



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Romero Álvarez I, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXIV, 2010, 101-120. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

RUTAS METABÓLICAS DE OXIDACIÓN DEL AZUFRE EN BACTERIAS QUIMIOLITOAUTÓTROFAS, RELEVANCIA AMBIENTAL Y BIOTECNOLOGÍA

Jesús Espinosa Márquez, Sergio Revah y Sylvie Le Borgne
Departamento de Procesos y Tecnología, UAM-Cuajimalpa
Artificios 40, Col. Hidalgo, Delegación Álvaro Obregón, 01120 México D. F.
sylvielb@correo.cua.uam.mx

Resumen

La oxidación de compuestos reducidos de azufre inorgánicos a azufre elemental y sulfato por bacterias quimiolitotróficas tiene importancia aplicada para la eliminación de sulfuro en efluentes, en la corrosión microbiana del concreto y en biominería. Los compuestos inorgánicos de azufre son exclusivamente oxidados por bacterias y arqueas. Las bacterias sulfoxidantes, se agrupan principalmente en la clase de las Gammaproteobacterias y son encontradas en ambientes con pH ácido, neutro o alcalino. El amplio rango de estados de oxidación del azufre (de -2 a +6) ha propiciado la aparición de una gran variedad de enzimas redox que les permiten oxidar diferentes compuestos inorgánicos de azufre. Sin embargo, en la actualidad, no se sabe con claridad cuáles de estas enzimas y rutas metabólicas usan los microorganismos para oxidar diferentes compuesto azufrados a diferentes pHs o concentraciones de oxígeno, ya sea en ambientes naturales o en biorreactores. Un mejor conocimiento de estas enzimas y rutas permitiría optimizar las condiciones de las reacciones de sulfoxidación y mejorar la actividad catalítica de estos microorganismos para su aplicación a bioprocesos industriales. En el caso de la corrosión microbiana, se podrían diseñar inhibidores específicos de la actividad sulfoxidante.

Palabras clave: Bacterias sulfoxidantes, metabolismo de la sulfoxidación, enzimas redox, eliminación de sulfuro, corrosión microbiana.

Abstract

The oxidation of inorganic reduced sulfur compounds to elemental sulfur and sulfate by chemolithotrophic bacteria has practical importance in the removal of sulfide in effluents, in the microbial corrosion of concrete and in biomining. Inorganic sulfur compounds are exclusively oxidized by bacteria and archaea. Sulfur-oxidizing bacteria mainly belong to the Gammaproteobacteria and are found in environments with acidic, neutral or alkaline pH. The wide range of sulfur oxidation states (from -2 to +6) has favored the emergence of a variety of redox enzymes able to oxidize different inorganic sulfur compounds. However, at the present time, it is not clear which enzymes or pathways are used to oxidize different sulfur compounds at different pH or oxygen concentration, either in natural environments or in bioreactors. A better knowledge of these enzymes and pathways would allow the optimization of sulfoxidation reaction conditions and improve the catalytic activity of these microorganisms for their application in industrial bioprocesses. In the case of microbial corrosion, specific inhibitors of the sulfur-oxidizing activity could be designed.

Keywords: Sulfur-oxidizing bacteria, sulfoxidation metabolism, redox enzymes, sulfide removal, microbial corrosion.

Introducción

El azufre es el décimo elemento más abundante en la corteza terrestre. Se encuentra naturalmente en la cercanía de aguas termales, zonas volcánicas, minas y agua de mar en forma de minerales de sulfato (yeso, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), minerales de sulfuro (pirita, FeS_2), azufre elemental (S^0) y sulfato (SO_4^{2-}) [1].

Bioquímicamente, el azufre es muy importante dado que es abundante en todos los organismos, donde aparece en compuestos orgánicos como aminoácidos, proteínas, hormonas, lípidos y vitaminas, entre otros. La materia orgánica viva y muerta constituye un reservorio menor de azufre pero de rápido reciclado [2]. En contraste, los compuestos inorgánicos de azufre, tienen un papel biológico más restringido, sirviendo como fuente de azufre para su asimilación e incorporación en los compuestos orgánicos o son empleados como donadores o aceptores de electrones en el transporte desasimilativo durante los procesos de respiración y fotosíntesis de algunos procariontes [3].

Químicamente las reacciones oxido-reductivas de los compuestos azufrados son complejas debido a que los átomos de azufre existen en 9 estados de oxidación desde (+6) hasta (-2) (Tabla I). Los 3 estados de oxidación más abundantes en la naturaleza son: -2 en forma del anión sulfuro de hidrógeno (HS^-), 0 en forma de azufre elemental (S^0) y +6 en forma de SO_4^{2-} [4].

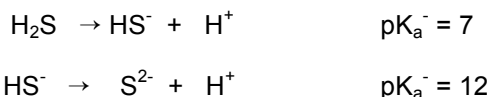
Tabla I. Estados de oxidación del azufre en algunos compuestos inorgánicos (adaptado de [4]).

Estado de oxidación	Compuestos y fórmula
-2	ácido sulfhídrico (H ₂ S), sulfuro de hidrógeno (HS ⁻), sulfuro (S ²⁻), azufre terminal del tiosulfato (S ₂ O ₃ ²⁻)
-1	azufre terminal de los polisulfuros (⁻ S-S _n -S ⁻) y del tiosulfato (S ₂ O ₃ ²⁻)
0	azufre elemental (S _n), azufre interno de los politionatos (⁻ O ₃ S-S _n -SO ₃ ⁻)
+4	sulfito (SO ₃ ²⁻), bisulfito (HSO ₃ ⁻)
+5	azufre en la sulfona de los politionatos (⁻ O ₃ S-S _n -SO ₃ ⁻) y azufre interno del tiosulfato (S ₂ O ₃ ²⁻)
+6	sulfato (SO ₄ ²⁻)

Ciclo biogeoquímico del azufre

En el planeta, los compuestos azufrados circulan entre el suelo, los océanos, la atmósfera y la materia viva, a través de reacciones descritas en el llamado ciclo biogeoquímico del azufre (Fig. 1). El azufre experimenta transformaciones cíclicas en su estado de oxidación de -2 (HS⁻) a +6 (SO₄²⁻), debido a procesos químicos, geológicos y biológicos.

Una parte importante de la movilidad de los compuestos de azufre se debe a que pueden encontrarse como gases o disueltos en líquidos y así transportarse en la naturaleza. Por ejemplo el H₂S, que es un gas a condiciones normales, se encuentra como ácido o base según el pH de la solución según los siguientes equilibrios:



Siendo las sales mucho más solubles que el H₂S, la cantidad disuelta en agua puede variar según el pH de la solución. De esta forma, una solución a pH=10 puede contener 1000 veces más de sulfuros totales que a pH=4,

Las bacterias desempeñan un importante papel en este ciclo, tanto en su parte reductiva como en su parte oxidativa [6]. Las bacterias oxidantes de azufre y sulfuros producen SO₄²⁻ mientras que las bacterias sulfato-reductoras lo consumen utilizándolo como aceptor de electrones en su respiración anaerobia y produciendo H₂S.

Bacterias quimiolitautótrofas sulfoxidantes

Los compuestos inorgánicos reducidos de azufre son oxidados casi exclusivamente por procariontes [7]. Los procariontes sulfoxidantes son filogenéticamente diversos. El dominio Arquea está restringido a los miembros del orden Sulfolobales (hipertermófilas) y en el dominio Bacteria, el azufre es oxidado por litótrofos aerobios o por fotótrofos anaerobios. Adicionalmente,

algunos microorganismos heterótrofos, incluyendo bacterias y hongos, tienen la capacidad de oxidar compuestos reducidos de azufre.

La oxidación de compuestos inorgánicos reducidos de azufre por bacterias quimiolitotróficas es parte vital del ciclo biogeoquímico del azufre en el medio ambiente. Además, este tipo de reacciones tienen importancia en el tratamiento de la contaminación por compuestos de azufre, en corrosión y en minería. La Figura 2 muestra un árbol filogenético de bacterias quimiolitotróficas sulfoxidantes construido a partir de la comparación de secuencias del gen 16S rRNA y con énfasis en aquellas bacterias de importancia práctica. En su gran mayoría estas bacterias pertenecen a la clase de las Gammaproteobacterias.

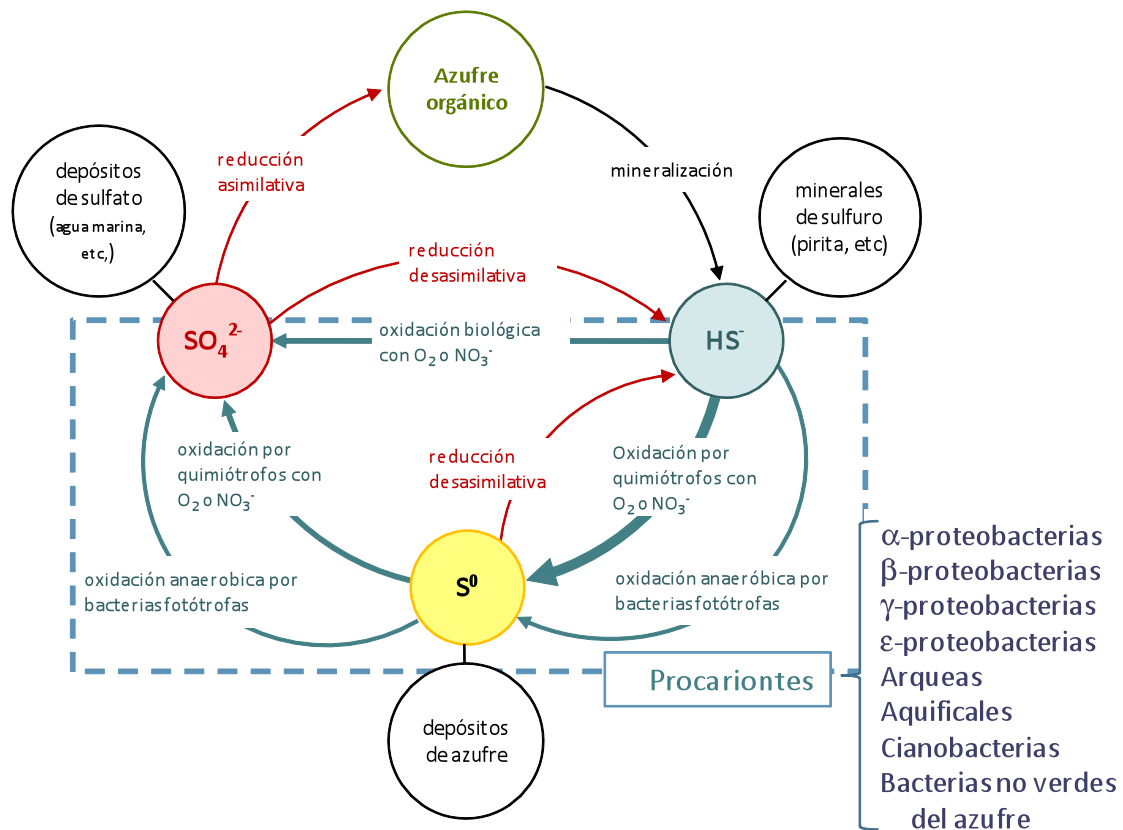


Figura 1. Ciclo del azufre (adaptado de [5]).

Las bacterias quimiolitotróficas obtienen su energía de la oxidación de donadores de electrones inorgánicos y fijan el CO₂ por el ciclo de Calvin (Fig. 3). La mayoría de las bacterias sulfoxidantes usan oxígeno molecular (O₂) como aceptor final de electrones. Algunas especies, como *Thiobacillus denitrificans*, son también capaces de usar nitrato (NO₃⁻) en condiciones anaerobias como aceptor final de electrones [5].

Las fuentes de donadores de electrones inorgánicos son diversas y abundantes en la naturaleza; pueden ser de origen geológico, biológico y antropogénico. La actividad volcánica es una importante fuente de compuestos inorgánicos reducidos de azufre al igual que la sulfato-reducción. Las actividades derivadas de la agricultura y minería así como la quema de combustibles fósiles y otras actividades industriales liberan compuestos inorgánicos reducidos de

azufre al medio ambiente, los cuales pueden ser utilizados como donadores de electrones por las bacterias quimiolitautótrofas sulfoxidantes.

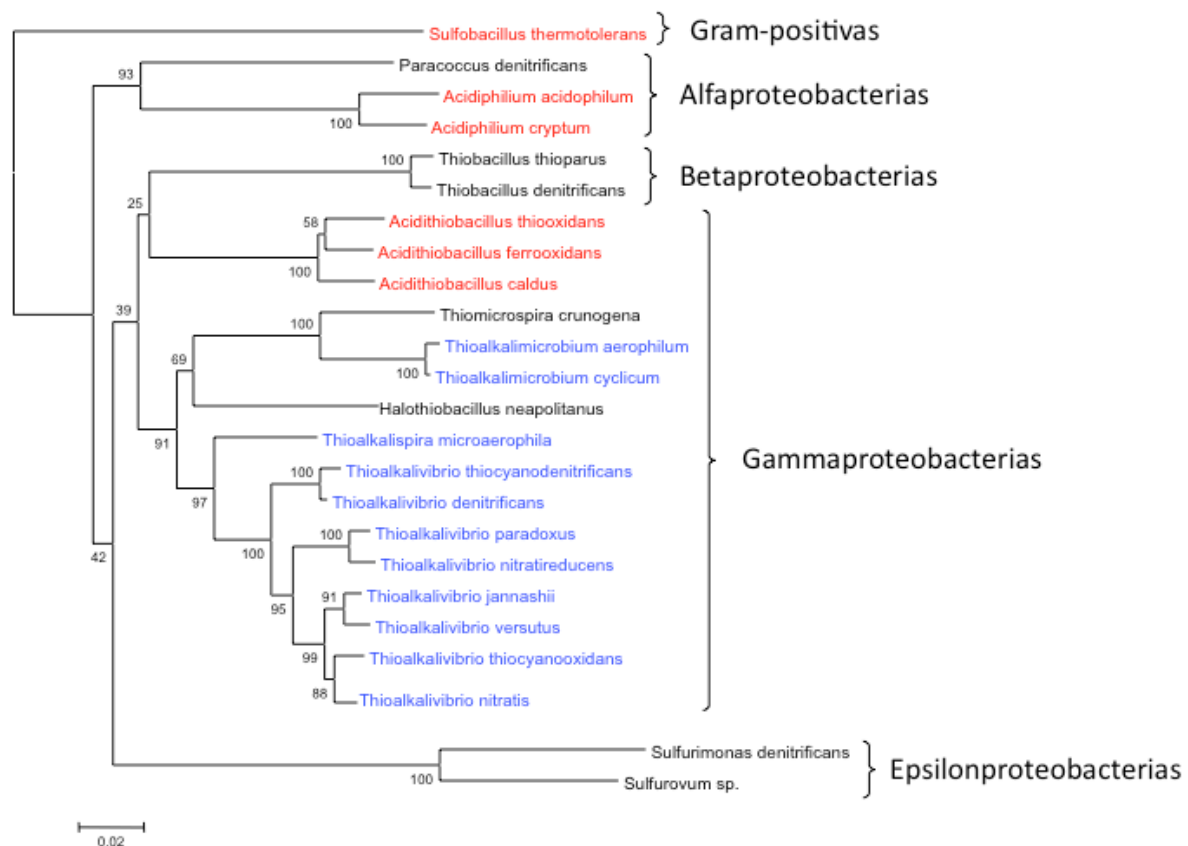


Figura 2. Árbol filogenético basado en el alineamiento de secuencias del gen 16S rRNA de bacterias quimiolitautótrofas sulfoxidantes. Se incluyeron también las secuencias del mixótrofo *Pantotrofus denitrificans* y de heterótrofos del género *Acidiphilium*. En rojo se indican las bacterias acidófilas, en azul las bacterias alcalófilas y haloalcalófilas y, en negro, las neutrófilas.

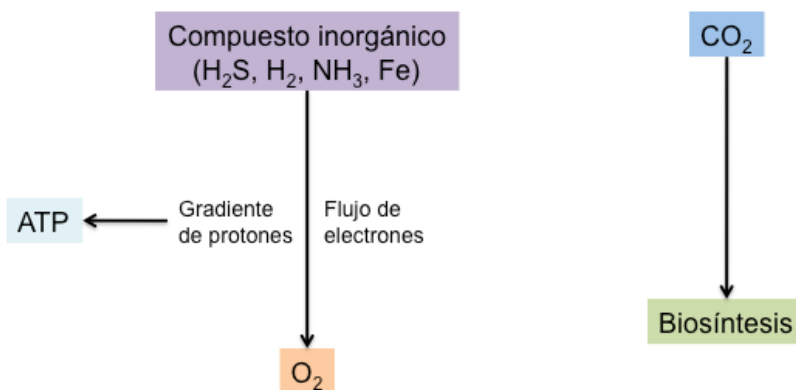
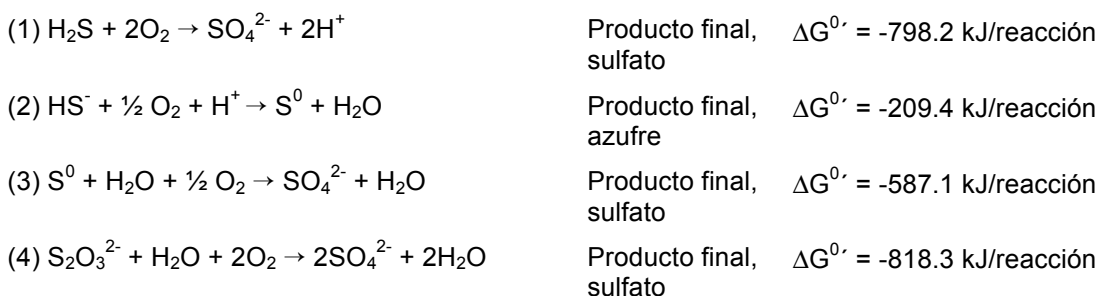


Figura 3. Energía y flujo de carbono en el metabolismo quimiolitotrofo (adaptado de [6]).

Los compuestos de azufre más comunes que pueden ser utilizados como fuentes de energía son el H₂S, el S⁰ y el S₂O₃²⁻. En la mayoría de los casos, el producto final de la oxidación del H₂S es el SO₄²⁻ y el cambio de estado de oxidación es de 8. Se libera menos energía cuando se utilizan compuestos de azufre con estados de oxidación intermedios [6]:



Las bacterias sulfoxidantes quimiolitotrofas se desarrollan óptimamente en una amplia variedad de hábitats, a altas temperaturas y condiciones ácidas (exclusivamente termófilos Gram positivos del género *Sulfobacillus*) y en condiciones mesofílicas a pH ácido, neutro o alcalino para todas las demás bacterias (Proteobacterias) (Fig. 2 y Tabla II) [7]. La Figura 4 muestra algunas bacterias sulfoxidantes quimiolitotrofas y los hábitats en donde se desarrollan.

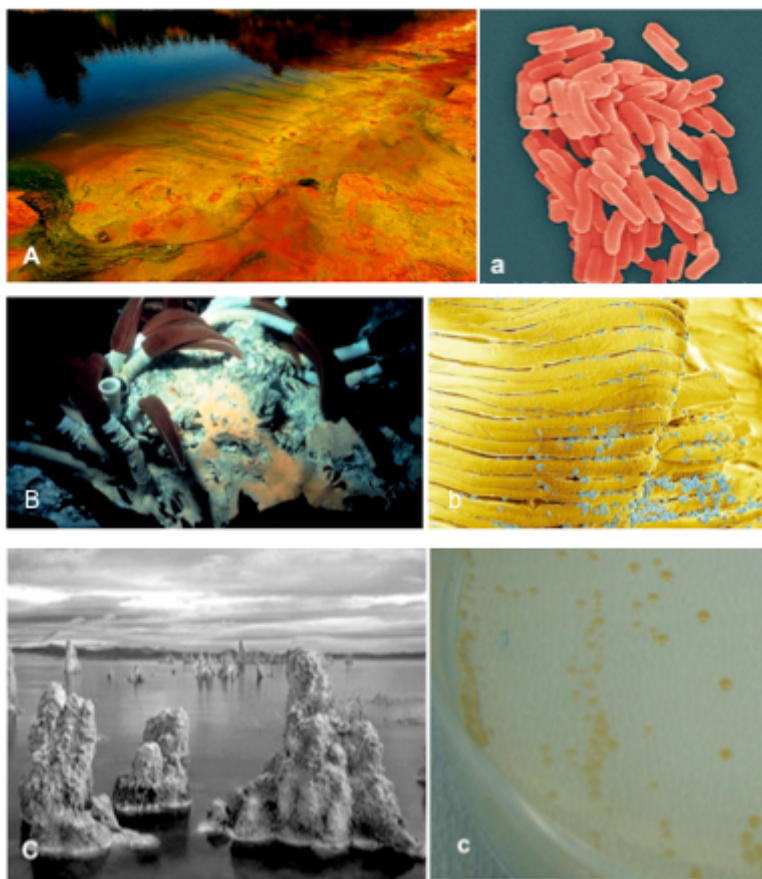


Figura 4. Distintos hábitats donde se desarrollan bacterias quimiolitotróficas sulfoxidantes. A) Río Tinto, España, a) micrografía de *Aciditobacillus ferrooxidans*; B) Fuentes hidrotermales, b) en azul bacterias sulfoxidantes endosimbióticas de gusanos anélidos; C) Lago Mono, EU, c) morfología colonial de *Thioalkalivibrio jannaschii*.

Recientemente tres nuevos géneros de bacterias quimiolitotróficas sulfoxidantes han sido descritos provenientes de lagos alcalino-sódicos de Asia Central, África y América del Norte: *Thioalkalimicrobium*, *Thioalkalivibrio* y *Thioalkalispira* [8]. Estos organismos son distintivos por su capacidad para crecer a pH mayores a 9 y tener actividad sulfoxidante hasta pH 11. Otra característica de estos organismos es su capacidad de crecer en ambientes salinos con concentraciones de hasta 4 M de Na^+ total. Actualmente, se estudia la capacidad del género *Thioalkalivibrio* para oxidar H_2S en condiciones haloalcalófilas, por su alto potencial para aplicarse en un proceso biotecnológico de remoción de HS^- en corrientes gaseosas [9]. Organismos similares han sido recientemente aislados en México a partir de muestras de sedimentos y aguas del ex-Lago de Texcoco en el Estado de México [10].

La Figura 5 muestra la morfología colonial de algunas bacterias quimiolitotróficas aisladas de ambientes neutros y ácidos en concreto corroído del Sistema de Drenaje Profundo de la Ciudad de México así como en condiciones haloalcalófilas en aguas y sedimentos del ex-Lago de Texcoco. En algunas tomas se puede apreciar la acumulación de S^0 de color blanco o amarillento en las colonias.

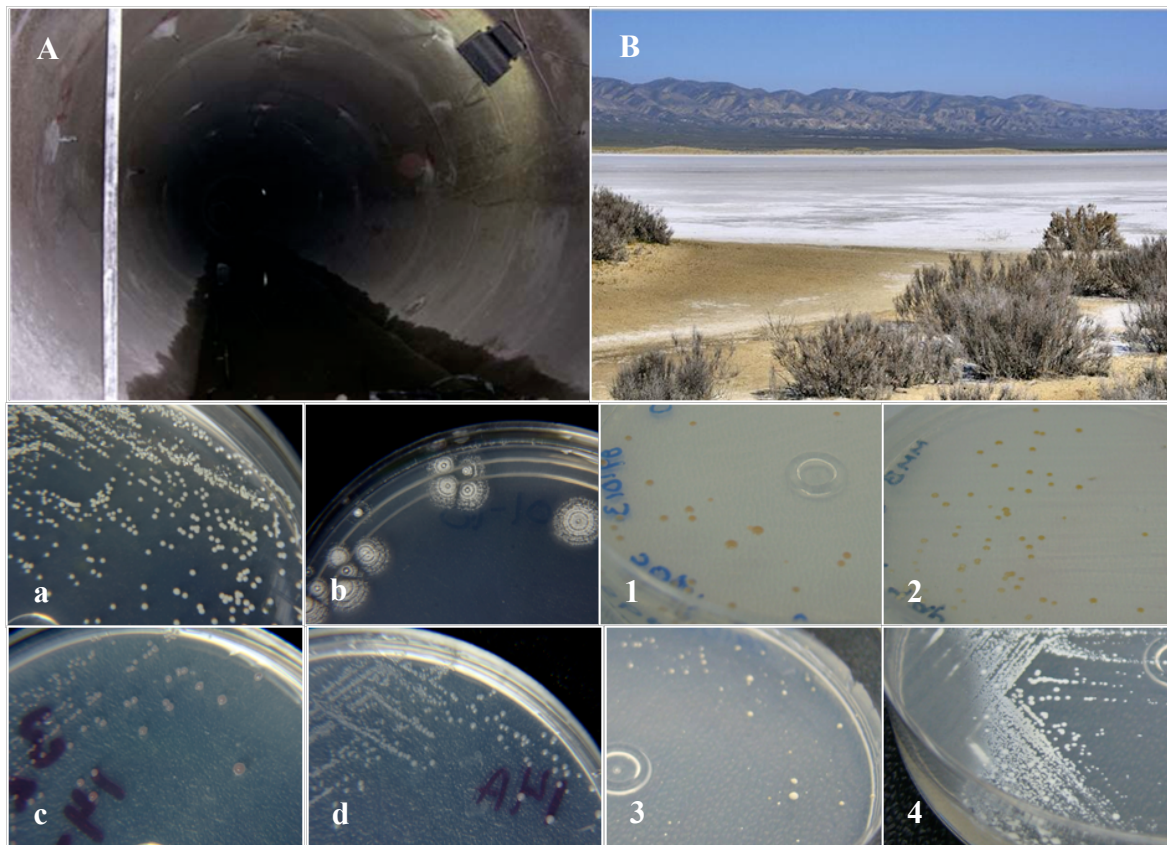


Figura 5. Sitios de muestreo y bacterias quimiolitotórficas aisladas de ambientes ácidos, neutros y alcalinos de México. A) Emisor central del Sistema de Drenaje Profundo de la Ciudad de México; (a) y (b) Aislados de muestras de concreto corroído en medio para neutrófilas; (c) y (d) Aislados de muestras de concreto corroído en medio para acidófilas. B) Ex - lago de Texcoco. (1), (2), (3) y (4) Aislados de sedimentos y aguas alcalinas en medio para bacterias haloalcalófilas.

El S^0 puede ser formado por diversas bacterias sulfoxidantes (Tabla II). El S^0 producido por estos microorganismos puede almacenarse en glóbulos de azufre, situados dentro o fuera de la célula. Los glóbulos de azufre excretados son partículas coloidales estabilizadas contra la agregación por repulsión electrostática. El S^0 formado tiene algunas propiedades que lo diferencian claramente con respecto al S^0 inorgánico. La densidad de las partículas es, por ejemplo, más baja que la densidad del azufre inorgánico y las partículas de azufre producidas biológicamente tienen características hidrofílicas mientras que el azufre ortorrómbico (S_8) se conoce por ser hidrofóbico [11].

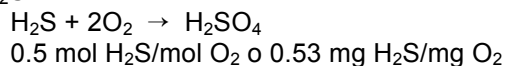
Tabla II. Características fisiológicas de algunas bacterias quimiolitotrofas sulfoxidantes de importancia aplicada.

Organismo	T óptima (°C)	pH óptimo	Glóbulos de azufre	Importancia
Bacterias Gram positivas				
Diversas especies de <i>Sulfobacillus</i>	40	1.2-2.4	No reportado	Extracción de metales en minería
Betaproteobacteria				
<i>Thiobacillus denitrificans</i>		6.8 – 7.4	Extracelulares, finamente dispersados	Tratamiento de la contaminación de aguas por compuestos de azufre y nitratos en condiciones anóxicas
<i>Thiobacillus thioparus</i>		6-8	Extracelulares	Tratamiento de emisiones gaseosas contaminadas con azufre
Gammaproteobacteria				
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	25 - 30	2-6	Extracelulares	Drenaje ácido de minas, extracción de metales, corrosión de metales y concreto
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>		2-5	Extracelulares	Drenaje ácido de minas, extracción de metales, corrosión de concreto
<i>Thioalkalivibrio</i> sp.		7.5-10.5	Extracelular	Tratamiento de biogás y emisiones gaseosas contaminadas con azufre

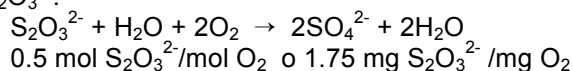
Actividad sulfoxidante

La técnica de respirometría se basa en el consumo de O₂ como una medida indirecta de la actividad sulfoxidante de las bacterias. Los cálculos de las tasas relativas de oxidación a partir de la velocidad de consumo del O₂ (qO₂) consideran los siguientes factores de la relación sustrato azufrado/O₂ de acuerdo a la estequiometría de la oxidación:

Para H₂S:



Para S₂O₃²⁻:



En las figuras 4 y 5 se muestra el efecto del $S_2O_3^{2-}$ y del HS^- como fuentes de energía en el consumo de O_2 para *Thiomicrospira crunogena* TH-55 y *Halothiobacillus neapolitanus* c2. En los resultados presentados, el efecto de la oxidación química de los compuestos azufrados fue restado de la velocidad de reacción global. *T. crunogena* es una bacteria originaria de fosas marinas hidrotermales profundas. Es la bacteria quimiolitotrofa con la tasa de crecimiento más alta reportada hasta ahora. *H. neapolitanus* c2 es procedente de aguas azufradas. Es la bacteria modelo en estudios de estructura y función de carboxisomas. Estas dos bacterias tienen su genoma completamente secuenciado.

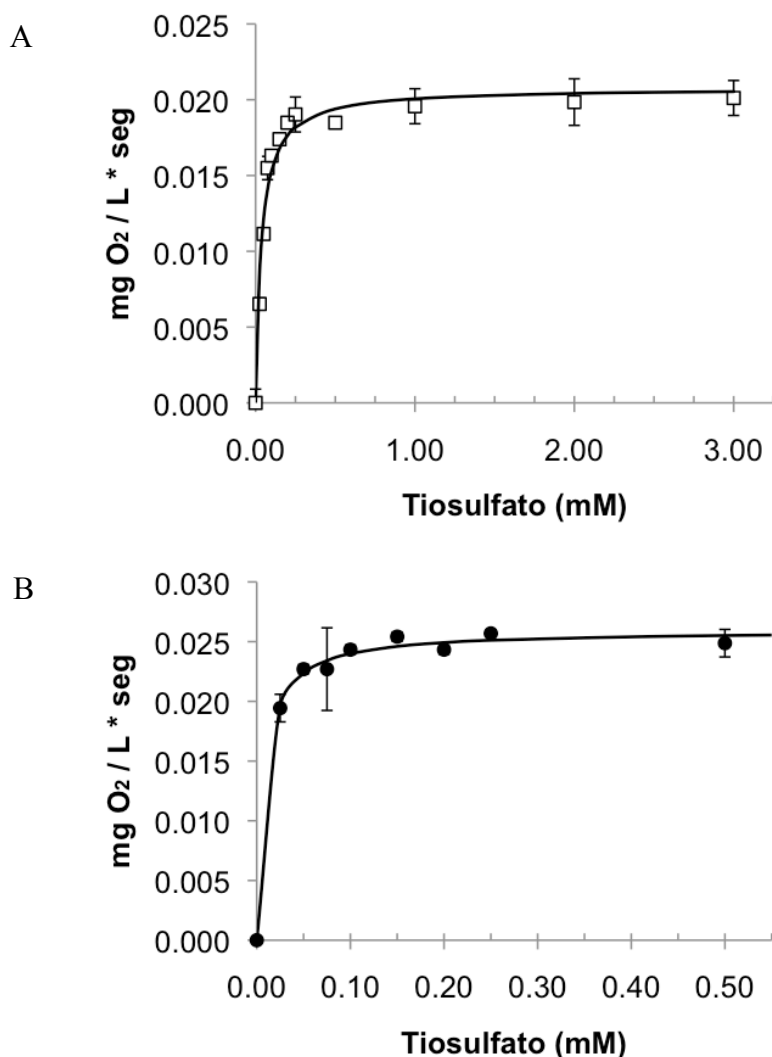


Figura 6. Consumo de O_2 para (A) *T. crunogena* TH-55 y (B) *H. neapolitanus* c2 en presencia de $S_2O_3^{2-}$.

Al incrementar la concentración de $S_2O_3^{2-}$ en el intervalo de 0 a 0.1 mM, las qO_2 tienen un comportamiento de orden 1 mientras que al incrementar la concentración de 0.25 a 3 mM, las tasas se mantienen constantes (reacción de orden cero), debido a la saturación de los sistemas enzimáticos (Fig. 6). No se presentó inhibición en presencia de este compuesto azufrado.

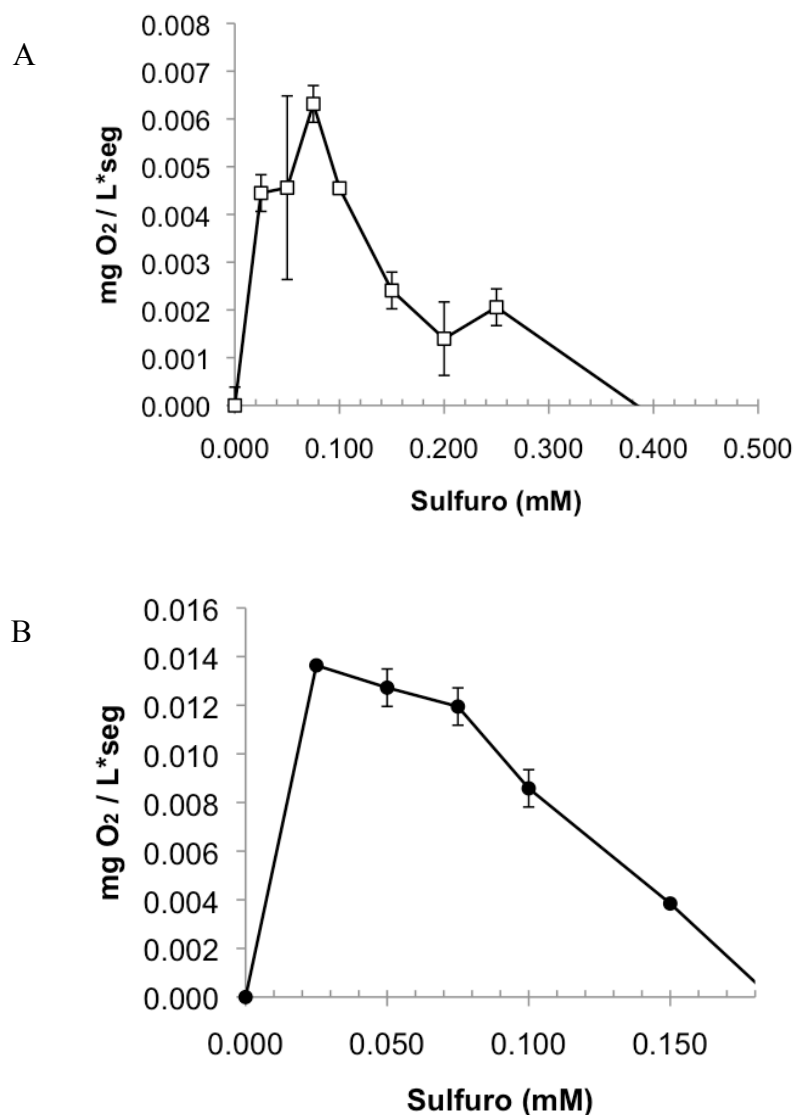


Figura 7. Consumo de O₂ para (A) *T. crunogena* TH-55 (□) y (B) *H. neapolitanus* c2 (●) en presencia de HS⁻.

A concentraciones de HS⁻ mayores a 0.025 mM para *H. neapolitanus* c2 y mayores a 0.075 mM para *T. crunogena* TH-55 se presenta un efecto inhibitorio de la oxidación (Figura 7). El HS⁻ es un inhibidor del crecimiento celular debido a que reacciona con metales, en particular con el hierro contenido en los citocromos [12].

El sulfuro es un compuesto volátil en condiciones ácidas y muy soluble como sales (HS⁻ y S²⁻) en agua en condiciones alcalinas. Por lo tanto, es interesante llevar a cabo la sulfoxidación en condiciones alcalinas. Con el fin de obtener bacterias sulfoxidantes alcalófilas para la oxidación del sulfuro, se buscó un punto de muestreo a nuestro alcance, el ex-Lago de Texcoco, que presenta las características de un lago alcalino-sódico. El consorcio C1 se obtuvo mediante

un proceso de enriquecimiento a partir de la mezcla de muestras de suelos del ex-Lago de Texcoco, en un medio mineral específico para bacterias alcalófilas quimiolitotrofas sulfoxidantes (con $S_2O_3^{2-}$ como donador de electrones y un amortiguador de carbonatos de pH 10.2) [13]. El efecto del pH sobre la actividad sulfoxidante del consorcio C1 en presencia de $S_2O_3^{2-}$ o HS^- se estudió por respirometría a distintos valores de pH (Fig. 8).

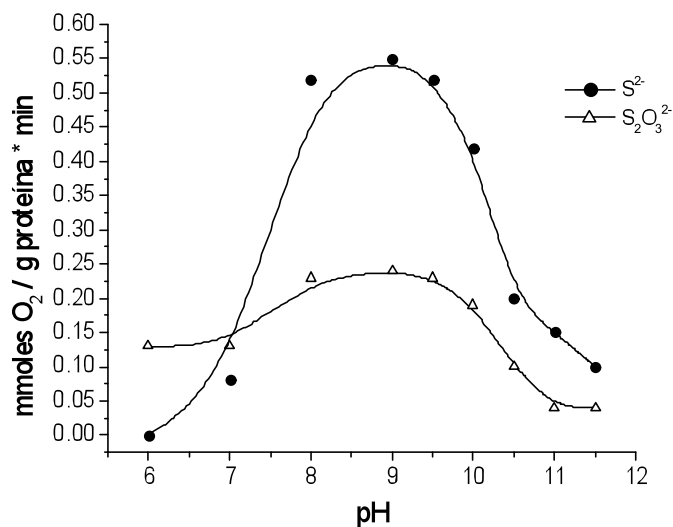


Figura 8. Efecto del pH sobre el consumo de O_2 por el consorcio C1 en presencia de $S_2O_3^{2-}$ y S^{2-} .

Como se observa en la figura anterior, tanto para el HS^- como para el $S_2O_3^{2-}$ la qO_2 más alta se encontró en un pH de 9.0, lo cual es consistente con los valores óptimos de pH reportados para los géneros descritos de bacterias alcalófilas quimiolitotrofas sulfoxidantes que tienen un intervalo óptimo de actividad sulfoxidante entre pH 9.0 y 10.2 [14].

Se muestra ahora el efecto del $S_2O_3^{2-}$ (Fig. 9) y del HS^- (Fig. 10) como fuentes de energía en la actividad sulfoxidantes del consorcio C1. Al incrementar la concentración de $S_2O_3^{2-}$ en el intervalo de 0 a 0.3 mM, la tasa de consumo de O_2 tiene un comportamiento de orden 1. Al incrementar la concentración de 0.3 a 5 mM, las tasas de consumo de O_2 se mantienen constantes (reacción de orden cero), debido a la saturación de los sistemas enzimáticos. No se presenta inhibición de la actividad sulfoxidante con este compuesto azufrado. En presencia de HS^- se presenta una inhibición de la actividad sulfoxidante. Los resultados indican que al aumentar la concentración de 0 a 0.3 mM, el comportamiento es de orden 1. Mientras que en el intervalo de concentración de 0.3 a 1.5 mM, la reacción es de orden cero. Finalmente a una concentración mayor a 1.5 mM se presenta un efecto inhibitorio de la oxidación.

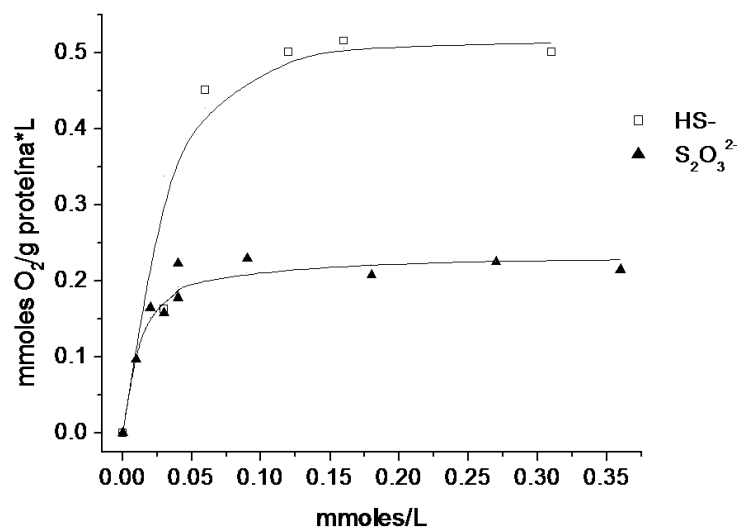


Figura 9. Capacidad sulfoxidante del consorcio C1 con S₂O₃²⁻.

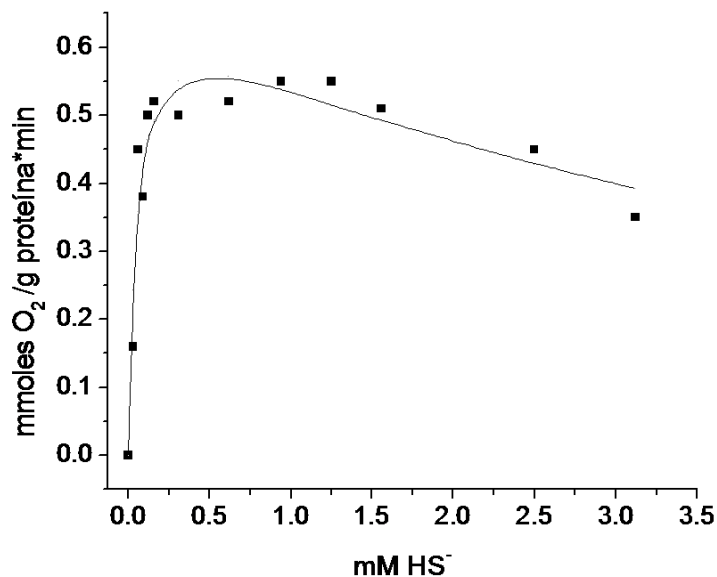


Figura 10. Capacidad sulfoxidante del consorcio C1 con HS⁻.

Relevancia ambiental y biotecnología

Si bien el azufre es esencial para la vida celular, este elemento forma también parte de importantes problemas ambientales, como consecuencia de un desequilibrio de su ciclo biogeoquímico natural, debido a emisiones antropogénicas excesivas de compuestos azufrados que rebasan la capacidad de la naturaleza para degradarlos [5,15]. Entre los compuestos de azufre de mayor importancia que se emiten a la atmósfera se encuentran diversos compuestos inorgánicos como el dióxido de azufre (SO₂), el sulfuro (H₂S) y el disulfuro de carbono (CS₂).

Cerca de un tercio de todos los compuestos de azufre, y 99% del SO_2 , que llegan a la atmósfera provienen de las actividades humanas.

El H_2S es un importante contaminante ambiental, que pese a los esfuerzos globales se encuentra entre los compuestos reducidos de azufre más emitidos al medio ambiente. El H_2S es un gas incoloro altamente reactivo, corrosivo y tóxico, con olor característico a huevos podridos. El H_2S se encuentra de forma natural en los gases de los volcanes, manantiales de azufre, emanaciones de grietas submarinas, pantanos, petróleo crudo, gas natural y como producto de la degradación biológica anaerobia de la materia orgánica en pantanos, ciénagas y llanuras cubiertas por las mareas. Las fuentes industriales engloban a una gran cantidad de industrias: producción y transporte de petróleo y gas, refinerías, plantas de gas natural, plantas petroquímicas, hornos de coque, industria alimentaria, industria del papel, curtidurías, plantas depuradoras de aguas residuales, etc. [15]. Además de estos efectos, es nocivo para las vías respiratorias y produce olores que afectan a la calidad de vida de las personas. Por otra parte, sus propiedades corrosivas ocasionan daños en infraestructura industrial tanto en procesos donde se libera este gas, como en aquellos procesos diseñados para removerlo, provocando indirectamente el deterioro de paredes de concreto en plantas de tratamiento de aguas, reactores y sistemas de drenaje; corroyendo tuberías, tanques, válvulas y bombas de acero. Por lo que la eliminación y manejo del H_2S , es tanto un problema de salud, ambiental y alto impacto económico.

La emisión de H_2S en los sistemas de drenaje debido a la actividad de las bacterias sulfato-reductoras esta indirectamente asociada a la corrosión del concreto (Fig. 11).

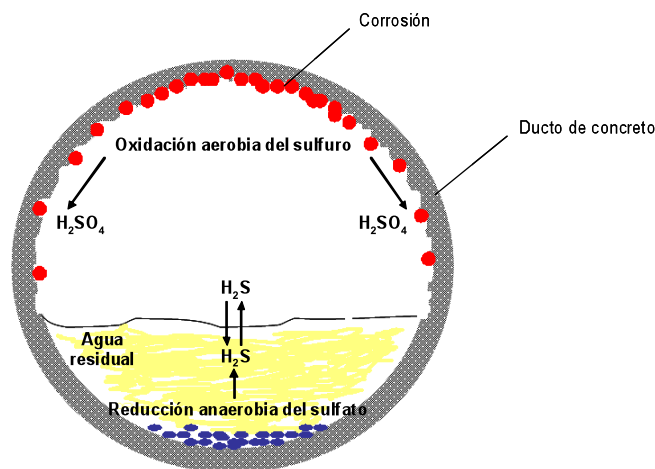


Figura 11. Sección transversal mostrando la corrosión de un ducto de drenaje debido a la acción de microorganismos.

El H_2S es poco soluble en soluciones ácidas como los son las aguas residuales (pH 5-6) y por lo tanto el H_2S generado por sulfatoreducción en las aguas residuales, ricas en materia orgánica, es emitido del agua hacia al espacio libre del ducto. El concreto es un material alcalino y el H_2S es mucho más soluble en condiciones alcalinas y se disuelve en el condensado formado sobre la superficie del concreto expuesto donde será convertido en SO_4^{2-} por bacterias quimilolitoautótrofas sulfoxidantes neutrófilas y posteriormente acidófilas. El SO_4^{2-} producido al combinarse con agua forma ácido sulfúrico (H_2SO_4) que acidifica progresivamente el concreto y lo disuelve formando yeso y etringita ($3\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{CaSO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ o $3\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot 3\text{CaSO}_4\cdot 31\text{H}_2\text{O}$) que se expande provocando la formación de fisuras y picaduras hasta debilitar la integridad estructural de los ductos y conducir a eventuales fallas y posible colapso. Este fenómeno se conoce como corrosión del concreto inducida por microorganismos. En este caso es deseable encontrar soluciones para inhibir la actividad sulfoxidantes de los microorganismos. La velocidad

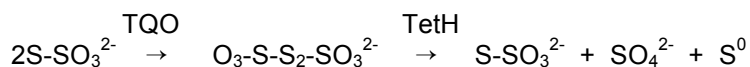
de corrosión del concreto en ductos de drenaje puede ser de 1 a 10 mm por año, lo cual puede reducir el tiempo de vida de estos sistemas a menos de 30 años en lugar de los 80-100 años que podrían ser útiles. En el condado de Los Ángeles (EU) un 10% de los ductos de drenaje son sujetos a este tipo de corrosión [16]. Hemos realizado estudios preliminares a partir de muestras de concreto corroído tomadas en diferentes puntos del Sistema de Drenaje Profundo de la Ciudad de México en el año 2008. El pH de las muestras de concreto se registró entre 7 y 2, los valores más bajos se obtuvieron para los concretos más deteriorados, donde la corrosión del concreto fue tan extensa que dejaba totalmente expuestas las barras de refuerzo del concreto. Se detectó la presencia y actividad de bacterias sulfoxidantes neutrófilas en prácticamente todas las muestras y de bacterias sulfoxidantes y oxidantes de hierro acidófilas en las muestras más ácidas (Tabla II). Los valores de pH encontrados y la presencia de bacterias sulfoxidantes muestran que el concreto del Sistema de Drenaje Profundo presenta una corrosión química y microbiológica avanzada.

Los sulfuros suelen oxidarse espontáneamente cuando se encuentran en soluciones acuosas en presencia de oxígeno. La velocidad de la reacción depende de la relación molar sulfuro-oxígeno, del pH, de la temperatura, de la fuerza iónica y de la presencia de catalizadores o inhibidores [4, 17]. Como intermediarios de la oxidación se producen principalmente S^0 , polisulfuros, sulfito y politionatos [17]. Sin embargo, en muchos casos la velocidad de las reacciones biológicas puede llegar a ser de 100 a 1000 veces mayor que las químicas [5]. Es por esta razón que en las últimas décadas los procesos biológicos para la eliminación de H_2S en efluentes industriales se han convertido en un complemento y alternativa para los procesos fisicoquímicos. Estos bioprocesos se basan en la capacidad de bacterias quimiolitautótrofas para oxidar los compuestos reducidos de azufre como el H_2S , produciéndose azufre S^0 o SO_4^{2-} (Tabla II). En estos procesos, es preferible la formación de S^0 debido a que es menos dañino que el SO_4^{2-} que formará H_2SO_4 , requiere menos neutralizante, además de que es fácil de separar por sedimentación [14,15]. Estos bioprocesos son aplicaciones benéficas del ciclo del azufre.

Enzimas y rutas metabólicas de oxidación del azufre en bacterias quimiolitautótrofas

El amplio rango de estados de oxidación del azufre (de -2 a +6) ha propiciado la aparición de una gran variedad de enzimas redox capaces de transformar diferentes compuestos de azufre. El $S_2O_3^{2-}$, uno de los compuestos reducidos de azufre inorgánico más abundante, juega un papel importante en el ciclo del azufre y es el sustrato comúnmente oxidado por todas las bacterias sulfoxidantes.

El proceso de degradación del tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$) vía tetratonato ($O_3S-S_2-SO_3^-$) como intermediario implica a las enzimas tiosulfato quinona oxidorreductasa (TQO) y tetratonato hidrolasa (TetH), que parecen ser comunes en las bacterias que viven en hábitats extremos ácidos como *Acidithiobacillus ferrooxidans* [18]:



La secuencia del genoma completo de *Acidithiobacillus thiooxidans* no ha sido publicada aún por lo que no se sabe si este microorganismo comparte esta ruta metabólica para la oxidación del $S_2O_3^{2-}$.

El sistema multienzimático Sox, estudiado en la bacteria mesoneutrófila *Paracoccus denitrificans*, es común en Alfaproteobacterias fotó- y quimiótrofas que convierten el $S_2O_3^{2-}$ a SO_4^{2-} sin la formación del glóbulos de azufre como intermediario libre [19]. El modelo actual del sistema enzimático Sox abarca cuatro complejos periplasmáticos SoxXA, SoxYZ, SoxB y Sox(CD)₂ que oxidan el $S_2O_3^{2-}$ según el siguiente mecanismo (Fig. 12): SoxXA cataliza la transferencia oxidativa y covalente del azufre sulfano del $S_2O_3^{2-}$ ($S-SO_3^{2-}$) a la cisteína de la

proteína acarreadora de sustrato SoxYZ. El grupo sulfona (SO_3^{2-}) del $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ es posteriormente hidrolizado por la hidrolasa SoxB, produciendo SO_4^{2-} y posteriormente el grupo sulfano es oxidado a sulfona por Sox(CD)₂ e hidrolizado otra vez por SoxB de tal modo que es restaurado el complejo SoxYZ. La filogenia del gen *soxB*, que codifica para la tiosulfato hidrolasa, ha sido estudiada y refleja la filogenia obtenida usando como marcador el gen 16S rRNA [20,21].

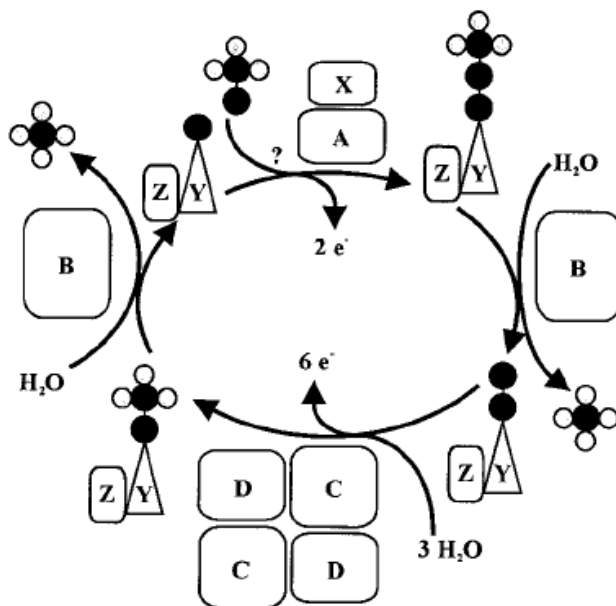
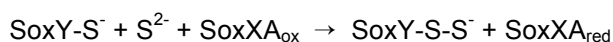


Figura 12. Sistema multienzimático Sox de *P. denitrificans* (tomado de [19]). Los círculos sólidos representan átomos de azufre y los círculos vacíos átomos de oxígeno.

Los pasos detallados de la oxidación del $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ son:

- (1) $\text{SoxY-S}^- + \text{S-SO}_3^- + \text{SoxXA}_{\text{ox}} \rightarrow \text{SoxY-S-S-SO}_3^- + \text{SoxXA}_{\text{red}}$
- (2) $\text{SoxY-S-S-SO}_3^- + \text{H}_2\text{O} + \text{SoxB} \rightarrow \text{SoxY-S-S}^- + \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{SoxB}$
- (3) $\text{SoxY-S-S}^- + \text{H}_2\text{O} + \text{SoxCD}_{\text{ox}} \rightarrow \text{SoxY-S-SO}^- + 2\text{H}^+ + \text{SoxCD}_{\text{red}}$
- (4) $\text{SoxY-S-SO}^- + \text{H}_2\text{O} + \text{SoxCD}_{\text{ox}} \rightarrow \text{SoxY-S-SO}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{SoxCD}_{\text{red}}$
- (5) $\text{SoxY-S-SO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + \text{SoxCD}_{\text{ox}} \rightarrow \text{SoxY-S-SO}_3^- + 2\text{H}^+ + \text{SoxCD}_{\text{red}}$
- (6) $\text{SoxY-S-SO}_3^- + \text{H}_2\text{O} + \text{SoxB} \rightarrow \text{SoxY-S}^- + \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{SoxB}$

El H_2S y el S^0 pueden ser oxidados por este sistema enzimático con la siguiente primera reacción inicial y los pasos siguientes son los mismos que para el $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$:



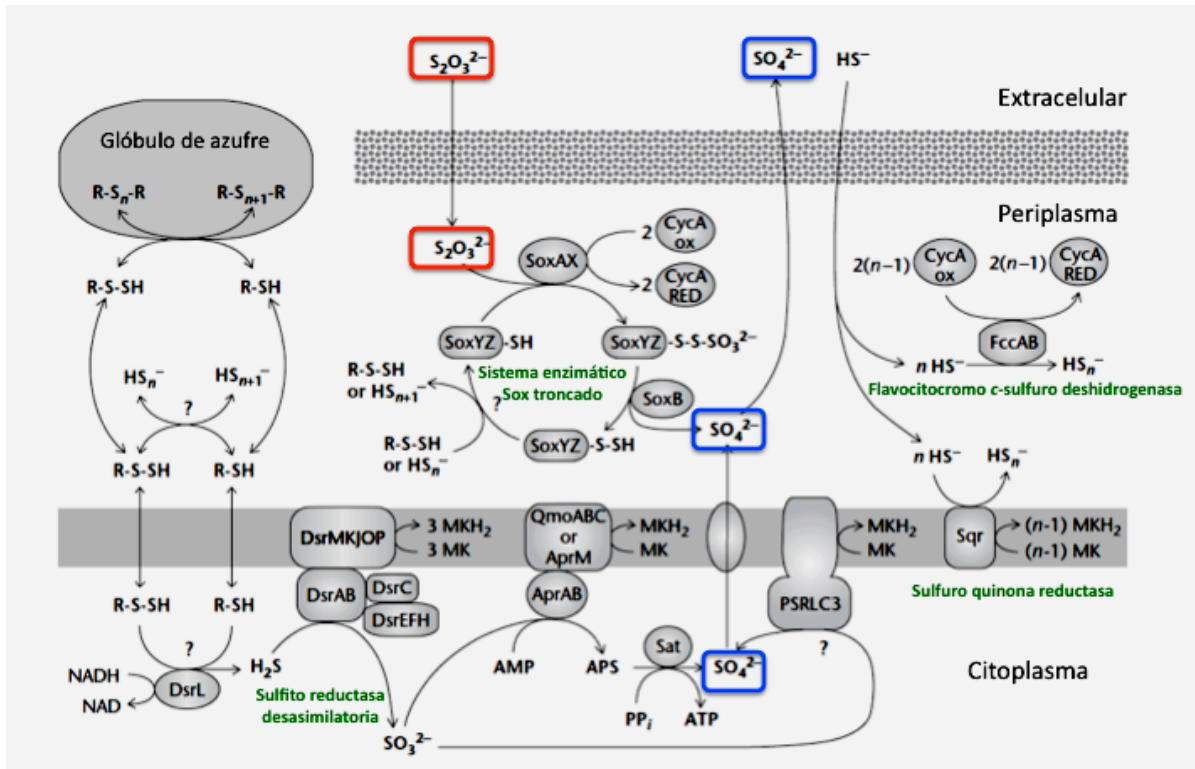


Figura 13. Posibles rutas metabólicas propuestas para la oxidación de compuestos reducidos de azufre inorgánicos. Es probable que no todas las rutas y enzimas estén presentes en un solo organismo (adaptado de [7]).

La ruta ramificada de oxidación del $S_2O_3^{2-}$ fue propuesta para aquellas bacterias que forman glóbulos de azufre intra- o extracelulares durante la oxidación del $S_2O_3^{2-}$. Esta ruta procede vía la interacción de dos sistemas enzimáticos espacialmente separados: un sistema Sox truncado sin SoxCD y proteínas codificadas en el *locus* de la sulfito reductasa desasimilatoria (Dsr) (Fig. 13). SoxXA acoplaría el $S_2O_3^{2-}$ a SoxYZ y SoxB liberaría una molécula de SO_4^{2-} de acuerdo a los pasos (1) y (2) descritos arriba para la oxidación del $S_2O_3^{2-}$ por el sistema Sox completo. Debido a la falta de SoxCD, el complejo SoxY-S-S- sería transferido a glóbulos de azufre. La oxidación del azufre almacenado en los glóbulos procedería vía la participación de las enzimas Dsr para liberar H_2S , SO_3^{2-} y finalmente SO_4^{2-} en una ruta metabólica inversa a la ruta de la sulfato-reducción.

La presencia de las proteínas Dsr y de proteínas relacionadas con la sulfato-reducción (Apr) así como la ausencia de SoxCD, ha sido generalmente detectada en bacterias que almacenan azufre [21]. Es el caso de *T. denitrificans*, donde se han podido detectar estas proteínas a partir de la secuencia completa del genoma de este microorganismo acumulador de azufre [22]. Sin embargo no es siempre el caso ya que, por ejemplo, *T. crunogena* posee el complejo Sox completo y no tiene las proteínas Dsr a pesar de que acumula azufre. En el caso de *T. thioparus*, que también acumula altas cantidades de azufre, se ha detectado la presencia de los genes que codifican para SoxB, DsrAB y AprAB por PCR, aunque no se ha reportado explícitamente la ausencia de SoxCD [20,22,23,24]. Recientemente se hizo pública, en el GenBank, la secuencia del genoma completo de dos cepas de *Thioalkalivibrio* sp. (HL-EbGR7 y K90mix) en la que hemos podido detectar la presencia de proteínas emparentadas con SoxZ, SoxY, SoxA y Dsr, por lo que en este género la oxidación de compuestos azufrados y la

acumulación de glóbulos de azufre podría ser mediante una ruta ramificada de oxidación del $S_2O_3^{2-}$.

Algunas bacterias quimiolitotóxicas utilizan una flavocitocromo c-sulfuro deshidrogenasa (Fcc) o una sulfuro quinona reductasa (Sqr) para oxidar H_2S a S^0 (Fig. 13). La Fcc no parece ser esencial para el crecimiento en presencia de H_2S [19]. Se han encontrado los genes *sqr* en una amplia variedad de bacterias quimiolitotóxicas incluyendo *A. ferrooxidans*, *T. denitrificans* y *T. crunogena* [25]. La enzima Sqr ha sido propuesta como la enzima potencialmente responsable de la oxidación de sulfuro en una amplia variedad de organismos con excepción de las plantas; esta oxidación es importante para la circulación global del sulfuro y del carbono en la interfaz óxica-anóxica de varios ambientes, así como para la tolerancia a H_2S y su detoxificación [25,26]. La menor tolerancia de *H. neapolitanus* al H_2S , comparado con *T. crunogena* (Fig. 7), quizás se debe a que no se ha detectado la presencia de Sqr al analizar el genoma completo de este microorganismo.

A. ferrooxidans puede consumir el S^0 de la siguiente manera [7]: El S^0 es activado por glutatión en forma de glutatión-sulfuro (G-SH). Este sulfuro es oxidado en el periplasma por una sulfuro dioxigenasa, produciendo sulfito que es posteriormente oxidado a sulfato por una sulfito deshidrogenasa.

La información sobre los detalles moleculares, genes, enzimas y rutas metabólicas implicadas en la oxidación de compuestos reducidos de azufre por bacterias quimiolitotóxicas de importancia aplicada es aun limitada. Estos microorganismos producen diferentes tipos de enzimas para metabolizar los compuestos azufrados. Un trabajo reciente con Gammaproteobacterias oxidantes de azufre simbiotes de moluscos mostró que, independientemente de las condiciones ambientales (aeróbico, semióxico, anaerobio), todos los genes que codifican para Dsr, Apr, SoxB, Sqr y Sat (Fig. 13) están expresándose al mismo tiempo, indicando que todas las rutas metabólicas de oxidación de azufre funcionan simultáneamente en estos organismos [27]. Un mejor conocimiento de estas enzimas y rutas permitiría mejorar las actividades catalíticas en bioprocesos benéficos (tratamiento de la contaminación por compuestos azufrados) o bien inhibirlas cuando tienen consecuencias negativas (corrosión).

Referencias

1. Maier, R.M. (2009) In *Environmental Microbiology* 2nd Ed. (Maier, R.M., Pepper, I.L. y Gerba, C.P., eds) pp. 287-318, Academic Press, San Diego, CA
2. Atlas, R. M. y Richard, B. (2002). *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*, Pearson Educación, Madrid
3. Brüser, T., Lens, P. y Truper, H. (2000). The biological sulfur cycle. In *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution – Principles and Engineering* (Lens, P. N. L y Hulshoff Pol, L., eds) pp. 47-85, International Water Association
4. Steudel, R. (2000). The chemical sulfur cycle. In *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution – Principles and Engineering* (Lens, P. N. L y Hulshoff Pol, L., eds) pp. 1-31, International Water Association, London
5. Lens, P. N. L. y Kuenen, J. G. (2001) *Water Sci. Technol.* **44**, 57-66
6. Madigan, M.T. y Martinko, J.M. (2006) *Biology of microorganisms*, Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ
7. Dhal, C., Friedrich, C. y Kletzin, A. (2008) Sulfur oxidation in prokaryotes. In *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, John Wiley & Sons, Chichester
8. Sorokin, D. Y. y Kuenen, J. G. (2005) *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 685-702

9. Sorokin, D. Y., van den Bosch, P. L. F., Abbas B., Janssen, A. J. H. y Muyzer, G. (2008) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**, 965–975
10. Granada, C., Revah, S. y Le Borgne, S. (2009) *Adv. Mat. Res.* **71-73**, 137-140
11. Kleinjan, W. (2005) Biologically produced sulfur particles and polysulfide ions: Effects on a biotechnological process for the removal of hydrogen sulfide from gas. Tesis de Doctorado Wageningen Universiteit, Holand
12. O'Flaherty, V. y Collieran, E. (2000). Sulfur problems in anaerobic digestion. In *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution – Principles and Engineering* (Lens, P. N. L y Hulshoff Pol, L., eds) pp. 467-489, International Water Association, London.
13. Sorokin, D. Y., Lysenko, A. M., Mityushina, L. L., Tourova, T. P., Jones, B. E., Rainey L. A. y Kuenen G. J. (2001). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **51**, 565-580
14. Sorokin, D. Y., Robertson, L. A. y Kuenen, J. G. (2000). *Antonie Van Leeuwenhoek* **77**, 251-262
15. Janssen, A. J. H., Ruitenberg, R. y Buisman, C.J.N. (2001). *Water Sci. Technol.* **44**, 85-90
16. Zhang, L., De Schryver, P., De Gussemé, B., De Muynck, W., Boon, N. Y. y Verstraete, W. (2008) *Water Res.* **42**, 1-12
17. González-Sánchez, A. y Revah, S. (2007) *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 292–298
18. Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Jedlicki, E., Holmes, D.S. y Bonnefoy, V. (2009) *BMC Genomics* **10**, 394-413
19. Friedrich, C. G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A. y Fischer J. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2873-2882
20. Petri, R., Podgorsek, L. y Imhoff J.F. (2001) *FEMS Microbiol. Lett.* **197**, 171-178
21. Meyer, B., Imhoff, J.F. y Kuever, J. (2007) *Environ. Microbiol.* **9**, 2957-2977
22. Beller, H.R., Chain, P.S., Letain, T.E., Chakicherla, A., Larimer, F.W., Richardson, P.M., Coleman, M.A., Wood, A.P. y Kelly, D.P. (2006) *J. Bacteriol.* **188**, 1473-1488
23. Loy, A., Duller, S., Baranyi, C., Mußmann, M., Ott, J., Sharon, I., Béjà, O., Le Paslier, D., Dahl, C. y Wagner M. (2009) *Environ. Microbiol.* **11**, 289–299
24. Meyer, B. Y Kuever, J. (2007) *Microbiology* **153**, 3478–3498
25. Pham, V, H., Yong, JJ., Park, SJ., Yonn, DN., Chung, WH. y Rhee, SK (2008) *Microbiology* **154**, 3112-3121
26. Hell, R., Dahl, C., Knaff, D.B. y Leustek, T. (2008) *Sulfur metabolism in phototrophic organisms*, Springer, Dordrecht, Holanda
27. Harada, M., Yoshida, T., Kuwahara, H., Shimamura, S., Takaki, Y., Kato, C., Miwa, T., Miyake, H. y Maruyama, T. (2009) *Extremophiles* **13**, 895-903

Semblanza de la Dra. Sylvie Le Borgne



Formación: 1994, Doctorado en Biotecnología – Microbiología, Instituto Nacional de Ciencias Aplicadas de Toulouse, Francia. 1991, Maestría en Biotecnología – Microbiología, Instituto Nacional de Ciencias Aplicadas de Toulouse. 1991, Licenciatura en Ingeniería Bioquímica y Genética Microbiana, Instituto Nacional de Ciencias Aplicadas de Toulouse. Realizó una estancia postdoctoral en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en el laboratorio de los Drs. Fernando Valle y Francisco Bolívar (1994-1997). Trabajó como Investigadora Asociada del Dr. Agustín López-Munguía en el mismo Instituto de Biotecnología (1997-1999). De 1999 a 2005, fue Investigadora del Programa de Biotecnología del Instituto Mexicano del Petróleo. Actualmente, es Profesora Investigadora Titular C del Departamento de Procesos y Tecnología de la UAM Cuajimalpa. Su trabajo ha sido publicado en revistas indexadas de carácter internacional y ha sido también presentado en congresos internacionales. Tiene el nivel I del Sistema Nacional de Investigadores. Obtuvo el Premio Carlos Casas Campillo 2004 por parte de la

Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería otorgado a jóvenes profesionales de menos de 35 años por su contribución al desarrollo de la Biotecnología o de la Bioingeniería en México.