C. A. Hamdan-Partida, Dra. L. Ongay-Larios y Dra M<sup>a</sup> del Carmen Fajardo Ortiz por su asistencia técnica en la realización del presente trabajo, a si mismo agradezco al Dr J.D. Sepúlveda-Sánchez por su accesoria en microscopia electrónica de barrido (scanning electron microscope SEM), y por brindarme su amistad.

Al Dr. N. Bruce, C.J Román-Moreno y H. Estrada por su ayuda en la redacción en inglés del artículo fruto del presente trabajo.

A mi comité tutorial Dr. Martín García Varela, Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez y Dra. Julia Pérez Ramos, Dr. Felipe Martínez Orta Dr. Francisco J. Fernández Perrino y Dra. Nathalie Cabriol Gilles por sus valiosas aportaciones.

Agradezco a los amigos y compañeros del Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel Sur UNAM, Prof. Ramiro González, Anita Méndez, Patricia García, M<sup>a</sup> Lourdes García, León Chanona por animarme a seguir adelante.

Agradezco a amigos y compañeros que me ayudaron desinteresadamente y me animaron a seguir adelante Dra Rina González, Minerva, Lupita, Dr Lino, Dra. Laura Castrillón y Dr. Alejandro Palma, Dra. Martha Rosete, Antonio Rodríguez y Arturo Nogueira.

Agradezco al CONACYT y al pueblo de México, la beca número: 66485 que me fue otorgada para mi sostenimiento económico durante la realización del doctorado.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de emisiones gaseosas (W-107) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, en el laboratorio de Ecología Molecular y laboratorio (G-007) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

*Honor a quien honor merece  
(Anónimo)*

# Índice

	Página
<b>ABREVIATURAS</b>	9
<b>RESUMEN</b>	11
<b>SUMMARY</b>	12
<b>INTRODUCCIÓN</b>	13
<b>1. MARCO TEORICO</b>	16
1.1 Principales contaminantes del ambiente	16
1.2 Importancia del ciclo biogeoquímico del azufre	17
1.3 Bacterias sulfoxidantes	22
1.4 Metabolismo del carbono de las bacterias sulfoxidantes	23
1.5 Metabolismo oxidante de compuestos reducidos de azufre	26
1.5.1 “La vía de oxidación de azufre del género <i>Paracoccus</i> ”o sistema multi-enzimático para la oxidación de tiosulfato (por sus siglas en inglés TOMES).	26
1.5.2 “La vía del intermediario $S_4$ ” (o <i>S4I</i> ) ( <i>involucra politionatos</i> )	28
1.5.3 Vía de oxidación de sulfito a sulfato	30
1.6 Energía de oxidación de compuestos reducidos de azufre	32
1.7 Importancia de las comunidades microbianas del azufre en los biotratamientos	32
1.8 Procesos biológicos para eliminación de compuestos de azufre	34
1.9 Métodos moleculares para el estudio de comunidades microbianas y sus especies	37
1.9.1 Hibridación DNA-DNA	39
1.9.2 Porcentaje de guanina y citosina (% G+C) del DNA	41
1.9.3 Estudios de genes blanco	43
1.9.4 Aislamiento del gen <i>rRNA 16S</i> y análisis de la secuencia	45
1.9.5 Análisis de RFLP	46
1.9.6 Análisis por DGGE	46
1.9.7 Análisis por TGGE	47
1.9.8 Técnica de RAPD	47
1.9.9 Técnica FISH	47
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	51
<b>PROBLEMA</b>	51
<b>2. OBJETIVOS</b>	51
2.1 Objetivo general	51
2.2 Objetivos particulares	51

<b>2.3 Estrategia de trabajo</b>	<b>52</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>53</b>
<b>3.1 Caracterización microbiológica</b>	<b>53</b>
<i>3.1.1 Origen del consorcio</i>	<b>53</b>
<i>3.1.2 Cepas, procedencia y su conservación</i>	<b>53</b>
<i>3.1.3 Medios empleados (composición ver apéndice B)</i>	<b>53</b>
<i>3.1.4 Aislamiento e identificación</i>	<b>53</b>
<i>3.1.5 Preparación de inóculo</i>	<b>54</b>
<b>3.2 Características fenotípicas</b>	<b>55</b>
<i>3.2.1 Morfología colonial</i>	<b>55</b>
<i>3.2.2 Morfología microscópica</i>	<b>55</b>
<i>3.2.3 Técnicas de tinciones descritas por Benson (1990)</i>	<b>55</b>
<i>3.2.4 Determinación de movilidad</i>	<b>55</b>
<i>3.2.5 Determinación del tipo del ácido diaminopimélico en pared celular</i>	<b>56</b>
<i>3.2.6 Determinación de ácidos grasos en la pared celular</i>	<b>57</b>
<b>3.3 Características fisiológicas y bioquímicas de los aislados</b>	<b>58</b>
<i>3.3.1 Tolerancia a la presencia de cloruro de sodio en el medio</i>	<b>58</b>
<i>3.3.2 Crecimiento a diferentes temperaturas</i>	<b>59</b>
<i>3.3.3 Crecimiento de aislados en presencia de tiosulfato</i>	<b>59</b>
<i>3.3.4 Comparación de crecimiento quimiolitótrofo entre cepa a caracterizar y <i>Bacillus jeotgali</i> CCM 7133<sup>T</sup></i>	<b>60</b>
<i>3.3.5 Determinación de catalasa y oxidasa</i>	<b>60</b>
<i>3.3.6 Identificación microbiológica por el sistema manual API</i>	<b>60</b>
<b>3.4 Caracterización de aislados por métodos moleculares</b>	<b>60</b>
<i>3.4.1 Extracción de DNA genómico</i>	<b>60</b>
<i>3.4.2 Amplificación del gen <i>rRNA 16S</i> por PCR</i>	<b>60</b>
<i>3.4.3 Amplificación de la región V6-V8 de los aislados</i>	<b>60</b>
<i>3.4.4 Tipificación por PCR-REA del gen del <i>rRNA 16S</i>.</i>	<b>61</b>
<i>3.4.5 Tipificación de los aislados por PCR-RAPD</i>	<b>61</b>
<i>3.4.6 Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)</i>	<b>62</b>
<i>3.4.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)</i>	<b>62</b>
<i>3.4.8 Secuenciación del gen del <i>rRNA 16S</i> de los aislados</i>	<b>63</b>
<i>3.4.9 Clonación de productos de PCR del aislado a caracterizar</i>	<b>63</b>
<i>3.4.10 Análisis filogenético del aislado a caracterizar</i>	<b>63</b>
<i>3.4.11 Determinación del contenido G+C del DNA</i>	<b>64</b>
<i>3.4.12 Preparación del DNA para ser marcado con el isótopo radioactivo <sup>3</sup>H y</i>	<b>64</b>

<i>experimentos de hibridación DNA-DNA</i>	
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>66</b>
<b>4.1 Aislamiento, identificación y caracterización microbiológica de los aislados</b>	<b>66</b>
<i>4.1.1 Aislamiento de bacterias sulfoxidantes</i>	66
<i>4.1.2 Morfología colonial de los aislados</i>	67
<i>4.1.3 Morfología microscópica y actividad enzimática</i>	69
<i>4.1.4 Determinación de la capacidad sulfoxidante de los aislados</i>	70
<i>4.1.5 Cambios en el pH</i>	73
<i>4.1.6 Determinación del perfil de ácidos grasos en los aislados</i>	75
<b>4.2 Caracterización de aislados por métodos moleculares</b>	<b>76</b>
<i>4.2.1 Tipificación de los aislados por PCR-REA del gen rRNA 16S</i>	76
<i>4.2.2 Tipificación por PCR-RAPD</i>	77
<i>4.2.3 Tipificación por DGGE</i>	79
<i>4.2.4 Secuenciación del gen rRNA 16S de los aislados</i>	80
<b>4.3 Caracterización del aislado BMP-1<sup>T</sup></b>	<b>83</b>
<i>4.3.1 Posición filogenética del aislado BMP-1<sup>T</sup></i>	83
<i>4.3.2 Características fisiológicas del aislado BMP-1<sup>T</sup> vs Bacillus jeotgali CCM 7133<sup>T</sup></i>	84
<i>4.3.3 Características fenotípicas del aislado BMP-1<sup>T</sup> vs Bacillus jeotgali CCM 7133<sup>T</sup> y otras especies de Bacillus</i>	86
<i>4.3.4 Características quimiotaxónomicas</i>	88
<i>4.3.5 Características genotípicas</i>	88
<i>4.3.6 Hibridación DNA-DNA</i>	89
<i>4.3.7 Descripción de Bacillus thioparus sp. nov.</i>	90
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>91</b>
<b>6. IMPORTANCIA DEL PRESENTE TRABAJO</b>	<b>91</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>94</b>
<b>Apéndice A</b>	<b>107</b>
<b>Apéndice B</b>	<b>109</b>
<b>Apéndice C</b>	<b>111</b>

## ABREVIATURAS

ADH	L-arginina
ARDRA	Análisis de restricción de DNA-ribosomal amplificado
ASW	Suplemento mineral
BLAST	Herramienta de búsqueda básica de alineación local
BSR	Bacterias sulfato reductores
BLE	Biolavadores de lecho escurrido
BMP-1 <sup>T</sup>	cepa tipo BMP-1 <sup>T</sup>
CC	Reactor en cultivo continuo
CSTR	Reactor de mezcla completa
CIT	Citrato trisódico
Cot <sub>1/2</sub>	Coefficiente de reasociación al 50%
COVS	Compuestos orgánicos volátiles de azufre
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FISH	Hibridación fluorescente in situ
G+C	Guanina +citocina
GEL	Gelatina
ITS	Espacio intergénico
LDC	L-lisina
MQ	Agua MilliQ
MSGG	Medio Sublette con goma gellana
MSL	Medio Sublette líquido
nov.	nuevo
nt	nucleótidos
ODC	L-ornitina
PAC	Ácido fenilacético
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PNPG	2-nitrofenil-βD-galactopiranosas
RAPD	Amplificación aleatoria de DNA polimórfico
RDP	Ribosomal Database Project
REA	Análisis de restricción por endonucleasas
RFLP	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
RLFI	Reactor de lecho fluidizado inverso
TGGE	Electroforesis en gel con gradiente de Temperatura
TOMES	Sistema multi-enzimático para la oxidación de tiosulfato
TSB	Caldo de tripticaseína soya
UAM-I	Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
UASB	Reactor del tipo manto de lodo con flujo ascendente
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
URE	Urea
VP	Piruvato de sodio
WFCC	Federación mundial de colecciones de cultivo

*Un investigador con vocación es aquel que puede sentir una inmensa alegría divina,  
que inunda su corazón, al lograr descubrir y entender los misterios de la naturaleza.  
¡Satisfacción que no todos pueden experimentar y entender!  
BM Pérez-Ibarra*

## RESUMEN

Los compuestos reducidos de azufre (sulfuros metálicos  $\text{Na}_2\text{S}$ , ácido tiosulfúrico  $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , ácido sulfuroso  $\text{H}_2\text{SO}_3$ , sulfhídrico  $\text{R-SH}$  y sulfuro  $\text{HS}^-$ ) son nocivos para el medio ambiente porque están asociados a la lluvia ácida, causante de daños a los cultivos, ganado fenómenos de corrosión y problemas respiratorios a la población. Dentro de las formas de remediación más eficientes y ecológicamente atractivas está el empleo de microorganismos que utilizan como fuente de energía dichos compuestos. Un amplio estudio en su identificación, caracterización, fisiología y bioquímica permitirá un manejo más eficiente de los procesos biotecnológicos de bio-remediación relacionados con el tratamiento de emisiones ricas en compuestos contaminantes como sulfuros y tiosulfatos. De acuerdo con lo anterior, en el presente trabajo se lograron aislar tres cepas sulfoxidantes nombradas IMP, BMP-1<sup>T</sup> y AR3, provenientes de comunidades bacterianas sulfoxidantes presentes en tres reactores en cultivo continuo, funcionando bajo diferentes condiciones de operación (Tabla 4). Los aislados mostraron un rendimiento de crecimiento en presencia de tiosulfato muy semejante, siendo para IMP 1.25 g proteína/mol  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  consumido, BMP-1<sup>T</sup> 1.07 g proteína/mol  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  consumido y por último AR3 con 1.49 g proteína/mol  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  consumido. El análisis de la secuencia del gen del rRNA 16S indicó que los aislados IMP y AR3 presentaron 98 % y 99 % de similitud con *Halothiobacillus neapolitanus* DMS 581, mientras BMP-1<sup>T</sup> resultó ser una especie nueva cuyas células fueron Gram variable, aerobias, halótolerantes móviles y bacilos con endoesporas. El contenido de G+C en el DNA fue de 43.8 mol%. En la pared celular el peptidoglicano se compone de ácido *m*-diaminopimélico; y también se encuentra como principal ácido graso  $\text{C}_{15:0}$  (77.30 %). El análisis del gen del rRNA 16S mostró que la especie pertenece al género *Bacillus*, compartiendo un 99.5% de similitud con *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup>. Sin embargo, la hibridación DNA-DNA entre nuestro aislado y esta especie fue del 44 %. Los bajos porcentajes demostraron claramente que BMP-1<sup>T</sup> y *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> representan dos especies diferentes. Por lo tanto, nosotros sugerimos la inclusión de la especie BMP-1<sup>T</sup> en el género *Bacillus* como una nueva especie con el nombre de *Bacillus thioparus* sp. nov. La cepa fue depositada en dos ceparios internacionales reconocidos, Colección de Cultivo UNAM-48/WFCC como especie tipo BM-B-436<sup>T</sup> y la Colección Española de Cepas Tipo como CECT 7196<sup>T</sup>. En cuanto a la secuencia del gen del rRNA 16S se depositó en la base de datos GenBank con el número de acceso **DQ371431**.

## SUMMARY

The reduced sulfur compounds have an impact on the environment. Among the methods for remediation, the most efficient and ecologically attractive is the one that use microorganism able to autotrophic growth using reduced sulfur compounds as sources of energy. A better identification and characterization as well as deeper understanding of their physiology and biochemistry will allow a more efficient management of the biotechnological bioremediation processes closely related to the treatment of rich emissions in sulfide and thiosulfates compounds pollutants. Then, according to what had been said above, this thesis reports the isolation of three sulfoxidizing species named IMP, BMP-1<sup>T</sup> y AR3 from three continuous wastewater treatments culture systems operating with a bacterial consortium at different conditions. Strains grew chemolithoautotrophically by oxidation of thiosulfate to sulfate with a growth yield of 1.25 g protein mol<sup>-1</sup> of thiosulfate consumed for IMP, 1.07 g protein mol<sup>-1</sup> of thiosulfate consumed for BMP-1<sup>T</sup> and finally, 1.49 g protein mol<sup>-1</sup> of thiosulfate consumed for AR3. The rRNA 16S gene analysis showed that strains IMP and AR3 had 98 % and 99% of sequence similarity with *Halothiobacillus neapolitanus* DMS 581, while BMP-1<sup>T</sup> was a novel bacterium. Cells of the isolate were Gram-variable, aerobic, moderately-halotolerant, motile and endospore-forming rods. Strain BMP-1<sup>T</sup> grew chemolithoautotrophically by oxidation of thiosulfate to sulfate with a growth yield of 1.07 g protein mol<sup>-1</sup> of thiosulfate consumed. DNA G+C content was 43.8 mol%. Its cell wall had peptidoglycan based on *m*-diaminopimelic acid, and the major component of fatty acid was C<sub>15:0</sub> (77.30 %). rRNA 16S gene analysis showed that this strain belongs to genus *Bacillus*, sharing a 99.5 % of sequence similarity with *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup>. DNA-DNA hybridization between our isolate and this strain was 44 %. Thus, one suggest the inclusion of strain BMP-1<sup>T</sup> in the genus *Bacillus* as a novel species and propose the name *Bacillus thioparus* sp. nov. The type strain BMP-1<sup>T</sup> was deposited in two international certified culture collections in two different countries (Colección de Cultivo UNAM-48/WFCC as BM-B-436<sup>T</sup> y Colección Española de Cepas Tipo as CECT 7196<sup>T</sup>) and sequence from rRNA 16S gene was deposited in the GenBank data bank accession with number is [DQ371431](#).

*La lucha siempre merece la pena si el fin vale la pena y los medios son honestos.*  
Steven Brust

## INTRODUCCIÓN

Dentro de los contaminantes de importancia, los compuestos azufrados tienen gran relevancia debido al impacto ambiental adverso que provocan en la naturaleza. Su emisión al ambiente está asociada con la lluvia ácida, fenómenos de corrosión, mal olor y daños a la salud (Manion, 1992; McEldowney, *et. al.*, 1993). Ante esta problemática, se han empleado una serie de procesos fisicoquímicos que intentan enfrentar la contaminación. Sin embargo, resultaron ser costosos y es entonces cuando surge el interés por los tratamientos biológicos, en donde se explota la capacidad de ciertos microorganismos para degradar contaminantes. Para los bioprocesos enfocados en la eliminación de compuestos reducidos de azufre en aguas residuales se consideran varios aspectos, como son temperatura, pH, concentración de sales, las cuales son determinadas por el tipo de industria de procedencia y pueden no ser las óptimas fisiológicamente para que los microorganismos del ciclo del azufre lleven a cabo su función. En otros casos, es necesario tener condiciones extremas para un proceso más eficiente; por ejemplo, altos valores de pH para una absorción eficiente de sulfuro de hidrógeno que en ingeniería, tales parámetros son difíciles de modificar, para lograr las condiciones óptimas para los microorganismos. Por tanto esto implicaría microorganismos con capacidad de adaptación a estos ambientes extremos, siendo los microorganismos extremófilos los más adecuados para ser aplicados en dichos tratamientos. Por tales motivos, se considera necesario profundizar en el estudio de la estructura y función de las poblaciones y comunidades bacterianas sulfoxidante, las cuales son la clave para entender los mecanismos de oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre así como las condiciones que hagan a estos, procesos más eficientes. Recientemente, se han aplicado técnicas de biología molecular para el análisis de tales comunidades. La técnica de PCR permite la amplificación de los genes del rRNA 16S a partir de muestras provenientes de reactores y, junto con la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (por sus siglas en inglés DGGE), se caracterizan los miembros de comunidades microbianas complejas y asociaciones sin tener que cultivarlos. El 90 % de los microorganismos presentes en los ambientes naturales no pueden ser cultivados usando las técnicas tradicionales (Amann & Kuhl 1998; Theron & Cloete, 2000). Además, no es posible obtener cultivos puros de ciertos microorganismos, porque dependen de las actividades

de otros microorganismos o porque no se conocen las condiciones para su cultivo. En otros casos, los microorganismos pierden la capacidad de reproducirse, pero retienen su capacidad metabólica. No se conocen todavía los mecanismos moleculares relacionados con ese fenómeno; se ha propuesto que no es posible cultivar células debido a su deterioro y se les podría considerar como moribundas. Otra teoría sugiere que las células se programan genéticamente para adaptarse a las condiciones adversas (agotamiento de nutrientes, temperatura baja, u otros tipos de estrés) y generan formas de latencia (**Nyström, 2003**). Otra herramienta similar, basada en la detección de la secuencia del gen rRNA 16S, se ha aplicado en el estudio de la estructura de las comunidades microbianas y la actividad de poblaciones microbianas en los biorreactores (**Amann & Kúhl, 1998; Oerther, 2000**).

En el presente trabajo se aisló, identificó y se caracterizó bacterias sulfoxidantes, proveniente de un consorcio contenido en tres reactores de cultivo continuo operando bajo diferentes condiciones por medio de la aplicación de técnicas tradicionales de microbiología como son: el enriquecimiento de cultivo en medios selectivo, morfología celular y colonial, actividad enzimática, determinación de capacidad sulfoxidante, características quimiotaxonómicas y bioquímicas. Conjuntamente, se aplicaron técnicas moleculares como tipificación por PCR-análisis de restricción por endonucleasas (por sus siglas en inglés PCR-REA) del gen rRNA 16S de los aislados, así como tipificación por PCR-análisis de DNA polimórfico amplificado al azar (por sus siglas en inglés PCR-RAPD), electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (por sus siglas en inglés DGGE), secuenciación del gen rRNA 16S de los aislados, concluyendo con la caracterización de una nueva especie sulfoxidante (**Pérez-Ibarra et al., 2007**).

*La soberbia y la mezquindad carcomen el alma, volviendo a los seres humanos,  
muertos vivientes.  
BM Pérez-Ibarra*

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 Principales contaminantes del ambiente

Los contaminantes que se liberan en la atmósfera se dividen en tres grandes categorías según su fuente de emisión:

- **Emisiones que proceden de fuentes móviles (sector del transporte):** Las más importantes, junto al bióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), son los óxidos de nitrógeno ( $\text{NO}_x$ ), el monóxido de carbono ( $\text{CO}$ ) y los hidrocarburos ( $\text{HC}$ ), que pueden ser compuestos orgánicos volátiles y no volátiles, partículas de hollín y derivados de precursores de  $\text{HC}$  y  $\text{NO}_x$ . El ozono ( $\text{O}_3$ ) se obtiene como consecuencia de una reacción de fotooxidación de los óxidos de nitrógeno.
- **Emisiones que proceden de fuentes fijas (industria, hogares, agricultura, actividad volcánica y vertederos):** Las más importantes, junto con el  $\text{CO}_2$  son el bióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ), ácido sulfhídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ), los  $\text{NO}_x$ , los hidrocarburos, las partículas de hollín y los metales pesados, los clorofluorocarbonos y el metano ( $\text{CH}_4$ ).
- **Emisiones que surgen de la industria eléctrica:** Las más importantes, junto con el  $\text{CO}_2$  son el  $\text{SO}_2$  y las partículas de hollín.

Los compuestos azufrados tienen gran relevancia, debido al impacto ambiental adverso que provocan en la naturaleza. La industria del petróleo en México es la segunda productora, en volumen y carga de aguas residuales industriales, y en algunos efluentes es común encontrar altas concentraciones de sulfuro junto con compuestos aromáticos y nitrogenados. El sulfuro representa un problema ambiental debido a su toxicidad y por los malos olores que provoca. El sulfuro cuando alcanza los cuerpos de agua superficiales puede causar una deficiencia de oxígeno, que es muy importante para ciertas especies acuáticas (**Lesley *et al.*, 1992**). El sulfuro presenta propiedades corrosivas y están relacionadas con el daño a paredes de concreto de los reactores, sistemas de drenaje y tuberías de acero; su emisión al ambiente además de su toxicidad genera olores desagradables y lluvia ácida (**Alcántara 2000, Manion, 1992; McEldowney *et al.*, 1993**). Sus efectos a la salud pueden variar dependiendo de la concentración, el sulfuro puede causar dolor de cabeza y náusea, pérdida del sentido del olfato ardor de ojos y tráquea a concentraciones de 500 ppm puede causar pérdida de equilibrio y de

razonamiento, en periodos largos de exposición puede causar paro respiratorio y muerte. Las alternativas sugeridas para solucionar estos problemas de contaminación fueron los procesos fisicoquímicos y biológicos siendo estos últimos los preferidos por su bajo costo y simplicidad operacional (**Revah & Ortiz, 2004**).

## **1.2 Importancia del ciclo biogeoquímico del azufre**

El estudio de las bacterias del ciclo del azufre se inicio en 1890 por los microbiólogos Winogradsky y Beijerinck aunque los descubrimientos acerca de las propiedades metabólicas, posición filogenética y comportamiento ecológico de las bacterias que juegan un papel importante en el ciclo biológico del azufre han continuado hasta nuestros días. El interés actual de la comunidad científica en el ciclo biológico del azufre radica en el descubrimiento de muchos organismos que habitan en el fondo del mar, en ambientes con condiciones extremas (alta salinidad, bajo y alto pH o temperatura, etc.) por lo que son llamados microorganismos extremófilos (**Lens & Kuenen, 2001**). Su importancia abarca diversos aspectos tanto básicos como aplicados por ejemplo estudios evolutivos, origen de la vida, como fuentes de enzimas con aplicación en investigación biológica, diagnóstico medico, forense, en la industrial de alimentos y petrolera, para el saneamiento de ambientes contaminados etc.

La importancia del ciclo del azufre y su papel en el origen de la vida en nuestro planeta fue recientemente resaltada cuando la sonda Galileo descubrió ácido sulfúrico en Europa, uno de los satélites de Júpiter (**Carlson et al., 1999**).

**Edwards et al. (2000)** describió la arqueobacteria *Ferroplasma acidarmanus* (capaz de oxidar fierro, crece a 40 °C en el drenaje ácido de minas con un pH de 0.4). Es probable que este tipo de microorganismos predominaran en las condiciones atmosféricas de la Tierra primitiva. Las transformaciones debidas a ellos, junto con el surgimiento de las cianobacterias (que liberan oxígeno al ambiente) son las responsables del cambio de aquellas condiciones a las actuales. Así, el aumento en la cantidad de oxígeno disponible ocasionó la intoxicación de muchas bacterias anaeróbicas, puesto que la respiración basada en oxígeno derivó en la producción de altas concentraciones de intermediarios tóxicos, tales como radicales hidróxido y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En esas condiciones ambientales empezaron a surgir nuevas formas de vida (organismos

aeróbicos) capaces de adaptarse a tales condiciones, mediante la utilización de un sistema enzimático conformado por las enzimas superóxido dismutasa, peroxidasa o catalasa para desintoxicarse, tanto de peróxidos como de sus productos. En contraste, muchos organismos anaeróbicos no poseen un sistema enzimático protector completo, por lo que su respuesta al oxígeno podría variar (**Kerkeler et al., 1998**). Resulta interesante resaltar, que el átomo de azufre fue el “motor de la vida” ancestral y que este elemento pertenece a la misma familia que el “motor” actual, el oxígeno.

El azufre es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre, y presenta varios estados de oxidación. Por ello forma diferentes compuestos, que se intercambian mediante procesos químicos o biológicos de oxidación-reducción, constituyendo el denominado “ciclo biogeoquímico del azufre” (**Takakuwa, 1992; Robertson & Kuenen, 2006**). En este ciclo que ocurre en la naturaleza, tres de sus estados de oxidación tienen una mayor importancia debido a su estabilidad:  $2^-$  (sulfhídrico R-SH y sulfuro  $\text{HS}^-$ ), 0 (azufre elemental,  $\text{S}^0$ ) y  $6^+$  sulfato,  $\text{SO}_4^{2-}$  (**Figura 1**). El producto final de la oxidación de dicho ciclo es el ( $\text{SO}_4^-$ ), el número de electrones implicados en la oxidación desde  $\text{H}_2\text{S}$  (-2) hasta el sulfato (6+) es de ocho electrones (**Lens & Hulshoff Pol, 2000**). A continuación se enlistan los diferentes compuestos del azufre:

#### Diferentes compuestos azufrados y sus estados de oxidación

Compuesto	Fórmula química	Estado de oxidación
S orgánico	R-SH	-2
Sulfuro	$\text{H}_2\text{S}$	-2
Polisulfuro	$\text{-(S(S))}_n\text{S}^-$	-1(S terminal)/ 0 (S interno)
Tiosulfato	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	+2 (promedio por S)
Tetrationato	$\text{S}_4\text{O}_6$	+2.5 (promedio por S)
Azufre elemental	Anillos $\text{S}_n$	0
Bisulfito	$\text{HSO}_3^-$	+4
Sulfato	$\text{SO}_4^{2-}$	+6

Tomado de **Madigan et al., 1999** y **Lens & Hulshoff Pol (2000)**

El sulfuro de hidrogeno  $H_2S$ , es la forma más reducida del azufre, es tóxico, inflamable y soluble en el agua (0.1 M/L a  $25^0C$ ) con un  $pK_1$  de 7.0 y un  $pK_2$  de 13.0. Es el producto principal de la respiración de las bacterias sulfato-reductoras en condiciones anaerobias y cuando no está limitada de materia orgánica. La forma en que esta presente el sulfuro en el ambiente depende del pH (**Oliver et al., 1996**). A pH mayores de 9 la forma dominante es el sulfuro,  $S^{2-}$  a pH entre 7.0 y 9.0 el  $HS^-$  y el  $H_2S$ , y por debajo de 6.0, la principal molécula es  $H_2S$ , siendo este último el menos soluble en agua (**Madigan et al., 1999**).

El sulfuro,  $S^{2-}$ , es la base conjugada del ácido débil  $H_2S$ , tiene una constante de disociación básica ( $K_b$ ) de  $1 \times 10^{-5}$  siendo una base fuerte y su hidrólisis en medio acuoso forma soluciones muy alcalinas (**Chang, 1999**).

El tiosulfato tiene dos átomos de azufre no equivalentes. Esto es, un ion sulfato,  $SO_4^{2-}$  en el que uno de los átomos de oxígeno ha sido desplazado por un azufre. Puede ser formado por reacción no biológica del sulfito con azufre o politionatos (**Schmidt, 1984**)



El tiosulfato tiene un papel importante en el ciclo biológico del azufre, porque existen bacterias oxidantes de azufre y bacterias productoras de sulfuro que utilizan el tiosulfato como un substrato para el metabolismo desasimilatorio (**Barret & Clark, 1987**).

El azufre es un sólido amarillo, que forma cristales ortorrómbicos, poco soluble en agua (5  $\mu g/L$  de  $S_8$  a  $25^0 C$ ), pero muy soluble en bisulfuro de carbono, tetracloruro de carbono y disolventes no polares análogos. El azufre ortorrómbico se funde a  $112.8^0 C$ , formando un líquido color pajizo. Puede ser formado por bacterias oxidantes de sulfuro.

Algunos sulfuros  $HS^-$  y sulfuros metálicos reaccionan espontáneamente con el oxígeno, sin embargo en muchos casos las reacciones biológicas pueden competir exitosamente con las reacciones espontáneas. Asimismo, en el ciclo del azufre se pueden distinguir dos etapas, de acuerdo al tipo de reacción de oxido-reducción que intervienen en el mismo:

- a) **Etapa reductiva.-** En los procesos biológicos se encuentran dos rutas bioquímicas de reducción de los compuestos de azufre inorgánicos:

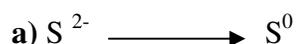
### La reducción asimilativa y la reducción desasimilativa:

- **La reducción asimilativa** la presentan tanto eucariontes como procariontes: el sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) es reducido a sulfuro ( $\text{H}_2\text{S}$ ) para la biosíntesis de compuestos que contienen azufre necesario para el crecimiento celular.
- **La reducción desasimilativa** la presentan principalmente los procariontes (eubacterias y archaea) el sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) es reducido a sulfuro ( $\text{H}_2\text{S}$ ) por bacterias sulfato reductores (BSR) en condiciones anóxicas, 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**).

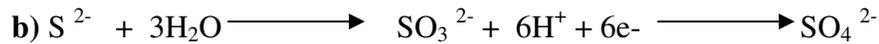
Las bacterias BSR han sido clasificadas como microorganismos anaerobios estrictos por Beijerinck. Sin embargo, los géneros como *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacterium* y *Desulfococcus*, permanecen viables por horas o aún por días cuando son expuestos a concentraciones de oxígeno que van desde 0.24  $\mu\text{M}$  hasta 1.17 mM (**Hardy & Hamilton, 1981, Cypionka et al., 1985, Fukui & Takii, 1990, Kjeldsen et al., 2005**). Las BSR pueden ser litótrofas, por lo que los electrones son obtenidos de la oxidación de un compuesto inorgánico como el hidrógeno ( $\text{H}_2$ ).

- **Etapa oxidativa.-** La constituyen las reacciones de oxidación de los compuestos reducidos de azufre. Esta etapa puede dividirse en dos rutas **a** y **b**:
  - a) Las reacciones de oxidación en condiciones anaeróbicas efectuados por microorganismos fotótrofos (**Cork et al., 1983**) y facultativos (**Sublette, 1987**).
  - b) La oxidación aerobia efectuada por microorganismos del género *Thiobacillus* (**Buisman et al., 1989; Kelly et al., 2000; Kelly & Wood, 2000**).

La reacción del tipo **(a)** consiste en la oxidación de sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ) a azufre elemental ( $\text{S}^0$ ) como producto final y cuya presencia en *Thiobacillus* extracitoplasmáticamente fue sugerida por **Hooper & Dispirito (1985)** dado a que observaron la precipitación de azufre elemental en el medio de crecimiento.



En la reacción de tipo **(b)**, donde el producto final es el sulfato, el sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ) es oxidado en forma directa a sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) que a su vez se oxida a sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ).



La enzima involucrada, sulfito reductasa, fue purificada de *Thiobacillus denitrificans* por **Schedel & Truper (1979)**. Es una enzima insoluble y su sitio de localización en la célula es incierto. Sin embargo, debido a que la reacción libera 6 protones del agua, se ha propuesto que la enzima se encuentra en el periplasma (**Hooper y Dispirito, 1985**).

Los seres vivos requieren del azufre para su metabolismo celular, ya que existen compuestos de la célula que contienen este elemento. Se ha encontrado que el 5% del peso de las bacterias es azufre y lo pueden incorporar por una reacción de reducción asimilativa del sulfato. Por su parte la industria química tiene gran demanda de azufre elemental para producir ácido sulfúrico, el cual es un producto importante para la síntesis de muchos compuestos, orgánicos e inorgánicos.



**Fig. 1** Ciclo biológico del azufre (**Robertson & Kuenen, 1991**).

### 1.3 Bacterias sulfoxidantes

Existe una gran diversidad de bacterias capaces de utilizar compuestos reducidos de azufre como fuente de energía para su crecimiento (**Madigan et al., 2003; Kelly et al., 2000; Kelly & Word, 2000**).

En la **Tabla 1** se enlistan algunos géneros de estos microorganismos sulfoxidantes también llamadas bacterias incoloras del azufre, la fuente de energía que utilizan y el intervalo de pH en el cual crecen. La mayor parte de los conocimientos fisiológicos de estos microorganismos proviene del estudio de un número limitado de géneros. En **1989**, **Kelly** describe la capacidad metabólica del grupo thiobacilli, que incluye varias especies, que crecen en presencia de compuestos reducidos de azufre usándolos como fuente de energía y electrones. Sin embargo, con los avances en el análisis sistemático basado en la filogenia molecular de las secuencias del gen rRNA 16S, el género *Thiobacillus* tuvo que ser reorganizado (**Kelly et al., 2000; Kelly & Word, 2000; Deb et al., 2004; Katayama et al., 2006**). Su estudio ha permitido entender de manera más detallada y precisa las rutas bioquímicas de la oxidación de los compuestos reducidos de azufre. Las especies de *Thiobacillus* son microorganismos aeróbicos y anaeróbicos facultativos, gram-negativos, con forma de bacilos pequeños que miden 0.3 µm de ancho por 1-3 µm de largo, móviles por un flagelo polar sencillo, no forman esporas y crecen entre los 25 – 35 °C. Sin embargo, se han encontrado especies termofilas moderadas que crecen a 55 °C como por ejemplo *Thiobacillus aquaesulis*, *Thiobacillus caldus* (**Wood & Kelly, 1988, Hallberg & Lindstrom, 1996**)

Las bacterias incoloras del azufre comprenden una colección heterogénea de bacterias con poca o ninguna relación taxonómica, morfología diversa y que sólo tienen en común su capacidad para oxidar compuestos reducidos de azufre. Actualmente, está claro que esta capacidad no está ligada, necesariamente, con la de crecer autotróficamente, ya que algunas bacterias sulfoxidantes son esencialmente heterótrofas. En consecuencia, resulta necesario discutir el metabolismo del azufre y del carbono por separado. Los estudios acerca del crecimiento en medios sintéticos han permitido identificar diversas fuentes de carbono como por ejemplo succinato, acetato, propionato y lactato utilizadas por estos microorganismos, identificando diferentes grupos de microorganismos de acuerdo a su capacidad para utilizar distintas fuentes de carbono.

**Tabla 1 Características fisiológicas de las bacterias sulfoxidantes**

Genero y/o especies	Donador inorgánico de electrones	Rango de pH para el crecimiento
<b>Especies de <i>Thiobacillus</i> con crecimiento pobre en medios con compuestos orgánicos</b>		
<i>T. thioparus</i>	H <sub>2</sub> S, sulfuros, S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	6-8
<i>T. denitrificans</i> <sup>2</sup>	H <sub>2</sub> S, S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	6-8
<i>Thiobacillus neapolitanus</i>	S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	6-8
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	S <sup>0</sup>	2-4
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Sulfuros metálicos, S <sup>0</sup> , Fe <sup>2+</sup>	2-4
<b>Especies de <i>Thiobacillus</i> con buen crecimiento en medios con compuestos orgánicos</b>		
<i>Starkeya novella</i>	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	6-8
<i>Thiomonas intermedia</i>	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	3-7
<b>Quimiolitótrofos filamentosos del azufre</b>		
<i>Beggiatoa</i>	H <sub>2</sub> S, S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	6-8
<i>Thiothrix</i>	H <sub>2</sub> S	6-8
<i>Thioploca</i> <sup>1</sup>	H <sub>2</sub> S, S <sup>0</sup>	*****
<b>Otros géneros</b>		
<i>Thiomicrospira</i> <sup>2</sup>	H <sub>2</sub> S, S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	6-8
<i>Thiosphaera</i>	H <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> S, S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	6-8
<i>Thermothrix</i> <sup>1</sup>	H <sub>2</sub> S, SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	6.5-7.5
<i>Thiovulum</i>	H <sub>2</sub> S, S <sup>0</sup>	6-8

<sup>1</sup> Aerobios facultativos; uso de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como aceptor de electrónico anaerobio.

<sup>2</sup> Una de sus especies es capaz de usar NO<sub>3</sub><sup>-</sup> anaeróbicamente.

#### 1.4 Metabolismo del carbono de las bacterias sulfoxidantes

El metabolismo del carbono de las bacterias sulfoxidantes va de un rango de completa autotrófia hasta la heterotrófia. Los estudios fisiológicos recientes sobre los géneros *Thiobacillus* y *Beggiatoa* han mostrado que algunas bacterias incoloras del azufre no sólo guardan una típica quimiolitótrofia obligada, sino que pueden clasificarse en un variado espectro fisiológico, como se muestra en la **Tabla 2A y B**.

Los microorganismos mixotrófica son modelos de crecimiento intermedios, bajo dichas condiciones, cualquier compuesto de azufre podría usarse como fuente de energía adicional para el crecimiento sobre un compuesto orgánico. Los organismos quimiolitoheterótrofos obtienen energía metabólica de la oxidación de compuestos de azufre, pero no pueden crecer autotróficamente. Recientemente, se han descrito organismos heterótrofos (incluidos en el grupo C de la **Tabla 2B**) que se benefician por otras vías de la oxidación de compuestos de

azufre (particularmente de sulfuros) El grupo D de bacterias heterótrofas puede oxidar compuestos de azufre, pero no se benefician de la oxidación.

**Tabla 2A Clasificación fisiológica de las bacterias incoloras del azufre**

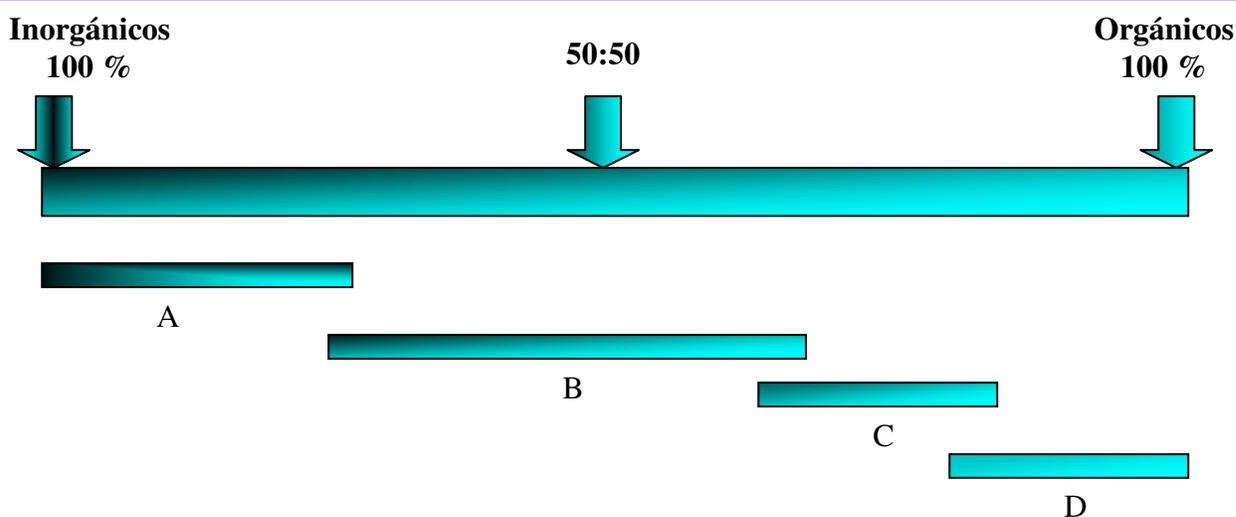
Tipo fisiológico	Sinónimos	Capacidad
Quimiolitautótrofos obligados	Quimiolitotrófo obligado, autótrofo obligado, quimioautótrofo obligado, litotrófo obligado	Utiliza CO <sub>2</sub> como única fuente de carbono y es capaz de obtener energía de la oxidación de compuestos de azufre inorgánicos
Quimiolitautótrofo facultativos	Quimiolitotrófo facultativo, autótrofo facultativo, quimioautótrofo facultativo, litotrófo facultativo Mixotrófo	Puede crecer utilizando ambos CO <sub>2</sub> o compuestos orgánicos como fuente de carbono y es capaz de obtener energía de la oxidación de compuestos de azufre inorgánicos
Quimiolitoheterótrofo	Heterótrofo	Capaz de obtener energía de la oxidación de compuestos inorgánicos de azufre y utiliza los compuestos orgánicos como fuente de carbono
Quimioorganoheterótrofo	Heterótrofo	Capaz de oxidar compuestos de azufre pero incapaz de obtener energía y utiliza como única fuente de carbono, compuestos orgánicos.

Todas las bacterias incoloras de azufre son capaces de oxidar compuestos reducidos de azufre en la oscuridad, pero no todos los organismos capaces de llevar esta oxidación caen dentro de este grupo. Por ejemplo, un número de bacterias fototróficas del azufre, tales como las especies del género *Chromatium* pueden crecer quimiolitautotróficamente bajo condiciones aeróbicas (Kämpf & Pfennig, 1980). También, muchas bacterias heterótrofas capaces de oxidar compuestos reducidos de azufre tampoco se consideran dentro de las bacterias incoloras del azufre. En la **Tabla 3**, se muestra algunos ejemplos de éstas. En realidad, son muy pocos los procariontes heterótrofos que pueden obtener energía útil a partir del proceso de oxidación de

compuestos inorgánicos. Estos se identifican como verdaderos quimiolitoheterótrofos (Kelly & Kuenen, 1984).

**Tabla 2B Espectro de los diferentes tipos fisiológicos en las bacterias incoloras del azufre**

Grupos	Fuente de carbono		Fuente de energía		Tipos fisiológicos	Ejemplos*
	Inorgánica (CO <sub>2</sub> )	Orgánica	Compuestos reducido de azufre	Orgánica		
A	+	-	+	-	Quimiolitotrófo obligado	<i>Thiobacillus sajanensis</i> <i>Thiobacillus thioparus</i>
B	+	+	+	+	Quimiolitotrófo facultativo (mixotrófos)	<i>Thermothrix thiopara</i> <i>Starkeya novella</i>
C	-	+	+	+	Quimiolitoheterótrofo	<i>Xylophilus ampelinus</i>
D	-	+	-	+	Quimioorganoheterótrofo (heterótrofo)	<i>Paracoccus denitrificans</i> <i>Beggiatoa alba</i>



Modelo que describe la selección de los diferentes tipos fisiológicos por la proporción de sustratos inorgánico a sustratos orgánicos proporcionados en el medio.

\*Kelly *et al.*, (2005) *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*.

**Tabla 3 Géneros capaces de oxidar compuestos reducidos de azufre no considerados bacterias incoloras del azufre**

<b>Bacterias heterotróficas</b>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Achchromobacter sp</i>
<i>Marine Pseudomonas spp</i>	<i>Mycobacterium sp.</i>
<i>Arthrobacter aurescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Arthrobacter simplex</i>	<i>Pseudomonas aromatica</i>
<i>Arthrobacter sp</i>	<i>Pseudomonas pyocyanea</i>
<i>Streptomyces sp</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Flavoacterium sp</i>	<i>Achchromobacter stutzeri</i>
<i>Micrococcus sp.</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Brevibacterium sp</i>	

### 1.5 Metabolismo oxidativo de compuestos reducidos de azufre

**Kelly (1982, 1985 y 1988)** reportó que los mecanismos de oxidación de los compuestos inorgánicos de azufre presentan diferencias radicales entre las bacterias; sin embargo, con el desarrollo reciente alcanzado en bioquímica, enzimología y biología molecular de la oxidación de azufre por bacterias litótrofas obligadas y facultativas se ha constatado la existencia de, por lo menos, dos vías principales para la oxidación de compuestos reducidos de azufre.

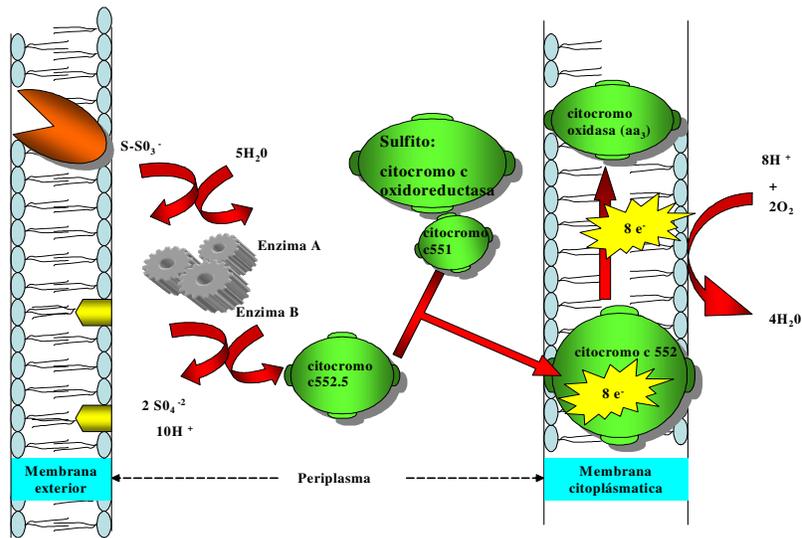
Esas dos vías se describen a continuación entre otras:

#### 1.5.1 “La vía de oxidación de azufre del género *Paracoccus*”o sistema multi-enzimático para la oxidación de tiosulfato (por sus siglas en inglés TOMES)

**Lu et al. (1985), Takakuwa (1992), Kelly et al. (1988 y 1997), Kelly & Wood (2000) y Ghosh et al. (2005)** describieron detalladamente el sistema **multi-enzimático para la oxidación de tiosulfato** en *Paracoccus versutus* (**TOMES**). Dicho sistema se compone de varias enzimas periplásmicas, como son la enzima A, enzima B, citocromo c<sub>551</sub>, citocromo c<sub>552</sub> citocromo c<sub>552.5</sub> y sulfito oxidorreductasa: citocromo c (**Figura 2**). La enzima A (16 kDa) se une a un mol de tiosulfato e interactúa con la proteína B (61 kDa), citocromos c<sub>551</sub> (260 kDa, contiene de cuatro a cinco grupos hemo) y citocromo c<sub>552.5</sub> (56 kDa, contiene tres grupos hemo) para producir estequiométricamente sulfato a partir de tiosulfato. Se requiere de los cuatro componentes del sistema para la oxidación del tiosulfato, y cada uno contribuye del 1% al 2% del total de la proteína de la célula. Los dos componentes multihemo tipo c son esenciales para el sistema y, aparentemente, funcionan como portadores de electrones en el

TOMES para transferirlos desde la oxidación del tiosulfato a los citocromos tipo c nativos convencionales (de los cuales *Paracoccus versutus* contiene tres: dos solubles y uno unido a la membrana). El proceso total catalizado por TOMES se lleva a cabo de una manera integrada, sin que se hayan identificado intermediarios libres. No se ha detectado actividad individual en ninguno de los cuatro componentes al ser incubados por separado con tiosulfato (solamente se ha observado la unión del sustrato con la enzima A sin que aparentemente haya transformación). Se cree que los complejos proteína-proteína se forman cuando los cuatro componentes actúan coordinadamente para llevar a cabo la catálisis de la oxidación del tiosulfato. La falta de cualquiera de los componentes da como resultado la pérdida total de oxidación o bien una oxidación extremadamente lenta. La actividad específica, en términos de la proteína total de los cuatro componentes utilizados, depende del volumen de reacción. En volúmenes pequeños se han observado valores altos de actividad específica, lo que nuevamente es consistente con la formación de complejos proteína-proteína dependiente de la concentración.

La enzima B contiene un “cluster” inusual de manganeso (dimérico, acoplado a un espín), el cual se cree que es un componente clave del centro de reacción de la enzima. Una hipótesis, aún por confirmarse, sugiere que el centro Mn está involucrado en la unión de las moléculas de agua requeridas como donadores de oxígeno para la conversión de sulfano-azufre (y el grupo SO<sub>3</sub>) del tiosulfato al sulfato. También podría estar involucrado un cofactor de molibdeno (Mo) en el funcionamiento de la enzima B, ya que espectrofotométricamente se han detectado pequeñas cantidades de Mo y, además, la proteína exhibe espectros de fluorescencia similares a los de las oxidasas que contienen molibdoproteínas. Se ha observado que ciertas mutantes de *Thiosphaera* (ahora renombrada *Paracoccus*) *pantotrophus*, una especie relacionada, tienen dañada su capacidad de oxidación de tiosulfato (así como de formiato y xantina). Estas mutantes son ineficaces en la síntesis de un cofactor de molibdeno requerido para la oxidación de estos compuestos. Se han identificado los genes que codifican para la oxidación de azufre en *Paracoccus denitrificans* y la enzima B de *Paracoccus versutus* es idéntica al producto del gen *soxB* de *Paracoccus denitrificans*. Esto ha permitido una mejor comprensión de la estructura de la proteína, la cual se piensa que es un monómero con un peso molecular de 61 kDa (Wodara *et al.*, 1994).



**Fig. 2** Mecanismo propuesto de oxidación de tiosulfato (TOMES) de *Paracoccus versutus* (Kelly *et al.*, 1997).

### 1.5.2 “La vía del intermediario $S_4$ ” (o *S4I*) (*involucra politionatos*)

Característica de quimiolitótrofos obligados (p. ej. *Thermithiobacillus tepidarius*, *Halothiobacillus neapolitanus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*) y especies facultativas, tales como *Acidiphilium acidophilus* y *Thiobacillus aquaesulis*. Todas pueden producir y oxidar tetratiónato cuando crecen en presencia de tiosulfato (**Figura 3**).

**Kelly *et. al.* (1997)** estudiaron la oxidación de tiosulfato marcado ( $^{35}\text{S}$ ) por *Thiobacillus neapolitanus* y mostraron los diferentes intermediarios que se detectaron. Una secuencia de las reacciones llevadas a cabo por este microorganismo se puede observar en la **Figura 3**. En muestras que se tomaron entre los 4 y 5 minutos, el único tiosulfato presente derivó exclusivamente del grupo  $^*\text{S}$  de  $(^*\text{S} - \text{SO}_3)^{2-}$  (donde  $^*$  señala la posición del  $^{35}\text{S}$ ). La formación de tritiónato fue mayor a partir de la forma  $(^*\text{S} - \text{SO}_3)^{2-}$  que de la forma  $-\text{S} - ^*\text{SO}_3^-$  y terminó cuando se agotó el tiosulfato marcado. La degradación del tritiónato derivado de  $-\text{S} - ^*\text{SO}_3^-$  no mostró movimiento del átomo de S marcado. Sin embargo, con  $(^*\text{S} - \text{SO}_3)^{2-}$  se presentó un marcado progresivo del grupo  $-\text{SO}_3^-$  del  $^*\text{S}$ , que alcanzó su máximo valor en el tiempo en el que se agotó el tiosulfato. Mientras que estas observaciones no excluyen la posibilidad de participación del azufre elemental como un intermediario en la oxidación del  $[\text{S}]$  del



### ***1.5.3 Vía de oxidación del sulfito a sulfato***

Para la oxidación del sulfito a sulfato se han postulado dos diferentes vías. Una es la oxidación de  $\text{SO}_3^{2-}$  a  $\text{SO}_4^{2-}$ , que depende de la enzima sulfito oxidasa. La enzima sulfito oxidasa transfiere directamente electrones desde el  $\text{SO}_3^{2-}$  al citocromo c, y la producción de ATP se realiza durante el transporte de electrones y la formación de la fuerza motriz de protones (**Figura 4 a y b**).

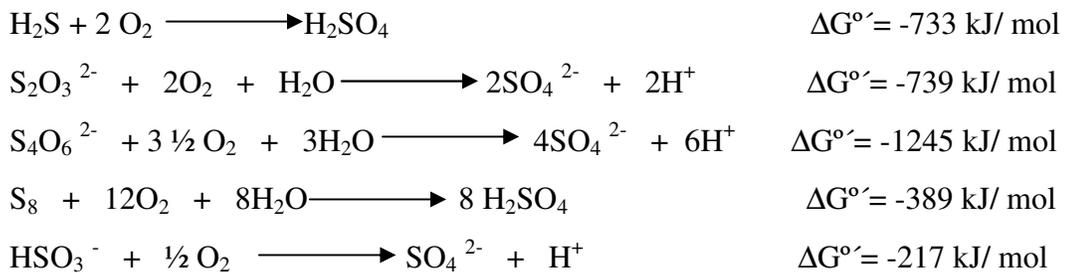
La otra vía se presenta en algunos quimiolitotrófos del azufre que oxidan  $\text{SO}_3^{2-}$  a  $\text{SO}_4^{2-}$  a través de la enzima adenosina-5-fosfosulfato reductasa (APS), enzima crítica en el metabolismo de las bacterias sulfato-reductoras (por que activa al  $\text{SO}_4^{2-}$  antes de ser metabolizado) (**Figura 4a**). Esta reacción, corre en dirección a la producción de  $\text{SO}_4^{2-}$  por quimiolitotrófos del azufre, originando un enlace fosfato de alta energía cuando el AMP es convertido a ADP (**Figura 4a**).

Cuando el tiosulfato es el donador de electrones en los quimiolitotrófos del azufre, éste se separa en  $\text{S}^0$  y  $\text{SO}_3^{2-}$ , y ambos pueden eventualmente ser oxidados a  $\text{SO}_4^{2-}$ . Todos los electrones provenientes de los compuestos reducidos de azufre llegan al sistema de transporte de electrones, como se muestra en la **Figura 4b**. Dependiendo del potencial de oxidación  $E_o'$  acoplado, a los electrones entre la flavoproteína ( $E_o' = -0.2$ ) o a nivel de citocromo c ( $E_o' = +0.3$ ) son transportados al  $\text{O}_2$  generando así una fuerza motriz de protones que conduce a la síntesis de ATP mediante la ATPasa. Los electrones para la fijación autotrófica de  $\text{CO}_2$  vienen del flujo inverso de electrones que eventualmente produce NADH, y el  $\text{CO}_2$  se fija en realidad por la vía del ciclo de Calvin (**Figura 4b**).



## 1.6 Energía de oxidación de compuestos reducidos de azufre

Una considerable variedad de microorganismos conservan energía de las oxidaciones quimilitotróficas. Los mejor estudiados son las especies de *Thiobacillus*, pero existe información sobre el crecimiento de *Thiomicrospira*, *Sulfolobus*, *Beggiota*, algunos fotótrofos oxidantes de tiosulfato incluyendo a *Thiocapsa* y *Chromatium* y algunos heterótrofos oxidantes de hidrógeno incluyendo a *Paracoccus denitrificans*, los cuales pueden crecer autotróficamente en la oscuridad utilizando como sustrato los compuestos reducidos de azufre (**Tabla 1**). Esto indica una unidad bioquímica respiratoria básica, en la cual se presenta una gran diversidad de sistemas enzimáticos oxidantes de azufre por medio de los cuales estas bacterias son capaces de generar electrones y obtener energía para su crecimiento. Las oxidaciones mejor estudiadas de acuerdo a **Kelly (1990)** son:



Algunos *Thiobacillus* e *Hyphomicrobia metilótrofos* son capaces de derivar energía quimilitotrófica de la oxidación de azufre inorgánico; también son capaces de oxidar el azufre de sulfuros metilados. Asimismo, en condiciones anaerobias algunos *Thiobacillus* y *Thiomicrospira denitrificans* pueden acoplar la oxidación de azufre inorgánico con la reducción completa o parcial de nitrógeno molecular (**Robertson & Kuenen, 1991**).



## 1.6 Importancia de las comunidades microbianas del azufre en los biotratamientos

Las comunidades microbianas poseen un gran potencial, ya que llevan a cabo procesos importantes para el mantenimiento de la biósfera, soportando la vida de muchos otros organismos y degradando contaminantes antropogénicos. Este potencial es explotado en los procesos biotecnológicos para el tratamiento de aguas residuales, por ejemplo. Los

microorganismos con capacidad de adaptación a estos ambientes extremos, como los microorganismos extremófilos, son los más adecuados para ser aplicados directamente en dichos tratamientos. Recientemente se ha descrito un amplio rango de bacterias sulfato reductoras, tanto autotróficas como heterotróficas, capaces de crecer en condiciones extremas. Estas incluyen termófilos: *Thermodesulfobacterium huragerdense* y *Thermodesulfovibrio islandicus* (Sonne-Hansen & Ahring, 1999), psicrófilos: *Desulfofrigus fragila*, *Desulfofaba gelida* y *Desulfotalea psychrophila* (Knoblauch et al., 1999), halófilos: *Desulfobacter halotolerans* (Brandt & Ingvorse, 1997) y alcalófilos: *Desulfotomaculum alklyphilum*; (Pikuta et al., 2000), así como también sulfoxidantes (Tablas 1 y 3).

En los tratamientos biológicos pueden emplearse cultivos puros y mixtos inmovilizados de microorganismos fototróficos, heterotróficos y autotróficos (Monticello, 2000). Para el caso de la desulfuración biológica se tienen varios ejemplos:

La cepa de *Pseudomona putida* CH11 aislada desde aguas residuales agrícolas con un pH óptimo entre 6 y 8, se empleó para el tratamiento de gases con sulfuro de hidrógeno y el principal producto metabólico de su oxidación fue azufre elemental. Cuando fue inmovilizada en alginato de calcio, las células exhibieron una alta eficiencia de remoción del sulfuro de hidrógeno, que excedieron al 96 %, a concentraciones de sulfuro de hidrógeno desde 10 hasta 150 partes por millón (ppm). Por tanto, dicha cepa inmovilizada tiene un alto potencial para ser usada como agente para la remoción del sulfuro de hidrógeno (Valencia, 2002).

En otros trabajos se utilizaron *Pseudomonas. putida* (S1), *Citrobacter* sp. (S4) y *Enterobacter* sp. (S5) observando la decoloración del efluente en un 97 %, la reducción de la DBO, DQO, compuestos fenólicos y el sulfuro de hidrógeno, este último hasta un 96.67 % en 24 horas de aireación. El cultivo de estas tres bacterias fueron inmovilizadas en cerámica porosa obteniéndose remociones del sulfuro de hidrógeno de 99.8 % después de 48 horas (Valencia, 2002).

Se han empleado cultivos puros de células de *Thiobacillus thiooxidans* JCM 7814 utilizando como agente tampón el citrato de sodio. El sulfuro de hidrógeno fue removido biológicamente a una velocidad máxima de oxidación a 0,84 milimolar de H<sub>2</sub>S por gramos de célula (mmol-H<sub>2</sub>S (g)/g célula), una concentración de citrato de 0,2 g/mol. El tiempo de retención fue de 30 minutos.

Por otro lado, en un reactor de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB) y un equipo para la desulfuración del biogás se empleó vinazas de destilerías tratadas, residuales azucarero y albañal como fuentes de microorganismos sulfoxidantes. Al caracterizar la microbiota mediante su aislamiento e identificación. Se encontraron diferentes tipos de bacterias, levaduras y hongos filamentosos como *Alcaligenes* spp., *Bacillus panthotenticus*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus versicolor* y *Penicillium melinii* capaces de utilizar los compuestos reducidos de azufre lo que indicó una participación activa en el proceso de desulfuración del biogás (**Vergara, 2002**). Por tanto, dichas cepas tiene un alto potencial para ser usadas en cultivos axénicos como agente para la remoción del sulfuro de hidrógeno. Entonces, de acuerdo con lo anteriormente señalado el estudio de la estructura y composición de las comunidades bacterianas sulfoxidantes en los procesos biotecnológicos es importante para entender los mecanismos de oxidación biológica de los compuestos reducidos del azufre, así como las condiciones que hagan más eficientes dichos procesos. Además, la diversidad microbiológica presente en los reactores ofrece una gran oportunidad para el desarrollo de nuevos procesos biocatalíticos que pueden ser usados en la producción microbiológica de químicos y polímeros (**Monticello, 2000**).

### **1.8 Procesos biológicos para eliminación de compuestos de azufre**

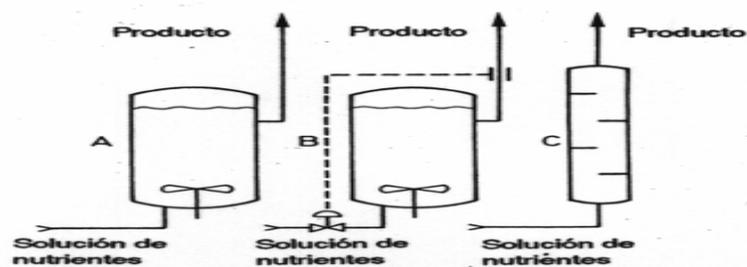
Los tratamientos biológicos tienen una aplicación diversificada; se han utilizado en el tratamiento de corrientes de aire contaminadas con sulfuros, así como también en corrientes de aire con sulfuro, bisulfuro y compuestos orgánicos volátiles de azufre (COVS). Dichos procesos biológicos han cobrado cada vez mayor interés, ya que se han aplicado a nivel industrial con resultados exitosos (**Revah & Ortiz, 2004**).

En el caso del tratamiento de gases contaminados, incluido el “biogás (metano, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>S principalmente)” proveniente de aguas contaminadas con sulfato, sulfuro, bisulfuro y COVS los sistemas que se han utilizados son principalmente biofiltros y biolavadores de lecho escurrido (BLE) (**Vásquez-Murrieta, 2000**) (ver apéndice A). Por otro lado, en muestras acuosas contaminadas con compuestos de azufre reducidos se han implementado diversos tipos de reactores de tanque agitado (**Buisman et al., 1989; Janssen, 1996**) como los reactores

de lecho fluidificado inverso (Gommers *et al.*, 1988); así como diseños de reactores que optimizan la recuperación de azufre elemental (Janssen *et al.*, 1997).

Los biorreactores de cultivo axénico y alimentados en forma continua, consisten de un sistema abierto, donde la solución nutritiva estéril se adiciona continuamente con la ayuda de una bomba peristáltica, y una cantidad equivalente se saca simultáneamente del sistema. Entre las distintas clases de fermentaciones continuas pueden distinguirse dos tipos:

**a. Reactor de tanque agitado:** también conocido como de mezcla completa (CSTR, por sus siglas en inglés), es uno de los reactores que tradicionalmente se han usado ya que garantiza que la composición sea la misma en cualquier punto del reactor. Este tipo de reactores pueden operar de tres diferentes formas, en forma discontinua, discontinua alimentada (fed-batch) y continua. Los reactores de tanque agitado son equipos cilíndricos con un sistema de homogeneización, de tipo mecánico. Este es utilizado como un quimiostato o como un turbidostato. En el quimiostato en estado de equilibrio, el crecimiento de las células se controla ajustando la tasa de dilución (Figura 5A). Cualquier sustrato que se requiera (sulfuros metálicos, tiosulfato, compuesto nitrogenado, sales, O<sub>2</sub>) puede ser utilizado como sustrato limitante. En el turbidostato el crecimiento de las células se mantiene constante utilizando la turbidez para controlar la concentración de biomasa y la velocidad de alimentación de la solución de nutrientes se ajusta de forma apropiada (Figura 5B).

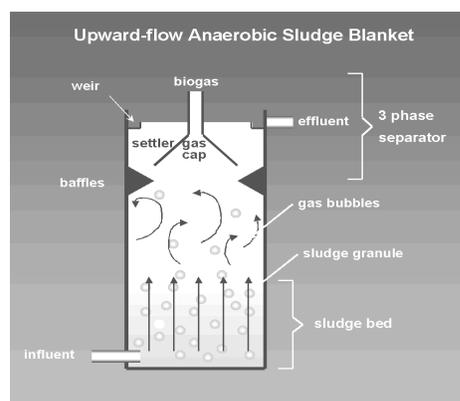


**Fig. 5** Fermentación continua en el quimiostato (A); turbidostato (B) y reactor de flujo de tapón (C) (Vásquez-Murrieta, 2000).

**b. Reactor de flujo ascendente.** En este tipo de reactores donde el medio de cultivo fluye sin mezclado (Figura 5C). A la entrada del reactor las células deben añadirse continuamente

junto con la solución de nutrientes (generalmente como un flujo que se revierte de una desviación desde la salida del fermentador o desde una segunda fermentación continua).

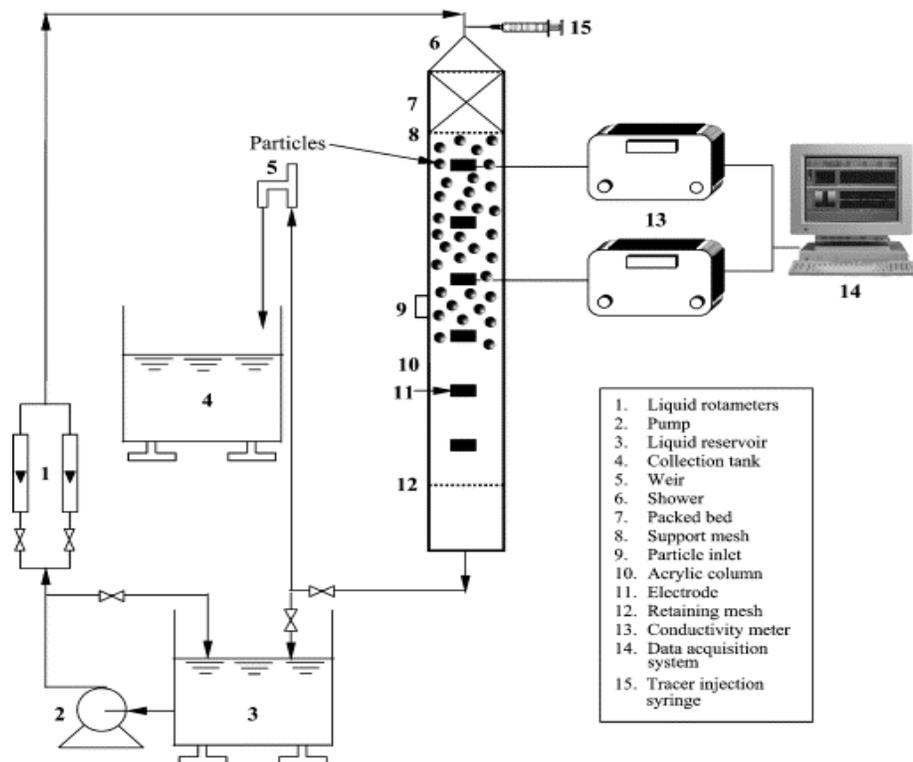
**Reactor de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB)** fue desarrollado inicialmente para procesos de digestión anaerobia (**Lettinga *et al.*, 1980**). Este reactor ha tenido gran aceptación mundial debido a que ha sido aplicado con éxito a una gran variedad de aguas residuales industriales y municipales, así como por su facilidad de operación, instalación compacta y menor costo (**Lettinga, 1995**). Su funcionamiento se basa en la formación de lechos biológicos, constituidos por microorganismos aglomerados en forma de gránulos o flóculos que permanecen en el reactor. La cama de lodo se compone de gránulos con un diámetro de 0.5-2 mm. Esto implica que el lodo granular tenga una gran actividad biológica y una excelente capacidad de sedimentación, a fin de evitar que sea evacuado por el flujo ascendente del agua y salga del reactor. Debido a la gran cantidad de microorganismos que logra contener, este tipo de reactores permite la utilización de caudales altos sin pérdida de eficiencia de eliminación de nutrientes. En la parte alta del reactor, la fase acuosa se separa de la fase sólida y gaseosa en un separador de tres fases. El separador de tres fases generalmente es una tapa del depósito de gas con un cono arriba de él. Debajo de la tapa del depósito, se colocan unos deflectores para conducir el gas hacia la abertura de la tapa del depósito (**Figura 6**).



**Fig. 6 Reactor de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB)\*.**

\*Imagen obtenida de [http://www.uasb.org/REACTORS/Reactor\\_case\\_studies.htm](http://www.uasb.org/REACTORS/Reactor_case_studies.htm)

**Reactor de lecho fluidificado inverso (RLFI)** en este tipo de reactores se utilizan partículas de menor densidad que el agua (nylon, poliéster y polietileno) como soporte (por esta razón flotan). Las partículas son fluidificadas por un flujo descendente del líquido. El flujo de gas (generado por el proceso o inyectado) y el líquido que esta en dirección opuesta, ayuda a la expansión del lecho (**Garcia-Calderon *et al.*, 1998; Beristain-Cardoso *et al.*, 2006**), mientras la biomasa flota los sulfuros metálicos sedimentados pueden recuperarse fácilmente en el fondo del reactor (**Figura 7**). Una de las posibles desventajas de estos reactores se encuentra en el periodo de arranque debido al difícil desarrollo de la biopelícula en el soporte. **Meraz *et al.*, (1995)** menciona que puede variar de 60 a 100 días. En el apéndice A se explican las ventajas y desventajas de dichos reactores.



**Fig 7** Reactor de lecho fluidificado inverso (LFI)\*

\*Imagen obtenida de **Renganathan & Krishnaiah, (2004)**

## 1.9 Métodos moleculares para el estudio de comunidades microbianas y sus especies

Durante el último siglo se ha dependido del aislamiento y cultivo de los microorganismos para su identificación. Éstos han sido caracterizados tradicionalmente por su fenotipo, el conjunto

de propiedades celulares observables, como su morfología, propiedades fisiológicas y por la estructura de sus componentes celulares. La necesidad de cultivar los microorganismos para identificarlos ha limitado la comprensión de la diversidad microbiana, ya que ahora se sabe que más del 90 % de los microorganismos en los ambientes naturales no pueden ser cultivados usando las técnicas tradicionales (**Amann RI & Kúhl M, 1998**). En los últimos años se ha incrementado el conocimiento de la diversidad microbiana en comunidades complejas debido al uso de métodos moleculares que no requieren el cultivo de microorganismos.

Los métodos moleculares empleados en el análisis de comunidades microbianas permiten obtener más información sobre aspectos relacionados con la ecología microbiana ambiental como la diversidad, relaciones filogenéticas y evolutivas, estructura y función de las especies individuales. Sin embargo, el uso de técnicas de biología molecular por huella genética tales como, electroforesis en gel con gradiente desnaturizante/electroforesis en gel con gradiente de temperatura (por sus siglas en inglés DGGE/TGGE), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (por sus siglas en inglés RFLP), análisis de restricción de DNA-ribosomal amplificado (ARDRA) y el uso de productos de PCR fluorescentes no resultan ser perfectas: cada una de ellas tiene sus ventajas y desventajas. Por ello, una combinación de diferentes técnicas de biología molecular, métodos microbiológicos tradicionales y métodos para determinar los parámetros ambientales guiarán a un entendimiento del rol de los microorganismos en el ambiente (**Olive & Bean 1999**).

Para el presente trabajo se emplearon las siguientes técnicas las cuales son descritas con mayor profundidad

- *Hibridación DNA-DNA.*
- *Porcentaje de guanina y citosina (% G+C) del DNA.*
- *Aislamiento del gen del rRNA 16S y análisis de la secuencia.*
- *Análisis de Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).*
- *Electroforesis en gel con gradiente de desnaturización (DGGE).*
- *Electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE).*
- *Análisis de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD).*
- *Hibridación fluorescente in situ (FISH).*

## **Estudios del genoma completo**

### **1.9.1 Hibridación DNA-DNA**

La hibridación de DNA se basa en varios principios. En primer lugar, el calentamiento del DNA hace que se desnaturalice, ya que los puentes de hidrógeno se rompen y permite que las dos cadenas de la doble hélice se separen. En segundo lugar, si el DNA se enfría, los puentes de hidrógeno se reconstituyen y las dos cadenas sencillas se reasocian, es decir, se unen de nuevo (**Izquierdo-Rojo, 1999**). Finalmente, si se mezclan cadenas sencillas de DNA de diferente procedencia, se reasociarán en aquellas regiones en las que las secuencias son iguales o semejantes, creando un híbrido. Por consiguiente, el grado de reasociación es un índice cuantitativo de la semejanza de las secuencias de bases en el DNA de ambas procedencias. La hibridación del DNA es simple y precisa, pero tiene un gran inconveniente; para que se efectúe una hibridación, las dos muestras de DNA (y en consecuencia los organismos de los que se obtuvieron las mismas) deben ser semejantes es decir, del mismo género y para determinar las relaciones más distantes entre familias y dominios se requiere conocer las secuencias de bases del DNA o RNA con exactitud.

La hibridación del DNA puede también utilizarse para identificar un organismo en particular, determinando si un pequeño fragmento específico de DNA, denominado sonda, híbrida o no con alguna fracción del DNA del organismo desconocido. Las sondas del DNA se seleccionan para que hibriden solamente con el DNA de organismos específicos. Las sondas se marcan con un átomo radiactivo, de manera que la hibridación puede ser detectada fácilmente (**Arahal et al., 1999, Arahal et al., 2001**).

#### Preparación de DNA radiocactivo

El DNA no radioactivo puede ser marcado con diversos isótopos radioactivos por técnicas in vitro. Una de ellas es la llamada “nick translation”. Nick se refiere al corte por una endonucleasa de una de las uniones desoxiribosafosfato en una de las cadenas del DNA, creando un grupo libre oxhidrilo 3'. A continuación, una segunda enzima presente en la mezcla, DNA polimerasa I, agrega nucleótidos de la solución al grupo 3', pero en virtud de que esta enzima tiene actividad exonucleotídica en la dirección 5' → 3', traslada el “nick” en esa dirección, al mismo tiempo en que lo va reparando por incorporación de nucleótidos a la solución. El “nick” se va trasladando y de allí el nombre del proceso. Nicks ocurren al azar en

distintos puntos de la cadena de DNA y si en la solución se tienen nucleótidos radioactivos, la reparación resulta en incorporación de estos. Para que la reparación ocurra sin interrupciones, los 4 nucleótidos, en forma de trifosfatos, deben estar presentes. Por razones de costo uno, o a lo sumo dos, son agregados en forma de compuestos radioactivos. La reacción se detiene por enfriamiento y el DNA se separa de los nucleótidos libres haciéndolos pasar por una columna de Sephadex G50 **(MC Márquez-Marcos comun. pers.)**

La manera más segura de practicar el método de nick translation es usar kits comerciales de reactivos preparados, porque de esa manera no se pierde tiempo en el cálculo de la actividad de las enzimas o la preparación de los reactivos. Estos kits incluyen todos los elementos necesarios, menos el nucleótido radioactivo. Esto se debe principalmente al hecho de que cada técnica para la que se requiere el DNA radioactivo requiere de un isótopo diferente. Para estudios de homología de DNA  $^3\text{H}$  es el isótopo más adecuado y también el menos peligroso **(MC Márquez-Marcos comun. pers.)**

#### **Hibridación con DNA inmovilizado en membranas de nitrocelulosa**

El DNA de la cepa que se toma como referencia es desnaturalizado por el calor y luego es pasado por una membrana de nitrocelulosa, que retiene el DNA desnaturalizado y no el nativo, de doble cadena. La membrana se seca, se fracciona en trozos de tamaño uniforme (concentración de DNA= 50 microgramos de DNA/cm<sup>2</sup>), y éstos se usan en el experimento de hibridación. Primero se los trata con una solución que ayuda a reducir la adsorción inespecífica del DNA a la membrana (mezcla Denhardt) y luego se sumergen individualmente en mezclas de reacción conteniendo DNA radioactivo proveniente de la misma cepa que el inmovilizado, y DNA “frío” de una cepa a comparar con la de referencia, o sea, con la de la membrana. Los dos DNA en solución han sido previamente sometidos a la sonicación, para reducir su peso molecular y han sido desnaturalizados por el calor.

En las condiciones descritas, el DNA radioactivo tiende a hibridarse con su homólogo en la membrana, mientras que el segundo DNA, que es añadido en considerable exceso, tiende a interferir con la hibridación, y lo hará tanto más efectivamente cuanto más parecido es al DNA de referencia. En otras palabras al final de la incubación la membrana estará muy radioactiva en el caso de que el DNA competidor y el de referencia son muy distintos, y viceversa **(MC Márquez-Marcos comun. pers.)**.

La mezcla de hibridación puede contener compuestos como formamida, que baja el punto de fusión del DNA y permiten conducir la hibridación a T<sup>a</sup> relativamente bajas. De cualquier modo, la T<sup>a</sup> de hibridación que se recomienda es de 25 °C por debajo del punto de fusión (T<sub>m</sub>) del DNA de referencia. La adición de formamida es particularmente conveniente en experimentos de hibridación de DNA de alto contenido en G+C, que tienen alto punto de fusión, para evitar excesiva pérdida de DNA de los filtros (**MC Márquez-Marcos comun. pers.**).

Medida de la radioactividad:  $=(X-Y/X-Z) \times 100$

X= radio actividad retenida sin competidor

Y= radioactividad retenida con competidor heterólogo

Z= radioactividad retenida en presencia de competidor homólogo

**Torsvik *et al.* (1990)** exploraron esta técnica y probaron, si la reasociación del DNA proveniente de la mezcla de organismos del suelo podría proveer una medida de la diversidad genómica, encontrando que la mayor parte del DNA aislado de la fracción bacteriana es muy heterogéneo, con un Cot<sub>1/2</sub> (coeficiente de reasociación al 50%) de 4600, equivalente a 4,000 genomas completamente diferentes de las bacterias del suelo.

### **1.9.2 Porcentaje de guanina y citosina (% G+C) del DNA**

La determinación del porcentaje de G+C se fundamenta en que en un DNA, la proporción de pares de bases constituidos por guanina y citosina (G-C), en oposición al par adenina-timina (A-T), puede variar ampliamente, dependiendo del origen del DNA. Por convenio, la proporción de bases G-C se expresa como moles por ciento de guanina más citosina, o % G+C, que indica el porcentaje, respecto del total, de pares de bases que son G-C. Por ejemplo, si el tanto por ciento G+C de una muestra de DNA es 40, el 40 % de los pares de base son G-C y el restante 60 % son pares de A-T (**Madigan *et al.*, 2003**).

El porcentaje de G+C del DNA afecta a sus propiedades físicas; puesto que los pares de G-C se unen mediante tres puentes de hidrógeno y los pares de A-T se unen por dos, los valores elevados de % G+C indican que las dos cadenas del DNA se encuentran unidas por más puentes de hidrógeno, haciendo que sea más difícil de fundir, o separar mediante

calentamiento. El punto de fusión del DNA, o temperatura a la cual las cadenas se separan, puede, por tanto, utilizarse para determinar el % G+C (**Izquierdo-Rojo, 1999**).

Los valores de % G+C se utilizan para determinar el parentesco de los organismos. Estos valores varían incluso más ampliamente en microorganismos que en eucariotas superiores. Pero las variaciones en los valores del % G+C que se dan en una especie son pequeñas y las que se dan en un género son sólo un poco mayores. Así, organismos estrechamente relacionados tienen valores de % G+C semejantes. Sin embargo, valores semejantes de % G+C no demuestran que dos organismos se encuentran estrechamente relacionados, ya que el % G+C no está relacionado con las propiedades de codificación del DNA. Por ejemplo, la especie humana y *Bacillus subtilis* tienen valores de % G+C casi idénticos (**MC Márquez-Marcos comun. pers.**).

El contenido G+C se utiliza a veces para clasificar organismos en taxonomía. Por ejemplo, las Actinobacterias se caracterizan por ser “bacterias de G+C alto”. En *Streptomyces coelicolor* el G+C es del 72%, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* del 38%, mientras que en el *Arabidopsis thaliana* es del 36%. Debido a la naturaleza del código genético, es virtualmente imposible para que un organismo tenga un genoma con un contenido G+C que se acerque al 0% o a 100%. Una especie con un G+C extremadamente bajo es *Plasmodium falciparum* (G+C ~20%), y en estos casos es generalmente común referirlos como A+T altos en vez de G+C bajos (**Madigan et al., 2003**).

**Holben et al. (1993)** reportaron un método para obtener el perfil de una comunidad bacteriana estudiando el porcentaje de guanina y citosina (% G+C) del DNA. El colorante bis benzamida se une preferentemente a los pares de bases del DNA (A-T), alterando su densidad de flotación. Por ejemplo: el DNA obtenido a partir de una comunidad bacteriana es mezclado con el colorante y sometido a centrifugación en gradiente de densidad. Las bandas de DNA se separan según su contenido en % G+C. El perfil del gradiente es registrado y refleja las proporciones relativas de microorganismo con diferente contenido de % G+C en la muestra. El gradiente puede ser extraído y cada fracción analizarse más adelante por la reacción en cadena de polimerasa (PCR) o estudios de reasociación.

El contenido en porcentaje de G+C proporcionan información sobre toda la comunidad, la información concerniente al tipo o identidad de las poblaciones presentes no es obtenida de

esta forma. Este problema puede superarse mediante el análisis de los genes que codifican el rRNA.

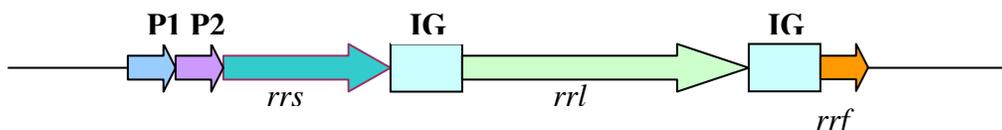
### 1.9.3 Estudios de genes blanco

#### Los ribosomas, los operones ribosómicos y el gen *rrs* (Rodicio & Mendoza, 2004)

Los ribosomas son estructuras complejas, altamente especializadas, que utilizan los organismos para el proceso de síntesis de proteínas. El ribosoma bacteriano tiene un coeficiente de sedimentación de 70S (expresado en unidades Svedberg), y puede disociarse en dos subunidades, la subunidad grande (50S) y la subunidad pequeña (30S). Cada subunidad es un complejo ribonucleoproteico constituido por proteínas ribosómicas y moléculas de rRNA específicas.

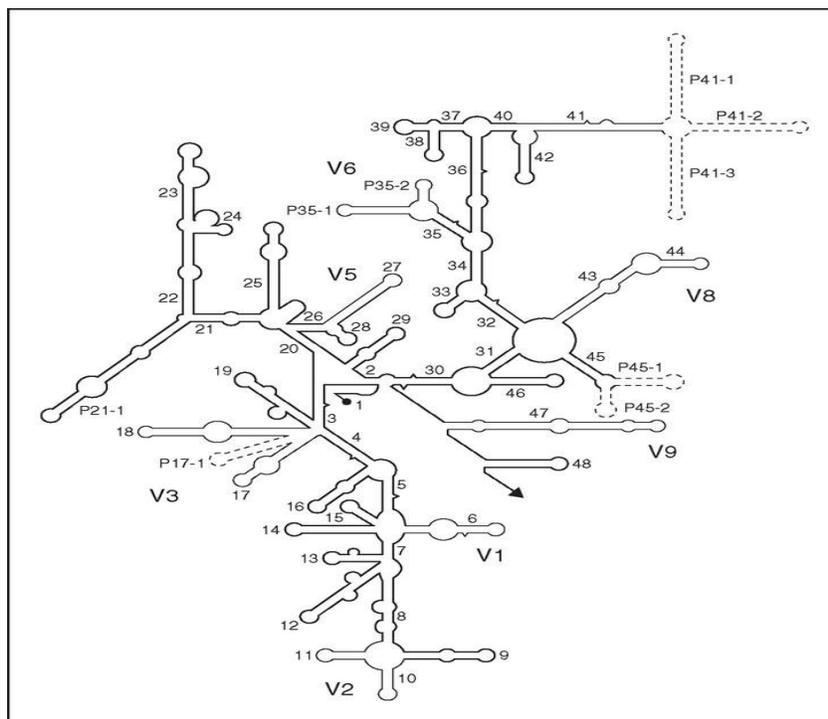
La subunidad 30S contiene el rRNA 16S y 21 proteínas diferentes (numeradas desde S1-S21, donde S procede de *small*), mientras que la subunidad 50S contiene los rRNA 5S y 23S junto con 34 proteínas (L1-L34; L, large).

En bacterias, los genes que codifican los RNA ribosomales están organizados en operones (conjunto de genes que se transcriben a partir de la misma región promotora). Cada operón ribosómico (*rrn* **Figura 8**) incluye genes para los rRNA 23S (*rrl*), 16S (*rrs*) y 5S (*rrf*), separados por regiones espaciadoras o intergénicas (IG), y contiene además genes para uno o más RNA de transferencia (tRNA). El producto de la transcripción del operón a partir de dos promotores, P1 y P2, situados en la región anterior a *rrs*, será procesado por la enzima RNAasa III mediante cortes en sitios específicos que separan las tres clases de rRNA, el/los tRNA y los IG.



**Fig. 8** Representación esquemática del operón ribosómico (*rrn*), donde se muestran los genes estructurales de los tres tipos de rRNA (*rrs*, *rml* y *rrf*), los promotores P1 y P2, y las regiones intergénicas (IG).

El rRNA 16S es un polirribonucleótico de aproximadamente 1500 nt, codificado por el gen *rrs*, también denominado DNA ribosomal 16S (rDNA 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el rRNA 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alterando con regiones de cadena sencilla (**Figura 9**). Los rRNA SSU (del inglés, *small subunit*) se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contiene además variaciones que se concentran en zonas específicas (**Figura 9**).



**Fig. 9** Estructura secundaria del rRNA 16S (imagen tomada de Neefs *et al.*, 1990) Las hélices comunes a todos los seres vivos, denominadas hélices universales, se numeran de 1 a 48, en orden de aparición a partir del extremo 5'. Las hélices específicas de procariontes se indican con Pa-b, donde (a) es el número de la hélice universal precedente y (b) el número de serie. Las regiones relativamente conservadas se presentan en negrilla. Las regiones variables, en líneas finas, se designan V1-V9, teniendo en cuenta que V4 es exclusiva de eucariotas. Las regiones que se muestran en líneas discontinuas sólo están presentes en un número limitado de estructuras.

El análisis de la secuencia de los genes del rRNA 16S de distintos grupos filogenéticos reveló la presencia de una secuencia característica que se denomina oligonucleótidos firma (**Woese *et al.*, 1985**). Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos (o en la mayor parte) los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca (o solo raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo.

El número de copias del operón ribosómico por genoma bacteriano varía considerablemente, de 1 a 15, siendo relativamente constante a nivel de especie, género e inclusive familia (**Klappenbach *et al.*, 2001**). Entre las copias de los genes del rRNA 16S codificadas por un mismo genoma se ha detectado un cierto grado de heterogeneidad (denominada microheterogeneidad). Además, diferentes autores encontraron variabilidad intragenómica entre los genes del rRNA 16S de otras bacterias lo cual tiene importantes implicaciones prácticas para la identificación. Sin embargo en la mayoría de los casos, todas las copias del rRNA 16S de un organismo son idénticas o casi idénticas (**Marchandin *et al.*, 2003**).

#### ***1.9.4 Aislamiento del gen del rRNA 16S y análisis de la secuencia***

Se extrae el DNA total de las muestras, y el gen del rRNA 16S es amplificado por PCR, los productos son clonados dentro de un plásmido o vector apropiado. Una colonia desarrollada sobre un medio de cultivo selectivo contiene sólo un gen del rRNA 16S insertado (clonado); además, representa un gen del rRNA individual presente dentro del total de la población (representa a la clona de la población). Para distinguir entre cada uno de ellos de manera rápida es necesario mapear. Para más detalles de estudio las clonas son secuenciadas y la información es utilizada para determinar la diversidad de especies y la identidad de las clonas (**Ward *et al.*, 1990**), dado que cada clona actúa como un biomarcador de una célula individual. Los organismos que más predominan o dominan tienen la oportunidad de mayor representación entre las clonas.

Las técnicas comúnmente adoptadas con rRNA 16S para el estudio de la diversidad dentro de una comunidad microbiana natural son las siguientes:

### ***1.9.5 Análisis de RFLP***

Mediante PCR se amplifican los genes del rRNA 16S produciendo una mezcla de productos diferentes de tamaño similar. La mezcla es digerida con enzimas de restricción que cortan el DNA en secuencias específicas, y posteriormente es analizada por electroforesis en gel de agarosa, que separa los fragmentos del DNA de acuerdo a su tamaño. El patrón de bandas así generado se emplea para determinar la complejidad de la comunidad original (**Hicks *et al.*, 1992**). En esta aproximación, muchas muestras pueden ser procesadas y se requiere un solo análisis en gel para cada comunidad. Sin embargo, no se puede obtener información para identificar especies similares. La resolución del método no se ha determinado totalmente.

### ***1.9.6 Análisis por DGGE***

En este método, los fragmentos amplificados por PCR son separados uno de otro de acuerdo al elemento principal de su composición en el DNA es decir, al contenido de A+T y G+C. Así los fragmentos, a medida que migran a través de un gel, se van desnaturalizando como consecuencia de un gradiente lineal de formamida/urea (sustancias desnaturalizantes que reaccionan directamente con las bases e impiden su apareamiento). Los productos de PCR con ligeras diferencias en su composición de nucleótidos, se localizarán, en diferentes posiciones del gel, produciendo un patrón de bandas, que reflejará la diversidad de secuencias dentro de los productos de PCR.

Inicialmente, el DGGE fue desarrollado para identificar mutaciones en genes específicos. **Muyzer *et al.*, (1993)** lo usaron para diferenciar los productos provenientes de los genes del rRNA 16S, donde los productos de las especies fueron identificados en longitud y por diferente composición de secuencia. También permite obtener información sobre la diversidad de la secuencia de una amplia variedad de genes que productos de PCR de un tamaño similar. Además, resultó ser una alternativa interesante para el análisis de sitios empleados por enzimas de restricción, o secuenciación de DNA, los cuales son comúnmente usados para diferenciar productos de PCR y tamizar bancos de clonas del rRNA 16S (**Berthier *et al.*, 1993; Bernier *et al.*, 1994 y Laguerre *et al.*, 1994**). El método también se ha aplicado al análisis directo de comunidades microbianas *in situ*, donde la mezcla inicial de productos de PCR se analiza directamente (**Muyzer *et al.*, 1993**). El DGGE aplicado de esta forma puede identificar miembros de hasta el 1% del total de población.

### ***1.9.7 Análisis por TGGE***

Permite separar fragmentos de la misma longitud pero con diferentes secuencias, que son características de los obtenidos mediante la amplificación de regiones de los genes ribosomales del DNA de una comunidad microbiana. De hecho es posible separar fragmentos que difieren en una sola base. El agente desnaturizante para este caso es la temperatura la cual provoca la separación de las cadenas dobles de DNA. Éstas contienen dominios con temperaturas de fusión ( $T_m$ ) característicos, de manera que cuando se alcanza una determinada temperatura, la molécula se desnaturaliza total o parcialmente y disminuye su velocidad de migración en el gel. Las temperaturas de fusión de esos dominios dependen de las variaciones de las bases, por lo que los fragmentos correspondientes a microorganismos diferentes tendrán diferentes posiciones en el gel.

### ***1.9.8 Técnica de RAPD***

Consiste en amplificar al azar regiones del DNA extraído de los microorganismos. Los cebadores se escogen al azar, por lo que no es necesario contar con información sobre secuencias específicas del microorganismo a tipificar. Se utilizan temperaturas de alineamiento bajas, de manera que se obtengan productos de PCR que permitan el alineamiento de los cebadores a pesar de que existan una o dos bases que no coincidan. Después de su separación mediante electroforesis en geles de agarosa se obtienen patrones simples de fragmentos de DNA de diferentes tamaños. El problema de esta técnica es su alta sensibilidad a las condiciones de reacción, por lo que es difícil en ocasiones obtener una reproducibilidad inter-laboratorios adecuada (**Kwong-Kwok *et al.*, 1996, Mark & Crawford, 2000**).

### ***1.9.9 Técnica FISH***

En esta técnica se emplean sondas filogenéticas que se detectan directamente en las células. Para esto se fijan con alcohol o aldehídos y se permeabilizan. En este procedimiento se debe permitir la entrada de la sonda a la célula, sin modificar su integridad morfológica. Si se usan sondas marcadas con fluorocromos diferentes, es posible la identificación simultánea de varios microorganismos y su distribución tridimensional. Se debe tomar en cuenta que puede existir problemas de accesibilidad a ciertas regiones del RNA, causado por proteínas ribosomales

(Amann, 1995). Se puede cuantificar las señales emitidas con una cámara sensible a la luz conectada a un analizador de imágenes digital.

Apoyándose en estas nuevas herramientas, actualmente se reconocen catorce linajes principales (Dominios) de bacterias, definidos por comparación de las secuencias del gen del rRNA 16S obtenidas de cultivos en laboratorio. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que tales metodologías tiene limitaciones. Por ejemplo, en los métodos de extracción de los ácidos nucleicos de las muestras no se asegura la lisis de todos los microorganismos presentes, así como su recuperación intacta. Además, es importante su purificación para la eliminación de sustancias inhibitoras de la reacción de PCR o de las enzimas de restricción (Wilson, 1997). La reacción de PCR puede introducir errores debido a amplificaciones preferenciales (consecuencia de la reasociación del DNA que se usa como molde y que evita la unión de los iniciadores; para evitarse se adiciona a la reacción acetamida, glicerol o dimetilsulfóxido) o formación de moléculas quiméricas (moléculas de rDNA híbridas que se forman cuando una molécula de DNA parcialmente elongada sirve como iniciador en el siguiente ciclo de la PCR), aunque estas últimas son detectables, por ejemplo con el programa Check\_Chimera Ribosomal Database Project (RDP). La formación de moléculas heteroduplex (asociación de cadenas sencillas de moléculas diferentes de DNA) durante la amplificación dificulta la interpretación de patrones de banda en el DGGE o TGGE. Esto puede evitarse al utilizar en la reacción de PCR mayor fuerza iónica, mayor concentración de cebadores, menores temperaturas de reasociación disminuyendo el número de ciclos de amplificación (Muyzer & Smalla, 1998). Por otro lado, se ha reportado que las técnicas de DGGE o TGGE pueden separar fragmentos pequeños, de hasta 500 pares de bases y esto limita las inferencias filogenéticas. Aunque existen reportes sobre la posibilidad de separar secuencias que difieren en una sola base, también se ha reportado la dificultad de separar fragmentos que difieren en 2 o 3 bases (Vallaey *et al.*, 1997). Otra limitación de estas técnicas es el número máximo de bandas de DNA que puedan separarse, aunque se ha reportado la detección de poblaciones que constituyen el 1% de la comunidad por PCR-DGGE (Muyzer *et al.*, 1993). Es posible también que ocurra la comigración de fragmentos de DNA, lo que provocaría la subestimación de la diversidad microbiana y la dificultad para extraer secuencias para su identificación o la sobreestimación de la diversidad debido a la microheterogeneidad en las secuencias de

algunos genes, que pueden ser detectadas por DGGE o TGGE (**Muyzer *et al.*, 1993**). En cuanto a los métodos *In situ*, puede ocurrir que no se detecte un microorganismo debido a una permeabilidad insuficiente o a la falta de acceso de las sondas a las regiones a las cuales debe unirse (**Amann, 1995**).

*La soberbia, nos ciega ante el conocimiento que nos brinda la naturaleza.*  
BM Pérez-Ibarra

## **JUSTIFICACIÓN**

En el marco de un convenio de colaboración entre el grupo de desarrollo de nuevas tecnologías de Cydsa y el área de ingeniería química de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa surgió la necesidad de implementar un sistema para el tratamiento de los efluentes gaseosos producidos en su planta de fabricación de celofán y rayón en Monterrey, Nuevo León (**Revah & Ortiz, 2004**). Posteriormente, surgieron convenios con fábricas de papel para tratar sus aguas residuales compuestas por sulfatos, óxidos de azufre y altos niveles de metanol. A partir de entonces, varios proyectos se han derivado de dicho convenio. Un ejemplo de ello es el presente trabajo, en donde se ha empleado, un consorcio bacteriano proveniente de la planta de tratamiento de agua de la UAM.

## **PROBLEMA**

Con el aislamiento, identificación y la caracterización de los microorganismos sulfoxidantes se pretende aportar información que contribuya a un manejo más eficiente de los procesos biotecnológicos, involucrando cepas puras para el tratamiento de aguas de desecho que contengan sulfuros y tiosulfatos

## **2. OBJETIVOS**

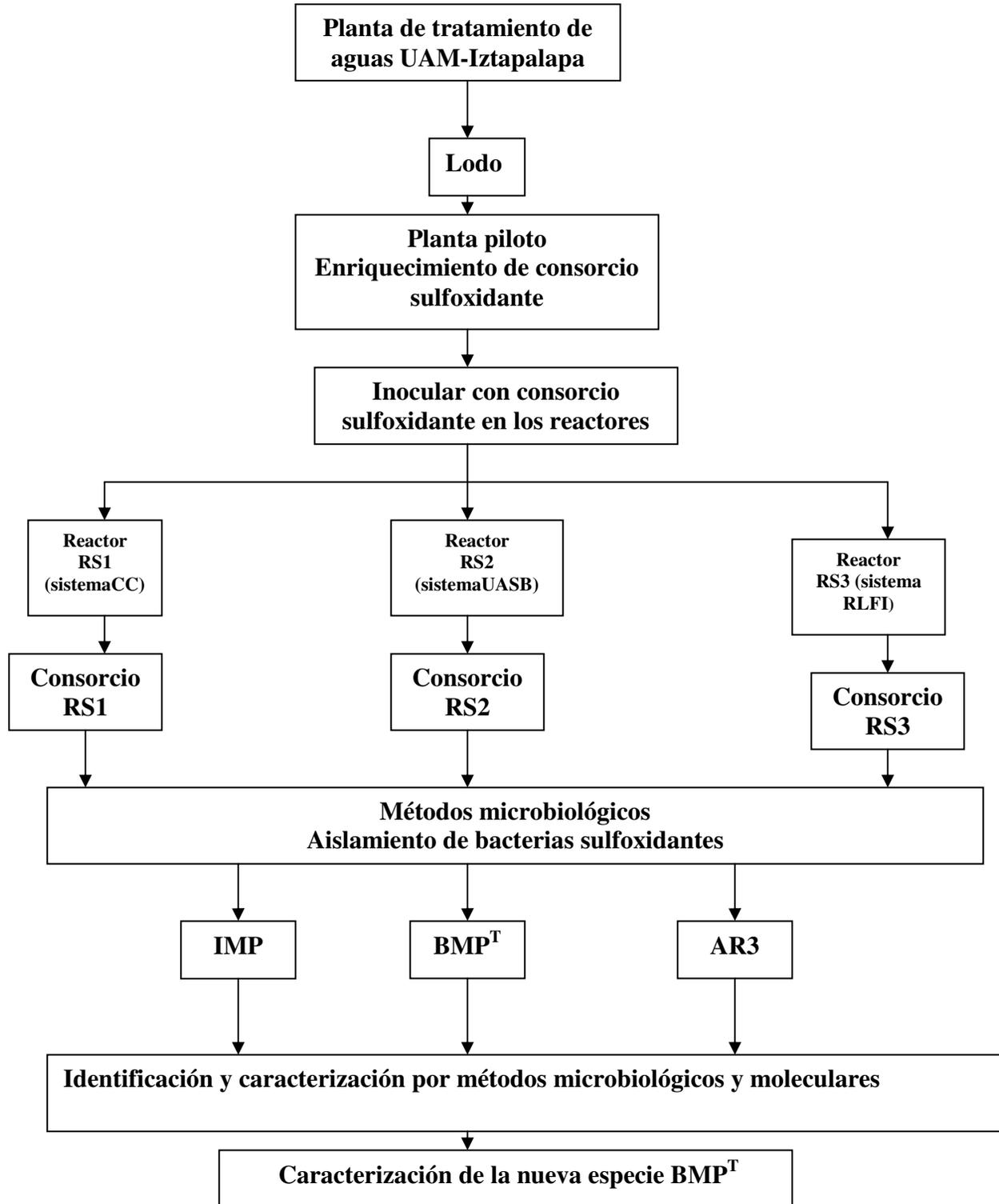
### **2.1 Objetivo general**

Caracterizar de manera microbiológica, bioquímica y molecular microorganismos obtenidos de reactores sulfoxidantes.

### **2.2 Objetivos particulares**

1. Caracterizar de manera microbiológica microorganismos obtenidos de reactores sulfoxidantes.
2. Caracterizar de manera fisiológica y bioquímica microorganismos obtenidos de reactores sulfoxidantes.
3. Caracterizar de manera molecular microorganismos obtenidos de reactores sulfoxidantes.

### 2.3 Estrategia de trabajo



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Caracterización microbiológica

##### 3.1.1 Origen del consorcio

A partir de un digestor anaerobio para el tratamiento de aguas en UAM-Iztapalapa se tomó una muestra de lodo para la inoculación de una planta piloto adaptada para la eliminación de sulfuro de carbono, la cual ha estado operando por más de un año (Alcántara *et al.*, 1999). De dicha planta se obtuvo el consorcio sulfoxidante que fue empleado para inocular, a los tres reactores que fueron estudiados en el presente trabajo.

##### 3.1.2 Cepas, procedencia y su conservación

Cepa de referencia *Halothiobacillus sp* UAM-I sulfoxidante aislada en trabajos previos (Kawasaki *et al.*, 2003) fue conservada en medio MSL con glicerol al 40 % (v/v) a -70 °C.

Cepa de referencia *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> fue adquirida a la Colección Española de Cultivos Tipo fue conservada a -70 °C en caldo de tripticaseína soya (TSB) con glicerol al 40 % (v/v).

Los aislados bacterianos obtenidos en este trabajo fueron conservados a -70 °C en medio MSL con glicerol al 40 % (v/v) por varios meses y durante la realización del presente trabajo se conservaron a -20 °C en medio líquido mineral con azufre (Sorokin *et al.*, 2000).

##### 3.1.3 Medios empleados (composición ver apéndice B)

Medio mineral Sublette & Sylvester, 1987 (MSL)

Medio mineral Sublette con goma gellana (MSGG)

Caldo de soya tripticaseína (TSB)

Medio de agar tripticaseína (TSA)

Medio agar tripticaseína más suplemento mineral (TSA+ASW)

##### 3.1.4 Aislamiento e identificación

Se tomaron en tubos estériles muestras de 15 ml de cada uno de los reactores en cultivo continuo a diferentes condiciones y operando con el mismo consorcio microbiano (Tabla 4). Los reactores fueron nombrados RS1 (sistema CC), RS2 (sistema USAB) y RS3 (sistema RLFI); las muestras fueron centrifugadas a 9,000 x g por 20 min a 5 °C y los pellets (biomasa)

se utilizaron como inóculo para llevar a cabo el enriquecimiento del consorcio bacteriano en matraces con medio **MSL**, incubándose a 30 °C con agitación a 180 rpm por 3 días. Posteriormente se realizaron diluciones de muestra provenientes del cultivo de enriquecimiento (1:10-1:1000). De cada dilución se tomaron 0.5 ml de muestra y se inoculó por duplicado en placas con medio mineral **MSGG** incubándose a 30 °C por 2 días. De estas placas se escogieron todas aquellas colonias amarillas bien aisladas que mostraron el mismo patrón de desarrollo colonial que la cepa de referencia *Halothiobacillus sp* UAM-I y se sembraron en el mismo medio. De las resiembras se tomaron varias colonias puras como inóculo para sembrar por triplicado en medio **MSL**, y por medio de la técnica de enriquecimiento se obtuvo suficiente biomasa de cada aislado bacteriano para ser conservada en glicerol.

**Tabla 4 Condiciones de operación de tres sistemas para el tratamiento de aguas residuales**

Condiciones	RS1 (CC)	RS2 (USAB)	RS3 (LFI)
Tanque			
Volumen de trabajo (L)	1.25	1.8	1.4
Medio de alimentación	Medio mineral+ Na <sub>2</sub> S (130 mg l <sup>-1</sup> ) + Fenol (170 mg l <sup>-1</sup> ) afluente	Medio mineral +Na <sub>2</sub> S (700 mg l <sup>-1</sup> )	Medio mineral + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (3.5 g l <sup>-1</sup> ) + lactato+ butirato+propionato (1:1:6)
pH	7.4	7.5	7.5-8.0
Temperatura °C	30	30	30
Tasa de dilución (día <sup>-1</sup> )	1	1	1.51
Tiempo de retención (día)	0.89	1	0.66
Saturación de oxígeno	aeróbico	aeróbico	Microaeróbico

### 3.1.5 Preparación de inóculo

Los microorganismos aislados se adaptaron al medio Sublette con 20 g/l de tiosulfato (anhidro) de acuerdo al procedimiento siguiente: matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio, se inocularon con 10 ml del cultivo aislado. Se dejó crecer por 2 días a pH 7, temperatura de 30 °C y en agitación a 180 rpm. Una vez que el pH descendió a 5, los dos

matraces se centrifugaron y se resuspendieron en solución salina estéril (0.85 %). Después se tomó 1 ml de células con una DO<sub>600</sub> de 1 como inóculo. Igual procedimiento se realizó para la cepa de referencia.

## **3.2 Características fenotípicas**

### **3.2.1 Morfología colonial**

Los aislados y cepa de referencia *Halothiobacillus* sp. UAM-I, fueron inoculados en matraces con 100 ml de MSL y se incubaron a 30 °C con agitación de 180 rpm por 3 días. Después las muestras se centrifugaron a 9,000 xg por 20 min a 5 °C y de los pellets se tomó una asada para inocular medio MSGG para observar morfología colonial.

*Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> fue inoculada en TSA+ ASW a 30 °C por 24 h para comparar el aspecto morfológico de sus colonias con la cepa aislada.

### **3.2.2 Morfología microscópica**

- Tinción mediante microscopio óptico
- Microscopia electrónica de barrido SEM

La morfología celular fue analizada mediante microscopia electrónica de barrido (scanning electron microscope SEM) a partir de células crecidas en fase exponencial en medio TSB con 24 h de incubación. Las células fueron preparadas siguiendo el método descrito por **Bozzola & Russell (1992)** (ver apéndice C). Después fueron observadas en un SEM (JEOL modelo JSM-5900LV).

### **3.2.3 Técnicas de tinciones descritas por Benson (1990) (ver apéndice C)**

Tinción de Gram

Tinción de espora por el método Schaeffer-Fulton.

### **3.2.4 Determinación de movilidad (ver apéndice C)**

Método por picadura en medio SIM (movilidad-indol-sulfuro), de acuerdo a la técnica reportada por **Koneman et al. (1985)**.

### ***3.2.5 Determinación del tipo del ácido diaminopimélico en pared celular***

A partir de un cultivo celular de 24 h a 30 °C en medio TSB fue determinado el tipo de isómero del ácido diaminopimélico en el peptidoglicano de la pared celular empleando el método descrito por **Staneck & Roberts (1974)**.

Para la determinación del ácido diaminopimélico se procedió de la siguiente manera:

1. 5 mg biomasa (peso seco) fueron colocados en una ampolleta con 1 ml de HCl 6M. La ampolleta fue mantenida a 100 °C por 24 h.
2. Después se dejó enfriar y el hidrolizado fue filtrado a través de un papel filtro Watman GF/F o no. 1.
3. El filtrado fue evaporado a sequedad en un baño de agua caliente para posteriormente redissolver en 1 ml de agua destilada y nuevamente volver a secar. El residuo final fue disuelto en 0.3 ml de agua destilada, y 2 ml fueron aplicados a la línea base de la placa de celulosa. A continuación se realizó la cromatografía en capa fina.

#### **Cromatografía en capa fina**

1. Los isómeros del ácido diaminopimélico fueron separados por cromatografía en capa fina en una placa de celulosa de 20 cm x 20 cm (Merck no.5716) empleando, como fase móvil la mezcla de disolventes metanol-agua-HCl 6M-piridina (80:26:4:10 por volumen). Se recomienda preparar el tanque de revelado adicionando previamente la mezcla de disolventes.
2. 2-3 µl de muestra fueron aplicados en la línea base del cromatograma, junto con un estándar DAP 1 µl de 0.01M DL-DAP (Sigma Chemical Co.), el cual contiene ambos isómeros *meso*- y L-DAP. El estándar fue colocado a ambos lados de la muestra experimental.
3. Posteriormente, se colocó la placa dentro de la cámara de revelado y se dejó ascender la fase móvil (saturación con disolvente) por aproximadamente 4 h.

4. Después la placa se sacó del tanque, se dejó secar al aire y se reveló con ninhidrina (0.2 % W/V en agua con acetona), y se calentó a 100°C por 5 min para visualizar los amino ácidos.

Los isómeros DAP corren más lentamente que otros aminoácidos y producen manchas verdes características. El isómero L-DAP asciende ligeramente más rápido que el *meso* (Rf aproximadamente de 0.29 y 0.24 respectivamente).

### ***3.2.6 Determinación de ácidos grasos en la pared celular***

Para el análisis cuantitativo de ácidos grasos en la pared celular de los aislados se partió de cultivos de 48 h a 30 °C en medio MSL. Las muestras fueron centrifugadas a 9,000 x g por 20 min a 5 °C y los pellets fueron preparados siguiendo la técnica reportada **Minnikin *et al.* (1980)**.

Para la determinación cuantitativa de ácido grasos se procedió de la siguiente manera:

1. 50 mg biomasa (peso seco) fueron colocados en un apropiado vial de vidrio con tapa, conteniendo politetrafluoroetileno. Después la muestra fue sometida a una metanólisis ácida con 3 ml de una mezcla de metanol-tolueno-ácido sulfúrico en una proporción de 30:15:1.
2. El vial cerrado se mantuvo a 75 °C en un horno por 18 h. Después se dejó enfriar a temperatura ambiente, 2 ml de petróleo (b.p 60-80) fue adicionado, la mezcla se agitó y centrifugó por 10 min.
3. Previamente, se preparó una columna pequeña en una pipeta Pasteur conteniendo algodón seguido de carbonato de amonio, para luego adicionar dietil éter seguido de la mezcla anterior.
4. El eluyente obtenido fue colocado en un vial para su análisis.
5. Los ácidos grasos (ésteres metílicos FAME) fueron inyectados en un cromatógrafo de gas Varian Start 3380 CP con una columna capilar DB-23 de 30 m x 0,53 mm. El gas Helio fue usado como eluyente. La temperatura del inyector fue de 170 °C, y la del detector de 300 °C. Para la identificación de los ácidos grasos se utilizó un estándar Supelco 37 componente FAME Mix.

Para el análisis cuantitativo de ácidos grasos en la pared celular de la cepa a caracterizar se siguió el siguiente procedimiento:

Tratamiento de la muestra

1. La cepa fue cultivada en TSB por 48 h, y más tarde se cosechó por centrifugación a  $9,000 \times g$  por 20 min a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, las células se lavaron con solución salina para remover el medio y se liofilizaron toda la noche en una liofilizadora Beta I (Heraeus-Christ, Osterode, Federal Republic of Germany). Las células liofilizadas (aproximadamente 100 mg de peso seco) se saponificaron y los ácidos grasos metil esterres se prepararon siguiendo las instrucciones del sistema de identificación microbiano (MIDI).
2. El análisis de los ácidos grasos metil esterres se llevó a cabo por cromatografía de gases usando un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer (AutoSystem 9000) con un detector ionizador de flama sobre una columna capilar de sílica Supelco SP 2560 (100 m x 0.25 mm x 0.2  $\mu\text{m}$  de grueso). La velocidad de flujo del gas helio fue de  $1\text{ ml min}^{-1}$ , la proporción de separación fue de 1:20, y el volumen de inyección fue de  $0.8\text{ }\mu\text{l}$ . Los datos de GC fueron integrados y cuantificados como porcentaje del área total del pico con un integrador P-Nelson modelo 1022 conectado a una computadora personal. El programa de temperatura del GC fue el siguiente: Temperatura inicial fue de  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; esta fue elevada a  $190\text{ }^{\circ}\text{C}$  con un rampeo de  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , elevada a  $215\text{ }^{\circ}\text{C}$  con una velocidad de rampeo de  $4\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , elevando a  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$  con una velocidad de rampeo de  $8\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , y sostenido por 15 min. El tiempo de corrida fue de 52.4 min y la temperatura del inyector y detector fue  $260\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Badings & De Jong 1983). Una mezcla comercial de 37-componentes de ácido grasos metil esterres (FAME Supelco) fue usada como estándar de calibración.

### **3.3 Características fisiológicas y bioquímicas de los aislados**

#### ***3.3.1 Tolerancia a la presencia de cloruro de sodio en el medio***

Para analizar la tolerancia de la cepa a caracterizar se probaron tres concentraciones: 5 %, 10 % y 15 % (w/v) en 100 ml de medio TSB, por triplicado, los cuales fueron inoculados con 1 % (v/v) de inóculo. Después fueron incubados a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación de 180 rpm por 48 h.

Posteriormente, las células se cosecharon por centrifugación a 9,000 x g por 20 min a 5 °C y se lavaron con solución salina. Los pellets se colocaron en papel filtro previamente pesado y se secaron toda la noche en una estufa a 60 °C. Después, por diferencia se determinó el peso seco (ver apéndice C).

### ***3.3.2 Crecimiento a diferentes temperaturas***

La cepa a caracterizar fue inoculada en 100 ml de medio TSB por triplicado y se incubó a diferentes temperaturas 10 °C, 30 °C, 35 °C y 45 °C por 48 h. El crecimiento se determinó por peso seco (ver apéndice C).

### ***3.3.3 Crecimiento de aislados en presencia de tiosulfato***

Para probar la capacidad sulfoxidante de los aislados, ambos fueron inoculados por separado en medio MSL y fueron incubados a 30 °C y 180 rpm por 84 h. El crecimiento fue determinado midiendo proteína celular usando el método de Lowry (**Lowry *et al.*, 1951**), con albúmina serica bovina como estándar (ver apéndice C).

Sulfato ( $\text{SO}_4^{-2}$ ) y tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$ ) fueron determinados por electroforesis capilar de iones (Millipore CIA 4000) de acuerdo con el Manual Capillary Ion Analyzer (Operator's Manual CIA) y **Rubinson & Rubinson (2001)** (ver apéndice C).

El pH fue medido por medio de un potenciómetro (Orion modelo 399A). Se utilizó un control sin inocular para determinar la oxidación abiótica del tiosulfato.

### ***3.3.4 Comparación de crecimiento quimiolitótrofo entre cepa a caracterizar y *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup>***

Ambos microorganismos fueron incubados en medio MSL a 30 °C con agitación de 180 rpm durante 6 días. Previamente, las células de *B. jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> y el aislado fueron adaptadas al mismo medio por 4 días. Después, el cultivo fue centrifugado a 9,000 x g por 20 min a 5 °C y los pellets fueron lavados dos veces con 0.85 % (p/v) NaCl. Un total de 1 ml de células con una densidad óptica  $\text{DO}_{460}$  de 0.5-0.8, medido con un espectrofotómetro (UV-1201 Uv-Vis Shimadzu), fue tomado e inoculado en medio MSL. Subsecuentemente la concentración de proteína celular y el decremento en el pH fueron medidos como se describió previamente.

### **3.3.5 Determinación de catalasa y oxidasa.**

Se utilizaron las técnicas descritas por Benson (1990) (ver apéndice C).

### **3.3.6 Identificación microbiológica por el sistema manual API**

Para analizar las características bioquímicas de la cepa BMP-1<sup>T</sup> se necesitó de un cultivo de 24 h a 30 °C en medio TSA, una vez obtenido se inocularon un par de galerías API 20E y API 20 NE kits (bioMérieux) de acuerdo con la metodología del fabricante reportada por **Sharp et al. (1980)** y **Logan & Berkeley (1984)** (ver apéndice C).

## **3.4 Caracterización de aislados por métodos moleculares**

### **3.4.1 Extracción de DNA genómico**

El DNA genómico de los aislados fue extraído utilizando el kit de purificación de DNA Wizard (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante (ver apéndice C).

### **3.4.2 Amplificación del gen del rRNA 16S por PCR**

Una vez obtenido el DNA, de los aislados se procedió a amplificar el gen del rRNA 16S completo. Dicho gen es importante en taxonomía bacteriana ya que presenta regiones muy conservadas y a la vez regiones variables, lo que proporciona suficiente diversidad genética para distinguir unas especies de otras (**Woese, 1987**).

El gen del rRNA 16S (~1,500 bp) fue amplificado de la región 8-1492 bp, usando los iniciadores 8 forward 5'-AGACTTTGATCMTGGCTCAG-3' y 1492 reverse 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' (Sigma Genosys) (**Polz & Cavanaugh, 1997**). La reacción de PCR consistió en adicionar en tubos de 1.5 ml cada iniciador [10 pmol ml<sup>-1</sup>], 2.5 µl de buffer 10X, 2.5 µl de MgCl<sub>2</sub> [25 Mm], 0.5 µl de cada dNTP's [10 mM], 5µl de Solución-Q 5x, 1 µl del DNA genómico, 10.3 µl de agua destilada estéril y 0.2 µl of *Taq* DNA polimerasa [2.5 U µl<sup>-1</sup>] (Qiagen). Parámetros para la reacción de PCR incluyeron desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido por 34 ciclos de 94 °C por 30 s, alineación a 53 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 1 min, 30 s, seguido por post-amplificación a 72 °C por 7 min.

### **3.4.3 Amplificación de la región V6-V8 de los aislados**

Una vez que se observó que el gen del rRNA 16S es amplificable, se procedió a amplificar la región V6-V8 (~500 bp) que va del nucleótido 968 al 1401 del mismo gen, donde se

encuentran zonas variables, lo cual confiere a la técnica de DGGE una mayor resolución. Para ello se emplearon como iniciadores GC968 5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG AAC GCG AAG AAC CTT ACC-3' y Uni1401 rev 5'- GCG TGT GTA CAA GAC CC-3' (Sigma Genosys). La reacción de PCR consistió en adicionar en tubos 1.0 µl de cada iniciador [10 pmol ml<sup>-1</sup>], 2.5 µl de buffer 10X, 3.0 µl de MgCl<sub>2</sub> [25 mM], 0.5 µl de cada dNTP's [10 mM], 5µl de Solución-Q 5x, 1 µl del DNA genómico, 10.8 µl de agua destilada estéril y 0.2 µl of Taq DNA polimerasa [2.5 U µl<sup>-1</sup>] (Qiagen). Parámetros para la reacción de PCR incluyeron desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, alineación a 56 °C por 20 s, extensión a 68 °C por 40 s, seguido por post-amplificación a 68 °C por 7 min.

#### **3.4.4 Tipificación por PCR-REA del gen del rRNA 16S.**

Una vez que fue amplificado el gen del rRNA 16S, los productos fueron empleados para llevar a cabo la tipificación de las cepas mediante las enzimas de restricción MspI 5'-C<sup>^</sup>C G G-3' 3'-G G C<sup>^</sup>C-5', HaeIII 5'-G G<sup>^</sup>C C -3' 3'-C C <sup>^</sup>G G-5' y HhaI 5'-G<sup>^</sup>C G C-3' 3'-C G C <sup>^</sup>G-5' (Promega). Se realizaron reacciones para cada aislado que consistió en adicionar en tubos, 0.2 µl de buffer BSA (albumina sérica bovina), 2.0 µl de 10x buffer, 1 µl del DNA genómico, 16.3 µl de agua destilada estéril y 0.5 µl enzima. Los tubos se incubaron a 37 °C por 1 hr 30 min. Posteriormente, los fragmentos de la digestión fueron separados en un gel de agarosa al 1.5% por electroforesis a 100 V por 2 hr. Se tiñó con bromuro de etidio al 1 %.

#### **3.4.5 Tipificación de los aislados por PCR-RAPD**

En este método, se emplea un sólo oligonucleótido o un par de oligonucleótidos con secuencias cortas (10-bases) escogidas al azar, empleándolos como iniciadores, para detectar rápidamente polimorfismos genómicos bajo condiciones estrictas. Los iniciadores se escogen al azar (Kwong-Kwok *et al.*, 1996, Mark & Crawford, 2000). Para aplicar esta técnica fue necesario encontrar las condiciones óptimas de temperatura de alineación y los parámetros para la reacción de PCR (Williams *et al.*, 1990, Orberá-Ratón, 2004). El iniciador empleado fue PFJ 5'-ACG CGC CCT-3' a una concentración de 20 ng µl<sup>-1</sup>. La reacción de PCR consistió en adicionar en tubos 0.5 µl de iniciador PFJ, 2.5 µl de buffer 10X, 2.5 µl de MgCl<sub>2</sub>

(25 mM), 0.5 µl de cada dNTP's (10 mM), 5µl de Solución-Q 5x, 1 µl del DNA genómico, 12.8 µl de agua destilada estéril y 0.2 µl of *Taq* DNA polimerasa (2.5 U µl<sup>-1</sup>) (Qiagen). Parámetros para la reacción de PCR incluyeron desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 94 °C por 45 s, alineación a 38 °C por 45 s, extensión a 72 °C por 90 s, seguido por post-amplificación a 72 °C por 7 min. Posteriormente para observar el patrón de bandas de los diferentes aislados se prepararon dos geles, uno con 30 % acrilamida y otro con 40 % acrilamida, para probar una mejor resolución.

#### ***3.4.6 Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)***

Los fragmentos del gen del rRNA 16S amplificados específicamente por PCR fueron separados uno de otro de acuerdo al contenido de A+T y G+C. A medida que migran los fragmentos a través de un gel se fueron desnaturalizando como consecuencia a un gradiente lineal de sustancias desnaturalizantes. Después, el gel fue teñido para revelar su patrón de bandas.

El DNA extraído de cada una de las muestras de los reactores, fue usado como templado para amplificar un fragmento comprendido entre las regiones variables V6 a V8 del gen del rRNA 16S. Las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo a las condiciones descritas anteriormente. Una vez obtenido los productos de PCR estos se corrieron en un gel conteniendo urea y formamida como desnaturalizante con un gradiente de 44% (nivel bajo) a 52% (nivel alto). Las condiciones de electroforesis fueron 5 min a 200 V, 16 h a 85 V. La detección final de los fragmentos de DNA se llevó a cabo por tinción del gel con nitrato de plata (**Muyzer *et al.*, 1996**).

#### ***3.4.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)***

El gel se elaboró empleando 17 g de urea, la cual se disolvió en 8 ml de 5X TBE, 6.7 ml de 40 % acrilamida/0.8 % N,N-metilenbisacrilamida (w/v) y 8 ml de agua MQ. Se mezcló bien y se ajustó el volumen a 40 ml con agua MQ. Posteriormente se adicionaron 40 µl N,N,N,N-Tetrametiletilendiamina (TEMED) y 40 ml de persulfato de amonio (APS). La mezcla se colocó en el sistema de electroforesis DCode<sup>TM</sup> Bio-Rad. Una vez gelificado se procedió a colocarlo en un buffer TBE para luego colocar en los pozos los productos de PCR. El gel se

corrió a 20 °C y a 85 V por 5 hr. Un segundo gel se elaboró de la misma forma, pero en este caso se empleó 30% acrilamida/0.8% N'N-metilenbisacrilamida (w/v) y las condiciones para su corrimiento fueron 23°C y 200 V por 3hr. Finalmente, ambos geles se revelaron con nitrato de plata (ver protocolo para DGGE).

#### ***3.4.8 Secuenciación del gen del rRNA 16S de los aislados***

Los productos de reacción de la PCR del gen del rRNA 16S de los aislados fueron purificados usando unidades de filtración montage-PCR (Millipore) para posteriormente ser secuenciados. La reacción de secuenciación fue realizada usando ABI BigDye (PE Applied Biosystems, Boston, Massachusetts), y los productos de la reacción fueron separados usando un detector ABI 310 capillary DNA sequencer. La secuencia fue analizada usando el programa Chromas v. 3.1.1 y fue alineada manualmente. Después las secuencias fueron comparadas con la base de datos del GeneBank.

#### ***3.4.9 Clonación de productos de PCR del aislado a caracterizar***

Los productos de la reacción de PCR del gen del rRNA 16S del aislado fueron visualizados en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio y fueron clonados dentro del vector TOPO-TA pCR 2.1 (Invitrogen), utilizando como células competentes *Escherichia coli* TOP10F'(Invitrogen). Los plásmidos fueron secuenciados por ambas cadenas usando iniciadores universales e internos. Las reacciones de secuenciación fueron realizadas usando el ABI BigDye (PE Applied Biosystems), y los productos de reacción fueron separados y detectados usando el ABI 310 capillary DNA secuenciador. Mediante el programa v. 3.1.1 Chromas (Gene Codes, Ann Arbor, Michigan), la secuencia fue analizada para luego ser alineada manualmente. Posteriormente, las secuencias fueron comparadas con la base de datos del GeneBank.

#### ***3.4.10 Análisis filogenético del aislado a caracterizar***

La secuencia del gen del rRNA 16S del aislado obtenido en este trabajo fue alineado con las secuencias del gen del rRNA 16S de otros *Bacillus* obtenidas de la base de datos de secuencias de nucleótidos (The European Molecular Biology Laboratory (EMBL) Nucleotide Sequence Database/GenBank). La alineación de las secuencias fueron realizadas con el programa Clustal

W (Thompson *et al.*, 1994) y ajustada manualmente. El alineamiento contiene 1,354 nucleótidos de 28 especies del género *Bacillus* y 5 especies de otros géneros, los cuales fueron usados como grupos externos. Para determinar qué modelo evolutivo se ajusta mejor a nuestros datos, se realizó una prueba jerarquizada del cociente de la probabilidad usando el programa MODELTEST, versión 3.04 (Posada & Crandall, 1998). Las relaciones filogenéticas fueron inferidas usando el método de máximo likelihood. La distancia genética entre las especies fueron estimadas por el método de Kimura (Kimura, 1980). La robustez del árbol (ML) fue evaluada usando una prueba de bootstrap de 100 replicas (Felsenstein, 1981). El árbol fue dibujado usando RETREE y DRAWGRAM a partir del programa PHYLIP (Felsenstein, 1999).

#### **3.4.11 Determinación del contenido G+C del DNA**

La bacteria aislada fue cultivada en medio TSA por 24 h a 30 °C. Del cultivo celular se extrajo el DNA y se purificó por el método de Marmur (1961) (ver apéndice C). El contenido de G+C del DNA fue determinado a partir del valor medio del perfil térmico de desnaturalización terminal obtenido a 260 nm con un espectrofotómetro (Perkin-Elmer modelo UV/VIS Lambda 20). Este instrumento fue programado para incrementos de 1.0 °C min<sup>-1</sup> (Marmur & Doty, 1962). El contenido de G+C fue calculado usando la ecuación descrita por Owen & Hill (1979) (ver apéndice C). El contenido de 51 mol% G+C de referencia proviene del DNA de la cepa *Escherichia coli* NCTC 9001 (Owen & Pitcher, 1985) (ver apéndice C).

#### **3.4.12 Preparación del DNA marcado con el isótopo radioactivo <sup>3</sup>H y experimentos de hibridación DNA-DNA.**

Las células de la cepa a caracterizar y *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> fueron cosechadas, lavadas y suspendidas en 0.15 M NaCl-0.1 M EDTA buffer (pH 8.0) (5 g peso húmedo en 50 ml de buffer), y lisadas con lisozima (10 mg) a 37 °C y con dodecil sulfato de sodio (2% concentración final) a 60 °C. DNA fue extraído y purificado por el método de Marmur (1961).

El DNA fue etiquetado radiactivamente con un kit comercial Multiprime, usando (1',2',5-<sup>3</sup>H) dCTP (Amersham), La actividad específica media obtenida con este procedimiento fue de  $8.8 \times 10^6$  cpm DNA  $\mu\text{g}^{-1}$ . La hibridación DNA-DNA fue realizada por el procedimiento de competición descrito detalladamente por **Arahal *et al.* (1999)**. Los experimentos de hibridación fueron realizados bajo condiciones óptimas, con temperaturas que se extienden entre 48.4 y 48.5 °C, descritos como los límites válidos del método del filtro (**De Ley & Tijtgat, 1970**) y el porcentaje de hibridación fue calculado según lo descrito por **Johnson (1994)**. Los valores reportados de DNA relacionado es el promedio de dos determinaciones independientes.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Aislamiento, identificación y caracterización microbiológica de los aislados

El aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos, provenientes de consorcios presentes en tres reactores se realizó conjuntamente técnicas de microbiología clásica como de biología molecular.

#### 4.1.1 Aislamiento de bacterias sulfoxidantes

Con el objetivo de aislar y caracterizar microorganismos sulfoxidantes presentes en tres sistemas de cultivo continuo (RS1, RS2 y RS3) operando con el mismo lodo, pero a diferentes condiciones de operación, se procedió a tomar muestras de cada uno de los reactores. Los consorcios presentes en los reactores RS1 y RS2 fueron sometidos a condiciones de aerobiosis, mientras que el consorcio presente en RS3 fue sometido a condiciones de microaerobiosis, además de las condiciones señaladas en la **Tabla 4**. Dichas condiciones favorecieron el crecimiento de comunidades sulfoxidantes que fueron capaces de adaptarse sobre otras, cuyo crecimiento se redujo o que incluso desaparecieron, lo cual explica el reducido número de microorganismos en tales consorcios. Además de que las muestras fueron enriquecidas, empleando como medio selectivo MSL y se realizaron diluciones seriadas. Se llevó a cabo el aislamiento en medio MSGG. Cabe señalar que el aislamiento de cultivos puros no es un procedimiento trivial, puesto que uno de los problemas más comunes en la obtención de cultivos puros de quimiolitotrófos es la persistencia constante de heterótrofos contaminantes, asociados con colonias de quimiolitotrófos en placas de agar (**Taylor et al., 1971; Harrison, 1984**). Esto es en parte debido a que muchos quimiolitotrófos obligados, liberan al medio compuestos orgánicos y por otra parte a la presencia de concentraciones traza de materia orgánica en el agar comercial (**Borichewski, 1967; Cohen & Kuenen, 1976; Schnaitman & Lundgren, 1965**), por tal motivo nosotros utilizamos el medio MSGG que contiene goma rellana ya que no contiene carbohidratos, en vez de agar, logrando así el aislamiento de siete cepas puras (**Tabla 5**). En todo momento, la pureza de los cultivos fue rigurosamente revisada, mediante tinción de Gram.

**Tabla 5** Cepas aisladas a partir de los consorcios presentes en cada reactor

Reactores a diferentes condiciones			
	SR1	SR2	SR3
Aislados	IMP	BMP-1	AR3
	A <sub>2</sub> M <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> M <sub>2</sub>	
	A <sub>3</sub> M <sub>1</sub>	A <sub>3</sub> M <sub>2</sub>	

De las siete cepas se seleccionaron aquellas capaces de crecer quimiolitotróficamente en presencia de tiosulfato para lo cual se consideraron varios criterios. El primero consistió en comparar el crecimiento de los aislados en los medio MSGG y MSL con la cepa de referencia *Halothiobacillus sp UAM-I*, la cual en trabajos previos mostró ser capaz de crecer quimiolitotróficamente oxidando compuestos reducidos de azufre y fijando dióxido de carbono por medio del ciclo de Benson-Calvin (**Kawasaki et al., 2003**). Así como también, los señalados por **Kuenen (1989)** que consistieron en establecer que el microorganismo o microorganismos en cuestión fueran procariontes capaces de oxidar compuestos reducidos como fuente de energía para su crecimiento y que no tuvieran pigmentos fotosintéticos, puesto que por definición ninguna de las bacterias incoloras del azufre son fotótrofas. El siguiente criterio fue su morfología celular, por lo tanto todos aquellos microorganismos sulfoxidantes que poseen forma de bacilo y crecen por debajo de 55 °C son clasificados como *Thiobacillus*, pero si los organismos poseen forma de bacilo y son capaces de formar filamentos así como crecer a altas temperaturas son clasificados como *Thermothrix*, pero si sus células poseen forma de vibrio y espiral son clasificadas como *Thiomicrospira*, o si se trata de cocos que crecen por encima de 55 °C pertenecen al género *Sulfolobus*. Un tercer criterio fue la presencia de partículas de azufre (elemental) intracelular o extracelular, visibles mediante microscopio de contraste de fases después de la incubación en medio MSL **Kuenen (1989)**. Entonces, con base en lo anterior se procedió a seleccionar los aislados.

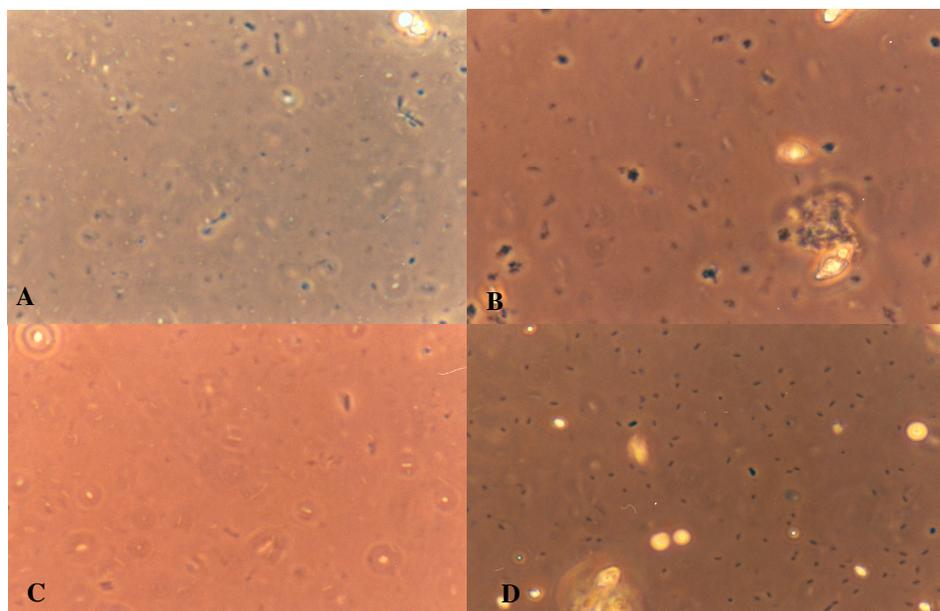
#### **4.1.2 Morfología colonial de los aislados**

En el medio MSGG se aislaron colonias pequeñas de color amarillo debido a depósitos de azufre con un diámetro de 1 mm, con bordes regulares. En el medio MSL se observó que los aislados (*Halothiobacillus sp UAM-I*, IMP, BMP-1<sup>T</sup> y AR3) generaban turbidez y descenso del pH 7 a 2, liberando al medio azufre, el cual se hizo evidente como gránulos brillantes bajo el microscopio de contraste de fases después de su incubación (**Tabla 6 y Figura 10**). Dicha

capacidad es propia de microorganismos sulfoxidantes, como por ejemplo, algunas especies de los géneros *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Starkeya*, *Acidithiobacillus*, *Halothiobacillus* y *Thermithiobacillus* (Kuenen *et al*, 1992; Kelly *et al*, 2000; Kelly & Wood, 2000).

**Tabla 6 Selección de aislados sulfoxidantes**

Aislados	Medio MSGG	Cambios en el medio MSL	Decisión
<i>Halothiobacillus</i> sp. UAM-I IMP BMP-1 <sup>T</sup> AR3	Colonias muy pequeñas de color amarillo Bordes regulares.	Liberación de azufre al medio y descenso de pH (Fig 10 y Fig 14)	<b>Seleccionados</b>
A <sub>2</sub> M <sub>1</sub> A <sub>2</sub> M <sub>2</sub>  A <sub>3</sub> M <sub>1</sub> A <sub>3</sub> M <sub>2</sub>	Colonias grandes de coloración blanco lechoso Bordes regulares. Colonias translucidas, muy pequeñas, con bordes irregulares	El pH se mantiene en 8 y no liberación de azufre	<b>No seleccionados</b>



**Fig. 10** Deposición extracelular de azufre elemental producido por los aislados en medio MSL observados como gránulos luminosos a través de microscopia de contraste de fases A) *Halothiobacillus* sp. UAM-I (referencia) B) IMP C) BMP-1<sup>T</sup> D) AR3.

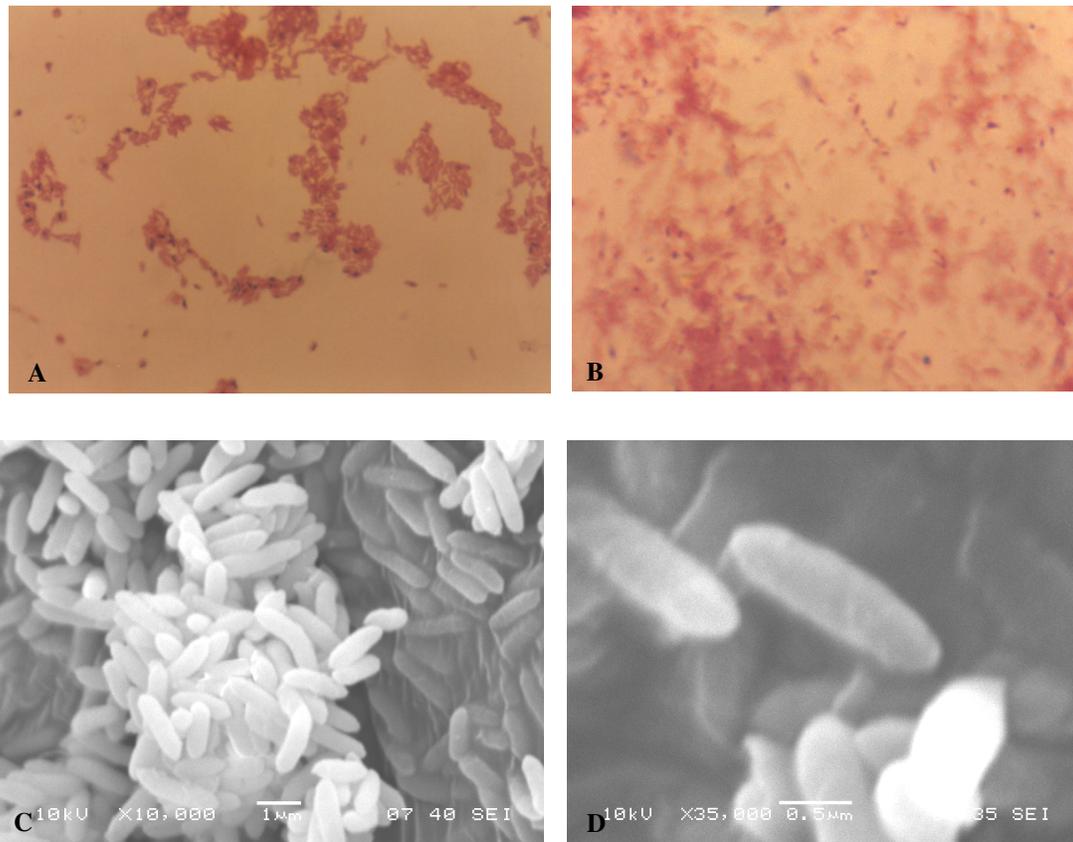
#### 4.1.3 Morfología microscópica y actividad enzimática

A partir de subcultivos de los aislados (*Halothiobacillus* sp. UAM-I, IMP, BMP-1<sup>T</sup> y AR3) en medio MSGG se analizó la morfología celular de los aislados por tinción de Gram, encontrándose que dichos microorganismos fueron bacilos cortos Gram-negativos catalasa-negativos cuyas medidas van de 0.5 a 2.0 µm de ancho por 1.5 a 2.0 µm de largo. Son móviles. En cuanto al aislado BMP-1<sup>T</sup>, fue Gram-variable, las imágenes de su morfología celular mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) a partir de células cultivadas en medio de TSB a 30 °C, muestran claramente bacilos cortos, con un ancho de 0.5-0.7 µm por 1.0-1.7 µm de longitud y superficie rugosa. La tinción de Gram de un cultivo de BMP-1<sup>T</sup> en medio MSL mostró endoesporas centrales (incoloras) que deforman ligeramente a las células y mediante la tinción de esporas por el método de Schaeffer-Fulton se hicieron evidentes (**Figura 11 A, B, C y D**). En cuanto a su actividad enzimática fue catalasa positivo y oxidasa negativo. En la **Tabla 7** se describen las principales características morfológicas de los aislados.

**Tabla 7 Principales características morfológicas y actividad enzimática de los aislados sulfoxidantes**

Parámetros	<i>Halothiobacillus</i> sp. UAM-I	IMP	BMP-1 <sup>T</sup>	AR3
Morfología celular	Bacilos cortos delgados en cadena de dos o tres.	Cocobacilos agrupados en pares.	Bacilos cortos agrupados en cadenas de dos.	Cocobacilos agrupados en tres o más.
Ancho (µm)	1.0	2.0	0.5-0.7	1.5-2.0
Largo (µm)	1.5		1.0-1.7	
Movilidad	+	+	+	+
Gram	-	-	v	-
Endoesporas	no	no	si	no
Catalasa (descomposición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	-	-	+	-
Oxidasa	nd	nd	-	nd

nd= no determinado; v= variable



**Fig. 11** Características microscópicas del aislado BMP-1<sup>T</sup> A) Gram-variable y B) presencia de endoesporas. C) y D) Muestra morfología celular y superficie rugosa de la celular, mediante microscopia de barrido (SEM).

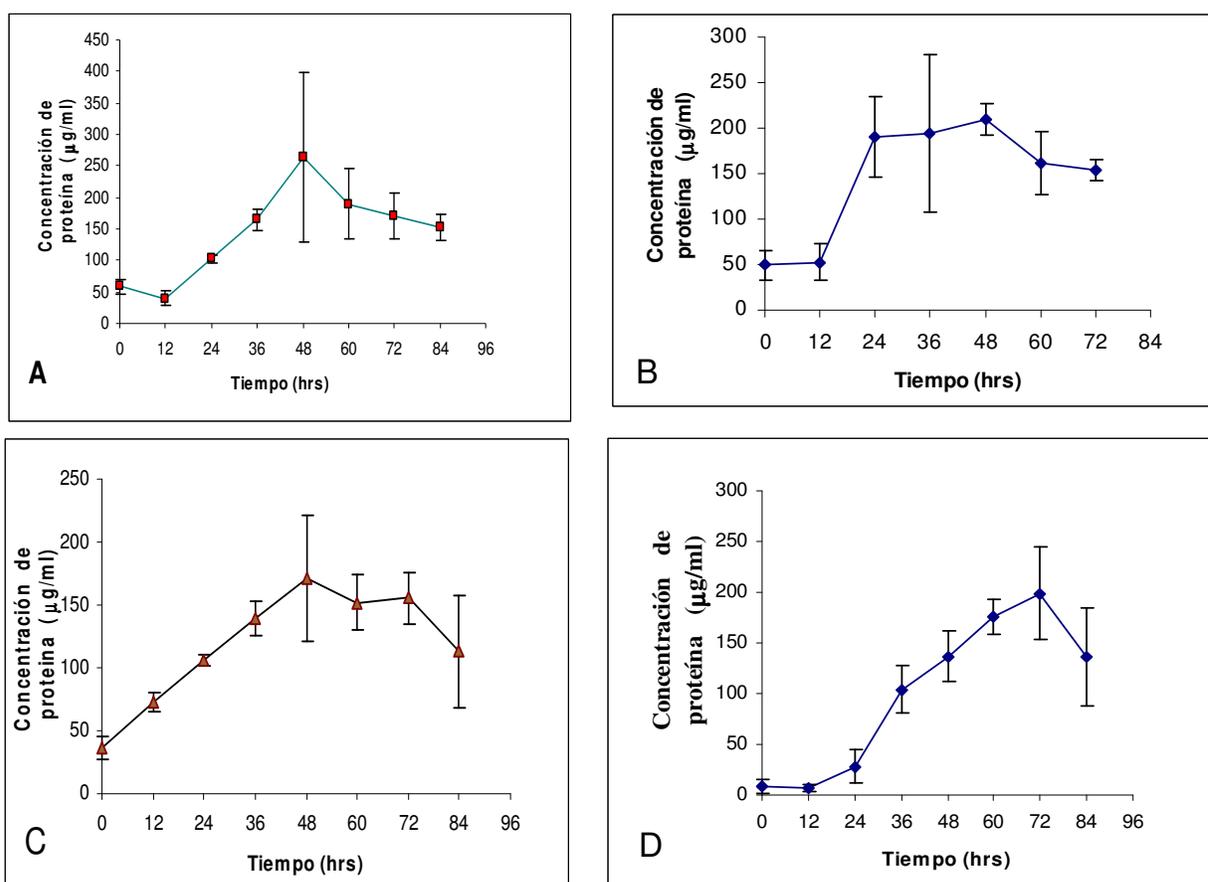
Como se observa, nuestros aislados presentan características fenotípicas muy semejantes a la cepa de referencia, excepto la cepa BMP-1<sup>T</sup> que mostró la presencia de esporas y actividad con catalasa, características que hasta ahora no presenta el género *Thiobacillus* y *Halothiobacillus*.

#### **4.1.4 Determinación de la capacidad sulfoxidante de los aislados**

Para probar la capacidad sulfoxidante de los aislados (*Halothiobacillus* sp UAM-I, IMP, BMP-1<sup>T</sup> y AR3) fueron cultivados en medio MSL. Para dicho análisis se utilizó tiosulfato (anhidro) por ser soluble, estable y por no presentar problemas de toxicidad. Se empleó la concentración de 20 g/l (127 mM), en vez de 10 g/l como indica **Sublette & Silvestre (1987)**, la razón es porque en trabajos previos se observó la estimulación del crecimiento en casi 3.6 veces su

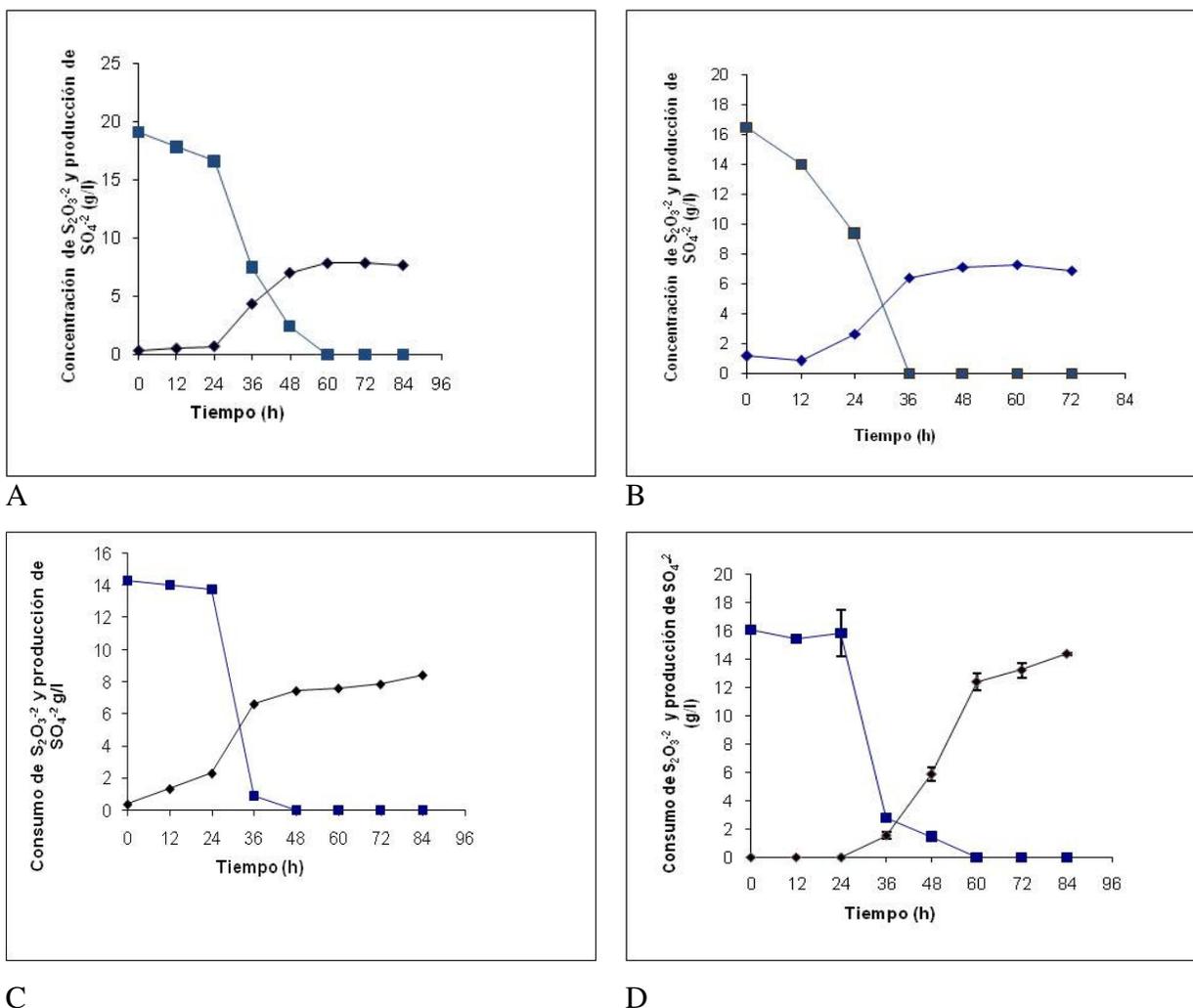
valor. Es decir, si con 10 g/l y 24 h de cultivo el valor de proteína celular fue de 126 mg/l, con 20 g/l y el mismo tiempo de cultivo su valor fue 460 mg proteína /l (Alcántara, 2000).

En la **Figura 12** se compara el crecimiento de los diferentes aislados, encontrándose para casi todos un crecimiento paulatino hasta un máximo que ocurre a las 48 h de cultivo. En el caso de la cepa de referencia, el valor de la proteína celular fue de 206 mg/l, mientras que para IMP fue de 160 mg/l y para BMP-1<sup>T</sup> fue de 136 mg/l. Sin embargo, para AR3 fue de 190 mg/l a un tiempo de 72 h, debido a que la concentración de inoculo fue menor según los datos de proteína celular al inicio del experimento. En la **Figura 13** se muestra para todos los aislados el consumo paulatino del tiosulfato y, paralelamente, la producción de sulfatos que se va incrementando a partir de las 24 h de cultivo.



**Fig. 12** Crecimiento de los diferentes aislados en medio MSL con 20g/l de tiosulfato A) *Halothiobacillus* sp. UAM-I, B) IMP, C) BMP-1<sup>T</sup> y D) AR3.

De los datos mostrados en las **Figuras 12 y 13** se desprende que en todos los aislados se presentó un estrecho acoplamiento entre el incremento en proteína celular y la desaparición de tiosulfato y un incremento lento subsecuente de sulfato, probablemente acoplado a una lenta oxidación de azufre acumulado. En general, para todos los aislados la cantidad de sulfato formado va de 7 a 8 g/l, que corresponde aproximadamente del 42-57 % de tiosulfato adicionado, y el restante corresponde a azufre elemental. Por tanto, la oxidación de sólo la mitad del ion tiosulfato se traduce en energía de rendimiento y la otra mitad aproximadamente se libera como azufre (**Figura 10**). El rendimiento del crecimiento para *Halothiobacillus* sp. UAM-1 fue de 1.6 g proteína/mol  $S_2O_3^{2-}$  consumido, para la cepa IMP 1.25 g proteína/mol  $S_2O_3^{2-}$  consumido, BMP-1<sup>T</sup> 1.07 g proteína/mol  $S_2O_3^{2-}$  consumido y por último AR3 con 1.49 g proteína/mol  $S_2O_3^{2-}$  consumido. Tales rendimientos resultan ser bajos comparados con los reportados para *Halothiobacillus neapolitanus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Paracoccus versutus*, debido quizás al tipo de experimento montado, ya que para estos últimos, sus estudios fisiológicos fueron realizados en quimiostatos obteniéndose rendimientos más altos (2.4 a 3 g proteína/mol  $S_2O_3^{2-}$  consumido) (**Gommers et al., 1988, Kelly, 1999**). Por su parte *Thiobacillus sajanens*, bajo condiciones óptimas de crecimiento en presencia de tiosulfato, similares a las utilizadas con nuestros aislados, mostró una concentración de proteína celular máximo de 15 mg/l a cuatro horas de crecimiento, inferior a la que nosotros reportamos para nuestros aislados (**Dul'tseva et al., 2006**).

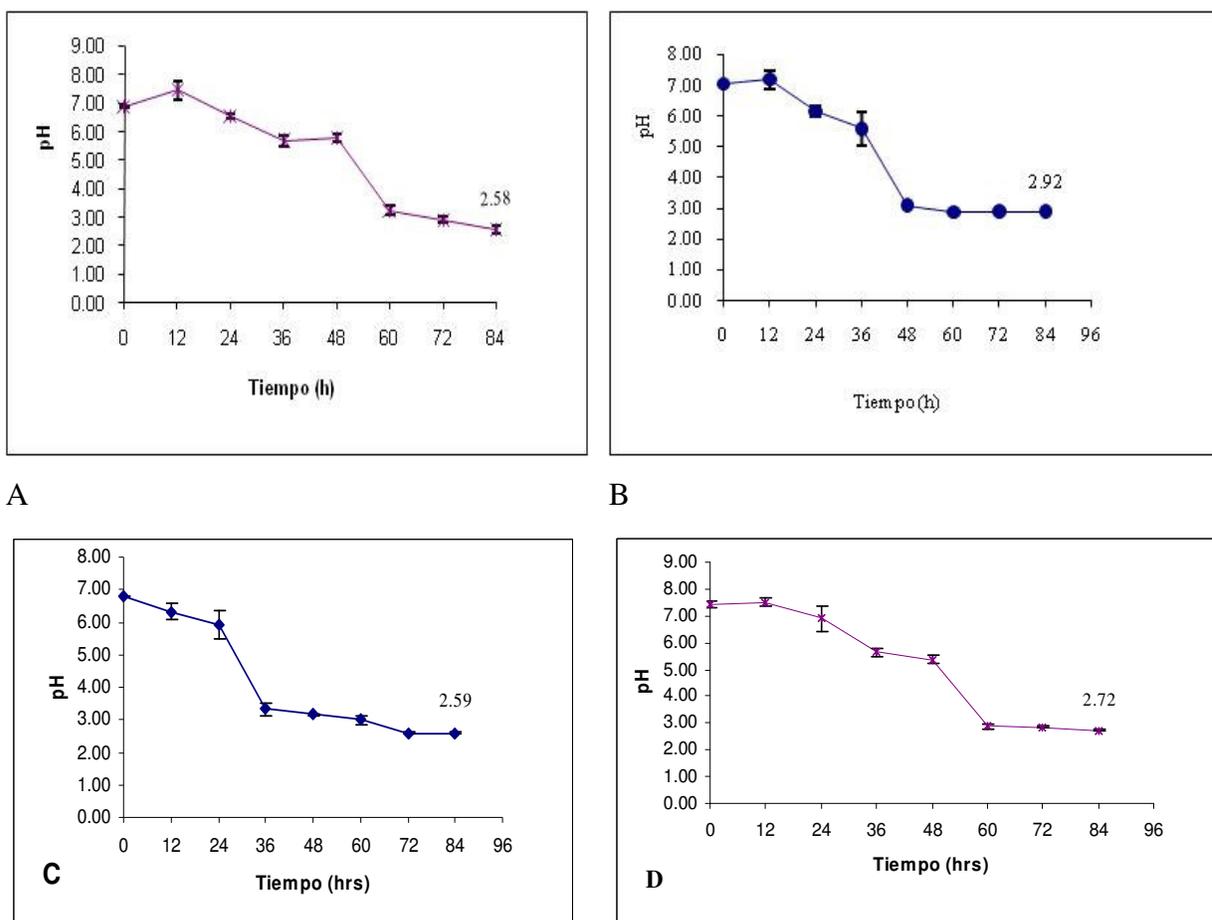


**Fig. 13** Consumo de tiosulfato (■) y producción de sulfato (◆) en MSL por A) *Halothiobacillus* sp. UAM-I, B) IMP, C) BMP-1<sup>T</sup> y D) AR3.

#### 4.1.5 Cambios en el pH

El descenso del pH por los diferentes aislados se muestra en la **Figura 14**, la cual está relacionada con la formación de ácido sulfúrico en el medio de cultivo. En general, se observó la disminución de pH 7.0 a 2.5. Esta característica ha servido como criterio para identificar microorganismos pertenecientes al género *Thiobacillus* (Kelly & Harrison 1989). Sin embargo, en recientes reportes se ha encontrado que la habilidad para oxidar azufre y su morfología, no pueden considerarse como criterios propios del género *Thiobacillus*. Esto se hizo evidente con algunas bacterias fotosintéticas (e.j. *Chromatium* y especies de *Chlorobium*)

y algunas especies *Alcaligenes* hidrógeno-oxidantes capaces de crecer autotróficamente utilizando compuestos de azufre como única fuente de energía. Por otro lado, con los avances en biología molecular el género *Thiobacillus* ha tenido que ser reorganizado. (Kelly et al., 2000; Kelly & Word, 2000). Especies que en un principio fueron asignadas al género *Thiobacillus*, actualmente se asignaron a un nuevo o diferente género, por ejemplo *Thiobacillus novellus* ahora *Starkeya novella* (Kelly et al., 2000).



**Fig. 14** Descenso de pH por los diferentes aislados en MSL **A)** *Halothiobacillus* sp. UAM-I, **B)** IMP, **C)** BMP-1<sup>T</sup> y **D)** AR3.

De acuerdo con lo anterior, se comprueba que los tres aislados son capaces de obtener energía para crecer a partir de la oxidación del tiosulfato y fijar bióxido de carbono del bicarbonato de sodio, mediante el ciclo de Benson-Calvin-Bassham. Por lo tanto, fueron capaces de crecer quimiolitautotróficamente soportando valores de pH bajos (2-4), condiciones óptimas para la

actividad de sus enzimas presentes en el periplasma (ver sección 1.5.1). Además, son microorganismos sulfoxidantes aerobios que podrían formar parte de diferentes géneros relacionados o no taxonómicamente. Por tanto, hasta este momento la información no es suficiente para poder clasificarlos, por lo que fue necesario el análisis de ácidos grasos.

#### 4.1.6 Determinación del perfil de ácidos grasos en los aislados

El análisis de ácidos grasos mostró para *Halothiobacillus* sp UAM-I como su principal ácido graso C18:2 (11.87 %), para IMP fue C16:2 (15.04 %), para BMP-1<sup>T</sup> fue C18:2 (17.89 %) y por último AR3 C18:2 (15.70 %). En la **Tabla 8** se muestran sólo los principales ácidos grasos obtenidos de cada aislado.

**Tabla 8 Principales ácidos grasos de los diferentes aislados**

Aislados	%							
	C18:0	C18:2	C16:0	C16:1	C16:2	C15:2	C14:0	C10:0
<i>Halothiobacillus</i> sp UAM-I	1.13	<b>11.87</b>	5.65	5.16	ND	2.16	0.58	3.96
<b>IMP</b>	2.45	6.81	6.94	4.12	<b>15.04</b>	2.14	1.21	3.50
<b>BMP-1<sup>T</sup></b>	2.50	<b>17.89</b>	6.46	4.91	ND	2.07	1.88	4.36
<b>AR3</b>	1.64	<b>15.70</b>	9.92	6.70	ND	3.56	1.80	3.65

ND = no determinado

Basándonos en estos resultados, nosotros podemos relacionar a los aislados BMP-1<sup>T</sup>, AR3 con la cepa de referencia sugiriendo su posible incorporación con el género *Halothiobacillus* sp., ya que ambos coinciden con el ácido graso (C18:2) así como, la predominancia de ácidos grasos insaturados conteniendo 16 y 18 átomos de carbono, el ácido palmitico saturado C10:0. Sin embargo, el ácido hidroxidecanoico (h10) inherente en todas las especies conocidas de *Thiobacillus*, no esta presente. Por otro lado, el aislado IMP probablemente corresponda a otro género, contrario a lo sugerido por los resultados descritos previamente.

De acuerdo, con lo hasta ahora expuesto los tres aislados presentan características similares tanto morfológica como fisiológica entre ellos y con el género *Halothiobacillus*. Sin embargo, el aislado BMP-1<sup>T</sup> fue capaz de formar esporas y fue catalasa positiva, características que lo separan del resto. Puesto que los análisis anteriores no son concluyentes para poder diferenciar

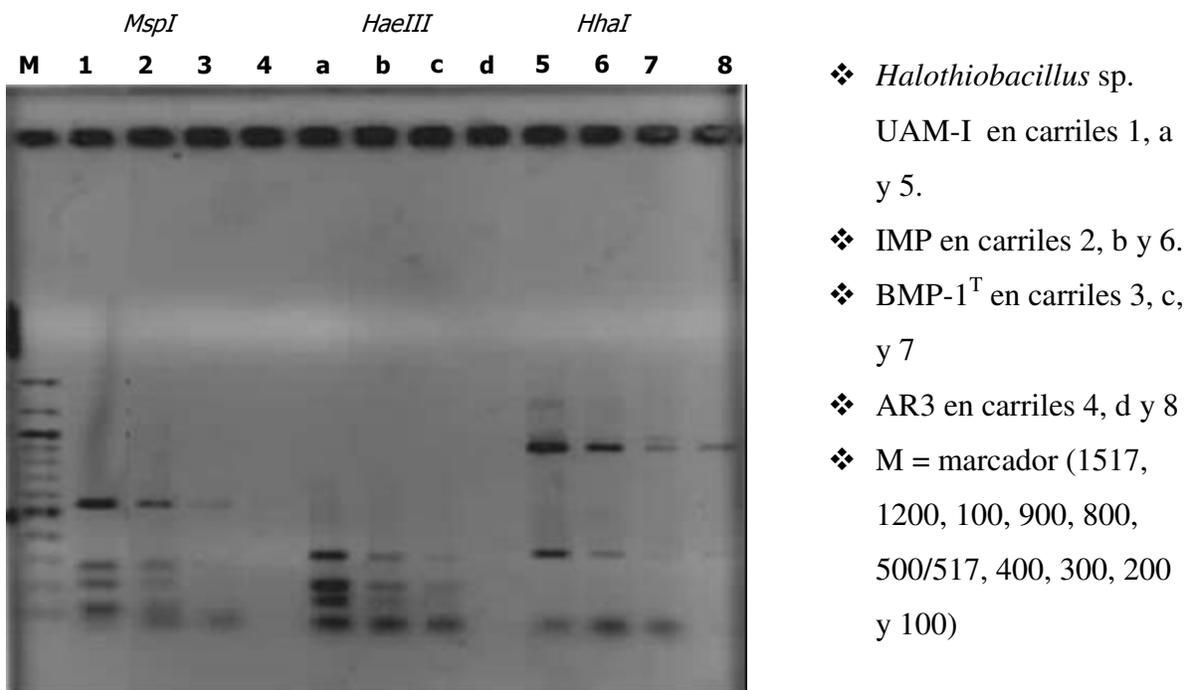
entre dichas cepas se recurrió a herramientas moleculares, para así conjuntar más información que nos permita diferenciarlas y establecer relaciones filogenéticas.

#### 4.2 Caracterización de aislados por métodos moleculares

Para la caracterización molecular de los aislados IMP, BMP-1<sup>T</sup>, y AR3 fue necesaria la extracción del DNA genómico. Posteriormente, se procedió a la amplificación del gen del rRNA 16S ya que dicho gen presenta regiones muy conservadas que permite establecer relaciones filogenéticas entre los diferentes aislados (**Figura 9** ver sección 1.9.3).

##### 4.2.1 Tipificación de los aislados por PCR-REA del gen del rRNA 16S

Para la tipificación de las cepas se realizó la amplificación del gen rRNA 16S de cada una de los aislados y los productos fueron sometidos a la restricción enzimática, mediante enzimas *MspI*, *HaeIII* y *HhaI* encontrándose un patrón de bandas para cada aislado y que se muestra en la **Figura 15**



**Fig. 15** Tipificación de los aislados por PCR-REA del gen rRNA 16S

La cepa de referencia *Halothiobacillus* sp. UAM-1 y los aislados IMP1 y BMP-1<sup>T</sup> presentan un patrón de bandas muy semejantes, por lo que pertenecen al grupo de restricción 1. Mientras tanto, para la cepa AR3 no se definió grupo debido a que no se observaron bandas con las enzimas *MspI*, y *HaeIII* posiblemente, por una baja concentración de productos de PCR en la

mezcla de reacción. Sin embargo, un patrón de dos bandas se observó con la enzima *HhaI*. Puesto que el perfil genómico de restricción es muy semejante no fue posible diferenciarlos. Dados tales resultados se decidió realizar la tipificación por RAPD, en donde se empleó el DNA genómico de cada uno de los aislados para una mayor sensibilidad.

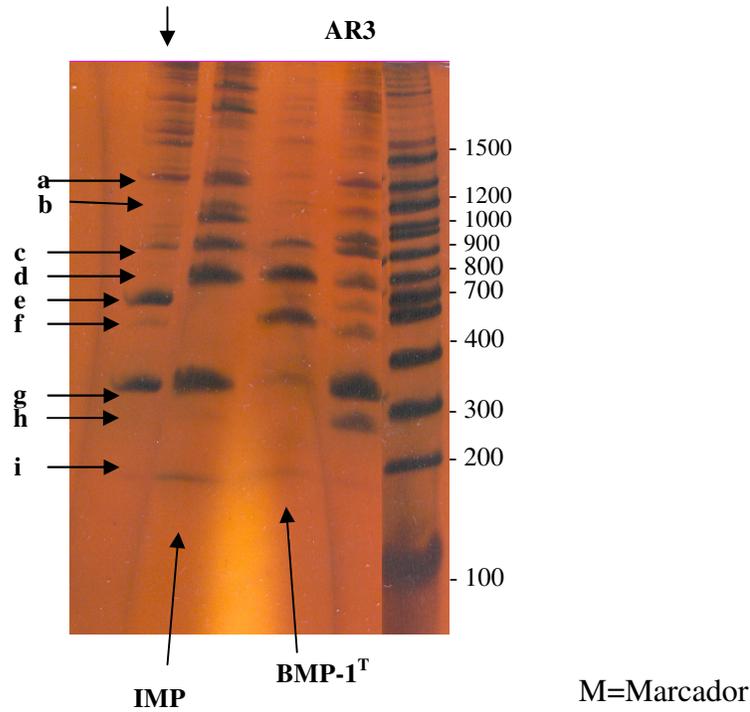
#### **4.2.2 Tipificación por PCR-RAPD**

Dicha técnica se basa en el uso de iniciadores cortos (alrededor de 10 pb), que se unen en sitios inespecíficos en todo el genoma, permitiendo la amplificación de fragmentos polimórficos de DNA de diferentes tamaños, que posteriormente son resueltos en geles de acrilamida, obteniéndose patrones característicos para cada aislado (**Ranjard *et al.*, 2000**). La huella genómica obtenida de la técnica de RAPD permite identificar diferencias pequeñas entre genomas complejos similares así como también mutaciones, las cuales se desarrollaron durante el tiempo de vida del microorganismos. Dichas diferencias se ven reflejadas, en diferentes patrones de bandas (**Kwong-Kwok *et al.*, 1996; Mark & Crawford *et al.*, 2000**).

Para aplicar esta técnica fue necesario encontrar las condiciones óptimas de temperatura de alineación y los parámetros para la reacción de PCR (ver sección 3.4). Cabe señalar que se probaron varias temperaturas de alineación (35-39 °C), siendo la temperatura optima 38 °C, ya que a dichas condiciones se obtuvo un mayor número de bandas al ser resueltas, en un gel con 30 % acrilamida. Este método fue usado con la finalidad de distinguir los aislados a través de diferencias genómicas, lo cual se tradujo en patrones de bandas específicos para cada aislado, como se muestra en la **Figura 16 y Tabla 9**.

En la **Tabla 9** se muestran nueve fragmentos amplificados (a, b, c, d, e, f, g, h, i) fueron obtenidos con el iniciador PFJ 5'-ACG CGC CCT-3' para las cuatro cepas. Algunos fragmentos (b, e, f, h, i) amplificaron para uno o dos aislados, pero los demás amplificaron en tres o cuatro aislados. La banda c aparece en todos los aislados. De acuerdo, con los datos la huella genómica nos indica que los cuatro aislados son diferentes entre si.

*Halothiobacillus* sp UAM-I



**Fig. 16** Perfiles genómicos obtenidos por PCR-RAPD para cada aislado en gel de acrilamida al 30 %.

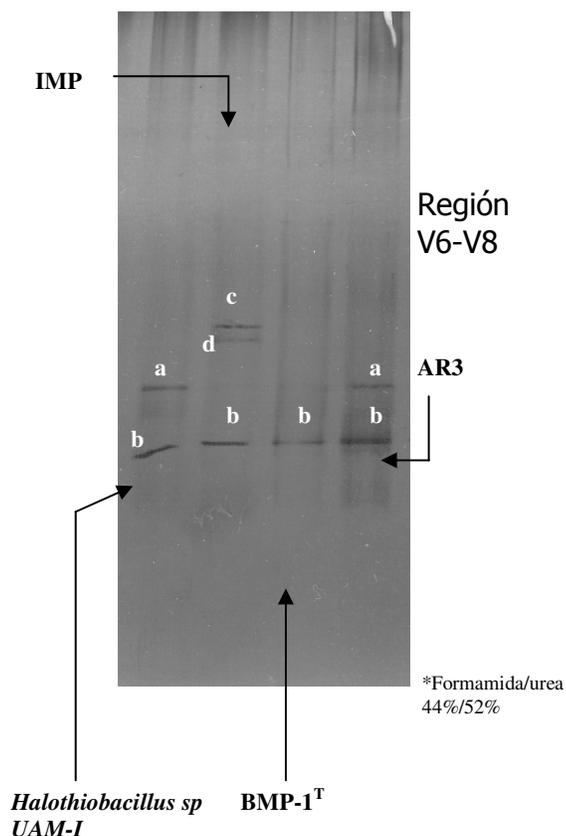
**Tabla 9** Segmentos amplificados de los aislados mediante PCR-RAPD

Aislados	Segmentos amplificados									Huella genómica
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	
<i>Halothiobacillus</i> sp. UAM-I	+	-	+	-	+	-	+	-	-	<b>A</b>
IMP	+	+	+	+	-	-	+	-	+	<b>B</b>
BMP-1 <sup>T</sup>	-	-	+	+	-	+	-	-	+	<b>C</b>
AR3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<b>D</b>

### 4.2.3 Tipificación por DGGE

Esta técnica se basa en separar fragmentos de igual longitud pero con secuencias diferentes sobre geles de poliacrilamida en presencia de un gradiente desnaturizante como urea y formamida (ver sección 3.4). Este método fue utilizado para tipificar las cepas aisladas a través del análisis de fragmentos (alrededor de 524 pb) correspondientes a la región V6 a V8 del gen del rRNA 16S. En la **Figura 17** se muestra que la cepa de referencia *Halothiobacillus* sp UAM-1, IMP y AR3 presentaron perfiles genómicos con más de una banda. El perfil genómico de la cepa de referencia y el aislado AR3 es igual (bandas a y b), mientras que para IMP y BMP-1<sup>T</sup> fue diferente. La detección de varias bandas por DGGE para una sola especie no necesariamente significa que se encuentren contaminadas. Actualmente, es muy conocido que algunas bacterias contienen copias heterogéneas de operones rDNA, lo cual es considerado como un factor limitante de la técnica (**Becker et al., 2000, Kisand & Wikner, 2003**). Particularmente, el aislado IMP presenta un patrón de tres bandas (c, d y b) donde dos de ellas migran muy juntas (c y d), observaciones que también fueron descritas por **Rosado et al. (1998)** quienes observaron en varias especies, patrones de dos bandas que migraban muy juntas en el DGGE lo cual indicaba que había moléculas de DNA con ligeras diferencias en su comportamiento en el momento de la desnaturalización, posiblemente causado por una incompleta extensión del mismo templado debido a las pinzas GC (**Nübel et al., 1996, Janse et al., 2004**). Por otro lado, BMP-1<sup>T</sup> presentó una sola banda (b), la cual también estuvo presente en los demás aislados migrando a la misma posición, esto puede indicar que los cuatro microorganismos poseen copias similares del gen del rRNA 16s (**Rosado et al., 1998**). Finalmente, la cepa de referencia y el aislados AR3 muestran semejanzas, mientras que BMP-1<sup>T</sup> e IMP presentan patrones de bandas diferentes en el DGGE.

Con base en los resultados obtenidos podemos indicar que el aislado BMP-1<sup>T</sup> presentó características fenotípicas y genotípicas que lo diferencian de los demás, pero para poder lograr la identificación de todos los aislados fue necesaria la secuenciación del gen del rRNA 16S.



**Fig. 17** Tipificación de aislados por DGGE

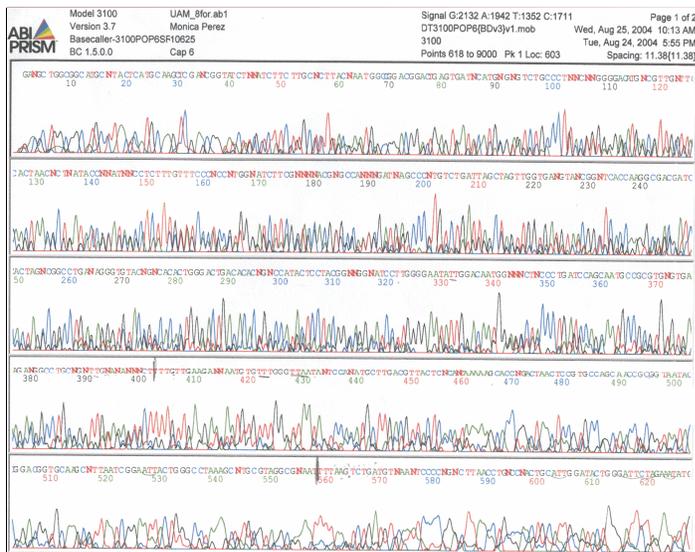
#### 4.2.4 Secuenciación del gen rRNA del 16S de los aislados

Los productos de reacción PCR del gen rRNA 16S de los aislados fueron purificados para luego ser secuenciados. Posteriormente, las secuencias fueron analizadas usando el programa Chromas v. 3.1.1 y fueron alineadas manualmente. Finalmente, las secuencias fueron comparadas con la base de datos del GeneBank obteniéndose los siguientes resultados para los diferentes aislados **Tabla 10**.

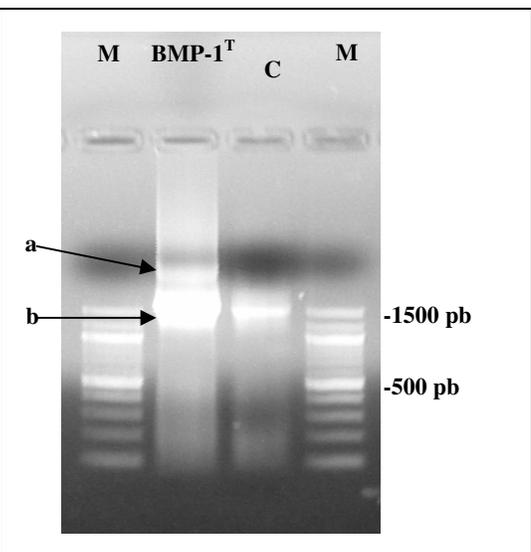
**Tabla 10 Análisis de secuencias de los aislados**

<b>Aislados</b>	<b>Comparación de secuencias con GenBank</b>
<i>Halothiobacillus</i> sp. UAM-I	<i>Halothiobacillus</i> sp. UAM-I rRNA 16S gene secuencia parcial (Revah & Ortiz, 2004)
<b>IMP</b>	<i>Halothiobacillus neapolitanus</i> DSM 581 (antes <i>Thiobacillus neapolitanus</i> DSM 581) gen rRNA 16S, secuencia parcial Longitud=1456 pb Identificación=1202/1214 ( <b>98 %</b> )
<b>BMP-1<sup>T</sup></b>	<i>Acinetobacter</i> sp. ANT9054 gen rRNA 16S, secuencia parcial Longitud=1486 pb Identificación=954/996 ( <b>95 %</b> )
<b>AR3</b>	<i>Halothiobacillus neapolitanus</i> DSM 581 (antes <i>Thiobacillus neapolitanus</i> DSM 581) gen rRNA 16S, secuencia parcial Longitud= 1456 pb Identificación=1205/1211 ( <b>99 %</b> )

Conjuntando los resultados anteriores así como las evidencias tanto morfológicas, fisiológicas y secuenciación del gen del rRNA 16S de los aislados IMP y AR3 se concluyó que ambos microorganismos quedan identificados como *Halothiobacillus neapolitanus* con un 98 % y 99% de similitud respectivamente. Sin embargo, el aislado BMP-1<sup>T</sup> mostró evidencias que lo separan de los otros tres microorganismos como fueron: la presencia de esporas, actividad con catalasa, los patrones de bandas por RAPD y DGGE fueron diferentes y la secuenciación del gen del rRNA 16S indicó tener un 95 % de similitud con *Acinetobacter* sp. ANT905, este resultado despertó dudas dado a que la secuencia obtenida presentaban señales encimadas en el electroferograma (**Figura 18**), causadas por subproductos indeseables durante la reacción de amplificación de PCR que no se lograron eliminar en el proceso de purificación y que mediante un gel de agarosa se manifestaron como dos bandas, siendo (a) una banda mayor a 1500 pb y (b) menor de 1500 pb (**Figura 19**).

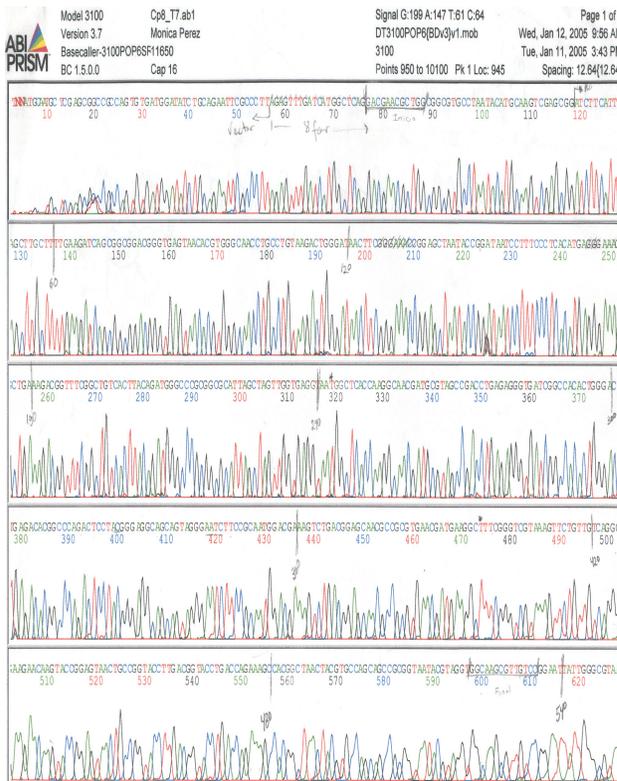


**Fig. 18** Electroferograma de la secuenciación del gen del rRNA 16S del aislado BMP-1<sup>T</sup> mostrando interferencias.



**Fig. 19** Las bandas a y b indican la presencia de subproductos no deseados provenientes de la reacción de PCR. M= Marcador C= control

Entonces para eliminar dichas interferencias y conseguir señales más limpias fue necesario realizar la clonación de los producto de PCR del gen del rRNA 16S de la cepa BMP-1<sup>T</sup> dentro del vector TOPO-TA pCR 2.1 y se emplearon como células competentes *Escherichia coli* TOP10F'. Los plásmidos fueron secuenciados para ambas cadenas de DNA usando iniciadores universales e internos y mediante el programa Chromas v. 3.1.1 una secuencia consensuada fue obtenida para el género *Bacillus*. En la **Figura 20** se muestra el electroferograma de la secuencia del gen del rRNA 16S del aislado BMP-1<sup>T</sup> conteniendo señales muy claras y bien definidas. En la **Figura 21** se muestra la secuencia alineada que fue depositada en la base de datos GenBank. Este último resultado, explica el porque el aislado BMP-1<sup>T</sup> presentó formación de esporas y fue catalasa positivo, ya que tales características son distintivas del género *Bacillus* (Slepecky & Hemphill, 1992).



**Fig. 20** Electroferograma de la secuencia del rRNA 16S del aislado BMP-1<sup>T</sup>

GACGAACGCTGGCGGCGTCCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGATCTTCATTAGCTGCTTTT  
 GAAGATCAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAC  
 TTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATCCTTTCCCTCACATGAGGAAAGCTGAAAGA  
 CGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGGCCCCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGCC  
 TCACCAAGGCAACGATCGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC  
 ACGGCCAGACTCTACCGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA  
 CGGAGCAACCCCGGTGAACGATGAAGGCTTTCCGGTCTGAAAGTTCTGTGTGACGGGAAG  
 AACAAGTACCGGAGTAAGTCCCGTACTTACCGTACCTGACCGTACCCAGAAAGCCACGGCTAAC  
 TACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTGTCCGGAATATTGGGCGTAA  
 AGCGCGCAGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTAACCGGGGAGGGTC  
 ATTGGAACCTGGGAACCTTGTAGTGAGAGAGGAGAGCGGAATCCACGTGTAGCGGTGAA  
 ATGCGTAGAGATGTGAGGAAACACCAGIGCGGAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCT  
 GAGGCGGAAAGCGTGGGAGGCAACAGGATTAGATACCTGGTATGCCACGCGTAAACG  
 ATGAGTCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTAGTGTGACGAAACCGATTAAAGCACTC  
 CGCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGC  
 GGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGAAGAACCTTACCAGTCTTGACATCTCT  
 GACAACCTAGAGATAGGCGTTCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTG  
 TCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCTTGATCTTA  
 GTTGCCAGCATTCAGTTGGGACTCTAAGGTGACTGCCGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG  
 GGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGA  
 ACAAGGGCAGCGAAGCCGAGGTGAAGCCAATCCATAAATCCATTCTCAGTTCCGATT  
 GCAGGCTGCAACTCGCTGCATGAAGCCGGAATCGTAGTAAATCCGGATCAGATGCCCG  
 GGTGAATACGTTCCCGGCTGTACACACCGCCCTCACACCAGAGATTTGTAACACCC  
 GAAGTCGGTGGGTAACCTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGACAGATGATTGGGGTG

**Fig. 21** Secuencia del gen del rRNA 16S del aislado BMP-1<sup>T</sup> depositada en GeneBank con el número de acceso **DQ371431**

### 4.3 Caracterización del aislado BMP-1<sup>T</sup>

#### 4.3.1 Posición filogenética del aislado BMP-1<sup>T</sup>

La comparación de las secuencias de los rRNA 16S (o de los genes que lo codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariontes. Este hecho ha proporcionado una enorme precisión a la taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias (**Rodicio & Mendoza, 2004**). De acuerdo con esto se procedió a ubicar la posición filogenética del aislado BMP-1<sup>T</sup>, para lo cual se comparó su secuencia del gen del rRNA 16S con las secuencias de miembros del mismo grupo filogenético.

Un maximum likelihood (ML) árbol (máxima probabilidad) de algunas especies del género *Bacillus* mostró un  $-\ln 7369.903$ . Este ML árbol colocó a BMP-1<sup>T</sup> en un clado con algunas especies del género *Bacillus*, con un valor 62% de bootstrap, como el grupo más ancestral del

clado que contiene a las especies *Bacillus jeotgali*, *Bacillus boroniphilus*, *Bacillus* sp. MB5 y *Bacillus* sp. Pec11 (**Figura 22**). Por lo que la cepa BMP-1<sup>T</sup> pertenece al género *Bacillus*, compartiendo un 99.5 % de similitud en la secuencias con *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> *Bacillus boroniphilus* DSM 17376<sup>T</sup> y 97 % con *Bacillus firmus* DSM 12<sup>T</sup>. Además mostró 98 % de similitud con *Bacillus* sp. MB5 y 99.8 % con *Bacillus* sp. Pec11, especies aun no descritas. El alto porcentaje de similitud del gen del rRNA 16S entre ambas cepas sugiere que todas ellas podrían pertenecer a la misma especie. Sin embargo, una alta similitud puede ser esperada en *Bacillus* ya que la velocidad de evolución del gene del rRNA 16S es excepcionalmente lenta (**Palys et al., 2000**). Además, se han descrito cepas y especies con muy altos porcentajes de similitud pero que difieren marcadamente en sus valores de hibridación DNA-DNA, su morfología y características bioquímicas, pruebas usadas con frecuencia para separar una especie de otra (**Martínez-Murcia et al., 1992; Jaspers & Overmann, 2004**). Por ello, en taxonomía, actualmente se recomienda la identificación polifásica, que utiliza criterios fenotípicos, genómicas y filogenéticas (**Stackebrandt et al., 2002**). Por lo tanto, debido a que BMP-1<sup>T</sup> mostró un alto porcentaje de similitud con *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup>, especie ya descrita, se decidió a la realización de diferentes pruebas que puedan diferenciar una especie de otra.

#### **4.3.2 Características fisiológicas del aislado BMP-1<sup>T</sup> vs *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup>**

Dado a que la principal propiedad de BMP-1<sup>T</sup> fue su habilidad para crecer quimiolitóautótróficamente sobre tiosulfato y dicha propiedad no se ha sido reportado para *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup>. Se procedió a crecer ambos microorganismos en medio MSL durante 6 días. En la **Figura 23** se observa que creció BMP-1<sup>T</sup> quimiolitóautótróficamente en presencia de tiosulfato de 0 a 3 días, con un incremento en proteína celular de 143 mg l<sup>-1</sup>, un decremento en pH 7.7 a 3 y depósitos de azufre elemental aparecieron en el medio. Mientras tanto, *B. jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> no presentó crecimiento 0 a 4 días, su proteína celular fue de 54 mg l<sup>-1</sup> y el pH se mantuvo sin cambio ya que el tiosulfato no fue oxidado a sulfato, y el azufre elemental no fue observado. Con estos resultados se demuestra que *B. jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> no puede utilizar el tiosulfato como fuente de energía y electrones para crecer, mientras que para BMP-1<sup>T</sup> se confirma su habilidad para crecer quimiolitóautótróficamente sobre tiosulfato, lo

cual es un fenómeno inusual en el género *Bacillus*. Actualmente, se conoce a *Bacillus schlegelii* como la primera evidencia de bacteria termofílica formadora de esporas capaz de crecimiento autotrófico en presencia de tiosulfato y crecimiento heterotrófico en la presencia de hidrógeno y dióxido de carbono (**Hudson *et al.*, 1988, Arango, 1992 y Beffa *et al.*, 1993, 1996**).

## **Árbol filogenético 22**

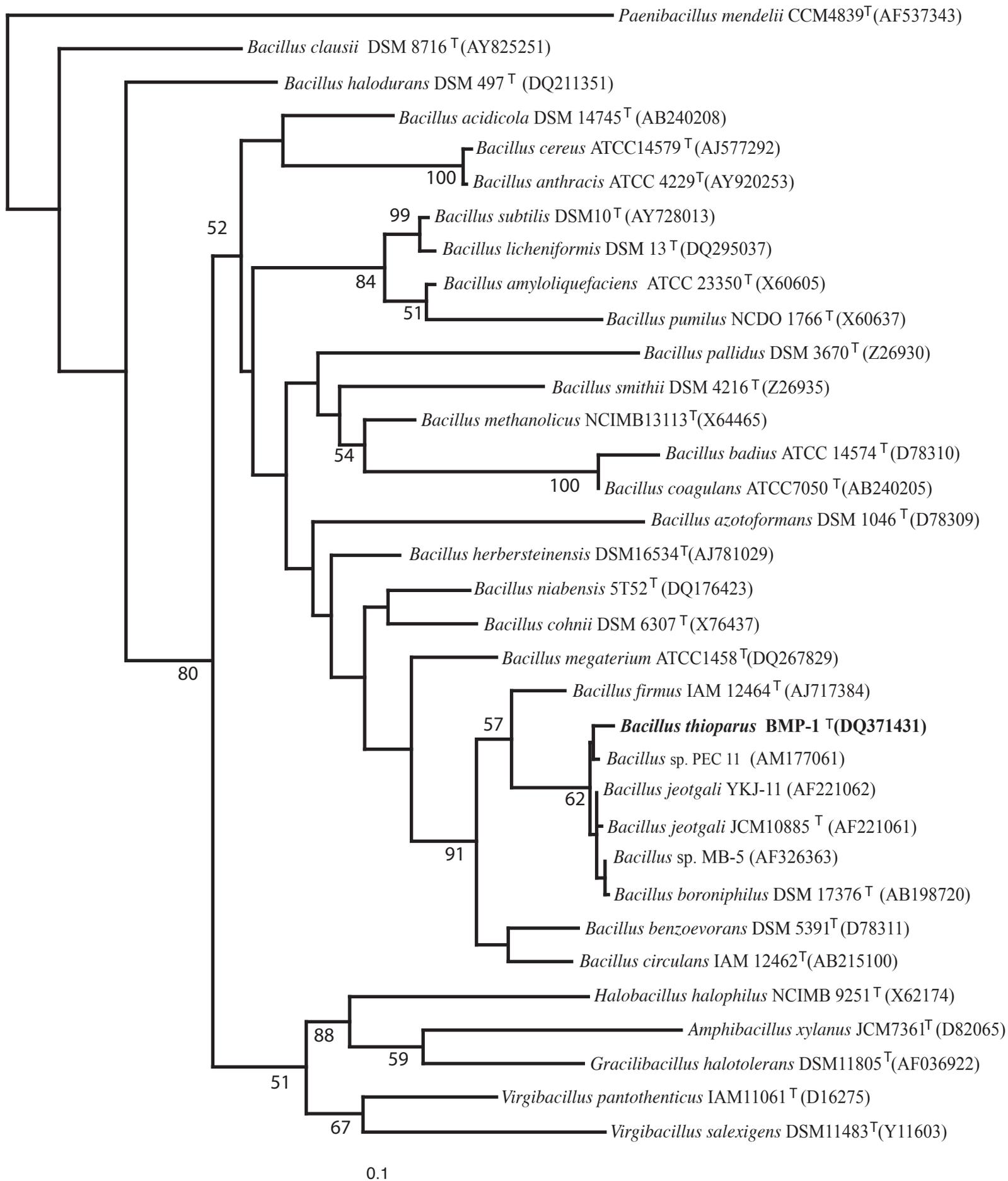
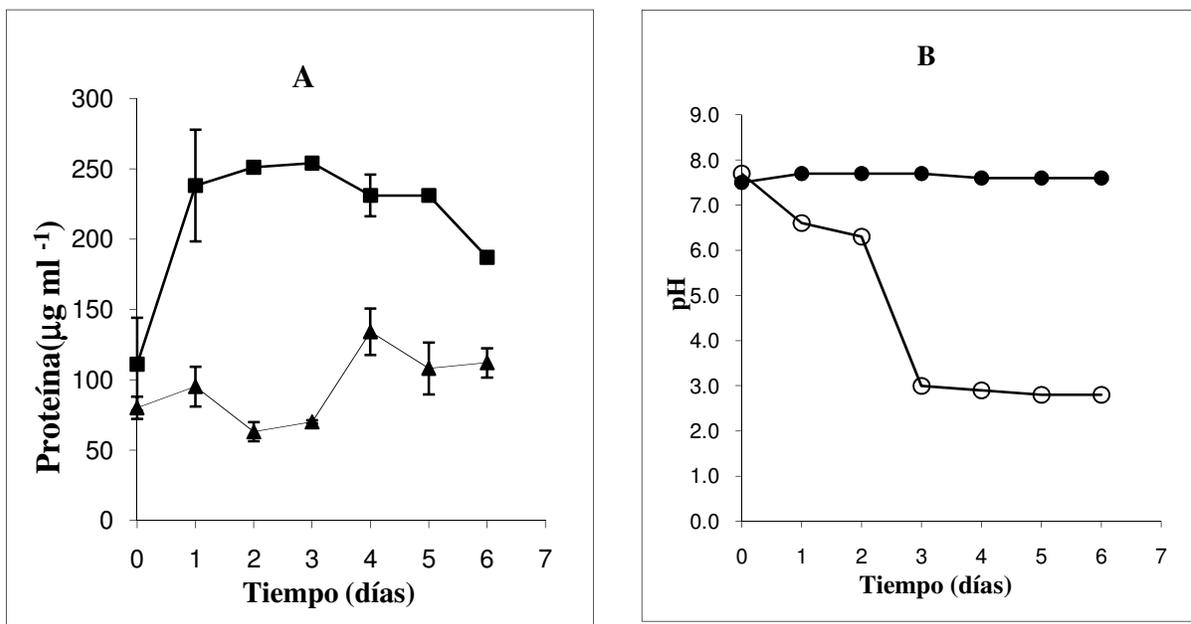


Fig. 22 "Maximum-likelihood" inferida a través de las secuencias del gen 16S rRNA de las diferentes especies. El número de acceso al GeneBank está entre paréntesis.



**Fig. 23** A) Comparación de crecimiento quimiolitotrófico en tiosulfato entre las especies BMP-1<sup>T</sup> (■) y *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> en MSL (▲) B) Cambios de pH por BMP-1<sup>T</sup> (○) y *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> (●).

#### 4.3.3 Características fenotípicas del aislado BMP-1<sup>T</sup> vs *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> y otras especies de *Bacillus*

Por otro lado BMP-1<sup>T</sup> creció en medio TSA formando colonias circulares, con márgenes lisos, color beige, con un diámetro de 0.8-1 mm. El aislado BMP-1<sup>T</sup> creció en presencia de 5 % (p/v) de NaCl pero no en presencia de 10 % y 15 % (p/v) de NaCl. Se observó crecimiento a 30 °C, 35 °C y 45 °C pero no a 10 °C. La temperatura óptima de crecimiento en TSB fue de 30-35 °C a pH 7.0. En las tiras API 20E y API 20NE, BMP-1<sup>T</sup> fue positiva para catalasa, reducción de nitratos, hidrólisis de esculina y ligeramente positivo a gelatina, asimilación de glucosa, n-acetil-glucosamina, maltosa, gluconato, ácido adípico, malato y citrato pero negativo para la reacción de oxidasa, lisina descarboxilasa, arginina dihidrolasa, ureasa, para-nitrofenil-βD-galactopiranosidasa, ornitina descarboxilasa, orto-nitro-fenil-βD-galactopiranosido, fermentación de glucosa, sulfuro de hidrógeno, triptofano deaminasa, producción de indol, acetoina, fermentación de manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacrosa, melibiosa, amigdalina, y arabinosa, asimilación de manosa, ácido caprónico y fenil-acetato. En la **Tabla 11** se muestra la comparación de algunas características fenotípicas de BMP-1<sup>T</sup> con *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> y otras especies de *Bacillus*.

**Tabla 11 Principales características que diferencian al aislado BMP-1<sup>T</sup> de otras especies pertenecientes al género *Bacillus***

Características	1	2	3	4	5	6	7
Temperatura de crecimiento (°C)							
Máximo	45	45	30	45	45	50	50
Óptimo	30-35	30-35	27-30	30	40	40	44
Crecimiento en NaCl							
5 %	+	+	+	+	+	+	+
10 %	-	+	-	+	-	-	+
pH óptimo	7.0	7.0-8.0	7.5-8.5	7.0	9.0	7.0	5.7-7.5
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	+	-	+	-	-
Reducción de nitratos	+	+	-	+	+	-	-
Hidrólisis de:							
Esculina	+	+	+	-	-	+	+
Gelatina	W	+	-	V	+	+	-
Actividad de arginina dihidrolasa	-	ND	-	-	-	-	-
Actividad de ureasa	-	+	-	-	-	+	-
Asimilación de:							
Glucosa	+	+	+	+	-	+	+
Arabinosa	-	-	ND	ND	ND	ND	+
Mannitol	-	-	ND	+	-	+	+
N-acetil-glucosamina	+	-	+	ND	-	+	ND
Maltosa	+	+	+	+	-	+	ND
Gluconato	+	-	+	ND	+	-	ND
Citrato	+	ND	ND	-	-	+	+
Sacrosa	-	+	ND	ND	-	-	+
DNA G+C contenido (mol%)	43.8	41	42.2	41.4	35	45	42

Especies: 1, especie BMP-1<sup>T</sup>; 2, *B. Jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> (Yoon *et al*, 2001), 3, *B. Boroniphilus* DMS 17376<sup>T</sup> (Ahmed *et al*, 2007) 4, *B. Firmus* DSM 12<sup>T</sup> (Suresh *et al.*, 2004; Abdelkafi *et al*, 2005) 5, *B. Cohnii* DSM 6307<sup>T</sup> (Täubel *et al.*, 2003; Suresh *et al.*, 2004) 6, *B. Megaterium* MTCC 1684 (Täubel *et al.*, 2003; Suresh *et al.*, 2004) 7, *B pumilus* ATCC 7061<sup>T</sup> ( Ivanova *et al.*, 1999; Suresh *et al.*, 2004).

+, positivo; -, negativo; W, ligeramente positivo; V, variable; ND, no determinado

Como puede observarse, BMP-1<sup>T</sup> muestra características fenotípicas similares a *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup>. Ambas especies fueron Gram-variables, móviles, bacilos y bacterias formadoras de esporas. Por otro lado como ya se mencionó BMP-1<sup>T</sup> creció bien en TSA mientras *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> creció pobremente. Cuando creció en TSA + ASW, BMP-1<sup>T</sup> género colonias beige con márgenes lisos, mientras que *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> formó colonias amarillas-crema y las colonias de *Bacillus jeotgali* YKJ-11 fueron amarillo-naranja, de acuerdo con **Yoon et al. (2001)**.

#### **4.3.4 Características quimiotaxónomicas**

BMP-1<sup>T</sup> y *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> presentaron ácido m-diaminopímélico en el peptidoglucano de su pared celular. Sin embargo, el perfil de ácidos grasos de BMP-1<sup>T</sup> fue muy diferente, siendo su principal ácido graso C<sub>15:0</sub> (77.3 %), mientras para *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> fue iso-C<sub>15:0</sub> (49.3%) (**Tabla 12**).

Por otro lado, BMP-1<sup>T</sup> resultó similar también con *Bacillus boroniphilus* DSM 17376<sup>T</sup>. Sin embargo, el perfil de ácidos grasos de *Bacillus boroniphilus* DSM 17376<sup>T</sup> fue muy diferente, siendo sus principales ácidos el iso-C<sub>15:0</sub> (44.8 %) y ai-C<sub>15:0</sub> (12.5 %) (**Tabla 12**).

#### **4.3.5 Características genotípicas**

En cuanto, al contenido de DNA G+C de la especie BMP-1<sup>T</sup> presentó 43.8 mol %, mientras para *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> fue de 41 mol % (**Tabla 11**), de acuerdo con los valores que se han reportado para el género *Bacillus* (32-69 mol%).

En cuanto, al contenido de DNA G+C para *B. boroniphilus* DSM 17376<sup>T</sup> fue de 42.2 mol% (**Tabla 11**). Además, **Ahmed et al., (2007)** describieron a *Bacillus boroniphilus* DSM 17376<sup>T</sup> como una especie que requiere de boro para poder crecer así como su tolerancia altas concentraciones del mismo. Mientras que BMP-1<sup>T</sup> puede crecer sin boro. Entonces, de acuerdo con lo señalado ambas especies resultaron ser diferentes.

**Tabla 12 Perfil de ácidos grasos de las especies BMP-1<sup>T</sup>, *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> y *Bacillus boroniphilus* DSM 17376<sup>T</sup>**

Composición de ácidos grasos (%)													
Especies	i-C <sub>14:0</sub>	C <sub>14:0</sub>	i-C <sub>15:0</sub>	ai-C <sub>15:0</sub>	C <sub>15:0</sub>	i-C <sub>16:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>16:1</sub> alcohol	C <sub>16:1</sub> 11c	i-C <sub>17:0</sub>	ai-C <sub>17:0</sub>	i-C <sub>17:1</sub> 10c	Características 4*
<i>Bacillus jeotgali</i> CCM 7133 <sup>T</sup> <sup>A</sup>	1.9	1.3	49.3	8.8	-	2.3	3.2	4.5	5.0	4.1	3.7	7.5	6.6
<i>Bacillus boroniphilus</i> DSM 17376 <sup>T</sup> <sup>B</sup>	0.7	0.64	44.8	12.5	-	1.6	1.5	1.5	3.9	5.0	9.3	6.9	6.8
<b>BMP-1<sup>T</sup></b>	<b>C<sub>10:0</sub></b> 0.04	<b>C<sub>11:0</sub></b> 0.19	<b>C<sub>13:0</sub></b> 0.41	<b>C<sub>14:0</sub></b> 2.63	<b>C<sub>15:0</sub></b> <b>77.30</b>	<b>C<sub>15:1</sub></b> 5.26	<b>C<sub>16:1</sub></b> <b>9.08</b>	<b>C<sub>17:0</sub></b> 5.09					

\*Características representa grupos de dos o tres ácidos grasos los cuales no pueden ser separados por GLC con el sistema MIDI. Características 4 contiene uno o más de los siguientes ácidos grasos: iso-C<sub>17:1</sub> I y/o anteiso-C<sub>17:1</sub> B. isómero cis

<sup>A</sup> Datos obtenidos de Yoon *et al.*, 2001

<sup>B</sup> Datos obtenidos de Ahmed *et al.*, 2007

#### 4.3.6 Hibridación DNA-DNA

Los valores de hibridación entre BMP-1<sup>T</sup> y *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> fue 44 %, y 45 % para la hibridación de reversa. Estos porcentajes bajos de hibridación claramente demuestran que el aislado BMP-1<sup>T</sup> y *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> representan dos diferentes especies. De acuerdo con el criterio señalado por **Stackebrandt & Goebel, (1994)** quienes indicaron que existen cepas que comparten una similitud inferior al 50% en experimentos de reasociación, y son por tanto clasificadas en especies diferentes, aunque presenten una identidad del 99-100 % a nivel de rRNA 16S. Por tal motivo, como ya se mencionó se recomienda realizar una taxonomía polifásica.

Finalmente, basándonos en las importantes diferencias en el perfil de ácidos grasos, características fenotípicas, así como la incapacidad de *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> para crecer quimiolitotroficamente sobre tiosulfato y los bajo porcentajes de hibridación, sugirió que el aislado BMP-1<sup>T</sup> y *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> representan dos especies diferentes y que la especie BMP-1<sup>T</sup> representa una nueva especie del género *Bacillus*, para lo cual, propusimos el nombre *Bacillus thioparus* (thi.o'par.us.Gk. n. *thios* azufre; L. v. *paro* productor; M.L. adj. *Thioparus* productor de azufre) (**Pérez-Ibarra *et al.*, 2007**). Dicho nombre fue sugerido por el Dr. DP Kelly quien hizo valiosas aportaciones al artículo producto del presente trabajo. Posteriormente, el nombre fue corregido de acuerdo a la regla 61 del

*Bacteriological Code* (1990 Revisión). La etimología es la siguiente: Gr. n. *thion* azufre; L. part. adj. *parans* productor; N.L. part. adj. *thioparans* productor de azufre para ser incorporado a la lista de validación no. **117** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2007) **57**:1933-1934.

#### **4.3.7 Descripción de *Bacillus thioparus* sp. nov.**

***Bacillus thioparus* (thi. ´ opar.us.Gk. n. thios azufre; L. v. paro producir; M.L. adj. thioparus productor de azufre) corrección *Bacillus thioparans* (Gr. n. thion azufre; L. part. adj. parans productor; N.L. part. adj. thioparans productor de azufre).**

En cultivos de 48 h en medio TSB, las células son Gram-variables, aerobias, móviles, bacilos cortos (0.5–0.7 por 1.0–1.7 µm) agrupados en pares, cadenas cortas. En medio Sublette (MLS) el tiosulfato es utilizado como fuente de energía, permitiendo un crecimiento quimiolitotrófico, tinción de Gram de estos cultivos a pH 5.8 mostró la presencia de endosporas en posición central. Durante la incubación, dicho medio llega a presentar turbidez debido al azufre. En medio MSGG forma colonias pequeñas amarillas, circulares con márgenes lisos. Se observó crecimiento en presencia de 5 % (p/v) NaCl, pero no de 10–15% (p/v) de NaCl. La temperatura óptima de crecimiento en medio TSB fue de 30-35 °C a pH 7.0. En las tiras API 20E y API 20NE , BMP-1<sup>T</sup> fue positiva para catalasa, reducción de nitratos, hidrólisis de esculina y ligeramente positivo a gelatina, asimilación de glucosa, n-acetil-glucosamina, maltosa, gluconato, ácido adípico, malato y citrato pero negativo para la reacción de oxidasa, lisina descarboxilasa, arginina dihidrolasa, ureasa, para-nitrofenil-βD-galactopiranosidasa, ornitina decarboxilasa, orto-nitro-fenil-βD-galactopiranosido, fermentación de glucosa, sulfuro de hidrógeno, triptofano deaminasa, producción de indol, acetoina, fermentación de manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melibiosa, amigdalina, y arabinosa, asimilación de manosa, ácido caprónico y fenil-acetato. Sus principales ácidos grasos fueron C15:0 (77.30%) y C16:1 (9.08%). El contenido de G+C en el DNA fue de 43.8 mol% (método Tm). La pared celular contiene m-diaminopimelico en el peptidoglicano. La especie tipo BMP-1<sup>T</sup> fue depositada en dos ceparios reconocidos internacionalmente como BM-B-436<sup>T</sup> y CECT 7196<sup>T</sup>. La secuencia del gen rRNA 16S fue depositada en la base de datos GenBank con el número **DQ371431**. El aislado provino de un consorcio bacteriano, presente en un sistema de cultivo continuo para tratamiento de aguas residuales de la UAM-Iztapalapa.

## 5. CONCLUSIONES

Con base en los anteriores resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que:

En cuanto al aislamiento y caracterización de aislados

- De acuerdo a las características morfológicas y bioquímicas de la cepa BMP-1<sup>T</sup> fue asignada al género *Bacillus*, estos resultados fueron confirmados con el análisis molecular del gen del rRNA 16S.
- El análisis de la secuencia del gen del rRNA 16S de cada uno de los aislados, así como su comparación con la base de datos GeneBank indicó que:  
Las cepas IMP y AR3 corresponden a un mismo microorganismo *Halothiobacillus neapolitanus* DSM 581 (98% y 99% de similitud respectivamente).
- Debido a importantes diferencias en el perfil de ácidos grasos, así como la incapacidad de *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> a crecer quimiolitotroficamente sobre tiosulfato y los bajos porcentajes de hibridación, sugirió que el aislado BMP-1<sup>T</sup> y *Bacillus jeotgali* CCM 7133<sup>T</sup> representan dos especies diferentes.
- La cepa BMP-1<sup>T</sup> representa una nueva especie del género *Bacillus*, para la cual, se denominó *Bacillus thioparus*, nombre que posteriormente fue cambiado por *Bacillus thioparans*.

## 6. IMPORTANCIA DEL PRESENTE TRABAJO

- Debido a que el estudio de los mecanismos de oxidación de compuestos reducidos de azufre por procariontes, aun no han sido aclarados, resulta interesante para la comunidad dedicada al estudio de microorganismos quimiolitotróficos sulfoxidantes, el reporte de una nueva especie del género *Bacillus*.
- El reporte de la nueva especie *Bacillus thioparans* permitirá abrir nuevas líneas de investigación relacionados a la habilidad para crecer quimiolitotroficamente sobre compuestos reducidos de azufre, lo cual es un fenómeno inusual en el género *Bacillus*.
- El presente estudio aporta información sobre un microorganismo seleccionado y adaptado a degradar compuestos reducidos de azufre, el cual puede ser implementado

en los procesos de biofiltración para la eliminación de compuestos volátiles inorgánicos contenidos en corrientes de aire residual.

- El aislamiento y caracterización de *Bacillus thioparans* como bacteria sulfoxidante permitirá el surgimiento de nuevos proyectos encaminados a efficientar procesos para la eliminación de contaminantes, ya que se tienen reportes de mejores resultados con bacterias puras, que con poblaciones mixtas. Así mismo, puede ser aplicada en procesos de desulfurización biológica del petróleo para mejorar su calidad y evitar la emisión de contaminantes.
- Así mismo, *Bacillus thioparans* podría ser aplicada en la industria minera en los procesos lixiviación que permiten la recuperación de metales con la oxidación y la solubilidad de los minerales de calidad inferior.
- *Bacillus thioparans* podría ser empleada en la eliminación de contaminantes presente en las aguas ácidas del drenaje de minas.

*Mientras tanto, la Ofelia terrenal muere en los brazos de Mercedes y todo indicio de su existencia en este mundo fue borrado, con excepción de los pequeños detalles visibles solo para aquellos que saben en dónde mirar.*

*-El laberinto del fauno-*

*Guillermo de Toro*

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelkafi S, Chamkha M, Casalot L, Sayadi S & Labat M (2005) Isolation and characterization of a novel *Bacillus* sp., strain YAS1, capable of transforming tyrosol under hypersaline conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **252**: 79-84.
- Ahmed I, Yokota A & Fujiwara T (2007) A novel highly boron tolerant bacterium, *Bacillus boroniphilus* sp. Nov., isolated from soil, that requires boron for its growth. *Extremophiles* **11**: 217-224.
- Alcántara S (2000) Estudio de la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre utilizando un consorcio de microorganismos sulfoxidantes. Evaluación de los parámetros que determinan la oxidación parcial del tiosulfato en azufre elemental. Tesis doctoral. UAM-Iztapalapa.
- Amann RI & Kúhl M (1998) *In situ* methods for assessment of microorganisms and their activities. *Curr. Opin Microbiol.* **1**: 352-358.
- Amann RI (1995) Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probe in the study of microbial ecology. *Mol. Ecol.* **4**: 543-554.
- Amann RI (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- Aragno M (1992) Aerobic, chemolithoautotrophic, thermophilic bacteria. *Thermophilic Bacteria* (Kristjansson JK, ed), pp.78–103. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Arahal DR, García TM, Ludwig W, Schleifer KH, & Ventosa A (2001) Transfer of *Halomonas canadensis* and *Halomonas israelensis* to the genus *Chromohalobacter* as *Chromohalobacter canadensis* comb. nov. and *Chromohalobacter israelensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1443-1448.
- Arahal DR, Márquez MC, Volcani BE, Schleifer KH & Ventosa A (1999) *Bacillus marismortui* sp. nov., moderately halophilic species from the dead sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **49**:521-530.
- Bading TF & De Jong C (1983) Glass capillary gas chromatography of fatty acid methyl ester a study of condition for the quantitative analysis of short and long-chain fatty acid in lipid. *J. Chromatogr.* **279**: 493-506.
- Barret E. & Clark MA (1987) Tetrathionate reduction and production of hydrogen sulfide from thiosulfate. *Microbiological Reviews* **51**:192-205
- Becker S., Böger P, Oehlmann R & Ernst A. (2000) PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative Taq nuclease assays in analysis of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** :4945–4953.

- Beffa T, Blanc M & Aragno M (1993) Elemental sulfur production during mixotrophic growth on hydrogen and thiosulfate of thermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *Curr Microbiol* **27**:349–353.
- Beffa T, Blanc M & Aragno M (1996) Obligately and facultatively autotrophic, sulfur- and hydrogen-oxidizing thermophilic bacteria isolated from hot composts. *Arch Microbiol* **165**: 34–40.
- Benson, J.H. (1990) *Microbiological Applications A Laboratory Manual in General Microbiology*, 56 pp. WCB Wm. C. Brown Publishers.
- Beristain-Cardoso R, Sierra-Alvarez R, Rowlette P, Razo-Flores E, Gómez J & Field JA (2006) Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying condition. *Biotech. Bioeng.* **95**:1148-1157.
- Bernier L, Hamelin RC & Ouellette GB (1994) Comparison of ribosomal DNA length and restriction site polymorphisms in *Gremmeniella* and *Ascocalyx* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1279-1286.
- Borichewski RM (1967) Keto acids as growth-limiting factors in autotrophic growth of *Thiobacillus thiooxidans*. *Journal of Bacteriology* **93**: 597-599.
- Bozzola JJ & Russell LD (1992) *Electron microscopy: principles and techniques for Biologists*. Jones & Bartlett, Boston.
- Brandt KK & Ingvorse K (1997) *Desulfobacter halotolerans* sp. Nov., a halotolerant acetate-oxidizing sulfate-reducing bacterium isolated from sediments of Great Salt Lake, Utah. *System. Appl. Microbiol.* **20**: 366-373.
- Buisman C, Post R, Ijspeert P, Geraats G & Lettinga G (1989) Biotechnological Process for Sulfide Removal with Sulfur Reclamation. *Acta Biotechnol.* **9**: 255-267.
- Carlson RW, Johnson RE & Anderson MS (1999) Sulfuric acid on Europa and the radiolytic sulfur cycle. *Science* **286**, 97-99.
- Chang R. Química. Editorial McGraw-Hill. 1999. México.
- Cohen Y & Kuenen JG (1976) Growth yields and excretion products of *Thiobacillus neapolitanus* grown in a chemostat. Abstracts of the annual meeting of the American Society of Microbiology.
- Cork D, Garunas R & Sajjad A (1983) *Chlorobium limicola* forma thiosulfatophilum: Biocatalyst in the production of Sulfur and Organic Carbon from a Gas Stream Containing H<sub>2</sub>S and CO<sub>2</sub>. *Appl Environ. Microbiol.* **45**: 913-918.
- Cypionka H, Widdel F, Pfennig N (1985) Survival of sulfate-reducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfate free oxygen sulfide gradients. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**:39-45.

- De Ley J & Tijtgat R (1970) Evaluation of membrane filter method for DNA-DNA hybridization. *Antonie van Leeuwenhoek* **36**: 461-474.
- Deb C, Stackebrandt E, Pradella S, Saha A & Roy P (2004) Phylogenetically diverse new sulfur chemolithotrophs of  $\alpha$ -proteobacteria isolated from Indian soils. *Curr. Microbiol.* **48**:452-458.
- Dul'tseva NM, Tourova TP, Spiridonova EM, Kolganova TV, Osipov GA, & Gorlenko (2006) *Thiobacillus sajanensis* sp. Nov., a new obligately autotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from Khoito-Gol hydrogen-sulfide spring, Buryatia. *Microbiology* **75**:582-592.
- Edwards KJ, Bon PL, Gihring TM & Banfield JF (2000) An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. *Science* **287**: 1796-1799.
- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**, 368-376.
- Felsenstein J (1999) PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.572. University of Washington, Seattle, Washington.
- Friedrich CG, Bardischewsky F, Rother D, Quentmeier A & Fischer J (2005) Prokaryotic sulfur oxidation. *Curr Opin Microbiol* **8**: 253-259.
- Friedrich CG, Rother D, Bardischewsky F, Quentmeier A & Fischer J (2001) Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria emergence of a common mechanism? *Appl Environ. Microbiol.* **67**: 2873-2882.
- Fukui M & Takii S (1990) Survival of sulfated-reducing bacteria in oxic surface sediments of a seawater lake *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**:317-322.
- García-Calderon D, Buffiere P, Moletta R. & Elmaleh S. (1998). Anaerobic digestion of wine distillery wastewater in downflow fluidized bed. *Water Res.* **32**: 3593-3600.
- Ghosh W, Bagchi A, Mandal S, Dam B & Roy P (2005) *Tetrathiobacter kashmirensis* gen. Nov., sp. Nov., a novel mesophilic, neutrophilic, tetrathionate-oxidizing, facultatively chemolithotrophic betaproteobacterium isolated from soil from a temperate orchard in Jammu and Kashmir, India. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:1779-1787.
- Gommers P, Bijlereld W, Zuijderwijk F, Kuenen J (1988) Simultaneous sulfide and acetate oxidation in a denitrifying fluidized bed reactor-I. *Wat. Res.* **22**:1075-1083.
- Hallberg KB & Lindstrom EB (1996) Multiple serotypes of the moderate thermophile *Thiobacillus caldus*, a limitation of immunological assays for biomining microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **62**:4243-4246.

- Hardy JA & Hamilton WA (1981) The oxygen tolerant of sulfate-reducing bacteria isolated from North Sea waters. *Curr. Microbiol.* **6**: 259-262.
- Harrison AP (1984) The acidophilic *Thiobacilli* and other acidophilic bacteria that share their habitat. *Annual Review of Microbiology* **38**:265-292.
- Hicks RE, Amann RI & Stahl DA (1992) Dual staining of natural bacterioplankton with 4',6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level rRNA 16S sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2158-2163.
- Holben WE, Calóbrese GVM, Harris D, Ka JO & Tiedje JM (1993) Trends in Microbial Ecology (Guerrero, R. And. Pedros-Alio, C. Eds) pp. 367-370.
- Hooper A & DiSpirito A (1985) In bacteria which grow on simple reductants, generation of a proton gradient involves extracitoplasmic oxidation of substrate. *Microbiol. Rev.* **49**: 140-157.
- Hudson JA, Daniel RM & Morgan HW (1988) Isolation of a strain of *Bacillus schlegelii* from geothermally heated Antarctic soil. *FEMS Microbiol Lett* **51**: 57-60.
- Ivanova EP, Vysotskii MV, Svetashev VI, Nedashkovskaya OI, Gorshkova NM, Mikhailov VV, Yumoto N, Shigeri Y, Taguchi T, & Yoshikawa S (1999) Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *Internatl. Microbiol.* **2**: 267-271.
- Izquierdo-Rojo M (1999) Ingeniería genética y transferencia génica Ed. Pirámide S.A. Madrid España pp. 24-30.
- Janse I, Bok J & Zwart G (2004) A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbial Methods* **57**:279-281.
- Janssen A (1996) Formation and colloidal behavior of elemental sulfur produced from the biological oxidation of hydrogen sulphide. Phd thesis, Wageningen, The Netherlands.
- Janssen A, Lens P, Lettinga G (1997) Performance of a sulfide-oxidizing expanded-bed reactor supplied with dissolved oxygen. *Biotechnol. Bioeng* **53**:32-40.
- Jaspers E & Overmann J (2004) Ecological significance of microdiversity: identical rRNA 16S gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysiologicals. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4831-4839.
- Johnson JL (1994) Similarity analysis of DNAs. *In Methods for general and molecular bacteriology*, (Gerhardt, RGE; Murray, WA; Wood & Krieg NR, eds), pp.655-681. American Society for Microbiology. Washington, DC.
- Jorgensen BB (1982) Ecology of bacteria of the sulfur cycle with special referent to anoxic-oxic interface environments. *Phil. Tans. R. Soc. Lond.* **298**, 543-561.

- Kämpf C & Pfennig N (1980) Capacity of Chromatiaceae for chemotropic growth. Specific respiration rates of *Thiocystis violacea* and *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* **127**:125-137.
- Katayama Y, Uchino Y, Wood AP & Kelly DP (2006) Confirmation of *Thiomonas delicata* (formerly *Thiobacillus delicatus*) as a distinct species of the genus *Thiomonas* Moreira and Amils 1997 with comments on some species currently assigned to the genus *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:2553-2557.
- Kawasaki L, Alcantara S, Rios M, Razo E, & Revah S (2003) Isolation and characterization of a sulfoxidizing bacterium from a microbial consortium adapted to sulfides. (en prensa).
- Kelly DP & Harrison AP (1989) The genus *Thiobacillus*. In *Bergey's Manual of determinative Bacteriology* (Staley JT, Pfennig N, Bryant MP & Holdt JG Eds) Williams & Wilkins. Baltimore. 3:1842-1858.
- Kelly DP & Kuenen JG (1984) Ecology of the colourless sulphur bacteria. In: *Aspects of microbial metabolism and ecology*. (Codd GA (ed), Academic Press, London. P 211-240.
- Kelly DP & Wood AP (2000) Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. Nov., *Halobacillus* gen. Nov. And *Thermithiobacillus* gen. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:511-516.
- Kelly DP (1982) Biochemistry of the chemolithotrophic oxidation of inorganic sulphur. *Philos. Trans. R Soc London, Ser. B* **298**, 499-528.
- Kelly DP (1985) Physiology of the *Thiobacilli*: elucidating the sulphur oxidation pathway. *Microbiol. Sci.* **2**: 105-109.
- Kelly DP (1988) Oxidation of sulphur compounds. *Soc. Gen. Microbiol. Symp.* **42**: 65-98.
- Kelly DP (1989) Physiology and biochemistry of unicellular sulfur bacteria. *Autotrophic bacteria*. (Schlegel HG & Bowien B, eds), pp. 193-217 Springer, Berlin, Germany.
- Kelly DP, McDonald IR & Wood AP (2000) Proposal for the reclassification of *Thiobacillus novellus* as *Starkeya novella* gen. Nov., comb. Nov., in the  $\alpha$ -subclass of the Proteobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:1797-1802.
- Kelly DP, Shergill KJ, Lu-Ping-Wei & Wood PA (1997) Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**: 195-197.
- Kelly DP, Wood AP & Stackebrandt E (2005) Genus *Thiobacillus* Beijerinck 1904, 597AL, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Brenner, DJ *et al.*, Eds. vol. 2, part C, Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 764-769.
- Kelly, D.P (1990) Energetic of Chemolithotrophs. In: *The bacteria*. (Krulwich, A.T. ed) vol. XII Academic Press, Inc. pp 479-501. USA.

- Kelly, D.P (1999) Thermodynamic aspects of energy conservation by chemolithotrophic sulfur bacteria in relation to the sulfur oxidation pathways. *Arch Microbiol* **171**: 219-229.
- Kerkeler D, Teske A, & Cypionka H. (1998) Strategies of sulfate-reducing bacteria to escape oxygen stress in a cyanobacterial mat. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**: 89-96.
- Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**, 111-120.
- Kisand V & Wikner J. (2003) Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences, *J. Microbiol. Methods* **54**:1183–1191.
- Kjeldsen KU, Joulian C, & Ingvorsen K (2005) Effects of oxygen exposure on respiratory activities of *Desulfovibrio desulfuricans* strain DvO1 isolated from activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecol.* **53**:275-284.
- Klappenbach JA, Saxman PR, Cole JR & Schmidt TM. (2001) rrndb:the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucl. Acids. Res* **29**:181-184.
- Knoblauch C, Sahm K & Jorgensen BB (1999) Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolate from permanently cold Arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. Nov., sp nov., *Desulfofrigus fragila* sp. Nov. *Desulfofaba gelida* sp. Nov. Y *Desulfotalea psychrophila* gen. Nov., sp. Y *Desulfotalea arctica* sp. Nov. *Int. J. System. Bacteriol.* **49**: 1631-1643.
- Koneman EW, Allen SD, Dowell VR & Sommers HM (1985) Diagnóstico microbiológico Texto y atlas color, 184 pp. Médica Panamericana, México.
- Kuenen JG, Robertson LA & Tuovinen OH (1992) The Genera *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, and *Thiosphaera*. *The prokaryotes*. Vol. III (Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, & Schleifer KH, eds.), pp. 2638-2657. 2<sup>a</sup> ed. Springer- Verlag, New York.
- Kuenen, J.G. (1989) Colorless sulfur bacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3 (Williams ST & Wilkins, eds), pp 1834-1837. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- Kwong-Kwok W, Cheng R, Saffer J, Ralph D, Welsh J & McClelland M (1996) DNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR (RAPDs). In *Molecular Microbial Ecology Manual* In: *Molecular Microbial Ecology Manual* (Akkermans D.L. & Elsas van Dirk J. Eds), Seccion 3.4.2. pp 1-14. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Laguerre G, Allard MR, Revioy F & Amarger N (1994) Rapid Identification of *Rhizobia* by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified rRNA 16S Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 56-63.

- Lens PNL & Hulshoff Pol LW (2000)** *Environmental Technologies To Treat Sulfur Pollution*. First edition. Ed: IWA publishing. pp. 49-51 London.
- Lens PNL & Kuenen JG (2001) The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Science and Technology*. **44** 57-66.
- Lesley A, Robertson LA & Kuenen JG (1992) The colorless sulfur bacteria. In: *The Prokaryotes*. 2nd Ed. Springer-Verlag. **I**:16. pp. 385-412.
- Lettinga G (1995) Anaerobic digestion and wastewater treatment systems *Antonie van Leeuwenhoek* **67**: 3-28.
- Lettinga G, van Velsen VFM, Hobma SW, de Zeeuw WJ & Klapwijk A (1980) Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng* **22**:699-734.
- Logan NA & Berkeley CW (1984) Identification of *Bacillus* strains using the API system. *J. Gen. Microbiol.* 130:1871-1882.
- Lowry OH, Rosenberg NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lu WP, Swoboda BEP & Kelly DP (1985) Properties of the thiosulphate-oxidizing multi-enzyme system from *Thiobacillus versutus*. *Biochim. Biophys. Acta* **828**:116-122.
- Madigan MT, Martinko JM & Parker J (2003) Prokaryotic Diversity Bacteria In: *Proteobacterias* tenth edition Pearson education **13**: 453-544.
- Madigan MT, Martinko JM & Parker J (1999). Cap. 13. Diversidad metabólica de los microorganismos y Cap. 16. Diversidad procariótica: Dominio bacteria. *En Brock Biología de los microorganismos*. Editorial Prentice Hall, Inc. Pp 494, 636-637, 661-664.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J (2000) *Microbial Ecology en Brock, Biology of Microorganisms*, Ninth Edition pp 642-719. Prentice Hall, N.J.
- Manion AM (1992) Acidification and Eutrophication. In: *Environmental*. (Mannion, A. M. And Bowley, S.R. and Chichester, J. W. Eds) pp 177-197.
- Marchandin H, Teyssier C, Simeon de Buochberg M, Jean-Pierre H, Carriere C, Jumas-Bilak E (2003) Intra-chromosomal heterogeneity between the four rRNA 16S gene copies in the genus *Veillonella*: implications for phylogeny and taxonomy. *Microbiology* **149**: 1493-1501.
- Mark AR & Crawford LD (2000) Use of Randomly Amplified Polymorphic DNA as a Means of Developing Genus and Strain-Specific Streptomyces DNA Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2555-2564.

- Marmur J & Doty P (1962) Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol Biol* 5, 109-118.
- Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol.* 3: 208-218.
- Márquez-Marcos MC Investigadora titular de la Universidad de Sevilla, Departamento de Microbiología-Parasitología. Facultad de Farmacia C/ Profesor García González, s/n 41012 - Sevilla
- Martínez-Murcia AJ, Benlloch S & Collins MD (1992) Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**:412-421.
- McEldowney S, Hardman D & Waite S (1993) *Pollution: Ecology and Biotreatment*. Logman Sci. & Tech., Sigapure. pp:193-230.
- Meraz M, Monroy O, Noyola A & Ilangovan K (1995). Studies on the Dynamics of Immobilization of Anaerobic Bacteria on a Plastic Support. *Wat. Sci. Tech.* **32**: 243-249.
- Minnikin DE, Iwona G, Hutchinson GM & Caldicott AB (1980) Thin-layer Chromatography of methanolysates of mycolic acid-containing bacteria. *Journal of Chromatography* **188**: 221-233.
- Morticello D. (2000) Boidesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Biotechnol* **11**: 540-546.
- Muyzer G, De Waal EC & Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for rRNA 16S. *Appl Environ Microbiol* **59**:695-700.
- Muyzer G, Hottentrager S, Teske A & Wawer C (1996) Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA- A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*. 3.4.4: 1-23, Kluwer Academic Publisher. Dordrecht. The Netherland.
- Muyzer, G. & Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Leeuwenhoek* **73**: 127-141.
- Neefs JM, van de Peer Y, Hendriks L & Wachter R (1990) Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucl. Acids. Res.* 18:2237-2330.

- Nübel U, Engelen B, Felske A, Snaidr J, Wieshuber A, Amann RI, Ludwig W & Backhaus H (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding rRNA 16Ss in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **178**:5636-5643.
- Nyström T (2003) Nonculturable bacteria: programmed survival forms or cell at death's door? *BioEssays* **25**: 204-211.
- Oerther DB (2000) Monitoring precursor rRNA 16Ss of *Acinetobacter* spp. In: *activated sludge wastewater treatment systems. Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2154-2165.
- Olive DM & Bean P (1999) Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1661-1669.
- Oliver J, Jin M, Li H & Buglass L. (1996) Sulfate-Reducing Bacteria. *Critical Reviews in Environmental science and technology.* **26**:155-187.
- Operator's Manual Capillary Ion Analyzer (CIA). The CIA method for general anions (Method N-601a).
- Orberá-Ratón T (2004) Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Rev. Iberoam Micol* **21**:15-19.
- Owen RJ & Hill LR (1979) The estimation of base compositions, base pairing and genome sizes of bacterial deoxyribonucleic acids. In: *Identification Methods for Microbiologists*, (Skinner FA & Lovelock DW, eds), pp. 217-296. Academic Press, London.
- Owen RJ & Pitcher D (1985) Current methods for estimating DNA base composition and levels of DNA-DNA hybridation. *Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser* **20**:72-74
- Palys T, Berger E, Mitrica I, Nakamura LK & Cohan FM (2000) Protein-coding genes as molecular markers for ecologically distinct populations: the case of two *Bacillus* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1021-1028.
- Pérez-Ibarra BM, Flores ME & García-Varela M (2007) Isolation and characterization of *Bacillus thioparus* sp. nov., chemolithoautotrophic, thiosulfate-oxidizing bacterium *FEMS Microbiol. Lett.* **271**: 289-296.
- Pikuta E, Lysenko A, Suzina N, Osipov G, Kuznetsov B, Tourova T, Akimenko V. & Laurinavichius K (2000) *Desulfotomaculum alklyphilum* sp. nov., a new alkaliphilic, moderately thermophilic, sulfate-reducing bacterium. *Int. J. System Evolut. Microbiol.* **50**: 25-33.
- Polz MF & Cavanaugh CM (1997). A simple method for quantification of uncultured microorganisms in the environment based on *in vitro* transcription of rRNA 16S. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1028-1033.

- Posada D & Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. **9**: 817-818.
- Ranjard L, Poly F, & Nazaret S (2000) Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: applications to soil environment. *Research Microbiology* **151**:167-177.
- Renganathan T & Krishnaiah K (2004) Liquid phase mixing in 2-phase liquid–solid inverse fluidized bed. *Chemical Engineering Journal*. **98**:213-218.
- Revah MS & Ortíz LI (2004) El desarrollo de bioprocesos para el tratamiento de aire contaminado emitido por fuentes fijas. En: Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna (Bolívar-Zapata FG ed) El Colegio Nacional. México D. F.
- Robertson L & Kuenen J (1991) The colorless sulfur bacteria In: *The prokaryotes* (Balows, A, Trüper H, Dworkin M, Harder H. & Schleifer K eds) Springer, Berlin Heidelberg New York, **1**: 385-413.
- Robertson L & Kuenen JG (2006) The colorless sulfur bacteria. In: *The prokaryotes, A Handbook on the biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. (Balows, H. G. Trueper, M.D. Workin, W. Harder, K.H. Schleifer K Eds) 3<sup>rd</sup> ed. Springer Verlag. Vol.2 385-413.
- Rodicio MR & Mendoza MC (2004) Identificación bacteriana mediante secuenciación del rRNA 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **22**:238-245.
- Rosado AS, Duarte GF, Seldin L & Van Elsas JD (1998) Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2770-2779.
- Rother D, Henrich HJ, Quentmeier A, Bardischewsky F & Friedrich CG (2001) Novel genes of the *sox* gene cluster, mutagenesis of the flavoprotein SoxF, and evidence for a general sulfur oxidizing system in *Paracoccus pantotrophus* GB17. *J Bacteriol* **183**:4499-4508.
- Rubinson KA & Rubinson JF (2001) Análisis Instrumental, pp 730-739. Prentice Hall. España.
- Schedel M & Truper H. (1979) Purification of *Thiobacillus denitrificans* siroheme sulfite reductase and investigation of some molecular and catalytic properties. *Biochim. Biophys Acta*.**56**:454-467.
- Schmidt, M. (1984) Chemical problems of flue-gas desulfurization, in: *Sulfur, its significance for chemistry, for the geo-, bio- and cosmosphere and technology* (Ed: Müller, A. and Krebs, B.) pp. 259-276, Elsevier, Amsterdam.

- Schnaitman K & Lundgren, DG (1965) Organic compounds in the spent medium of *Ferrobacillus ferrooxidans*. *Canadian Journal of Microbiology* **11**: 23-27.
- Sharp RJ, Bown KJ & Atkinson A (1980) Phenotypic and genotypic characterization of some thermophilic species of *Bacillus*. *J Gen. Microbiol.* **117**:201-210.
- Shungu D, Valiant M, Tutlane V, Weinberg E, Weissberger B, Koupal L, Gadebusch H & Stapley E (1983) GELRITE as an Agar substitute in Bacteriological Media. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**:840-845.
- Slepecky RA & Hemphill EH (1992) The genus *Bacillus*-nonmedical In: *The prokaryotes* (Ballou *et al.*, Eds) 2<sup>a</sup> ed. Springer-vesleg, New York. 1663-1694.
- Sonne-Hansen J & Ahring BK (1999) *Thermodesulfobacterium hveragerdense* sp. nov. and Icelandic hot spring. *System. Appl. Microbiol.* **22**: 559-564.
- Sorokin DY, Robertson LA & Kuenen JG (2000) Isolation and characterisation of obligately chemolithoautotrophic alkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **77**:251–260.
- Stackebrandt E & Goebel BM (1994) Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and rRNA 16S sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:846-849.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kampfer P, Maiden MCJ, Nesme X, Rossello-Mora R, Swings J & Other authors (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:1043-1047.
- Staneck JL & Roberts GD (1974) Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.* **28**:226-231.
- Steffes G, Torremans A, Schrijver R, Robertson L & Kuenen J (1996) Quantitative measurement of sulphur formation by steady-state and transient-state continuous cultures of autotrophic *Thiobacillus* species. *App. Microbiol. Biotechnol.* **45**:169-175.
- Sublette KL & Sylvester ND (1987) Oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus denitrificans*: desulfurization of natural gas. *Biotech. Bioeng.* **29**: 249-257.
- Suresh K, Prabakaran SR, Sengupta S & Shivaji S (2004) *Bacillus indicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium isolated from an aquifer in West Bengal, India. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1369-1375.
- Takakuwa S (1992) Biochemical aspects of microbial oxidations of inorganic sulfur compounds In: *Organic sulfur chemistry: Biochemical Aspects.* (Oae S & Okuyama T Eds). CRC Press, Boca Raton, Fla. 1-43.

- Täubel M, Kämpfer P, Buczolits S, Lubitz W, & Busse HJ (2003) *Bacillus barbaricus* sp. nov., isolated from an experimental wall painting. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 725-730.
- Taylor BF, Hoare DS, Hoare SL (1971) *Thiobacillus denitrificans* as an obligate chemolithotroph isolation and growth studies. *Archiv für Mikrobiologie* **78**: 193-204.
- Theron J & Cloete TE (2000) Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Crit. Rev. Microbiol.* **26**: 37-57.
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Torsvik V, Goksoyr J, Daae FL (1990) High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ Microbiol* **56**:782–787.
- Valencia, R. (2002) *Reducción del sulfuro de hidrógeno en el biogás, empleando como fuentes de microorganismos las aguas residuales de las fábricas de azúcar y de destilerías de alcohol*. Tesis de diploma. Facultad de Ingeniería Química. ISPJAE. Cuba.
- Vallaes TE, Topp G, Muyzer V, Macheret G, Laguerre Y & Soulas G (1997) Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**: 279-285.
- Van den Ende FP, Meier J. & van Gemerden H (1997) Syntrophic growth of sulfate-reducing bacteria and colorless sulfur during oxygen limitation. *FEMS Microbiol. Eco.* **23**: 65-80.
- Vásquez-Murrieta MS (2000) Tesis de Maestría en Biotecnología titulada “Efecto del uso de inhibidores sobre la oxidación biológica de compuestos reducidos de azufre en un consorcio microbiano” Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- Vergara L. (2002) *Caracterización de la microbiota presente en un reactor de desulfurización de biogás obtenido a partir del tratamiento de vinazas de destilerías de alcohol*. Tesis de Diploma; Facultad de Biología, Universidad de la Habana.
- Ward DM, Weller R & Bateson MM (1990) 16S ribosomal RNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature.* **345**:63–65.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA & Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**:6531-6535.
- Wilson IG (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **10**: 3741-3751.

- Wodara C, Kostaka S, Egert M, Kelly, DP & Friedrich C (1994) Identification and sequence analysis of the soxB gene essential for sulfur oxidation of *Paracoccus denitrificans* GB17. *J. Bacteriol.* **176**: 6188-6191.
- Woese CR (1987) Bacterial evolution *Microbiol. Rev.* **51**:221-217
- Woese CR, Stackebrandt E, Macke TJ & Fox GE (1985) A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Sys. Appl. Microbiol.* **6**: 143-151.
- Wood AP & Kelly DP (1988) Isolation and physiological characterization of *Thiobacillus aquaesulis* sp. nov., a novel facultatively autotrophic moderate thermophile. *Arch. Microbiol.* **149**: 339-343.
- Yoon JH, Kang SS, Lee KC, Kho YH, Choi SH, Kang KH & Park YH (2001) *Bacillus jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, Korean traditional fermented seafood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1087-1092.

## Apéndice A

**Tabla 1 Descripción general de un biofiltro**

Características	Ventajas
Biomasa inmovilizada Fase acuosa inmóvil Reactor unitario	Área de contacto gas/ líquido alta Fácil arranque y operación Bajos costos de operación
Área de aplicación	Desventajas
Concentración de contaminantes < 1 g/m <sup>3</sup> Coeficiente de Henry < 10	Poco control de condiciones de reacción Lento proceso de adaptación al floccular Requiere de grandes áreas

**Tabla 2 Descripción general de un biolavador**

Características	Ventajas
Biomasa suspendida en su mayoría Fase acuosa móvil Dos reactores	Buen control de las condiciones de reacción Posibilidades de evitar la acumulación de productos Equipo compacto Baja caída de presión
Área de aplicación	Desventajas
Concentración de contaminantes < 5 g/m <sup>3</sup> Coeficiente de Henry < 0.10	Baja superficie para la transferencia de masa. Lavado de microorganismos de lento crecimiento Alta generación de lodos Sistema de arranque complicado Requerimiento extra de aire para concentraciones mayores de contaminante Costos de inversión, operación y mantenimiento elevados

**Tabla 3 Descripción general de un biolavador de lecho escurrido**

<b>Características</b>	<b>Ventajas</b>
Biomasa inmovilizada Fase acuosa inmóvil Reactor unitario	Comparables a los filtros de escurrimiento Mejor retención de microorganismos de lento crecimiento Reactor unitario
<b>Área de aplicación</b>	<b>Desventajas</b>
Concentración de contaminantes < 0.5 g/m <sup>3</sup> Coeficiente de Henry < 1	Baja superficie para la transferencia de masa. Generación alta de lodos Complicado sistema de arranque Costos de operación elevados

**Tabla 4 Descripción general de un reactor UASB**

<b>Características</b>	<b>Ventajas</b>
Biomasa que forma gránulos pellets un diámetro 0.5-2 mm Fase acuosa ascendente Reactor unitario	Comparables a los filtros de escurrimiento No requiere mecanismo de agitación Retención de microorganismos de lento crecimiento Rápida velocidad de sedimentación Sistema sencillo No costoso
<b>Área de aplicación</b>	<b>Desventajas</b>
Concentración de contaminantes < 3.5 g/m <sup>3</sup>	

## Apéndice B

### 1) Medio mineral Sublette líquido (MSL) modificado se compone de:

**Tabla 1 Composición del medio mineral**

Componentes	Concentración (g/l)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.8
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.4
NH <sub>4</sub> Cl	0.5
CaCl <sub>2</sub>	0.03
MnSO <sub>4</sub>	0.02
NaHCO <sub>3</sub>	1.0
FeCl <sub>3</sub>	0.02
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	20

2) *Medio Sublette sólido (MSGG)* contiene la misma formulación que el MSL de: sales inorgánicas, elementos traza, tiosulfato como fuente de energía y como fuente de carbono bicarbonato. Sin embargo, al medio sólido se le adiciona 1 % de Goma Gellana Gelrite (Sigma) (MSGG) biopolímero sustituto de agar (**Shungu et. AL., 1983**). En la **Tabla 1** se describe la composición del medio mineral de Sublette.

Para ambos medios se ajusta el pH a 7.0 y se esterilizan a 121 °C y a 15 lb de presión por 20 min. Después el bicarbonato es esterilizado por filtración y adicionado a los matraces para evitar su descomposición. Para el caso del medio sólido, una vez a temperatura ambiente colocar en cajas petri. Este medio fue empleado para estudiar morfología celular y características coloniales de los aislados. El tiosulfato de sodio se utilizó como modelo de estudio dado a que permite su manipulación sin riesgos asociados a toxicidad (**Sublette & Sylvestre, 1987, Steffes et al., 1996 y Kelly et al., 1997**).

### 3) *Caldo de soya tripticaseina (TSB)*

El medio se compone de caldo de soya tripticaseina.

Se preparó 5 g/l de caldo de soya tripticaseina (BBL) se ajusto pH a 7.5 y se colocó 100 ml de medio en cada matraz para luego esterilizar a 121 °C por 15 min a 15 lb.

**4) Agar de soya tripticaseina (TSA)**

El medio se compone de caldo de soya tripticaseina y agar

Se preparó 5 g/l de agar tripticaseina a pH 7.5 se esterilizo a 121 °C por 15 min a 15 lb y se distribuyo en cajas petri.

**5) Agar de soya tripticaseina (TSA) + ASW**

El medio se compone de caldo de soya tripticaseina y agar, suplementado con medio mineral ASW compuesto por 24 g NaCl, 7 g MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O, 5.3 g MgCl<sub>2</sub>. 6 H<sub>2</sub>O, 0.7 g KCl y 0.1 g CaCl<sub>2</sub> (ASW) pH 7.5 se esterilizó a 121 °C por 15 min a 15 lb y se distribuyó en cajas petri.

## Apéndice C

Técnica de microscopía electrónica de barrido (scanning electron microscope SEM) descrito por **Bozzola & Russell (1992)**

1. Se parte de células crecidas en fase exponencial en medio TSB con 24 h de incubación. El cultivo se centrifuga a 4,000 rpm y a la biomasa adicionar 3 ml de glutaraldehído, después refrigerar por 24 h.
2. Las células son lavadas con buffer de fosfatos de sodio al 0.1 M, 3 veces o más hasta eliminar todo el glutaraldehído.
3. Una vez lavadas las células se elimina por centrifugación (4,000 rpm) el buffer de fosfatos. A la biomasa obtenida se adiciona 14 gotas de  $\text{OsO}_4$  y se incuba por 2 h en refrigeración.
4. Deshidratación celular:  
En esta etapa se elimina poco a poco el agua presente en el interior de las células, mediante su exposición por 20 min, con cada concentración de acetona (30%, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, y 100 %) y así evitar que se destruyan.
5. Para el tratamiento con acetona al 100 %, la muestra es colocada sobre papel filtro Watman con un poro de 0.1  $\mu$  y a su vez se coloca en el interior de un porta muestras, el cual se sumerge en acetona al 100 % y se conserva a temperatura ambiente por 24 h.
6. Después la muestra es colocada en desecador a punto crítico (Tousimis Sandra 780S).
7. El pellet obtenido del paso anterior se disgrega y monta sobre plata coloidal para posteriormente cubrir la muestra con oro y carbono.

### Tinción de Gram

1. Colocar una gota de agua destilada sobre un portaobjetos, y junto colocar una asada de microorganismos (frotis).
2. Extender la muestra en la parte media del portaobjeto y fijarla mediante la flama de un mechero a sequedad.
3. Cubrir la muestra seca cristal violeta. Mantener por 20 segundos.
4. Lavar con agua destilada por 2 segundos.
5. Cubrir el frotis con solución de yodo. Mantener por 1 minuto.

6. Eliminar el yodo con un disolvente (alcohol-acetona) por 20 segundos.
7. Lavar con agua destilada y cubrir con safranina por 20 segundos.
8. Lavar con agua destilada por 2 segundos y dejar secar para su posterior observación al microscopio.

#### **Tinción de espora por el método Schaeffer-Fulton.**

1. Prepara frotis con la muestra y cubrir con verde de malaquita.
2. Exponer el frotis a vapores de agua, provenientes de un vaso de precipitados conteniendo agua hirviendo, por 5 minutos.
3. Después dejar enfriar y lavar con agua destilada por 30 segundos.
4. Cubrir el frotis con safranina por 20 segundos.
5. Lavar con agua destilada para remover la safranina.
6. Dejar secar y dejar secar para su posterior observación al microscopio.

#### **Determinación de movilidad en medio semi-sólido**

1. Prepara previamente, tubos con medio semi-sólido (Agar nutritivo SIM).
2. Tomar dos tubos uno corresponde al control (sin inocular) y el otro se inocula con el microorganismos por picadura a 2 o 3 de su profundidad.
3. Después incubar a 37 °C por 48 h.

#### **Determinación de peso seco**

El peso seco (contenido de sólidos) de las células bacterianas que se encuentran en suspensión se obtiene por el secado de un volumen en un horno a 105 °C hasta peso constante.

La desventaja de este método es que componentes volátiles de la célula pueden perderse por el secado y puede existir alguna degradación. También la muestra seca puede recobrar humedad durante el pesado, principalmente si el ambiente tiene una humedad relativa alta.

#### **Determinación de catalasa y oxidasa**

La actividad de la catalasa fue determinada por la formación de burbujas cuando colonias de los diferentes aislados por separado se colocaron sobre portaobjetos y se les adiciono una gota

de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % (v/v). La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia indica una reacción positiva.

La actividad de la oxidasa fue determinada por la oxidación de 1% (v/v) de tetrametil-p-fenil endiamina dihidrocloro según la técnica de **Benson (1990)**.

### **Identificación microbiológica por el sistema manual API (bioMérieux)**

Galerías API 20E sistema de identificación para enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos no exigentes:

1. Seleccionar una colonia bien aislada y preparar una suspensión del microorganismo (desconocido) con solución salina estéril. Mezclar con la ayuda de un Vortex.
2. Colocar 5 ml de agua destilada en la charola y sobre ella colocar la tira API. 20E
3. Con ayuda de una pipeta Pasteur, adicionar dentro de la cúpula la suspensión de microorganismos tratando de no llenarlas totalmente ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S y URE. Llenar completamente sólo las cúpulas CIT, VP y GEL.
4. Para crear condiciones de anaerobiosis, colocar en la parte superior de las cámaras de ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S y URE aceite mineral estéril. Después colocar la tapa
5. Llevar a incubar a 36 °C durante 18-24 h.
6. Interpretar resultados.

Galería API 20 NE sistema de identificación para bacilos Gram negativos no enterobacteriaceae y no fastidiosos:

1. Seleccionar una colonia bien aislada y preparar una suspensión del microorganismo (desconocido) con solución salina estéril. Mezclar con la ayuda de un Vortex.
2. Colocar 5 ml de agua destilada en la charola y sobre ella colocar la tira API 20 NE
3. Con ayuda de una pipeta Pasteur, rellenar las cúpulas desde el NO<sub>3</sub> al PNPG con la suspensión de microorganismos.
4. Abrir una ampolleta de medio API AUX y transferir a ella 200 µl de la suspensión precedente. Homogeneizar
5. Rellenar las cúpulas de los ensayos desde GLU al PAC.
6. Rellenar con aceite mineral estéril las cúpulas de los tres ensayos subrayados (GLU, ADH, URE) formando un menisco convexo.

7. Cerrar la cámara y llevar a incubar a 29 °C durante 24 h.
8. Interpretar resultados.

### **Extracción de DNA y purificación por método de Marmur (1961)**

Dicho método utiliza cloroformo para eliminar las proteínas de los lisados celulares.

En la extracción del DNA se han utilizado los siguientes reactivos:

- Tampón EDTA salino: NaCl 0.15 M EDTA Na 2 0.01 M pH 8.0
- SDS: Dodecil sulfato sódico al 20 % (p/v)
- Perclorato de sodio: NaClO<sub>4</sub> 5 M
- Cloroformo-isopentanol: 24:1 (v/v)
- SSC: NaCl 0.15 M Citrato trisódico 0.015 M pH 7.0

Las soluciones que se utilizaron son una dilución 1/10 (SSC x 0.1) y otra 20 veces concentrada (SSC x 20):

- SSC x 0,1: NaCl 0.015 M Citrato trisódico 0.0015 M pH 7.0
- SSC x 20: NaCl 3M Citrato trisódico 0.3 M pH 7.0
- Ribonucleasa: RNasa bovina 1 mg/ml, en NaCl 0.15 M pH 5.0

Previamente, se prepara una suspensión bacteriana en solución salina 0.84% con el crecimiento bacteriano de un tubo de TSA de 48 h de incubación a 30 °C para posteriormente, tomar 5 ml de la suspensión e inocular 250 ml de medio TSB. Las bacterias se incuban a 30 °C en agitación (180 rpm), durante 48 h.

El cultivo líquido se centrifuga a 6,000 rpm 15 min a 10 °C. Las células se lavan dos veces con 50 ml de tampón EDTA salino. El sedimento resultante, de 2 a 5 g de células en peso húmedo, se resuspende en 50 ml de solución EDTA salino. Se añade entonces SDS al 20 % hasta una concentración final del 1 %. La suspensión bacteriana se calienta entonces a 60 °C hasta que se produzca la lisis celular, la cual se detecta por un aumento de la viscosidad y por un cambio en el aspecto de la suspensión que pasa de turbia a opalescente.

En el caso de bacterias que no son sensibles a la lisis por SDS, como ocurre por ejemplo con la mayoría de las bacterias Gram positivas, debe de realizarse un tratamiento previo al SDS con lisozima (en nuestro caso, la cepa a caracterizar fue sensible a la lisis por SDS).

Los lisados celulares viscosos se enfrían para añadir la solución de perclorato hasta una concentración final 1 M. A partir de aquí se procede a la extracción de proteínas con medio volumen de cloroformo-isopentanol, agitando los lisados durante 30 min. La agitación debe ser justa la necesaria para crear una emulsión. Una agitación muy vigorosa no es conveniente. Para eliminar la proteína se centrifuga el lisado a 12.000 rpm a 4-10 °C durante 10 min. Quedan dos fases, la superior acuosa que contiene el DNA y la inferior clorofórmica. Entre las dos fases queda una interfase de proteína. La fase acuosa se extrae con mucho cuidado, con la ayuda de una pipeta despuntada o bien con una pipeta Pasteur con el extremo curvado, evitando así arrastrar la interfase de proteínas.

El proceso de extracción con cloroformo-isopentanol se va repitiendo hasta que quede muy poca proteína en la interfase, momento en el que se procede a precipitar el DNA con etanol del 96 % frío. Para ello se utilizan aproximadamente dos volúmenes de etanol por cada uno de fase acuosa. El DNA se recoge enrollado en una varilla de vidrio y se deja secar al aire hasta eliminar el exceso de alcohol.

En el caso de que el DNA no se enrolle bien y queden hebras de DNA sueltas, se recogen centrifugando 10 min a 6.000 rpm a 10 °C.

El DNA se disuelve en 10 ml de SSC x 0.1. El volumen de SSC x 0.1 utilizado dependerá también de la cantidad de DNA recogido. Una vez disuelto el DNA se ajusta la concentración a SSC x 1 añadiendo 0.5 ml de SSC x 20 por cada 10 ml de SSC x 0,1. Posteriormente la solución de DNA se somete a la acción de la RNasa, añadiéndose ésta a una concentración final de 50 µg/ml e incubando durante 30 min a 37 °C. Una vez finalizado el tratamiento con la RNasa se procede a repetir extracciones con cloroformo-isopentanol durante 15 min hasta que quede muy poca proteína en la interfase. Una vez finalizada la purificación del DNA, éste se precipita con etanol frío y se disuelve en SSC igual como se ha indicado más arriba. Este proceso de precipitación y disolución se repite varias veces a fin de eliminar los restos de RNA que pudieran quedar. El DNA así preparado se guarda congelado a -20 °C o en refrigeración con unas gotas de cloroformo.

La pureza del DNA bacteriano extraído se determino por el cálculo de las relaciones de absorbancia A 260 nm: A 280 nm y A 260 nm: A 230 nm (**Johnson, 1994**).

Cuando el DNA está libre de proteína y otros materiales contaminantes, las relaciones anteriores tienen un valor entre 1.8 y 2 para (A 260 nm : A 280 nm) y entre 2,0 y 2,2 para (A 260 nm : A 230 nm).

### **Determinación del contenido en G + C**

El contenido G+C del DNA bacteriano se determinó a partir de la temperatura media de fusión del DNA ( $T_m$ ), obtenida al realizar el perfil de desnaturalización del DNA (Marmur y Doty, 1962).

En primer lugar, las muestras de DNA conservadas en SSC se precipitan en etanol tal y como se ha indicado en el apartado anterior y luego el DNA se disuelve en SSC x 0.1. Posteriormente se procede a dializar durante 48 h en SSC x 0.1 a 4 °C, realizando 8 cambios de la solución de diálisis. Este proceso permite eliminar contaminantes como cationes divalentes o restos de cloroformo. Para obtener el perfil de desnaturalización térmico, la solución de DNA se diluye en SSC x 0.1 hasta una absorbancia de 0.4 a 260 nm.

El contenido de G+C fue calculado usando la ecuación descrita por **Owen & Hill (1979)** que corresponde a:

$$\%G+C = (T_m - T_m E.coli) 2.08 + 50.9$$

El  $T_m$  del DNA de referencia de *E.coli* NCTC 9001 es igual a 74.6 °C en SSC x 0.1 (**Owen y Pitcher, 1985**).

### **Extracción de DNA genómico por kit Wizard (Promega)**

Aislamiento de material genómico a partir de bacterias Gram positivas y Gram negativas

#### **Biomasa celular**

1 ml de un cultivo celular de una noche se centrifugó por 2 minutos a 13,000-16,000 x g\*.

Eliminar el sobrenadante.

A) Para bacterias Gram negativas

Suspender las células en 480 µl de EDTA 50 mM.

#### **Lisis celular**

1. Adicionar 600 µl de solución (llamada Nuclei Lysis). Pipetear cuidadosamente, para mezclar

2. Incubar por 5 min a 80 °C, entonces enfriar a temperatura ambiente.
3. Adicionar 3 µl de la solución RNasa. Mezclar, incubar a 37 °C por 15-60 min, entonces enfriar a temperatura ambiente.

#### **Precipitación de proteínas**

4. Adicionar 200 µl de solución para precipitar proteínas. Agitar con vortex.
5. Incubar en hielo por 5 min
6. Centrifugar de 13,000-16,000 xg\* por 3 min.

#### **Precipitación de DNA y rehidratación**

7. Transferir el sobrenadante a un tubo conteniendo 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente. Mezclar.
8. Centrifugar como en el paso 1 y decantar el sobrenadante.
9. Adicionar 600 µl de alcohol al 70 % a temperatura ambiente.  
Mezclar
10. Centrifugar por 2 min a 13,000-16,000 xg\*.
11. Aspirar el etanol y secar el DNA al aire por 10-15 min.
12. Rehidratar el DNA con 100 µl de la solución rehidratante por 1 h a 65 °C o por toda la noche a 4 °C.

\* Máxima velocidad en una microcentrifuga

## Determinación de proteína celular método descrito por Lowry *et al.*, 1951

### Preparación de soluciones

#### *Solución A carbonato de sodio*

Na(OH) (0.1 N)	4 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2 %)	20 g
Agua destilada	1 litro

#### *Solución B Tartrato de Na y K al 2 %*

Tartrato de Na y K	2 g
Agua destilada	100 ml

#### *Solución C Sulfato de cobre al 1 %*

Sulfato de cobre	1 g
Agua destilada	100 ml

### Preparación de Reactivos

#### *Reactivo I*

Mezclar:

Solución A (Carbonato de sodio)	50 ml
Solución B (Tartrato de Na y K)	0.5 ml
Solución C (Sulfato de cobre)	0.5 ml

#### *Reactivo II*

Reactivo de Folin cicalteau 1:2 en  
agua destilada  
Agregar 0.3 ml a cada tubo

### Curva tipo para la determinación de proteínas

1. De una solución estándar de BSA 1 mg/ml hacer una dilución 1:10 (0.3 ml de BSA + 2.7 ml de agua destilada) y proceder a preparar la curva tipo de acuerdo con el siguiente protocolo.

<b>Tubo</b>	<b>BSA (ml)</b>	<b>H<sub>2</sub>O (ml)</b>	<b>(µg/ml)</b>	<b>Reactivo I(ml)</b>	<b>Reactivo II(ml)</b>
1	0.000	1.000	0.00	3.0	0.3
2	0.125	0.875	12.5	3.0	0.3
3	0.250	0.750	25.0	3.0	0.3
4	0.500	0.500	50.0	3.0	0.3
5	0.750	0.250	75.0	3.0	0.3
6	1.000	0.000	100.0	3.0	0.3

2. Preparar 1.0 ml de las diluciones adecuadas de la muestra problema
3. Adicionar el reactivo I tanto a los tubos de la curva, como a los de las diluciones de la muestra problema.
4. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Adicionar el reactivo II tanto a los tubos de la curva, como a los de las diluciones de la muestra problema.
6. Incubar a temperatura ambiente 30 minutos.
7. Leer en el espectrofotómetro a 590 nm.

### **Determinación por electroforesis capilar de iones ( $\text{SO}_4^{-2}$ y $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$ ) (Millipore CIA 4000)**

El contenido de sulfatos, nitratos, nitritos, fosfatos y carbonatos se obtiene del extracto en agua. Dependiendo de cual sea el ión que se quiere determinar, se utilizan dos electrolitos de trabajo: una solución de cromato (para la determinación de los 5 iones) o bien, una solución de sulfato de sodio (para la determinación de nitratos y nitritos).

#### **Material**

- Tubos Eppendorf de 0.5 ml de capacidad
- Micropipeta de 1000 ml
- Puntas para micropipeta
- Pipeta de 10 ml
- Vasos de precipitado de 50 ml
- Filtro en forma de perinola
- Jeringa de 10 ml
- Filtro de nitrocelulosa de 0.45 mm
- Electrolito OFM waters
- Solución de cromato o de fosfatos
- Agua destilada y desionizada

#### **Procedimiento**

1. Preparar las curvas estándar por medio de dilución de cada ión a partir de una solución de 4000 ppm hasta 5 ppm (Apéndice 1). Posteriormente, con la micropipeta toma 0.5 ml de cada punto de la curva y colocarlas en tubos eppendorf. Marcar cada tubo para identificarlas al momento de introducirlas en el carrusel.
2. Con la micropipeta tomar 0.5 ml de la muestra obtenida de la extracción en agua y colocarla en el tubo eppendorf. Marcar el tubo para identificarlo al momento de introducirlo al carrusel.
3. Encender el equipo Waters Capillary Ion Analyzer junto con la computadora.
4. Presionar la tecla down para que bajen ambos carruseles en donde se colocan las muestras.

5. Presionar el botón open door para abrir la puerta. Levantar y girar hacia la izquierda para retirar el carrusel utilizando la perilla blanca.
6. Filtrar 36 ml del electrolito de trabajo, considerando que 18 ml son para el análisis de cada 5 muestras a analizar en el carrusel; mientras que en el resto se coloca en el segundo frasco vacío del segundo carrusel.
7. Colocar los tubos eppendor destapados y con las tapas secas en el carrusel (se sugiere introducir primero la curva estándar y posteriormente las muestras).
8. Regresar el carrusel a su posición original (posición E3 del carrusel al frente) y girar el capilar a su posición original.
9. Colocar el frasco vacío del segundo carrusel en la posición uno.
10. Cerrar la puerta y presionar las teclas purgue, auto y manual para purgar el capilar durante 20 minutos.
11. En la computadora, se realiza la siguiente secuencia: localizar el botón inicio, programas, Millenium 32. Esperamos a que cargue el programa. Localizar Login, run simples y verificar que esté seleccionado CIA. Aceptamos. En este momento aparece una ventana en donde a la izquierda se escribe el nombre de la muestra y a la derecha se observa el espacio para ver el cromatograma.
12. Cuando haya terminado el programa de purga del analizador, se abre la puerta (door open) y colocar el frasco con electrolito de trabajo (18 ml filtrados) en la posición uno el vacío en la posición cinco.
13. Presionar star y automáticamente debe apagarse fault. Esto indica que el equipo está listo para comenzar a programar el análisis.
14. El programa consta de las siguientes teclas:
  - Simple: Es el número de la muestra que se analiza
  - Repetición: las veces que se van a repetir la inyección, se presiona el número 2 y posteriormente enter.
  - Run time: tiempo que dura la corrida (4 min)
  - Éste programa se repite hasta que se termine con el número de muestras presentes en el carrusel.

15. Concluida la programación, se presiona la tecla star en el analizador y el botón inyect de la computadora.
16. El orden en que aparecen los iones son: sulfatos, nitrito, nitrato, fosfato y carbonato.
17. La computadora automáticamente guarda el cromatograma obtenido. Para visualizarlo, en la pantalla se busca la opción review data, channels y se acepta. Se abre una ventana en donde se observan columnas en las cuales se presentan los datos de la muestra, como su nombre, fecha y hora de análisis. Para observar el cromatograma, se selecciona la fila que tiene la opción de satin\_cia. Se abre otra ventana en donde se observan los picos obtenidos; en la parte de debajo de la pantalla, se observa el tiempo de retención y el área. Para cada pico obtenido, ambos valores se registran en la bitácora. Este procedimiento se puede hacer mientras se analizan las muestras.
18. Cuando se ha terminado el análisis, se abre la puerta, se retira el carrusel con las muestras y el frasco con el electrolito de trabajo del segundo carrusel. Se quitan los tubos eppendor y el electrolito de trabajo del primer carrusel.
19. En donde había electrolito de trabajo, se coloca agua destilada ambos en la posición uno de su respectivo carrusel.
20. Cerrar la puerta y poner a purgar por 20 minutos para dejar el equipo limpio. Al término, se apaga el analizador y la computadora, cerrando todas las ventanas abiertas y utilizando la opción de apagar el sistema.
21. los datos obtenidos se analizan utilizando una hoja de cálculo. A los datos provenientes de las curvas estándar, se realizan una regresión lineal para obtener una ecuación con un coeficiente de correlación de 0.99.
22. la ecuación obtenida permitirá obtener la concentración de las muestras problema en unidades de ppm. Posteriormente, se hace la conversión en mg del ión/kg material filtrante seco.

## Apéndice 1

En la **Tabla 1** se presentan los iones que se utilizan para realizar las curvas estándar.

**Tabla 1 Aniones utilizados para realizar las curvas estándar**

Anion	Concentración (ppm)	Peso del reactivo
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	4000	0.592 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	4000	0.600 g NaNO <sub>2</sub>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4000	0.548 g NaNO <sub>3</sub>
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	4000	0.598 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4000	0.707 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>

**Electrolito concentrado (cromato):** en un matraz volumétrico de 1 litro colocar aproximadamente 300 ml de agua destilada y desionizada (18 megOhm); adicionar 23.41 g de cromato de sodio tetrahidratado (Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> \* 4H<sub>2</sub>O), (pH entre 7 y 12); agregar 68 ml de ácido sulfúrico 10 mM y por último aforar el matraz hasta la marca con el agua desionizada.

**Ácido sulfúrico 10 mM:** Adicionar 560 µl de ácido sulfúrico en un matraz de un litro y posteriormente llene con agua destilada hasta la marca.

**Electrolito de trabajo:** colocar 3 ml de solución BT-anión OFM (Waters CIA-Pak) en un matraz volumétrico de 100 ml adicione 20 ml de agua destilada y desionizada (18 megOhm); adicione 4 ml de electrolito concentrado (cromato); aforar el matraz con el agua.

**Electrolito de trabajo (solución de sulfato de sodio):** preparar una solución de sulfato de sodio 0.1 M. En un matraz aforado de 100 ml poner 10 ml de la solución de sulfato de sodio junto con 3 ml de la solución BT-anión OFM (Waters CIA-Pak) y aforar con agua destilada y desionizada sin agitar.

**El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó**

**Beatriz Mónica Pérez Ibarra**

El día 16 de Noviembre del año de 2007

**Comité Tutorial:**

Tutor: Dr. Martín García Varela

Asesor: Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez

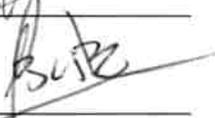
Asesor: Dra. Julia Pérez Ramos

Sinodal: Dra. Nathalie Cabirol Gilles

Sinodal: Dr. Felipe Martínez Orta

Sinodal: Dr. Francisco José Fernández Perrino

**Firma**

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_