



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

*Iztapalapa*

***“DINÁMICA POBLACIONAL DE UNA BIOPELÍCULA ASOCIADA A LA  
REDUCCIÓN DE SULFATO A SULFURO Y LA OXIDACIÓN PARCIAL  
DEL SULFURO A AZUFRE ELEMENTAL BAJO CONDICIONES  
LIMITADAS DE OXÍGENO DISUELTTO”***

**T E S I S**

Propuesta para obtener el grado de

**Maestro en Biotecnología**

P R E S E N T A:

Uriel Cid Reyes

DIRECTORA:

Mónica A. Méraz Rodríguez

Asesores:

DRA. Ma. DE LOURDES B. CELIS GARCÍA  
DR. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO

MEXICO, D.F.

2012

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”

México D.F., a 07 de Septiembre del 2012

El Honorable Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobó la tesis

*“Dinámica poblacional de una biopelícula asociada a la reducción de sulfato a sulfuro y la oxidación parcial del sulfuro a azufre elemental bajo condiciones limitadas de oxígeno disuelto”*

Que presentó

**I.B.I. Uriel Cid Reyes**

**COMITÉ TUTORAL:**

**Directora:**

Dra. Mónica Alicia Méraz Rodríguez  
UAM-Iztapalapa

**Asesor:**

Dra. Sylvie Le Borgne Le Gall  
UAM-Cuajimalpa

**Asesor:**

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García  
IPICYT-S.L.P.

**Asesor:**

Dr. Francisco José Fernández Perrino  
UAM-Iztapalapa

**JURADO:**

**Presidente:**

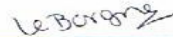
Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



---

**Secretario:**

Dr. Sylvie Le Borgne Le Gall  
Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa



---

**Vocal:**

Dr. Florina Ramírez Vives  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



---

**Vocal:**

Dr. Ricardo Beristain Cardoso  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalpa



---

*Gracias*

*A todos....*

*Al ATP y ADP de mí metabolismo:*

*Rodolfo Yafte y Sahará Fernanda*

## INDICE

RESUMEN.....	8
ABSTRACT .....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Química del azufre .....	12
1.1.1 Estados de oxidación y encadenamiento del azufre .....	12
1.1.2 Alótropos de azufre elemental .....	13
1.1.3 Sulfuros .....	13
1.1.4 Polisulfuros .....	16
1.2 Contaminación del agua por compuestos azufrados.....	16
1.3 Consecuencias de la contaminación del agua por compuestos azufrados .....	18
1.4 Ciclo biogeoquímico del azufre .....	18
1.4.1 Bacterias sulfato reductoras .....	20
1.4.1.1 Fisiología de las bacterias sulfato reductoras.....	21
1.4.1.2 Bioquímica de las bacterias sulfato reductoras .....	23
1.4.2.3 Bioquímica de las bacterias sulfo-oxidantes.....	26
1.4.2 Efecto inhibitorio del sulfuro .....	27
1.5 Aplicación de técnicas moleculares al estudio de comunidades microbianas complejas .....	28
1.5.1 Técnicas de huella genética.....	29
1.5.1.1 Técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE).....	29
2 ANTECEDENTES .....	32
2.1 Procesos biológicos para la eliminación de compuestos azufrados.....	32
2.1.1 Eliminación de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) .....	32
2.1.2 Eliminación de sulfuro ( $\text{H}_2\text{S}$ ) .....	33
3 JUSTIFICACIÓN.....	39
4 HIPÓTESIS.....	41
5 OBJETIVO GENERAL.....	41
5.1 Objetivos particulares.....	41
6 MATERIALES Y MÉTODOS .....	42
6.1 Materiales .....	42
6.1.1 Reactor de lecho fluidificado inverso.....	42
6.1.2 Medio de cultivo .....	42
6.1.3 Inóculo.....	43
6.2 Operación del reactor de lecho fluidificado inverso.....	44
6.2.1 Operación en lote del RLFI: Inmovilización de la biopelícula .....	44
6.2.2 Operación en continuo del RLFI.....	45

6.3	Métodos analíticos.....	46
6.3.1	Toma y conservación de muestra del efluente .....	46
6.3.2	Medición de pH.....	46
6.3.3	Determinación de $\text{SO}_3^{2-}$ , $\text{SO}_4^{2-}$ y $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ .....	46
6.3.4	Determinación de lactato .....	47
6.3.5	Determinación de acetato y etanol.....	48
6.3.6	Determinación de bicarbonato .....	48
6.3.7	Determinación de azufre elemental .....	48
6.3.8	Determinación de sulfuro disuelto.....	50
6.3.9	Detección de oxígeno disuelto .....	50
6.3.10	Determinación de sólidos volátiles (SSV) .....	51
6.3.11	Cálculo de la equivalencia de la DQO.....	51
6.3.12	Determinación de biomasa inmovilizada.....	52
6.4	Métodos de preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido .....	53
6.5	Métodos de biología molecular .....	53
6.5.1	Toma y conservación de la muestra .....	53
6.5.2	Extracción del ADN genómico .....	54
6.5.3	Electroforesis horizontal en gel de agarosa.....	54
6.5.5	Amplificación del ADN extraído por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	55
6.5.6	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante.....	57
6.5.6.1	Preparación de las soluciones desnaturalizantes y geles de acrilamida .....	58
6.5.6.2	Preparación del tanque de electroforesis.....	59
6.5.6.3	Preparación y carga de la muestra .....	60
6.5.6.4	Tinción con plata de los geles de acrilamida.....	60
6.5.6.5	Recuperación del ADN de las bandas individuales.....	61
6.5.6.6	Secuenciación y análisis de los productos purificados .....	62
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	63
7.1	Operación del Reactor de Lecho Fluidificado Inverso (RLFI) .....	63
7.1.1	Operación en lote del RLFI: inmovilización de la biopelícula.....	63
7.1.2	Operación en continuo del RLFI .....	67
7.2	ANÁLISIS MOLECULAR DE DIVERSIDAD MICROBIANA DE LA BIOPÉLICULA	73
8.	CONCLUSIONES.....	78
9.	RECOMENDACIONES.....	79
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	80
	ANEXOS .....	88

### RESUMEN

Las descargas de aguas residuales que contienen compuestos azufrados y materia orgánica generan la formación de H<sub>2</sub>S debido a la acción de microorganismos anaerobios presentes en estas aguas. El H<sub>2</sub>S es un compuesto indeseable ya que presenta propiedades tóxicas, corrosivas y mal olor. Además puede ocasionar cambios en la variedad en cuerpos de agua naturales a consecuencia del cambio de pH y por el consumo de oxígeno disuelto, problemas de salud e incluso la muerte a concentraciones en la atmósfera mayores de 2000 mg L<sup>-1</sup>. Con el fin de eliminar estos problemas se han empleado biotecnologías fundamentadas en el ciclo del azufre, sin embargo, los criterios de diseño para estos sistemas se han basado principalmente en parámetros de ingeniería y microbiología clásica, y en ellos no se estudia con detalle la identificación, función y estructura de las comunidades que conforman los consorcios microbianos utilizados. En los últimos años se han empleado técnicas como la DGGE para el análisis de los cambios poblacionales en los sistemas de tratamiento de aguas residuales, con el fin de dejar de ver a los reactores como “cajas negras” y entender lo que realmente sucede dentro de ellos, debido a que la diversidad microbiana. En el presente trabajo se estudió la dinámica e identificación de las poblaciones de una biopelícula cultivada en un reactor de lecho fluidificado inverso (RLFI) en donde se llevó a cabo la reducción del SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> a H<sub>2</sub>S y la oxidación parcial del H<sub>2</sub>S a S<sub>8</sub><sup>0</sup> en condiciones limitadas de oxígeno disuelto, con el fin de relacionar los géneros microbianos que forman la biopelícula con el comportamiento del reactor. El RLFI operó inicialmente en lote con el fin de formar una biopelícula sobre partículas de polietileno de baja densidad (400 Kg m<sup>-3</sup>). El inóculo fue un lodo anaerobio de la planta de tratamiento de aguas residuales de la UAM-I. El medio mineral que se alimentó al reactor contenía 31.33 mM de lactato y 40.60 mM de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. La concentración de SVI en la biopelícula al final de esta etapa fue de 1 kg m<sup>-3</sup> de soporte seco y mostró eficiencias de consumo de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> del 75% con respecto al alimentado. La formación de S<sup>0</sup> fue cercana al 12% del SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> alimentado. Posteriormente el RLFI operó en continuo con un TRH de 2 días y con una relación másica de DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> fue de 0.66 para favorecer el proceso sulfato-reductor de forma desasimilativa y el TRH fue de 2 días. La operación en continuo se llevó a cabo durante 72 días: en los primeros 41 días (etapa I) las fuentes de carbono fueron lactato y etanol en una proporción de 80:20, respectivamente, en los 31 días restantes (etapa II) la proporción de lactato-etanol alimentada fue 50:50. En la etapa I, la eficiencia de eliminación del SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> disminuyó aproximadamente un 6% en comparación con la etapa de inmovilización (75%). Sin embargo, al cambiar la proporción en la alimentación de lactato-etanol a 50:50 (etapa II), la eliminación de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> se vio considerablemente disminuida, ya que sólo el 60% del SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> alimentado fue consumido (24 mM). La concentración de SVI en las etapas I y II fueron 1.46 y 1.34 kg m<sup>-3</sup> de soporte seco respectivamente. En cuanto al estudio de biología molecular se apreciaron una baja diversidad de generos, principalmente bacterias sulfato-reductoras. Los géneros encontrados fueron *Desulfomicrobium* y *Desulfovibrio*, principalmente, además de *Geobacter*, *Desulfuromonas* y/o *Petrimonas*. No se encontraron bacterias sulfo-oxidantes, lo cual apoya la teoría de que la formación de azufre elemental se dió principalmente por vía química. Por otra parte, se observó que al identificar los generos microbianos



mediante estas técnicas se puede explicar el comportamiento del reactor con mayor certeza que sólo haciendolo con balances de materia y electrones, los cuales son afectados fuertemente por el potencial redox.

## **ABSTRACT**

Discharges of wastewater containing organic sulfur compounds and the formation of H<sub>2</sub>S generated by the action of anaerobic microorganisms present in these waters. H<sub>2</sub>S is a toxic compound because it has corrosive and odor. It may also cause changes in the variety in natural water bodies as a result of the change of pH and dissolved oxygen consumption, health problems and even death to higher atmospheric concentrations of 2000 mg L<sup>-1</sup>. In order to eliminate these problems have been used in the biotechnology grounded sulfur cycle, however, the design criteria for these systems are based mainly on engineering parameters and classical microbiology, and they are not discussed in detail the identification, function and structure of the communities that make microbial consortia used. In recent years they have used techniques such as DGGE for the analysis of population changes in the systems of wastewater treatment, in order to stop seeing the reactors as "black boxes" and understand what is really going on inside them, because microbial diversity. In the present work, the dynamics of populations and identification of a biofilm grown in a fluidized bed reactor inverse (RLFI) where it conducted the reduction of SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> to H<sub>2</sub>S and partial oxidation of H<sub>2</sub>S to S<sub>8</sub><sup>0</sup> in conditions dissolved oxygen limited, in order to relate the microbial genera forming biofilm reactor behavior. The RLFI initially operated in batch to form a biofilm on particles of low density polyethylene (400 kg m<sup>-3</sup>). The inoculum was a plant anaerobic sludge from wastewater treatment UAM-I. The mineral medium which was fed to the reactor contained 31.33 mM and 40.60 mM lactate SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. SVI concentration in the biofilm at the end of this stage was 1 kg m<sup>-3</sup> and dry support consumption showed efficiencies of 75% SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> relative to the feed. The formation of S<sup>0</sup> was close to 12% of SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> fed. Subsequently RFLI continuously operated with a TRH of 2 days and a mass ratio was 0.66 DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> to facilitate the process of sulfate-reducing and deassimilative TRH was 2 days. The continuous operation was carried out for 72 days: in the first 41 days (Stage I) the carbon sources was lactate and ethanol in a ratio of 80:20, respectively, in the remaining 31 days (Stage II) the proportion lactate-ethanol fed was 50:50. In step I, the removal efficiency of SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> decreased approximately 6% compared to

the immobilizing step (75%). However, by changing the feeding ratio of ethanol to lactate 50:50 (stage II), removing  $\text{SO}_4^{2-}$  was substantially reduced, as only 60% of the  $\text{SO}_4^{2-}$  fed was consumed (24 mM). The concentration of SVI in stages I and II were 1.46 and 1.34  $\text{kg m}^{-3}$  dry support respectively. As for the study of molecular biology appreciated a low diversity of genres, mainly sulfate-reducing bacteria. The genera *Desulfovibrio* and *Desulfomicrobium* were found mainly *Geobacter* addition, *Desulfuromonas* and / or *Petrimonas*. There were no sulfo-oxidizing bacteria, which supports the theory that the formation of elemental sulfur was mainly by chemical means. Moreover, it was observed that the microbial genera identified by these techniques can explain the behavior of the reactor with greater certainty than just doing it with material balances and electrons, which are strongly affected by the redox potential.

### 1. INTRODUCCIÓN

**Comentario [FJFP1]:** Falta el resumen y las páginas del Posgrado

El azufre es un elemento reactivo con distintos estados de oxidación estables que oscilan entre las valencias -2 y +6. Es uno de los 10 elementos más abundantes de la corteza terrestre y se encuentra principalmente en forma mineral, como galena (PbS), pirita (FeS<sub>2</sub>), cinabrio (HgS), barita (BaSO<sub>4</sub>), yeso (CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) y como elemento libre (S<sup>0</sup>). También se encuentra en los combustibles fósiles (como sulfuro, H<sub>2</sub>S) y en el mar, como ión sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) (Atlas y Bartha, 2002). En los seres vivos, se encuentra principalmente formando grupos sulfhidrilo (-SH) en los aminoácidos (cisteína y metionina) y sus polímeros, su concentración media es de 520 ppm y raramente llega a ser un nutriente limitante (Ehrlich, 1995; Jorgensen, 1983).

**Eliminado:** s

**Eliminado:**

Los compuestos azufrados son empleados para la producción de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), pólvora, fungicidas, fertilizantes, productos farmacéuticos, reactivos fotográficos y en la industria papelera. La contraparte del uso de los compuestos azufrados es la contaminación que ocasiona en las aguas residuales industriales, principalmente por SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Las emisiones de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> no son una amenaza directa para el ambiente, ya que es químicamente inerte, no es volátil y no es tóxico. Sin embargo, altas concentraciones de este compuesto ocasionan un desbalance en el ciclo del azufre. Además, bajo condiciones anaerobias, las bacterias sulfato reductoras (BSR) emplean al SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> como aceptor terminal de electrones para oxidar la materia orgánica y el hidrógeno, produciendo sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S). Por eso, el mayor problema de la emisión y el tratamiento anaerobio de las aguas residuales ricas en SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> es la generación de un compuesto tóxico, corrosivo y de olor desagradable como es el H<sub>2</sub>S (Holshoff Pol y col., 1998; Hvited-Jacobsen y Nielsen, 2000).

**Eliminado:** de diversos productos, tales

**Eliminado:** como

Es indispensable, por lo tanto, el control de los compuestos azufrados residuales mediante procesos biológicos integrales que permiten recuperar al azufre como azufre elemental, ya que es un compuesto no tóxico y que puede ser reutilizado, con los tratamientos adecuados de purificación. Gracias a los avances en biología molecular, en los últimos años se han empleado técnicas moleculares para el estudio de comunidades microbianas complejas, lo que permite observar la correlación de las actividades metabólicas de comunidades microbianas con la eficiencia del proceso (y, de esta forma, dejar de ver a los reactores biológicos como cajas negras).

**Comentario [FJFP2]:** No están en las referencias...

## 1.1 Química del azufre

### 1.1.1 Estados de oxidación y encadenamiento del azufre

La complejidad de la química del azufre es originada por los diferentes estados de oxidación que puede presentar (Tabla 1.1). Muchos de ellos juegan un papel importante en sistemas acuosos en los cuales las reacciones de óxido reducción ocurren como resultado de la actividad microbiana o, simplemente, siguiendo la termodinámica del sistema en reacciones no enzimáticas (Steudel, 2000).

Eliminado: t

Eliminado: o

**Tabla 1.1** Estados de oxidación del azufre en compuestos comunes.

Estado de oxidación	Compuestos
-2	Sulfuro de hidrógeno (H <sub>2</sub> S), ion sulfuro de hidrógeno (HS <sup>-</sup> ), ion sulfuro (S <sup>2-</sup> )
-1	Disulfano (H <sub>2</sub> S <sub>2</sub> ), disulfuro (S <sub>2</sub> <sup>2-</sup> ), polisulfuros (S-S <sub>n</sub> -S), tiosulfato (S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )
0	Azufre elemental (S <sub>n</sub> ), polisulfanos orgánicos (R-S <sub>n</sub> -R), politionatos (O <sub>3</sub> S-S <sub>n</sub> -SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )
+1	Diclorurodisulfano (Cl-S-S-Cl)
+2	Bicloruro de azufre (S <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ), sulfoxilato (SO <sub>2</sub> <sup>2-</sup> )
+3	Ditionito (S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )
+4	Dióxido de azufre (SO <sub>2</sub> ), sulfito (SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ), bisulfito (HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )
+5	Ditionato (S <sub>2</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup> ), sulfonato (RSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )
+6	Trióxido de azufre (SO <sub>3</sub> ), sulfato (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ), peroxosulfato (SO <sub>5</sub> <sup>2-</sup> )

Tabla elaborada a partir de Steudel, 2000.

Por otra parte, el azufre elemental (S<sup>0</sup>) puede enlazarse covalentemente con otros átomos o consigo mismo formando cadenas de azufre del tipo -S-S-S- de, prácticamente, longitud ilimitada. Estas cadenas pueden terminar con un sólo átomo de H o Cl, con grupos como -CH<sub>3</sub> o -SO<sub>3</sub>H, o unirse entre sus extremos y formar anillos de varios tamaños. Un caso especial son los aniones de polisulfuro (tabla 1.2), en los cuales las cadenas terminan con un átomo de azufre con carga negativa (S<sup>-</sup>).

Eliminado: s

Eliminado: que son iso-electrónicos con los átomos de Cl.

Tabla 1.2 Longitud de cadenas en los compuestos azufrados

Especie	Fórmula	Número de átomos de azufre
Homociclos	$S_n$	$n = 6 \dots 20$
Polisulfanos	$H-S_n-H$	$n = 1 \dots 8$
Polisulfuros	$S_n^{2-}$	$n = 1 \dots 8$
Polisulfanos orgánicos	$R-S_n-R$	$n = 1 \dots 13$
Politionatos	${}^-\text{OS-S}_n\text{-SO}_3^-$	$n = 1 \dots 4$
Poliazufres	$S_n (S_\mu \text{ o } S_\infty)$	$n > 10^5$

Eliminado: y tamaño de anillos

Tabla tomada de Steudel, 2000.

### 1.1.2 Alótropos de azufre elemental

Los átomos de azufre aislados ( $S_1$ ) tienen una entalpía de  $279 \text{ kJ mol}^{-1}$  y, por lo tanto, no pueden existir a temperatura ambiente. A presión y temperatura ambiente, el azufre elemental existe en forma de anillos de diferentes tamaños ( $S_n$ ), los cuales pueden contener desde 6 hasta 20 átomos de azufre, o como cadenas poliméricas de alta masa molecular ( $S_\mu$ ) (Steudel, 1982).

De todos los alótropos del azufre, el más estable termodinámicamente es el  $\alpha$ - $S_8$  ortorrómbico (su entalpía de formación es cero, por definición), el cual presenta un color amarillo verdoso y es el principal constituyente del azufre comercial (Steudel y Holz, 1988). Los puntos de fusión abarcan el intervalo de  $39\text{-}48^\circ\text{C}$ , siendo los alótropos  $S_7$  y  $S_{12}$  los que se encuentran en los límites inferior y superior, respectivamente, del intervalo de puntos de fusión. Todas las especies se convierten rápidamente a la molécula más estable ( $S_8^0$ ) a temperaturas cercanas al punto de fusión. Todos los alótropos del azufre son hidrofóbicos; las densidades de los materiales cristalinos están en el intervalo de  $1.9\text{-}2.2 \text{ g cm}^{-3}$  y son prácticamente insolubles en agua a  $20^\circ\text{C}$ . La solubilidad del  $\alpha$ - $S_8$  es aproximadamente de  $5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  (Boulégué, 1978). Por otra parte, es muy soluble en compuestos no polares como el disulfuro de carbono ( $\text{CS}_2$ ) (33% a  $25^\circ\text{C}$ ) y es menos soluble en cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) y tolueno ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ ) (Steudel, 2000).

### 1.1.3 Sulfuros

El sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) es un constituyente de ciertos tipos de gas natural (“gas amargo”), el cual es recuperado y oxidado a azufre elemental (líquido) por el proceso de CLAUS. El  $\text{H}_2\text{S}$  se forma también en grandes cantidades en la desulfuración del petróleo

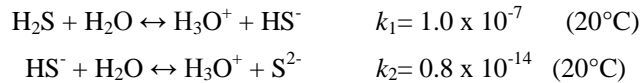
Eliminado: ácido

## Introducción

---

crudo por el proceso hidrodesulfuración (HDS), llevado a cabo en refinerías. Además, el H<sub>2</sub>S es un componente de aguas residuales y gases de desecho industriales. También está presente en las exhalaciones volcánicas y es abundante en la salida del agua de respiraderos hidrotermales en el suelo oceánico (Barton y Tomei, 1995).

La solubilidad del H<sub>2</sub>S en agua a 20°C es sólo de 0.4 g/100 g H<sub>2</sub>O (0.12 M), a una presión total (H<sub>2</sub>S + H<sub>2</sub>O) de 1.013 bar. La solubilidad decrece con el incremento de la temperatura. En soluciones acuosas débilmente ácidas, el H<sub>2</sub>S se encuentra con un grado variable de desprotonación, dependiendo del pH:



Cabe mencionarse que, debido a los bajos valores de  $k_2$ , la formación del ion sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ) se ve limitada en casi todas las soluciones, excepto a valores de pH cercanos a 14. Por lo tanto, cuando se habla de “soluciones de sulfuro” en realidad se habla de soluciones en las que están presentes las dos especies: H<sub>2</sub>S y el ion bisulfuro (HS<sup>-</sup>); en ocasiones, y en mucha menor cantidad, aparece el ion sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ).

En el diagrama de la figura 1.1 se muestra la composición en el equilibrio de un sistema acuoso que contiene azufre y oxígeno. Las diferentes áreas en este diagrama indican cuáles especies predominarán con determinados potenciales y valores de pH. Un dato importante que se observa en este diagrama es la pequeña área del azufre ( $\text{S}_v^0$ ): este compuesto sólo existirá en un intervalo de 0.2 a 0.4 Volt y de 0 a 2 unidades de pH (Steudel, 2000).

Eliminado: é

Eliminado: s

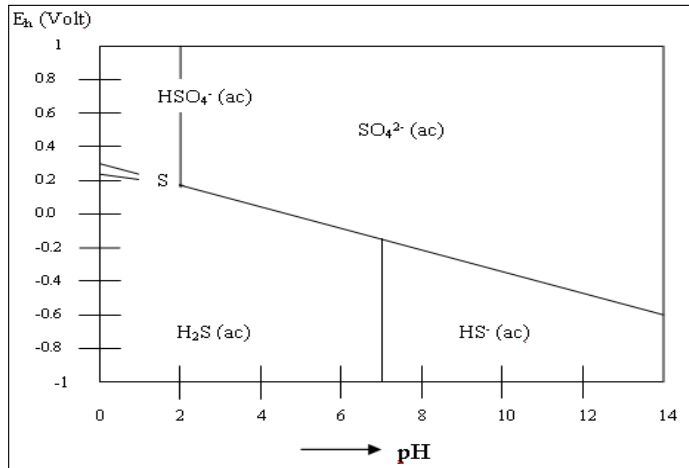
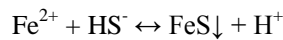


Figura 1.1 Diagrama del sistema binario de azufre/oxígeno a 25°C y 1.103 bar (Studel, 2002);**Error! Marcador no definido.**

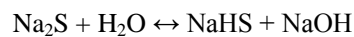
Por otra parte, el  $\text{HS}^-$  reacciona con muchos metales catiónicos para formar sulfuros insolubles, como por ejemplo:



En soluciones de ácido clorhídrico, sin embargo, se lleva a cabo la reacción inversa. Dependiendo de sus productos de solubilidad, los sulfuros metálicos pueden ser solubles en ácido clorhídrico ( $\text{ZnS}$ ,  $\text{CdS}$ ,  $\text{FeS}$ ,  $\text{CoS}$ ,  $\text{NiS}$ ,  $\text{MnS}$ ) o no ( $\text{HgS}$ ,  $\text{As}_2\text{S}_3$ ,  $\text{Sb}_2\text{S}_3$ ,  $\text{Bi}_2\text{S}_3$ ,  $\text{Cu}_2\text{S}$ ,  $\text{Ag}_2\text{S}$ ).

Los sulfuros alcalinos y metales alcalinos térreos son solubles en agua, pero esta solución es fácilmente hidrolizada como se muestra en la siguiente reacción:

**Eliminado:** en agua

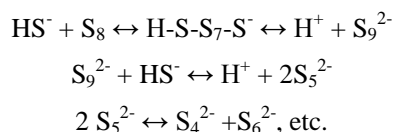


En presencia de oxidantes suaves, las soluciones de sulfuro, y en particular el ion  $\text{HS}^-$ , son oxidados a azufre elemental, con lo cual precipitan. El azufre elemental se forma sólo en soluciones con pH cercano al neutro. Las soluciones alcalinas de sulfuro y  $\text{Na}_2\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$  ( $x$  tiene valores entre 7 y 9 en las presentaciones comerciales) pueden ser oxidados por el aire a polisulfuros ( $\text{S}_n^{2-}$ ), tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) y, eventualmente, a sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) (Stuedel, 2000).

**Eliminado:** sólido

### 1.1.4 Polisulfuros

Las soluciones alcalinas de sulfuros disuelven el azufre elemental con la formación de aniones de polisulfuro, los cuales forman un equilibrio de varias especies:



Estas reacciones, fuertemente reversibles, dependen del valor de pH y de la concentración total de azufre. A bajos valores de pH se da la formación de H<sub>2</sub>S y la precipitación de azufre elemental, mientras que a valores de pH > 6 se favorece la formación de cadenas cortas de aniones de polisulfuro.

Las reacciones mostradas anteriormente son típicas *reacciones de desplazamiento nucleófilico*, las cuales son muy comunes en la química del azufre. Tanto el HS<sup>-</sup> como el S<sub>x</sub><sup>2-</sup> son nucleófilos fuertes (bases de Lewis), los cuales son capaces de abrir los anillos de la molecula S<sub>8</sub><sup>0</sup> y unirse a las moléculas con enlaces S-S y formar cadenas lineales con carga negativa (Steudel, 2000).

Las soluciones acuosas de polisulfuro (soluciones de color amarillo a anaranjado) son propensas a una rápida auto-oxidación cuando se exponen al aire. El producto mayoritario formado es el tiosulfato, que se forma de acuerdo a la siguiente reacción:



El azufre elemental se observa sólo si el promedio de átomos de azufre (x) de la solución de polisulfuros es mayor que 2 (Steudel y col., 1986).

## 1.2 Contaminación del agua por compuestos azufrados

Una de las principales fuentes de contaminación del agua por compuestos azufrados es la que se presenta en las aguas residuales industriales, sobre todo en los efluentes del tratamiento anaerobio de aguas residuales que contienen sulfatos provenientes de industrias



como la petroquímica (aguas ácidas, amargas y desflemadas), la de producción de viscosa y celofán, y de la extracción de gas natural (González, 2002). Los principales contaminantes en esta agua de proceso o de tratamiento son el  $\text{SO}_4^{2-}$  y el  $\text{H}_2\text{S}$ ; sin embargo, también presentan una gran cantidad de materia orgánica (medida como demanda química de oxígeno, DQO) (Tabla 1.3).

**Tabla 1.3** Procesos que generan corrientes que contienen compuestos azufrados.

Tipos de industria	Compuestos azufrados (g/L)	pH	DQO (g/L)	Referencia
Pulpa y papel, proceso químico-termomecánico	$\text{SO}_4^{2-}$ (1.2-1.5) $\text{H}_2\text{S}$ (0.05-0.20)	7-9	7.5-10.4	Habers y de Vega (1991)
Viscosa y rayón (agua residual)	$\text{SO}_4^{2-}$ (3)	2-3	1-2	Kroiss y col., (1985)
Planta de celofán y rayón (emisión gaseosa)	$\text{H}_2\text{S}$ (0-1000 ppm) $\text{CS}_2$ (0-400 ppm)	-	-	Revah y col., (1995)
Fermentación (ácido cítrico)	$\text{SO}_4^{2-}$ (2.5-4.5)	-	30	Svardal y col., (1993)
Aceite comestible	$\text{SO}_4^{2-}$ (10-50)	2-3	2-6	Hoeks y col., (1984)
Aceite comestible	$\text{SO}_4^{2-}$ (9.6-11.5)	-	2.0-2.9	Rinzema y Lettinga (1994)
Procesadora de mariscos	$\text{SO}_4^{2-}$ (2.1-2.7)	-	12.4-16.9	Mendez y col., (1995)
Tenería	$\text{H}_2\text{S}$ (0.15-0.3) $\text{SO}_4^{2-}$ (1.2-2.0)	8.6	4.8-8.0	Shin y col., (1996)
Proceso fotográfico	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (45.5) $\text{SO}_4^{2-}$ (8.0) $\text{SO}_3^{2-}$ (3.5)	-	67.8	Lens y col., (1998)
Producción de TNT (Trinitrotolueno)	$\text{SO}_4^{2-}$ (51.4) $\text{SO}_3^{2-}$ (5.5)	7.6	68.5	Hao y col., (1994)
Refinería (sosas gastadas)	$\text{SO}_4^{2-}$ (20.3) $\text{H}_2\text{S}$ (48.5)	13	320	

Tabla tomada de Celis, 2004.

### 1.3 Consecuencias de la contaminación del agua por compuestos azufrados

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los principales contaminantes azufrados en las aguas residuales es el  $\text{SO}_4^{2-}$ . No obstante, y como ya se comentó, este compuesto no puede ser considerado como una amenaza para el ambiente, ya que no es tóxico ni volátil y es químicamente estable. Sin embargo, el  $\text{SO}_4^{2-}$  presente en aguas con limitada concentración de oxígeno disuelto y en presencia de materia orgánica es reducido por bacterias sulfato reductoras a  $\text{H}_2\text{S}$  (Holshoff Pol y col., 1998; Hvited-Jacobsen y Nielsen, 2000; Liamleam y Annachhatre, 2007). El  $\text{H}_2\text{S}$ , es un gas corrosivo, tóxico y volátil, el cual genera problemas de salud (principalmente a personas con padecimientos respiratorios), ambientales y en los procesos de tratamiento de aguas residuales. En la tabla 1.4 se muestran algunos de los principales problemas:

**Tabla 1.4** Efectos de la formación del  $\text{H}_2\text{S}$

		Referencia
<i>Problemas de salud:</i>	0.250-0.300 mg L <sup>-1</sup>	Dolor de cabeza, náuseas e insomnio.
	50-100 mg L <sup>-1</sup>	Irritación de ojos
	250 mg L <sup>-1</sup>	Edema pulmonar
	750-1000 mg L <sup>-1</sup>	Problemas neurotóxicos
	>2000 mg L <sup>-1</sup>	Muerte
<i>Problemas ambientales:</i>	Cambio de pH en aguas, cambio de la variedad natural de los seres vivos	
	EPA, 2007	
<i>Problemas en tratamiento de efluentes:</i>	Disminuye la eficiencia de eliminación de DQO	
	Corrosión de tuberías y equipo	
	Acumulación de sulfuros metálicos	
	Afecta a los procesos metanogénicos y otros post-tratamientos	
	Olor desagradable	
		Holshoff Pol, y col., 1998.

### 1.4 Ciclo biogeoquímico del azufre

Como se mencionó anteriormente, las transformaciones del azufre son complejas debido a los diversos estados de oxidación que este elemento presenta y a que algunas de sus transformaciones ocurren tanto químicamente como por procesos biológicos. Sin embargo, sólo tres estados de oxidación tienen importancia en la naturaleza: -2 (sulfhídrico,  $\text{R-SH}$  y sulfuro,  $\text{HS}^-$ ), 0 (azufre elemental,  $\text{S}^0$ ) y +6 (sulfato,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) (Madigan y col., 2009).

Los sulfuros ( $\text{HS}^-$ ), los polisulfuros ( $\text{S-S}_n\text{-S}^-$ ), tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ), politionatos ( $\text{O}_3\text{S-S}_n\text{-SO}_3^-$ ), azufre elemental ( $\text{S}^0$ ), bisulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) y sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) son los compuestos

inorgánicos del azufre más comunes en el ambiente. Estos pueden ser usados por diversos organismos con propósitos asimilativos y no asimilativos. Todos los organismos vivos participan en los ciclos biogeoquímicos, pero los microorganismos (debido a su ubicuidad) desempeñan un papel principal dentro del ciclo del azufre (Atlas y Bartha, 2002). Este ciclo (Figura 1.2) está constituido por las reacciones de oxidación y reducción que suceden química y bioquímicamente (biosíntesis, biodegradación y biotransformaciones), así como por las transformaciones físicas (disolución, precipitación, volatilización y fijación) de los compuestos azufrados que se llevan a cabo en la atmósfera, la hidrósfera y la litósfera.

Eliminado: presentes

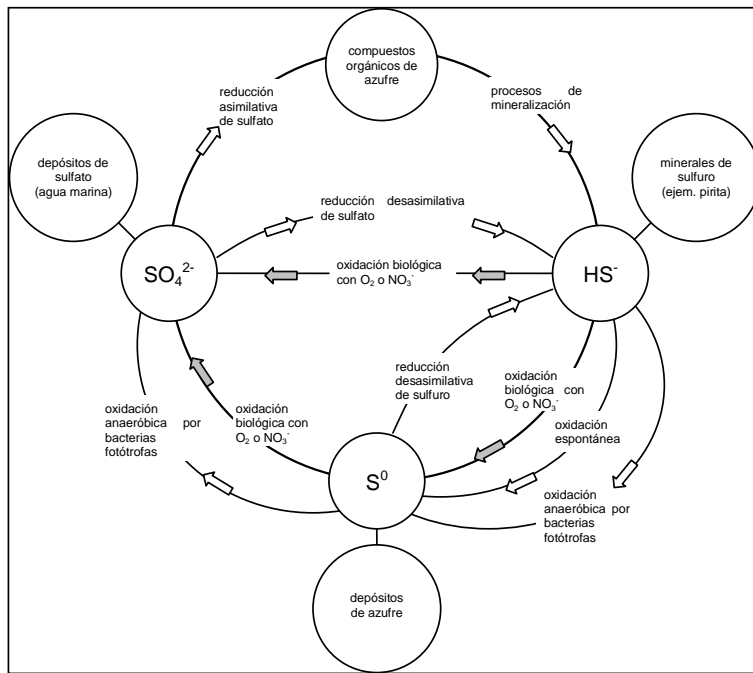


Figura 1.2 Ciclo biogeoquímico del azufre (tomado de Lens y Kuenen, 2001)

Comentario [FJFP3]: Falta en las referencias

El ciclo se puede dividir en dos etapas, de acuerdo al tipo de reacciones de óxido-reducción que intervienen:

*Etapas reductivas.* En los procesos biológicos se encuentran dos formas bioquímicas de reducción de los compuestos de azufre inorgánicos: la reducción asimiladora y la reducción desasimiladora. La primera la presentan tanto eucariontes como procariontes y en ella el  $SO_4^{2-}$  es reducido a  $HS^-$  para la biosíntesis de compuestos y componentes celulares que

## Introducción

contienen azufre, necesarios para el crecimiento celular (Alcántara, 2000). Tales como, aminoácidos (cisteína y metionina), cofactores enzimáticos, antibióticos, lípidos y carbohidratos (Brüser y col., 2000). La reducción no asimilativa la presentan exclusivamente los procariontes y en ella el  $\text{SO}_4^{2-}$  es reducido a  $\text{HS}^-$  por microorganismos sulfato reductores en condiciones anóxicas, en las que el  $\text{SO}_4^{2-}$  es utilizado como aceptor final de electrones en la respiración anaerobia (Oude Elferink y col., 1994). Esta reducción está acoplada con la oxidación de varios ácidos grasos volátiles (lactato y piruvato), etanol e  $\text{H}_2$ , que generan el ATP y poder reductor necesarios para el crecimiento celular (Madigan, y col., 2009).

Eliminado: .

Eliminado: t

Eliminado: principalmente

*Etapa oxidativa.* La segunda etapa del ciclo la constituyen las reacciones de oxidación de los compuestos reducidos de azufre. Esta etapa puede dividirse en dos: las reacciones de oxidación en condiciones anaerobias, efectuadas por microorganismos fotótrofos y facultativos, y la oxidación aerobia por microorganismos litoautótrofos (Alcántara, 2000). Los compuestos azufrados usados comúnmente como fuente de energía en esta etapa son el  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{S}_8^0$  y el  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , y el  $\text{CO}_2$  es utilizado como fuente de carbono. En la mayor parte de los casos, el producto final de la oxidación es el  $\text{SO}_4^{2-}$ , y el número total de electrones implicados desde el  $\text{H}_2\text{S}$  (estado de oxidación, -2) al  $\text{SO}_4^{2-}$  (estado de oxidación, +6) es de ocho, que son aceptados finalmente por el oxígeno (Madigan, y col., 2009).

### 1.4.1 Bacterias sulfato reductoras

Las bacterias sulfato reductoras (BSR) pertenecen al grupo de procariontes (principalmente *Proteobacteria*) contribuyen en funciones esenciales en muchos ambientes anaerobios. Además de su importancia en el ciclo del azufre, las BSR son importantes reguladores de una amplia variedad de procesos en suelos húmedos, incluyendo remoción de materia orgánica, bio-oxidación de contaminantes aromáticos clorados en suelos anaerobios y sedimentos y metilación del mercurio.

Eliminado: que

Eliminado: a una variedad importante de

Actualmente, con el análisis comparativo de las secuencias del rARN 16S, las BSR se agrupan en siete linajes filogenéticos, cinco de los cuales pertenecen al dominio *Bacteria* y los dos restantes al dominio *Archaea*. En su mayoría, las BSR pertenecen a los ~23 géneros de las  $\delta$ -Proteobacterias, seguidas de las BSR Gram (+), dentro de las que se encuentra la

Eliminado: están conformados dentro del

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: en el

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: ∅

Con formato: Fuente: Symbol

clase *Clostridia* con los siguientes géneros representativos: *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus* y *Desulfosporomusa*. Hay tres linajes con microorganismos termófilos, que pertenecen a las clases *Nitrospirae* (género *Thermodesulfovibrio*), *Thermodesulfobacteriae* (género *Thermodesulfobacterium*) y *Thermodesulfobiaceae* (género *Thermodesulfobium*).

Dentro del dominio *Archaea*, el género *Archaeoglobus*, del filo *Euryarchaeota*, y de los géneros *Thermocodium* y *Calditerrivirga* del filo *Crenarchaeota* (Muyzer y Stams, 2008).

### 1.4.1.1 Fisiología de las bacterias sulfato reductoras

Las BSR pueden usar una amplia variedad de donadores de electrones, entre los que se encuentran ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato, butirato, lactato y piruvato), alcoholes primarios (metanol y etanol, entre otros), compuestos aromáticos, azúcares, melazas e incluso el hidrógeno (Liamleam y Annachhatre, 2007). Sin embargo, una de las principales características de clasificación es la incompleta o completa oxidación de la fuente de carbono empleada. El grupo I de BSR oxidan la fuente de carbono hasta acetato, el cual es excretado como producto final. El grupo II oxida completamente la fuente de carbono, como el lactato, succinato e incluso el benzoato, hasta CO<sub>2</sub> (tabla 1.4). No obstante, algunos géneros pueden crecer autotróficamente y quimiolitotróficamente, empleando H<sub>2</sub> como donador de electrones y CO<sub>2</sub> como fuente de carbono. Además del SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, compuestos como el nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), el azufre elemental, los sulfonatos e, incluso, algunos compuestos orgánicos pueden actuar como aceptores de electrones (Madigan, y col., 2009).

Antiguamente se consideraba que las BSR eran microorganismos anaerobios estrictos, pero estudios recientes muestran que las BSR pueden llevar a cabo el metabolismo sulfato reductor en presencia de O<sub>2</sub> (Cypionka, 2000). Se cree que esta tolerancia al oxígeno es sólo un mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo, ya que no se observa un crecimiento microbiano bajo estas condiciones (Cypionka, 2000; Dolla, y col., 2006).

Eliminado: (

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: )

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: I, Las BSR que se incluyen en el

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: son d

Eliminado: (

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: )

Eliminado: mientras que

Eliminado: pertenecen a

**Tabla 1.5** Características Importantes en la clasificación de las bacterias sulfato reductoras.

	Morfología	Movilidad	GC en ADN (%)	Desulfoviridina	Citocromos	Oxidación de lactato	Grupo (oxidación fuente de carbono)	Temperatura de crecimiento (°C)
<b>Gram (-) mesófilas</b>								
<i>Desulfovibrios</i>								
<i>D. vulgaris</i>	Espirales o vibrios	+	60-62	+	c <sub>3</sub>	In <sup>a</sup>	I	25-40
<i>D. giga</i>	Espirales o vibrios	+	60-62	+	c <sub>3</sub>	In	I	25-40
<i>D. desulfiricans</i>	Espirales o vibrios	+	46-47	+	c <sub>3</sub>	In	I	25-40
<i>D. salexigens</i>	Espirales o vibrios	+	46-47	+	c <sub>3</sub>	In	I	25-40
<i>D. sapovorans</i>	Espirales o vibrios	+	42-46	+	c <sub>3</sub>	In	I	25-40
<i>Desulfobulbus</i>	límón a barras	-/+	59-60	-	b, c, c <sub>3</sub>	In	I	25-40
<i>Desulfomicrobium</i>	Ovoides a barras	-/+	52-67	-	b, c	In	I	25-40
<i>Desulfomonas</i>	Barras	-	66	+	c	In	II	30-40
<i>Desulfobacter</i>	Oval a barras	+/-	44-46	-		C <sup>b</sup>		20-33
<i>Desulfobacterium</i>	Oval a barras	+/-	41-52	-	b, c	C	II	20-35
<i>Desulfococcus</i>	Esféricas o limón	-/+	46-57	+/-	b, c	C	II	28-35
<i>Desulfomonile</i>	Barras	-	49	+	c <sub>3</sub>	C	I	37
<i>Desulfonema</i>	Filamentos	deslizamiento	35-42	+/-	b, c	C	II	28-32
<i>Desulfosarcina</i>	Barras ovoides o cocoides	+/-	51	-	b, c	C	II	33
<b>Gram (+) formadoras de esporas</b>								
<i>Desulfotomaculum</i>	Barras derechas o curvas, bacilos	+	42-52	-	b, c	In/C	I	Más de 25-40 Algunas 40-65
<b>Bacterias termófilas</b>								
<i>Thermodesulfobacterium</i>	Vibrios a barras	-/+	30-38	-	c <sub>3</sub> , c	In	I	65-70
<b>Arqueas termófilas</b>								
<i>Archaeoglobus</i>	cocoides	+/-	41-46	-	nr <sup>c</sup>	In	I	64-92

<sup>a</sup> In, incompleto; <sup>b</sup>C, completo; <sup>c</sup>nr, no reportado.

Tabla elaborada a partir de Parés y Juárez, 2002.

1.4.1.2 Bioquímica de las bacterias sulfato reductoras

La reducción del  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{H}_2\text{S}$  ocurre en varias etapas, lo que es debido a que el  $\text{SO}_4^{2-}$  presenta un bajo potencial redox (-0.217 V) (Matias, y col., 2005). Por tal motivo, el  $\text{SO}_4^{2-}$  debe ser activado por medio de ATP, dando lugar a la formación de adenosina-5-fosfosulfato (APS), reacción catalizada por la enzima  $\Delta$ ATP sulfurilasa. Una vez formado el APS, puede seguir dos vías: 1) la vía asimiladora y 2) la vía desasimiladora. En la vía asimiladora, se incorpora un fósforo a la molécula de APS formando fosfoadenosina-5-fosfosulfato (PAPS) y sólo entonces es reducida la porción del  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{SO}_3^{2-}$ . Posteriormente, el  $\text{SO}_3^{2-}$  es reducido a  $\text{H}_2\text{S}$  por la enzima  $\Delta$ sulfito reductasa. El  $\text{H}_2\text{S}$  seguirá otras rutas metabólicas para la formación de los aminoácidos como cisteína y metionina. Por otra parte, en la reducción desasimiladora la porción de  $\text{SO}_4^{2-}$  del APS es reducida directamente a  $\text{SO}_3^{2-}$  por la enzima *APS reductasa*, con la consiguiente liberación de AMP. Esta reducción está acoplada a la oxidación de materia orgánica o  $\text{H}_2$ , en la cual las *deshidrogenasas* propias de las BSR generan un gradiente de protones ( $\text{H}^+$ ) e impulsan la formación de ATP debido al transporte de electrones llevado a cabo principalmente por los citocromos  $c_3$  (figura 1.3). Por último, el  $\text{SO}_3^{2-}$  producido es reducido directamente por la *sulfito reductasa* a  $\text{H}_2\text{S}$ , el cual es excretado de la célula (Parés y Juárez, 2002; Madigan, y col., 2009).

Con formato: Fuente: Sin Cursiva

Con formato: Fuente: Sin Cursiva

Con formato: Fuente: Sin Cursiva

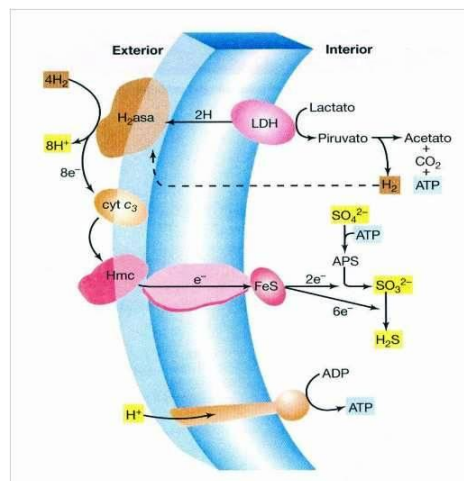


Figura 1.3 Bioquímica del metabolismo sulfato reductor (tomada de Madigan y col., 2009).

### 1.4.2 Bacterias sulfo-oxidantes (BSO)

Las reacciones biológicas de oxidación del azufre son realizadas por procariontes de los dominios *Archaea* y *Bacteria*. La oxidación del azufre por eucariontes es realizada por endosimbiosis con bacterias quimiótroficas, en gusanos o mejillones de los ecosistemas de ventos hidrotermales. Los electrones derivados de la oxidación del azufre son usados por bacterias y arqueas quimiótroficas aerobias para la transformación de energía de la cadena respiratoria y para la reducción autotrófica de CO<sub>2</sub>. Por otra parte, las bacterias anaerobias usan la energía solar para la transferencia de electrones del azufre o de otras fuentes para la reducción autotrófica del CO<sub>2</sub> (Friedrich, y col., 2005; Madigan, y col., 2009).

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: Archaea

La oxidación aerobia del azufre por arqueas está restringida a los miembros termoácidofilos del género *Sulfolobus*. En el dominio *Bacteria*, el azufre es oxidado por quimiótrofos aerobios y bacterias fotótrofas anaerobias. Por otra parte, las bacterias sulfo-oxidantes quimiolitotótrofas son filogenética y fisiológicamente diversas y pueden ser alcalófilas, neutrófilas o acidófilas (tabla 1.5) (Friedrich, y col., 2005).

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: sulfo-baterias

#### 1.4.2.1 Fisiología de las bacterias sulfo-oxidantes

La capacidad de crecer quimiolitotótroficamente sobre compuestos reducidos de azufre es una característica interesante de un grupo de Proteobacterias. Dentro de este grupo se identifican microorganismos que son capaces de crecer tanto a pHs neutros como ácidos, así como de usar compuestos inorgánicos u orgánicos como fuente de carbono (tabla 1.5).

En presencia de oxígeno, los compuestos reducidos de azufre pueden ser utilizados como fuente de energía por los microorganismos quimiolitótrofos. Los compuestos del azufre comúnmente oxidados son: H<sub>2</sub>S, el S<sup>0</sup> y S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>. En general, el producto final de la oxidación de estos compuestos es el SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y el número total de electrones que intervienen entre el H<sub>2</sub>S (estado de oxidación -2) y el SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (estado de oxidación +6) es de ocho.

Eliminado: formar parte del metabolismo

Eliminado: o

Eliminado: microbiano

Eliminado: utilizados en estos casos son el sulfhídrico (

Eliminado: )

Eliminado: azufre elemental (

Eliminado: )

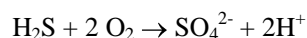
Eliminado: el tiosulfato (

Eliminado: )

Eliminado: sulfato (

Eliminado: )

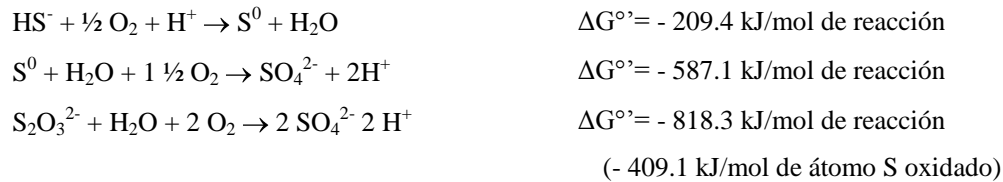
Cabe mencionar que hay menos energía disponible cuando se usan compuestos con estados de oxidación intermedios, como se muestra a continuación:



$$\Delta G^\circ = -798.2 \text{ kJ/mol de reacción}$$



## Introducción



**Tabla 1.6** Características fisiológicas de los procariotas quimiolitótrofos oxidantes del azufre

Géneros y/o especies	Donador inorgánico de e <sup>-</sup>	Intervalo de pH para el crecimiento	Grupo filogenético	GC en ADN (%)
<b>Especies de <i>Thiobacillus</i> que crecen menos en medios orgánicos:</b>				
<i>T. thioparus</i>	H <sub>2</sub> S, S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	6-8	β	61-66
<i>T. denitrificans</i>	H <sub>2</sub> S, S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	6-8		63-68
<i>T. neapolitanus</i>	S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	6-8		52-56
<i>T. thiooxidans</i>	S <sup>0</sup>	2-4		51-53
<i>T. ferrooxidans</i>	S <sup>0</sup> , sulfuros metálicos, Fe <sup>2+</sup>	2-4		55-65
<b>Especies de <i>Thiobacillus</i> que crecen más en medios orgánicos:</b>				
<i>T. novellus</i>	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	6-8	β	66-68
<i>T. intermedius</i>	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	3-7		64
<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	γ	37-51
<i>Thiothrix</i>	H <sub>2</sub> S	6-8	γ	52
<i>Thioploca</i>	H <sub>2</sub> S, S <sup>0</sup>	-	γ	-
<b>Otros Géneros:</b>				
<i>Thiomicrospira</i>	H <sub>2</sub> S, S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	6-8	γ	-
<i>Thiosphaera</i>	H <sub>2</sub> S, S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , H <sub>2</sub>	6-8	α	36-44
<i>Thermothrix</i>	H <sub>2</sub> S, S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	6.5-7.5	β	66
<i>Thiovulum</i>	H <sub>2</sub> S, S <sup>0</sup>	6-8		-
<i>Sulfolobus</i>	H <sub>2</sub> S, S <sup>0</sup>	1-5		-
<i>Acidianus</i>	S <sup>0</sup>	1.5		-

Tabla tomada de Madigan, y col., 2009.

El género microbiano *Thiobacillus* ha sido ampliamente estudiado, y comprende bacilos Gram-negativos con flagelo polar. Algunas de sus especies son quimiolitótrofos obligadas y dependientes de la fijación de CO<sub>2</sub>, pudiendo obtener energía de la oxidación del H<sub>2</sub>S, el S<sup>0</sup> y S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> (Juárez y Parés, 2002; Madigan, y col., 2009).

Por otra parte, hay especies de *Thiobacillus* que presentan crecimiento mixotrófico, como es el caso de *T. novellus* y *T. intermedius* (tabla 1.5). Se entiende por mixotrofia la capacidad de utilizar productos orgánicos e inorgánicos como fuente de carbono (Brüser y col., 2000; Juárez y Parés, 2002).

Otra característica importante que presentan las bacterias sulfo-oxidantes es la acumulación intracelular de S<sup>0</sup> como consecuencia de la oxidación parcial del H<sub>2</sub>S. Sin embargo, hay otro grupo de bacterias que crece adheridas a los cristales de S<sup>0</sup>; se cree que este

Eliminado: o

Eliminado: o

Eliminado: sulfuro, azufre elemental y tiosulfatos

Eliminado: conjuntamente

comportamiento es debido a la acción de proteínas de la membrana o del periplasma que solubilizan el azufre (Madigan, y col., 2009).

### 1.4.2.3 Bioquímica de las bacterias sulfo-oxidantes

Las ruta bioquímica de oxidación de los compuestos reducidos de azufre dependerá de la especie de azufre que se utilice. Por una parte, si la oxidación se inicia a partir de  $\text{H}_2\text{S}$ , se produce  $\text{SO}_3^{2-}$ , oxidación en la que participan 6 electrones. Durante el proceso, el  $\text{H}_2\text{S}$  debe ser oxidado a poliazufre-sulfuro por la enzima *sulfuro oxidasa*, la cual requiere glutatión (GSH).



Si el compuesto de partida es  $\text{S}_8^0$ , el producto final de la oxidación es igualmente  $\text{SO}_3^{2-}$ , sin embargo el  $\text{S}_8^0$ , debe ser reducido inicialmente a  $\text{HS}^-$ . Una vez que el compuesto inicial ha sido oxidado a  $\text{SO}_3^{2-}$ , se pueden seguir dos vías para oxidarse a  $\text{SO}_4^{2-}$ . La más común es aquella en la que interviene la enzima *sulfito oxidasa*, esta enzima transfiere electrones directamente del  $\text{SO}_3^{2-}$  al citocromo *c*, impulsando la producción de ATP durante el transporte de electrones y la generación del potencial por extrusión de protones. Otra forma de oxidar el  $\text{SO}_3^{2-}$  a  $\text{SO}_4^{2-}$  es por medio de la vía *adenosina-5-fosfosulfato reductasa*; en esta vía se produce un enlace fosfato de alta energía al convertir AMP en ADP. Cuando el  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  es usado como donador de electrones, se bismuta en  $\text{S}_8^0$  y  $\text{SO}_3^{2-}$  y ambos son oxidados a  $\text{SO}_4^{2-}$  (Parés y Juárez, 2002; Madigan, y col., 2009).

Cabe mencionar, que todos los electrones de los compuestos reducidos del azufre entran finalmente en la cadena de transporte de electrones. Dependiendo de la  $E_0'$  del par, los electrones ingresan al nivel de la flavoproteína ( $E_0' = \sim -0.2 \text{ V}$ ) o bien en el citocromo *c* ( $E_0' = +0.3 \text{ V}$ ) y son transportados al  $\text{O}_2$ , por lo que se genera una fuerza motriz de protones que lleva a la síntesis de ATP. Aunque los quimiolitótrofos del azufre son, por lo general, aerobios, algunas especies crecen de forma anaerobia usando nitrato como aceptor de electrones. El mejor ejemplo de este metabolismo es *Thiobacillus denitrificans* (Madigan, y col., 2009).

Eliminado: o

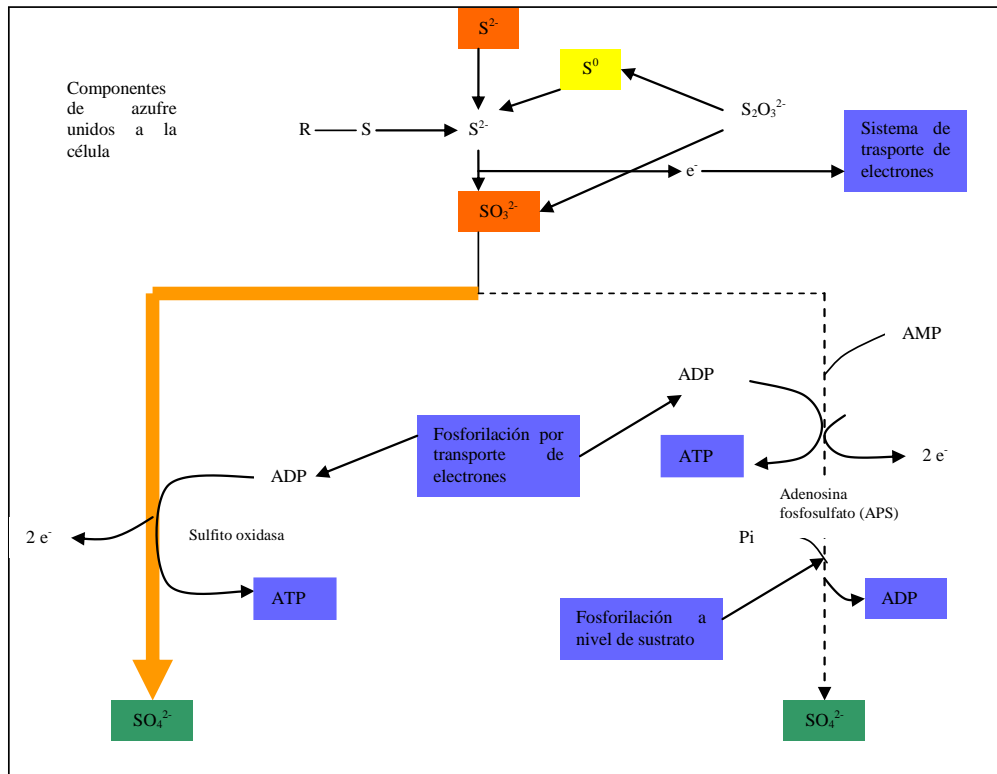


Figura 1.4 Bioquímica del metabolismo sulfuro-oxidante (tomada de Madigan y col., 2009).

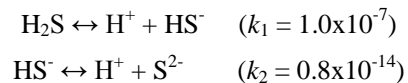
**Comentario [FJFP4]:** Tiene formato de título, por eso te aparece luego en el índice...

### 1.4.2 Efecto inhibitorio del sulfuro

Como se mencionó anteriormente el  $H_2S$ , se disocia en agua de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

**Con formato:** Subíndice

**Eliminado:** sulfuro de hidrógeno



Por lo cual, el efecto inhibitorio del sulfuro se puede considerar dependiente del pH. Tanto en BSR y BSO el efecto inhibitorio de sulfuro es ocasionado por la forma no disociada ( $H_2S$ ), ya que debido a su carácter no polar puede permear la membrana celular. Una vez que el  $H_2S$  ha atravesado la membrana celular puede desnaturar proteínas, debido a la formación de puentes bisulfuro ( $HS^-$ ) entre las cadenas de polipéptidos, y reducir el grupo

hemo de las flavoproteínas de las BSR y los citocromos presentes en ambos grupos microbianos, inhibiendo el transporte de electrones de las cadenas respiratorias. También puede enlazarse con las coenzimas A y M, impidiendo la formación de acetil coenzima A para la fijación de CO<sub>2</sub>, mecanismo común en BSR y BSO (O'Flaherty y Colleran, 2000; Reis y col., 1992; Visser, 1995). Las concentraciones inhibitorias de sulfuro para BSR y BSO son muy variadas. Para las BSR se ha reportado la inhibición del cultivo en un intervalo de concentraciones de 2 a 29 mM de H<sub>2</sub>S (González-Blanco, 2007; O'Flaherty y Colleran, 2000; Reis y col., 1992; Visser, 1995). Para las BSO, Steffes y col., (1996), reportaron la inhibición del cultivo a concentraciones de H<sub>2</sub>S entre 0.15 y 1 mM. En cultivos de *Thiobacillus denitrificans* se ha reportado inhibición a concentraciones de 18.75 mM de H<sub>2</sub>S (Buisman y col., 1990).

Eliminado: aron

### 1.5 Aplicación de técnicas moleculares al estudio de comunidades microbianas complejas

Los estudios de consorcios o comunidades microbianas realizados por técnicas tradicionales no reflejan la complejidad de éstos, ya que se estima que sólo el 1% de las bacterias en la naturaleza han sido aisladas y caracterizadas por estos métodos; en muchas ocasiones se desconocen las condiciones reales en las cuales los microorganismos se desarrollan en su ambiente natural. Las técnicas moleculares permiten detectar poblaciones microbianas concretas y sus actividades, sin necesidad de cultivarlos (Muyzer, y col., 1993) y ofrecen nuevas oportunidades para el análisis de la estructura y composición de especies en comunidades microbianas. Un ejemplo de esto es el cada vez más frecuente uso de marcadores como el del gen que codifica para el ARNr 16S. En particular, la variación de esta secuencia de nucleótidos permite inferir las relaciones filogenéticas entre los microorganismos y diseñar sondas específicas para la detección de taxones microbianos individuales en hábitat naturales. Además, estas técnicas también son aplicadas para determinar la diversidad genética de comunidades microbianas y para identificar varios microorganismos no cultivables.

Eliminado: 20

En general, los análisis moleculares se han realizado mediante la clonación de fragmentos del gen ADNr 16S, obtenidos de diferentes hábitats por amplificación mediante la reacción

en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Sin embargo, estos estudios sólo están enfocados en la exploración de la diversidad microbiana y no dan información de la compleja dinámica debida a las fluctuaciones por muerte o cambios ambientales en los nichos microbianos (Freeman y col., 2005; Madigan y col., 2009; Muyzer, y col., 1993; Muyzer y Smalla, 1998).

A este respecto, existen mejores métodos [\(como la técnica de FISH\)](#) para el estudio de los cambios poblacionales, métodos que se basan en el uso de sondas específicas del taxón para la hibridación del ARNr extraído o de toda la célula. La desventaja de estos estudios es que sólo están enfocados a microorganismos para los cuales las sondas ya se han desarrollado. Por lo tanto, para estudiar la estructura compleja de las comunidades microbianas y su dinámica deben emplearse otras técnicas, como las de huella genética (Amann, y col., 1995).

### 1.5.1 Técnicas de huella genética

Estas técnicas proveen un patrón o perfil de la diversidad genética de una comunidad microbiana. Una de las técnicas de huella genética que ha sido usada en ecología microbiana durante más de una década es la separación electroforética de alta resolución en geles de poliacrilamida de moléculas de ARNr de bajo peso molecular (5S ARNr, ARNt). Recientemente, se han introducido en los estudios de ecología microbiana las técnicas de *electroforesis en gel con gradiente desnaturizante* y de *electroforesis en gel con gradiente de temperatura* (DGGE y TGGE, por sus siglas en inglés, respectivamente), las cuales analizan fragmentos de ADNr amplificados por PCR. La diferencia entre ambas técnicas radica en que la desnaturización de los fragmentos de ADNr se lleva a cabo por distintos medios: en la DGGE la desnaturización es debida a la formación de un gradiente desnaturizante lineal por el empleo de agentes químicos, en cambio en la TGGE se realiza por medio de la formación de un gradiente lineal térmico (Muyzer y Smalla, 1998).

#### 1.5.1.1 Técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

Esta técnica se basa en la diferente movilidad electroforética de fragmentos de ADN parcialmente desnaturizados, para lo cual se utilizan geles de poliacrilamida con un gradiente creciente de urea-formamida. Cada molécula de ADN se desplaza hacia el polo

**Eliminado:** La DGGE es una buena técnica para estudiar las comunidades microbianas de un ecosistema, si lo que se pretende es obtener una información, taxonómica y filogenética, no exhaustiva ni cuantitativa, pero si relativamente precisa (menos que la clonación, pero más que el FISH) acerca de los microorganismos predominantes en dicho ecosistema.¶

positivo y deja de moverse cuando la concentración de urea-formamida provoca su desnaturalización. Esta desnaturalización se lleva a cabo en una zona única del ADNr llamado *dominio desnaturalizante* (segmento de pares de bases con idéntica temperatura de desnaturalización). Una vez que un dominio alcanza su temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) en una posición determinada del gel, se lleva a cabo una transición de la forma elíptica a una parcialmente desnaturalizada (abierta) y es entonces cuando la migración del fragmento de ADNr se detiene.

La DGGE permite obtener un patrón de bandas, la cual refleja la diversidad genética presente en la comunidad microbiana. El número de bandas se corresponde con el número de miembros predominantes en la comunidad, y su secuenciación y posterior análisis filogenético dan una buena perspectiva sobre la composición de la misma.

El uso del DGGE permite detectar cerca del 50% de la variación de las secuencias de los fragmentos de ADN. Este porcentaje aumenta, cerca del 100% cuando se fija a uno de los extremos del fragmento una secuencia rica en guaninas (G) y citosinas (C), secuencias llamadas *GC-clamp*. Esta *GC-clamp* es fijada generalmente al extremo 5' de uno de los oligonucleótidos (normalmente al de ida o F, Forward en inglés), de forma que la secuencia queda incorporada en el fragmento de ADN amplificado. La *GC-clamp* evita que la doble hebra del fragmento de ADN se disocie completamente.

Eliminado: a

La mayor utilidad de la DGGE reside en su empleo para seguir la dinámica de comunidades microbianas de un ecosistema, por ejemplo los cambios temporales en las poblaciones de microorganismos como respuesta a cambios fisicoquímicos o nutricionales en el mismo, especialmente cuando se trata de un gran número de muestras (Muyzer y Smalla, 1998).

A continuación se presentan algunas ventajas y desventajas de la DGGE:

Ventajas:

- Si se trabaja exclusivamente con patrones de bandas, se puede estudiar de manera rápida y sencilla la variabilidad espacio-temporal de las poblaciones.
- Se obtiene una rápida idea global sobre las especies predominantes en el sistema biológico.
- Es una técnica adecuada para analizar un gran número de muestras (comparado con el clonaje).

## Introducción

---

- Permite enfocar nuestros esfuerzos en la búsqueda diferencial de representantes de los dominios *Bacteria o Archaea*.

**Con formato:** Fuente: Cursiva

Desventajas:

- Una mala técnica en la extracción del ADN representativo de las poblaciones, y amplificables por PCR puede ocasionando patrones de bandas que no representen a la cantidad de especies en la muestra analizada.
- Las secuencias que se obtienen corresponden a un fragmento (400-600 nucleótidos) del gen del 16S ARNr, por lo que las relaciones filogenéticas que se establecen son menos fiables que las obtenidas con la secuencia completa del gen.
- Poco útil para diseñar sondas específicas.
- No es cuantitativa.

**Eliminado:** Pueden aparecer problemas en la

**Eliminado:** presentes

**Eliminado:** .

**Eliminado:** <#>Depende del número de copias del ADN. Si el número de bandas detectadas es pequeño, el número de especies identificadas también lo es.¶

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Procesos biológicos para la eliminación de compuestos azufrados

Existen diversas tecnologías para la eliminación biológica de los compuestos azufrados. Estas están basadas en el ciclo del azufre y, principalmente, se busca la formación de intermediarios insolubles como el  $S^0$ , el cual es fácilmente separado de la fase líquida. Sin embargo, el tratamiento de efluentes contaminados con compuestos azufrados se lleva a cabo en sistemas independientes. Uno anaerobio, en el cual el  $SO_4^{2-}$  es reducido a  $H_2S$  (que es un compuesto tóxico) y, por otro lado, uno aerobio en el cual se pretende oxidar parcialmente al  $H_2S$  a  $S^0$ .

Eliminado: azufre elemental

Eliminado: generando un

Eliminado: azufre elemental

#### 2.1.1 Eliminación de sulfato ( $SO_4^{2-}$ )

Existen diversas configuraciones de reactores anaerobios para el tratamiento de aguas residuales ricas en  $SO_4^{2-}$  y materia orgánica. En los tratamientos anaerobios de aguas residuales se ha reportado la eliminación de materia orgánica de distintas fuentes en un amplio intervalo, el cual puede variar de entre un 20 a 100% de eliminación. Por otra parte, la eliminación de  $SO_4^{2-}$  en estos sistemas se encuentra entre el 70 y 100% del  $SO_4^{2-}$  alimentado (tabla 2.1). Además, la relación DQO/ $SO_4^{2-}$  que se establezca define el proceso, ya que se considera un parámetro importante para favorecer al proceso sulfato reductor con respecto al metanogénico, dos procesos relacionados (Hulshoff Pol y col., 1998; Omil, y col., 1998; Hulshoff Pol/Visser, 1995;).

Eliminado: (medida como DQO, demanda química de oxígeno)

En aguas residuales con relaciones masicas de DQO/ $SO_4^{2-}$  de 0.67 se tiene la cantidad de  $SO_4^{2-}$  necesaria para la eliminación de la materia orgánica vía sulfato reducción. Para relaciones menores a la anterior se deberá adicionar algún sustrato orgánico al agua residual, ya que de lo contrario no se dispondrá de la cantidad de electrones necesarios (proporcionados por la oxidación de la materia orgánica) para la reducción del  $SO_4^{2-}$  (Hulshoff Pol y col., 1998; Omil, y col., 1998). En el caso contrario, se ha observado que a relaciones de DQO/ $SO_4^{2-}$  mayores de 0.67 el proceso sulfato reductor no se ve afectado y que tanto la eliminación de materia orgánica como la conversión de  $SO_4^{2-}$  son mayores, en relación con los procesos realizados con relaciones de 0.67 (Hulshoff Pol y col., 1998; Nagpal, y col., 2000; Omil y col., 1998; Visser, 1995).

**Tabla 2.1** Tipos de reactores empleados en el tratamiento anaerobio de aguas residuales ricas en  $SO_4^{2-}$  y



materia orgánica.

Tipo de reactor	Fuente de carbono	Influyente		Efluente		DQO/ SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Referencias
		DQO (g L <sup>-1</sup> )	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (g L <sup>-1</sup> )	DQO eliminada por BSR (%)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> eliminado (%)		
UASB	Ac	1.5-2.1	0.7-3.4	50-90	70	2.14-0.61	Visser, y col., 1993b
EGSB	Ac/Pro/But	0.5-2.5	1.2-4.6	59-90	27-68	0.41-0.54	Omil, y col., 1996
USSB	Ac/Pro/But	0.5-6.0	1.0-12.0	67-81	35	1.0-0.5	Lens y col., 1998b
MUSB	Ac	0.2-0.4	0.1-0.2	100	40-80	2	Arora, y col., 1995
FA	Ácido cítrico	25.8	3.4	18	93	7.58	Colleran <i>et al.</i> , 1994
Bio- electro	Glucosa	0.4	0.7-3.0	NR	35-55	0.57-0.13	Watanabe, y col., 1997
Hibrido	Lixiviados de vertederos	19.6-42.0	5.9	NR	> 90	3.32-7.12	Nedwell y Reynolds 1996
Digestores	Desechos de alimentos marinos	10-60	0.6-2.7	3-12	96.0	16.7-22.2	Omil y col., 1995

Comentario [FJFP5]: Falta en las referencias

Ac, acetato; Pro, propionato, But, Butirato

UASB, reactor de lecho de lodo granular de flujo ascendente; EGSB, reactor de lecho de lodo granular expandido; USSB, reactor de lecho de lodo estancado de flujo ascendente; MUSB, reactor de lecho de lodo granular microaerófilico, FA, filtro anaerobio; NR, no reportado.

Tabla elaborada a partir de Lens, y col., 1998a.

El mayor problema asociado al tratamiento anaerobio de aguas ricas en SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> es la producción de H<sub>2</sub>S, ya que puede resultar inhibitorio para los microorganismos involucrados en el proceso (Hulshoff Pol y col., 1998).

### 2.1.2 Eliminación de sulfuro (H<sub>2</sub>S)

Los métodos para la eliminación de H<sub>2</sub>S comúnmente usados se basan en procesos fisicoquímicos, los cuales involucran la eliminación por aireación, oxidación y precipitación por agentes químicos. La principal desventaja en estos procesos son los altos costos para la disposición de los sólidos generados, la compra de los reactivos químicos y un elevado consumo de energía. Por tal motivo, se recomienda el uso de los procesos biológicos para el tratamiento de estos efluentes. Estos tratamientos consisten en procesos aerobios en donde los microorganismos sulfo-oxidantes tienen la capacidad de oxidar al H<sub>2</sub>S a SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, aunque bajo condiciones limitadas de O<sub>2</sub> se puede lograr la oxidación parcial a azufre elemental. El azufre elemental formado es insoluble, por lo cual se puede separar

## Antecedentes

de la fase líquida y este puede ser empleado en la producción de ácido sulfúrico, fertilizantes, fungicidas, pólvora, etc. (Buisman y col., 1989). Se han empleado diversos sistemas para realizar la oxidación biológica de los compuestos azufrados, aunque debe mencionarse que no en todos los sistemas se logra recuperar los compuestos azufrados como azufre elemental, ya que en ocasiones la oxidación es completa hasta SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. En los sistemas usados para la oxidación biológica de sulfuro (tabla 2.2) se ha logrado la eliminación del HS<sup>-</sup> en un intervalo del 90 al 100%; sin embargo, el intervalo de recuperación de azufre elemental varía entre el 60 y 100%.

**Tabla 2.2** Sistemas usados en la oxidación biológica del sulfuro a azufre elemental.

Escala	Sulfuro en: agua residua/gas/otro	Sistema	Q <sub>v</sub> <sup>alim.</sup> HS <sup>-</sup> (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	Eliminación HS <sup>-</sup> (%)	Recuperación S <sub>8</sub> <sup>0</sup> (%)	Referencia
<i>Sistemas fototróficos</i>						
Lab.	Agua residual	Suspendidas	4.4 mg L <sup>-1</sup>	100	100	Henshaw y col., 1998
Lab.	Gas	Inmovilizadas	1.77	100	-	Kim y col., 1992
Lab.	Gas	Suspendidas	2.5-3.3	100	99	Basu y col., 1996
Lab.	Agua residual	Suspendidas	0.43	-	70	Khanna y col., 1996
Lab.	Agua residual	Fija	0.87	95	-	Kobayashi y col., 1983
<i>Sistemas quimiotróficos</i>						
Lab.	Gas	Filtro flotado	1.0	100	~100	Visser y col., 1997
Lab.	Agua residual	Suspendida	21.8	100	85	Alcántara y col., 2004
Lab.	Gas	Flocular	25 mM g <sup>-1</sup> Biomás. h <sup>-1</sup>	100	-	Sublette, 1987
Lab.	Agua residual	Flocular	0.8-3.4	-	-	Lee y Sublette 1993
Lab.	Agua residual sintética	Suspendidas	6	99	-	Buisman y col., 1990b
Lab.	Efluente anaerobio	Flocular lodo-azufre	14	90	80	Janssen y col., 1997
Piloto	Líquido de lavadores de H <sub>2</sub> S	fijas	6	99	100	Buisman y col., 1993
Piloto	Efluentes industria papelera	fijas	-	70	60-90	Buisman y col., 1993b
Lab.	Agua residual sintética	Lecho fluidizado	7.5-30	100-90	90-65	Krishnakumar y col., 2005

Eliminado: F

Comentario [FJFP6]: Falta en las referencias

Comentario [FJFP7]: Esta falta en las referencias

Por otra parte, también se han reportado estudios acerca de la eliminación de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y la recuperación de S<sup>0</sup> utilizando el crecimiento sintrófico de BSR y BSO. Entre estos trabajos destacan:

Eliminado: azufre elemental

**van den Ende y col., (1997)**, desarrollaron un co-cultivo estable de *Desulfovibrio desulfuricans* PA2805 y de *Thiobacillus thioparus* T5 en un reactor continuo de tanque agitado, alimentado con 19.6 mM de  $\text{SO}_4^{2-}$ , 13.5 mM de lactato y 0.36 mmol/L-h de  $\text{O}_2$ . Se observó que ninguna de las especies pudo crecer como cultivo puro y, bajo estas condiciones, *D. desulfuricans* pudo crecer sólo cuando las concentraciones de  $\text{O}_2$  se mantuvieron por debajo de 2  $\mu\text{M}$  debido al metabolismo de *T. thioparus*. Por su parte *D. desulfuricans* produjo sulfuro y el  $\text{CO}_2$  necesario para el crecimiento de *Thiobacillus*. La elevada producción de  $\text{S}^{2-}$  obtenida por *Desulfovibrio* se tradujo en un incremento de la producción de azufre elemental por parte de *Thiobacillus*. De esta forma se obtuvo un sistema sinérgico en el que se estabilizó y se demostró la asociación sintrófica de estos dos microorganismos. El azufre elemental acumulado fue utilizado eventualmente por *D. desulfuricans* como aceptor de electrones, generando una mayor concentración de  $\text{SO}_4^{2-}$  en el efluente.

**González-Blanco (2007)**, logró la inmovilización de una biopelícula con los metabolismos sulfato-reductor y sulfo-oxidantes acoplados en un reactor de lecho fluidificado inverso (RLFI) empacado con partículas de polietileno molido de baja densidad, que sirvió como soporte a la biopelícula. El reactor se inoculó con lodo de un reactor metanogénico que trataba efluentes municipales. El RLFI se operó durante 55 días en lote, con el fin de lograr la inmovilización de la biopelícula al soporte de polietileno y fue alimentado con medio mineral que contenía 3.9 g  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{SO}_4^{2-}$  (40.6 mM) y 3.0 g  $\text{L}^{-1}$  de lactato (33.3 mM) con una relación de DQO/ $\text{SO}_4^{2-}$  de 0.76; el tiempo de recambio del medio mineral fue de un día y el reactor se mantuvo en un cuarto a temperatura constante de 35°C. Durante la etapa en lote, la máxima producción de azufre elemental fue de 18.7 mM, que corresponde aproximadamente al 50% del  $\text{SO}_4^{2-}$  alimentado. Posteriormente, el reactor fue operado en continuo en tres etapas, con diferentes velocidades de carga volumétricas de  $\text{SO}_4^{2-}$  (40.6, 63.64 y 92.47 mM  $\text{d}^{-1}$ ), lactato (27.2, 43.9 y 61.2 mM  $\text{d}^{-1}$ ) y de oxígeno ( $\text{O}_2$ ) (20.64, 31.68 y 46.56 mM  $\text{d}^{-1}$ ), respectivamente en cada etapa. Durante la operación en continuo se mantuvo una relación de DQO/ $\text{SO}_4^{2-}$  de 0.66 en cada etapa. En las etapas I y II las eficiencias de consumo de  $\text{SO}_4^{2-}$  fueron aproximadamente del 75% y la recuperación de azufre elemental fue del 52% en ambas etapas. Por otra parte, en la

etapa III la eficiencia de consumo del  $\text{SO}_4^{2-}$  y recuperación de azufre elemental disminuyeron a 72% y 30% respectivamente, y se observó la acumulación de  $\text{S}^{2-}$  residual. Con respecto al lactato, sólo se oxidó parcialmente a acetato, y una cantidad del acetato formado fue fermentado a propionato. También se realizaron observaciones de la evolución de la biopelícula mediante microscopía electrónica de barrido durante las etapas de operación del reactor, en las cuales se reportaron morfologías características de microorganismos sulfato-reductores y sulfo-oxidantes.

Como se ha observado en los sistemas empleados para el tratamiento de contaminantes azufrados disueltos (tanto aerobios como anaerobios) en su mayoría se emplean consorcios microbianos, lo cual dificulta la optimización de los procesos, debido a que por lo general se desconocen los microorganismos que están involucrados y cuál es su función dentro del reactor (Freeman y col., 2005).

Eliminado: , como están estructurados

**Lapara y col., (2000)**, realizaron estudios de filogenia de comunidades bacterianas en siete biorreactores conectados en serie y acomodados en orden descendente de temperatura (termofílicos y mesofílicos), los cuales trataban aguas residuales de industrias farmacéuticas. El objetivo de este trabajo fue determinar si en los reactores termofílicos había una disminución de la biodiversidad en comparación con los reactores mesofílicos. Los biorreactores termofílicos se operaron en un intervalo de temperatura de 50 a 58°C y los mesofílicos operaban de 28 a 32°C. El análisis filogenético se realizó empleando la técnica de DGGE con los segmentos amplificados de la región V3 del gen para el ARNr 16S del dominio *Bacteria*. Posteriormente, las bandas obtenidas de la DGGE fueron clonadas y secuenciadas con el fin de identificar la comunidad microbiana presente.

Con formato: Fuente: Cursiva

En los resultados observados se encontró que en los biorreactores termofílicos la comunidad microbiana disminuía en comparación con los reactores mesofílicos. Las secuencias del ARNr 16S en los biorreactores termofílicos mostraban sólo a miembros de las  $\beta$ -Proteobacterias, mientras que en los biorreactores mesofílicos se identificaron seis comunidades bacterianas, que correspondían a: *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*, *Synergistes*, *Planctomycetes*, bacterias Gram (+) con

bajo contenido G+C, *Holophaga-Acidobacterium*, y *Proteobacteria* ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -*Proteobacteria*).

**Freeman y col., (2005)**, realizaron análisis moleculares a comunidades microbianas estabilizadas en biorreactores sulfato-reductores termofílicos (55°C) y mesofílicos (30°C) a escala laboratorio. Los biorreactores fueron alimentados con etanol (3 g DQO L<sup>-1</sup>) como fuente de carbono y en condiciones no limitadas de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Ambos reactores se operaron durante aproximadamente 450 d, con un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 8 h. Se empleó la técnica de DGGE para caracterizar la dinámica y FISH para determinar la estructura y localización de las comunidades microbianas, además de secuenciar los fragmentos amplificados del ADNr 16S para identificar la filogenia de las comunidades del lodo granular de ambos reactores y comprender mejor el bioproceso. Los resultados observados en este estudio fueron los siguientes: en el reactor mesofílico, las secuencias predominantes se encontraron relacionadas cercanamente con las  $\delta$ -*Proteobacterias* y *Firmicutes*, y muchas de las secuencias de las  $\delta$ -*Proteobacterias* estuvieron relacionadas estrechamente con los géneros sulfato-reductores *Desulfuromonas* y *Desulfovibrio*. Por otra parte, en el reactor termofílico se encontró una mayor biodiversidad y las secuencias analizadas para el dominio Bacteria estuvieron relacionadas con las  $\delta$ - y  $\beta$ -*Proteobacterias*, *Firmicutes* y *Spirochaetes*. También se realizaron estudios moleculares en ambos reactores para el dominio *Archaea*, observándose una gran diferencia para ambos reactores: en el reactor mesofílico predominaron las secuencias cercanamente relacionadas con *Methanosaeta spp.*, mientras que en el reactor termofílico las secuencias analizadas se encontraron estrechamente relacionadas con *Methanomethylovorans thermophila*. Cabe mencionar que la actividad metanogénica en los reactores fue despreciable. Otro resultado importante observado en este trabajo fue el cambio significativo en las poblaciones microbianas en ambos reactores cuando se les cambió la fuente de carbono alimentado (de etanol a una mezcla de isopropanol, ácido cítrico y polietilenglicol).

Eliminado: *quea*

**Muyzer y col., (1993)**, empleó la DGGE como herramienta para caracterizar las comunidades microbianas complejas de distintos ambientes y de reactores que trataban aguas residuales que operaban en condiciones aerobias y anaerobias. Con el

fin de probar la sensibilidad de la técnica, realizaron ensayos con cinco especies distintas de eubacterias: *Escherichia coli*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio sapovorans*, *Microcoleus chthonoplastes* y *Thiobacillus thioparus*, y con una mezcla de ellas. Al analizar mediante DGGE los segmentos amplificados, con iniciadores para eubacterias, de la mezcla de las especies antes mencionadas observaron en los geles de acrilamida patrones de bandas semejantes, los que se obtuvieron con los géneros analizados individualmente, lo que demuestra que la DGGE puede ser usada para el análisis de comunidades complejas. Por otra parte, al analizar las muestras de los distintos ambientes observaron patrones de bandas semejantes a los de la mezcla realizada por los autores. En la biopelícula del reactor aerobio se observó un patrón de 10 bandas intensas, mientras que en la biopelícula del reactor anaerobio sólo se observaron 8 bandas. Al realizar el análisis de hibridación de los patrones de bandas de ambos reactores mediante sondas específicas para los géneros mencionados anteriormente, se encontró una fuerte hibridación con los segmentos de ADN obtenidos de *D. desulfuricans*, pero no con los segmentos de *D. sapovorans* o con los otros segmentos de los géneros analizados. Concluyeron que las **BSR**, como *D. desulfuricans*, pueden desarrollar actividad microbiana en condiciones aerobias, así como que la DGGE puede ser empleada como una herramienta eficaz para el análisis de comunidades complejas. Sin embargo, es posible identificar a los géneros de una comunidad sólo cuando constituyan al menos el 1% de la comunidad.

**Eliminado:** bacterias sulfato reductoras

### 3 JUSTIFICACIÓN

Las descargas de aguas residuales que contienen compuestos azufrados y materia orgánica generan una serie de problemas debido a la formación de  $H_2S$ , compuesto que presenta propiedades corrosivas (daña tuberías y plantas de tratamiento de aguas residuales), mal olor y además puede ocasionar cambios en la variedad en cuerpos de agua naturales a consecuencia del cambio de pH y por el consumo de oxígeno disuelto, problemas de salud e incluso la muerte a concentraciones en la atmósfera mayores de  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  (EPA, 2007; Holshoff Pol y col., 1998; Milby y Baselt, 1999). Para evitar esto se han empleado biotecnologías fundamentadas en el ciclo biogeoquímico del azufre, con las cuales se pretende transformar los compuestos azufrados reducidos en azufre elemental. Este compuesto es prácticamente insoluble en agua y presenta densidades entre  $1.9$  y  $2.2 \text{ g cm}^{-3}$ , con lo cual puede ser fácilmente separado de la fase líquida; además es un compuesto inerte, no tóxico y puede ser empleado en la fabricación de fertilizantes, fungicidas, pólvora, entre otros productos (Holshoff Poly col., 1998; Hvited-Jacobsen y Nielsen, 2000). Sin embargo, los sistemas para el tratamiento de estos compuestos son aplicados en compartimentos espacialmente separados: la reducción del  $SO_4^{2-}$  a  $H_2S$  se lleva a cabo en sistemas anaerobios y posteriormente este efluente alimenta a un sistema aerobio, en donde el  $H_2S$  es oxidado parcialmente a  $S_8^0$ .

Los criterios de diseño para estos sistemas se han basado principalmente en parámetros de ingeniería y microbiología clásica, y en ellos no se estudia con detalle la identificación, función y estructura de las comunidades que conforman los consorcios microbianos utilizados. En los últimos años se han empleado técnicas como la DGGE para el análisis de los cambios poblacionales en los sistemas de tratamiento de aguas residuales, con el fin de dejar de ver a los reactores como “cajas negras” y entender lo que realmente sucede dentro de ellos, debido a que la diversidad microbiana, en el caso concreto del tratamiento de aguas, está en función de la composición del agua residual, de las condiciones ambientales, del tipo del reactor y de los parámetros operacionales (Etchebehere y col., 2001).

En el presente proyecto se estudió la dinámica e identificación de las poblaciones de una biopelícula cultivada en un reactor de lecho fluidificado inverso en donde se llevó a cabo la

## *Justificación*

---

reducción del  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{H}_2\text{S}$  y la oxidación parcial del  $\text{H}_2\text{S}$  a  $\text{S}_8^0$  en condiciones limitadas de oxígeno disuelto, con el fin de relacionar los géneros microbianos que forman la biopelícula con el comportamiento del reactor.



### 4 HIPÓTESIS

La reducción de  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{H}_2\text{S}$  y la oxidación parcial del  $\text{H}_2\text{S}$  a  $\text{S}_8^0$  pueden ser llevadas a cabo por una biopelícula de bacterias sulfato-reductoras en asociación metabólica (sintrofia) con bacterias sulfo-oxidantes bajo condiciones limitadas de oxígeno, en la que los sustratos necesarios para las bacterias sulfo-oxidantes serán proporcionados por el metabolismo de las bacterias sulfato-reductoras.

Eliminado: sintrofia

Además, la dinámica e identificación de las comunidades microbianas en la biopelícula permitirá relacionar a los géneros microbianos con las eficiencias de eliminación de los compuestos azufrados, materia orgánica y producción de  $\text{S}_8^0$  en las distintas condiciones de operación del reactor de lecho fluidificado inverso.

### 5 OBJETIVO GENERAL

Identificar las comunidades microbianas de una biopelícula cultivada en un reactor de lecho fluidificado inverso en donde se lleva a cabo la reducción de  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{H}_2\text{S}$  y la oxidación parcial del  $\text{H}_2\text{S}$  a  $\text{S}_8^0$  bajo condiciones limitadas de oxígeno disuelto y relacionar la dinámica poblacional de la biopelícula con la eficiencia del proceso.

#### 5.1 Objetivos particulares

1. Inmovilizar una biopelícula con actividad sulfato-reductora y sulfo-oxidante en partículas de polietileno molido en un reactor de lecho fluidizado inverso (RLFI).
2. Caracterizar los procesos sulfato-reductor y sulfo-oxidante bajo condiciones limitadas de oxígeno durante las etapas de operación en lote y en continuo del RLFI.
3. Estudiar la dinámica y biodiversidad de las comunidades microbianas durante las distintas etapas de operación del RLFI.
4. Correlacionar la estabilidad de los procesos sulfato-reductor y sulfo-oxidantes con las comunidades presentes en la biopelícula en cada etapa de operación del RLFI.

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Materiales

#### 6.1.1 Reactor de lecho fluidificado inverso

La parte experimental se llevó a cabo en un reactor de lecho fluidificado inverso (RLFI) fabricado de acrílico, el cual consistía de una columna cilíndrica de 1 m de altura y de 5.5 cm de diámetro interno, con un volumen de operación de 2.3 L. En su interior contenía partículas molidas de polietileno de baja densidad, con un diámetro promedio de partícula de 0.4 mm y densidad aparente de  $400 \text{ kg m}^{-3}$ , material que ocupaba el 30% del volumen de operación del reactor sin expandir. La alimentación se realizó por medio de una bomba peristáltica, mezclándose con la recirculación del reactor. El efluente que salía por la parte inferior se hizo pasar por un sedimentador de vidrio con un volumen de 0.5 L, en donde eran retenidas las partículas de mayor densidad que provenían del reactor. El reactor contó con recirculación con el fin de expandir el lecho (60% del volumen del reactor), conseguida mediante una bomba peristáltica con una tasa de recirculación de  $3.5 \text{ L d}^{-1}$ , la recirculación pasaba también por un expansor para evitar los pulsos ocasionados por el funcionamiento de la bomba. La corriente de aire se suministraba con una bomba peristáltica directamente a un expansor de flujo que estaba conenctado a la recirculación del reactor. El caudal de aire fue de  $4.32 \text{ L d}^{-1}$ . El RLFI se mantuvo, durante su operación en lote y en continuo, en un cuarto a temperatura controlada ( $30^\circ\text{C}$ ).

#### 6.1.2 Medio de cultivo

La composición de macronutrientes y oligoelementos del medio mineral se muestra en la tabla 6.1. A la solución de macronutrientes se le adicionó 1 mL de la solución de oligoelementos (1000X) para un volumen total de 1 L de medio mineral.

- Eliminado:** aireación
- Eliminado:** se llevó a cabo por medio del expansor de flujo, con
- Eliminado:** una velocidad de
- Eliminado:**  $^{-1}$
- Eliminado:** , en donde se tenía un difusor metálico conenctado a una bomba peristáltica.
- Eliminado:** , a aproximadamente  $30^\circ\text{C}$ .

**Tabla 6.1** Medio mineral

<b>MACRONUTRIENTES</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>
NH <sub>4</sub> Cl	280
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	169
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	150
KCl	500
CaCl <sub>2</sub>	10
Extracto de levadura	18
<b>SOLUCIÓN DE OLIGOELEMENTOS</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>
FeCl 4H <sub>2</sub> O	2000
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	785
ZnCl <sub>2</sub>	150
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O	50
EDTA	500
HCl 37%	1 ml L <sup>-1</sup>

EDTA: Acido etilen diamino tetracético

El medio mineral se complementó con lactato (1.95 g L<sup>-1</sup> en la etapa de inmovilización), lactato-etanol (1.95-0.52 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, en la etapa I), lactato-etanol (1.22-0.62 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, en la etapa II) y sulfato de sodio (3.9 g L<sup>-1</sup>), compuestos usados para el metabolismo sulfato-reductor. Las fuentes empleadas de carbono (HCO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) y sulfuro para el metabolismo sulfo-oxidante se generaron a partir del metabolismo sulfato-reductor. El pH del medio mineral se ajustó a 6.6 con solución 2 N de NaOH.

### 6.1.3 Inóculo

Se recolectó lodo del reactor UASB de la planta de tratamiento de agua residual (PPTAR) de la UAM-Iztapalapa. Se dejó sedimentar durante 24 horas y posteriormente fue decantado. Se vertió 1 L del lodo decantado en un frasco de vidrio de 3 L, al cual se le adicionó 1 L del medio mineral descrito anteriormente, suplementado con lactato y sulfato de sodio con el fin de evitar que los microorganismos presentes en el lodo perdieran actividad metabólica. La relación de DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> fue de 0.76, para favorecer el enriquecimiento de las bacterias sulfato-reductoras. El frasco se mantuvo en un cuarto a

temperatura constante (aproximadamente 30°C) y la renovación del medio de cultivo se hizo en lapsos de 15 días durante un mes.

## 6.2 Operación del reactor de lecho fluidificado inverso

El RLFI operó en lote y en continuo bajo las condiciones de operación que se muestran en la tabla 6.2. La operación en lote tuvo como fin lograr la inmovilización de la biopelícula a las partículas de polietileno molido. Posteriormente, al observar la formación de la biopelícula, el reactor se operó en continuo.

**Tabla 6.2** Parámetros y etapas de operación del reactor de lecho fluidificado inverso.

	Unidades	Etapas		
		Inmovilización	I	II
Tiempo de operación	Días	57	41	31
TR* /TRH**	Días	1	2	2
Alimentación lactato-etanol	%	100-0	80-20	50-50
DQO <sub>Lactato</sub>	g L <sup>-1</sup>	3	2.08	1.3
DQO <sub>Etanol</sub>	g L <sup>-1</sup>	-	0.52	1.3
DQO <sub>Total</sub>	g L <sup>-1</sup>	3	2.6	2.6
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	g L <sup>-1</sup>	3.9	3.9	3.9
DQO/SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	-	0.76	0.66	0.66
Flujo de aire	L d <sup>-1</sup>	1.07	0.54	0.54
<i>Velocidades de carga</i>				
Bv DQO <sub>Total</sub>	g DQO L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	-	1.3	1.3
Bv SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	g SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	-	1.95	1.95
Bv O <sub>2</sub>	g O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	-	0.16	0.16

\*TR, Tiempo de recambio; \*\*TRH, Tiempo de residencia hidráulico.

### 6.2.1 Operación en lote del RLFI: Inmovilización de la biopelícula

Antes de introducir las partículas de polietileno en el reactor, se acondicionaron poniéndolas en un vaso de precipitados de 4 litros, que contenía 2 litros de agua destilada y 2 g de peptona de caseína, con el fin de modificar sus propiedades hidrofóbicas. Las

partículas se mantuvieron en agitación durante 3 horas mediante un agitador magnético a velocidad media (Meraz, 1998).

Las partículas de polietileno molido se adicionaron por la parte superior del RLFI, posteriormente se vertieron 230 mL de lodo decantado (previamente acondicionado durante un mes), el cual contenía una concentración de SSV de 37 g L<sup>-1</sup>. Por último, se llenó el reactor con medio mineral, el cual se suplementó con 3 g L<sup>-1</sup> de DQO (31.2 mM de lactato) y una concentración de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 3.9 g L<sup>-1</sup> (41 mM). La relación de DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> fue de 0.76 (tabla 6.2).

La operación en lote se realizó durante un periodo de 57 días, el tiempo de recambio del medio mineral fue de un día y este se realizaba retirando totalmente la fase líquida del reactor, añadiendo posteriormente el medio mineral fresco por la parte superior del reactor y, por último, purgando el sistema para retirar el aire atrapado en la tubería. La aireación del sistema se realizó con una bomba peristáltica, con una velocidad de 4.32 L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, como se describió anteriormente.

### **6.2.2 Operación en continuo del RLFI**

Una vez que el reactor mostró estabilidad en la operación (la concentración de SVI fue de 1.1 kg m<sup>-3</sup> de soporte seco), se inició la operación en continuo, que tuvo una duración de 72 días. De ellos, durante 41 días se alimentó con una mezcla de lactato-etanol con las proporciones de 80:20, respectivamente, y, posteriormente, los 31 días restantes fue alimentado con una mezcla de lactato-etanol con las proporciones 50:50. Durante toda la operación en continuo la cantidad de DQO total (lactato-etanol) fue de 2.6 g y la relación de DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> se mantuvo en 0.66 (tabla 6.2). El medio mineral que se añadía al reactor era depositado en un recipiente de vidrio cerrado, el cual se mantenía dentro de una hielera que contenía hidrogeles congelados con el fin de evitar la descomposición del medio. El medio mineral era cambiado diariamente y alimentado al reactor mediante una bomba peristáltica, como se mencionó anteriormente (6.1.1). El TRH durante la operación en continuo fue de 2 días.

Eliminado: .

### 6.3 Métodos analíticos

#### 6.3.1 Toma y conservación de muestra del efluente

La muestra del efluente se tomó directamente de la parte inferior del reactor. La muestra se conservaba para análisis posteriores en un congelador a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

#### 6.3.2 Medición de pH

La medición de pH se realizó a partir de la toma de muestra del efluente del reactor, empleando un potenciómetro.

Eliminado: de vidrio

#### 6.3.3 Determinación de $\text{SO}_3^{2-}$ , $\text{SO}_4^{2-}$ y $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$

La cuantificación de sulfato se realizó empleando un método turbidimétrico y por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC). Por este último método se detectaron además los iones  $\text{SO}_3^{2-}$  y  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ .

**Método turbidimétrico:** Este método fue reportado por Sheen (1955) y Thomas y Cotton (1954). Consiste en precipitar el ion sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) con cloruro de bario en medio ácido y posteriormente, leer la absorbancia de la muestra tratada en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 420 nm, correlacionando dicho valor con una curva patrón de  $\text{NaSO}_4$  anhidro (5–40 mg/L).

Comentario [FJFP8]: Faltan las dos referencias...

*Preparación de soluciones:*

**Mezcla de reacción:** mezclar 50 mL de glicerol con una solución que contenga 30 mL de HCl concentrado, 300 mL de agua destilada, 100 mL de alcohol isopropílico o etílico al 95% y 75 g de NaCl.

**Solución estándar de sulfato (100 mg/L):** disolver 147.9 mg de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro en 1000 mL de agua destilada, realizar las diluciones necesarias para la curva patrón.

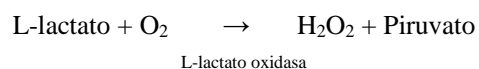
**Procedimiento:** Colocar 50 mL de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Agregar 5 mL de mezcla de reacción. Agitar. Mientras la solución esta agitándose, añadir 0.5 g de cloruro de bario, dejar agitar durante 1 min. Leer absorbancia a 420 nm, durante los primeros cuatro minutos. Tomar la lectura de absorbancia que sea mayor e interpretar con la curva estándar. Corregir el factor de dilución.

**Método cromatográfico:** La determinación de  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  se realizó empleando un cromatógrafo de líquidos de alta presión (HPLC, marca Waters), equipado con un detector de arreglo de diodos (Waters 2996). La columna empleada fue una Ionospher 5A de fase reversa, con una longitud de 200 mm y un diámetro de 3.0 mm. Se empleó como fase móvil una solución de biftalato de potasio 40 mM, con un flujo de  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$ . La fase móvil fue filtrada con una membrana de nylon con un diámetro de poro de  $0.45 \mu\text{m}$ . Las muestras del efluente fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 5 minutos y posteriormente se filtraron empleando membranas de nylon con un diámetro de poro de  $0.22 \mu\text{m}$ . No se requirió la dilución de las muestras del efluente.

### 6.3.4 Determinación de lactato

Las concentraciones de lactato alimentado y residual se determinaron empleando un analizador bioquímico marca YSI modelo 2700. Este método emplea una o más reacciones catalizadas por enzimas adheridas a una membrana de policarbonato, produciendo peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que es oxidado electroquímicamente por un ánodo de platino, produciendo una señal que es captada por un detector.

La enzima que cataliza la reacción del L-lactato es la L-lactato oxidasa, como se muestra en la siguiente reacción:



El método tiene un intervalo de sensibilidad de 2.38 a 2.63 g lactato/L, por lo cual si la concentración de lactato es superior, se deberá diluir la muestra en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.

Las muestras del efluente del reactor fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 5 min, para precipitar los compuestos insolubles presentes en la fase acuosa e impedir interferencias en la determinación del lactato.

### 6.3.5 Determinación de acetato y etanol

El acetato y el etanol se determinaron por cromatografía de gases, empleando un cromatógrafo Hewlett Packard modelo 5890 automático equipado con una columna AT1000 y un detector de ionización de flama (FID). El flujo de nitrógeno como gas acarreador fue de 40 mL min<sup>-1</sup>. Las temperaturas de la columna, inyector y detector fueron 150, 150 y 150°C respectivamente. Las muestras del efluente fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 5 minutos, y posteriormente se filtraron empleando membranas de nylon con un diámetro de poro de 0.22 µm. Posteriormente se tomó una alícuota de 950 µL y se acidificó con 50 µL de HCl diluido al 50%, procediéndose al análisis.

### 6.3.6 Determinación de bicarbonato

El bicarbonato formado fue determinado empleando un cromatógrafo de líquidos de alta presión (presión Waters), equipado con un detector de conductividad (Waters 431). La columna empleada fue la Anion/R, con tamaño de partícula de 10 µm, longitud de 250 mm y diámetro de 4.1 mm. Se empleó como fase móvil una solución de ácido p-hidroxibenzoico 5 mM a pH 8.5, ajustándolo con LiOH, con un flujo de 1.5 mL/min. Las muestras del efluente fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 5 minutos y posteriormente se filtraron empleando membranas de nylon con un diámetro de poro de 0.22 µm. Las muestras fueron diluidas con agua desionizada filtrada y posteriormente inyectadas al equipo.

Con formato: Sin Tachado

Eliminado:

Eliminado: (

### 6.3.7 Determinación de azufre elemental

La determinación de azufre elemental se realizó por dos métodos; 1) El método de Bartlett (1954), el cual es un método colorimétrico y 2) por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución.

**Método de Bartlett:** Este método se fundamenta en la reacción del azufre elemental y el cianuro en medio alcalino para formar al ion tiocianato, el cual puede ser determinado colorimétricamente por la adición de cloruro férrico disuelto en acetona. Los reactivos empleados en esta técnica son los siguientes:



## Materiales y Métodos

---

1. *Solvente de acetona*: 50 mL de agua destilada se aforan a 1 L con acetona.
2. *Solución de cianuro de sodio*: Disolver 0.1 g de cianuro de sodio en 100 mL del solvente de acetona. Preparar al momento de usarla.
3. *Solución de cloruro férrico*: Disolver 0.4 g de cloruro férrico hexahidratado en 100 mL del solvente de acetona. Se recomienda preparar la solución 24 h antes de usarla, decantar la solución para eliminar precipitados metálicos. Esta solución es estable por varias semanas.

Eliminado: potasio

**Procedimiento:** Para determinar la concentración de  $S_8^0$  en el reactor, se tomó un volumen determinado del efluente, se homogenizó y se tomó 1 mL. Se vertió en un tubo Ependorff y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min; posteriormente se retiró el sobrenadante y se le adicionó 1 mL de éter de petróleo para disolver el  $S_8^0$  presente en la muestra. La muestra disuelta se vertió en un tubo con tapa de rosca y se le adicionaron 3 mL de la solución de cianuro de sodio, se mezcló y se dejó reposar durante 2 min (formación del ión tiocianato). Después, se adicionó 1 mL del solvente de acetona, obteniéndose un volumen final de 5 mL, a los cuales se les adicionaron 5 mL de la solución de cloruro férrico. Se mezcló y se determinó la absorbancia a 465 nm en un espectrofotómetro Espectronic 20<sup>+</sup>, con una lámpara de tungsteno. El blanco se preparó con 5 mL de solución de acetona y 5 mL de cloruro férrico.

**Método cromatográfico:** El azufre elemental formado fue determinado empleando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC, marca Waters), equipado con un detector de arreglo de diodos (Waters 2996). La columna empleada fue una Econospher 5 $\mu$  C<sub>18</sub> de fase reversa, longitud de 250 mm y diámetro de 4.6 mm. Se empleó como fase móvil una solución etanol:agua (95:5) con un flujo de 1.0 mL/min (McGuire y Hamers, 2000).

**Solución Estándar de  $S^0$ :** Se pesaron 24 mg de  $S^0$  precipitado o sublimado y se disolvió en 100 mL de tetracloroetileno. Se mezcló en vórtex y se dejó reposar durante una noche en refrigeración. La concentración de la solución fue de 240 ppm de  $S^0$ .

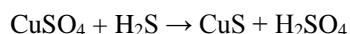
**Curva Estándar:** La curva estándar se realizó en un intervalo de 0 a 240 ppm de  $S^0$ , para lo que se realizaron diluciones (empleando como solvente el tetracloroetileno) a partir de la solución estándar de  $S^0$  descrita anteriormente. Los estándares para realizar la curva se filtraron y se inyectaron en el HPLC, en las condiciones de operación mencionadas anteriormente.

### ***Análisis de la muestra de reactor:***

Las muestras del efluente fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se decantaron y se desecaron en una estufa a 100°C durante 30 min. Una vez secas, se adicionó 1 mL de tetracloroetileno con el fin de disolver el azufre elemental presente en el efluente. Posteriormente, las muestras se filtraron empleando membranas de nylon con un diámetro de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  y se inyectaron al equipo.

### **6.3.8 Determinación de sulfuro disuelto**

La determinación de sulfuro disuelto ( $\text{S}^{2-}$ ) se realizó por medio del método propuesto por Cord-Ruwisch (1985). El sulfuro disuelto se determina colorimétricamente como una solución coloidal de sulfuro de cobre (color café), el cual se forma tras la reacción del  $\text{S}^{2-}$  con el  $\text{Cu}^{2+}$ .



Este método permite cuantificar trazas de sulfuro disuelto (concentraciones de  $\mu\text{L}^{-1}$ ). Los reactivos empleados en esta técnica son los siguientes:

1. *Reactivo de cobre:* consiste en HCl (50 mM) y  $\text{CuSO}_4$  (5 mM)

Para determinar la concentración de  $\text{S}^{2-}$  en el reactor se tomó un volumen determinado del efluente, se tomó 1 mL se vertió en un tubo Ependorff y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min. Posteriormente, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se adicionaron a una celda espectrofotométrica que contenía 4 mL del reactivo de cobre, se mezcló y se determinó la absorbancia de la muestra a 480 nm en un espectrofotómetro Espectronic 20<sup>+</sup> con una lámpara de tungsteno. El blanco consistió solamente en reactivo de cobre.

### **6.3.9 Detección de oxígeno disuelto**

La concentración de oxígeno en la fase líquida fue determinada en la recirculación del efluente, mediante un electrodo polarográfico de oxígeno disuelto (Applisens sensor dissolved oxygen L=590 mm 20 L) calibrado en un intervalo de 0.0 hasta 5.45  $\text{mg O}_2\text{ L}^{-1}$ , que es la concentración correspondiente a las condiciones del medio de cultivo en la Ciudad de México. El electrodo fue conectado a un controlador digital de oxígeno disuelto OD

controller 565.2 B&C Electronics, el cual registraba la concentración ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de oxígeno disuelto.

### 6.3.10 Determinación de sólidos volátiles (SSV)

Eliminado: suspendidos

Se realizó por gravimetría, de acuerdo al método recomendado por la APHA (2005). Los crisoles se pusieron a peso constante, un volumen de 10 mL de muestra homogénea se depositó en el crisol y se evaporó el líquido en una parrilla a baja temperatura, para evitar la ebullición y pérdidas por proyección y sin llegarse a la sequedad total. Las muestras en los crisoles se secaron en una estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  durante una hora, y una vez transcurrido el tiempo se colocaron en un desecador durante 15 min. Se pesaron y se obtuvo el contenido de sólidos totales. El contenido de sólidos fijos se midió después de mantener la muestra 30 minutos en una mufla a  $550^{\circ}\text{C}$ .

Eliminado: 199

La concentración de sólidos totales (ST), se calculó de la siguiente forma:

Eliminado: suspendidos

$g_{SST} / L = [(masa\ del\ crisol + masa\ del\ residuo\ secado\ a\ 105^{\circ}\text{C}) - masa\ del\ crisol\ a\ peso\ constante] / Volumen\ de\ la\ muestra$

Eliminado: suspendidos

Eliminado: suspendidos

Eliminado: S

Los sólidos fijos (SF).

$g_{SSF} / L = [(masa\ del\ crisol + masa\ del\ residuo\ incinerado\ 550^{\circ}\text{C}) - masa\ del\ crisol\ a\ peso\ constante] / Volumen\ de\ la\ muestra$

Eliminado: suspendidos

Eliminado: S

Y por diferencia se obtienen los sólidos volátiles.

Eliminado: suspendidos

$$SV (g/L) = ST - SF$$

Eliminado: S

Eliminado: S

Eliminado: S

### 6.3.11 Cálculo de la equivalencia de la DQO

#### Cálculo de la DQO

La demanda teórica de oxígeno (DQO) es la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar completamente cierta cantidad de materia orgánica, de acuerdo a Tarvin y Buswell (1934). Puede ser calculada de la siguiente manera:

De esta forma, se puede hacer una equivalencia en gramos de diferentes compuestos orgánicos con el fin de compararlos. Las equivalencias de DQO de los compuestos usados en este estudio son las siguientes:

Ácido láctico ( $C_3H_6O_3$ ): 1.066 g DQO / g Ácido láctico.

Ácido acético ( $C_2H_4O_2$ ): 1.066 g DQO / g Ácido acético

Etanol ( $C_2H_6O$ ): 2.084 g DQO / g Etanol.

El ácido acético no fue adicionado al medio mineral, es producido a partir de la oxidación parcial del ácido láctico y por ese motivo también es considerado.

### **6.3.12 Determinación de biomasa inmovilizada**

Se llevó a cabo por gravimetría, tomando 5 mL de soporte directamente del reactor. Dicho volumen se lavó con agua destilada en una probeta de 100 mL que cuenta con una oliva de evacuación en la parte inferior, posteriormente el empaque se vertió a una botella serológica de 60 mL y se le adicionaron 100 mL de agua destilada, la botella se selló con un arillo metálico. A continuación se colocó la botella en un baño ultrasónico (Sonicor) y se sonicó durante 10 min, una vez transcurrido el tiempo se retiró el volumen de la botella con una jeringa de 20 mL. El volumen retirado se recolectó en tubos Falcon, la operación se repitió un total de tres ocasiones. Posteriormente, el total del volumen recolectado (60 mL) se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min, el sobrenadante fue descartado y el precipitado se resuspendió con ayuda de un vórtex, sin adicionar líquido alguno. El precipitado resuspendido se filtró a través de papel filtro Whatman 15. El papel con los sólidos retenidos se puso en charolas de aluminio, secándose en una estufa a 105°C durante 30 min. Una vez transcurrido dicho tiempo se colocaron en un desecador durante 15 min. Los papeles de filtro se pesaron, obteniéndose el contenido de sólidos suspendidos totales inmovilizados. El contenido de sólidos suspendidos fijos inmovilizados se midió después de mantener la muestra 30 minutos en una mufla a 550°C. Las concentraciones de los sólidos suspendidos totales y sólidos suspendidos fijos inmovilizados se determinaron como se indicó en el apartado anterior. La biomasa inmovilizada se reportó como Kg de  $SVI \cdot m^{-3}$  de soporte seco.

#### **6.4 Métodos de preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido**

Se mantuvieron las partículas durante un periodo de 24 horas a 4°C en una solución de glutaraldehído al 2%, que se utilizó como fijador. Posteriormente se retiró el fijador, haciendo lavados con una solución amortiguadora de fosfatos 2 mM a pH 7.2. Retirado el primer fijador se hizo una segunda fijación con tetraóxido de osmio. Después de dos horas fue retirado el segundo fijador y se inició la deshidratación de las muestras con inmersiones sucesivas en soluciones de acetona-H<sub>2</sub>O del 30 al 100%. Al finalizar la deshidratación, la muestra se trasvasó a cápsulas, para hacer una desecación a punto crítico con CO<sub>2</sub> (desecador Samdri-780B). Al terminar el proceso, las muestras se colocaron en un portamuestras de aluminio y fueron cubiertas con carbón y oro en un equipo Denton Vacuum Desk III, observándose en un microscopio electrónico de barrido, JSM-5900 LV (Bozzola y Russell, 1991).

Eliminado: JOEL

#### **6.5 Métodos de biología molecular**

##### **6.5.1 Toma y conservación de la muestra**

Las muestras para el análisis de la dinámica e identificación poblacional se tomaron directamente de la parte interna del reactor, mediante la introducción de una manguera a través del lecho de partículas de polietileno que permanecían en la parte superior del reactor debido a su densidad (esto se hizo de esta forma ión el fin de tomar partículas a lo largo de todo el empaque). También se tomó una muestra de la fase líquida del reactor. Se tomaron un total de 13 muestras durante la operación del RLFI, las muestras tomadas se depositaron en frascos estériles y se conservaron en congelación a -20°C hasta su análisis. Los criterios para realizar la toma de muestras del reactor se basaron en los cambios drásticos, tales como: cambios de coloración de la biopelícula o de la fase líquida, la aparición de espumado, o una vez que se alcanzó un estado estacionario en el reactor.

Eliminado: o

### 6.5.2 Extracción del ADN genómico

Inicialmente se realizó el desprendimiento de la biopelícula adherida al empaque de polietileno, como se describió en el apartado 6.3.12.

Una vez que se obtuvo el precipitado resuspendido se trasvasó a un tubo Ependorff de 1.5 mL, el cual fue centrifugado a 10,000 rpm durante 5 min; posteriormente se retiró cuidadosamente la mayor cantidad de sobrenadante, con el fin de eliminar agua de la muestra.

En cuanto a la fase líquida tomada del reactor, la extracción se realizó centrifugando 100 mL de la muestra líquida a 10,000 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y el precipitado se transfirió a un tubo Ependorff de 1.5 mL, centrifugándose nuevamente a 10,000 rpm durante 10 min, con el fin de retirar la mayor cantidad de agua del pellet.

Por último, la extracción del ADN (tanto para la biopelícula como para la muestra líquida) se realizó empleando el kit UltraClean Soil DNA Isolation (No. Cat. 12800) de MoBio, siguiendo el protocolo de máximo rendimiento.

**Eliminado:** (ya que el contenido de la materia soluble pudiese interferir con la extracción del ADN)

### 6.5.3 Electroforesis horizontal en gel de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa se emplea como indicador de la pureza de las moléculas de ácidos nucleicos, además de ser una técnica empleada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos. La separación de las moléculas es influenciada por la aplicación de un campo eléctrico. Para lograr la mejor separación se debe tomar en cuenta: la concentración de la agarosa en el gel, el voltaje y tiempo de corrida, principalmente.

La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1%, empleando como disolvente la solución amortiguadora TAE 1X. La mezcla de ambos componentes se calentó en el horno de microondas hasta lograr que la agarosa se disolviera totalmente y se observará una solución homogénea. Posteriormente, se dejó enfriar y se vertió el volumen necesario en la canastilla de la cámara de electroforesis en la cual se montó el peine para formar los pozos. Por último, se dejó solidificar a temperatura ambiente.

**Eliminado:** : prueba de pureza del ADN extraído

**Eliminado:** óptima

## Materiales y Métodos

Una vez solidificado el gel en la canastilla, se depositó en la cámara de electroforesis y se vertió el amortiguador de electroforesis (TAE 1X) hasta inundar el gel.

Por otra parte, se preparó la mezcla del ADN extraído con el amortiguador de carga como se indica a continuación: se tomaron 5  $\mu\text{L}$  del ADN extraído, 2  $\mu\text{L}$  del amortiguador de carga (Promega<sup>MR</sup>, No. Cat. G190A) y 13  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada estéril y se mezclaron.

Por último, la mezcla se cargó en el gel y se corrió la electroforesis a 100 V durante 30 min.

Eliminado: ío

Eliminado: ¶

Al terminar el tiempo de la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio como se menciona a continuación: el gel se transfirió a un recipiente que contenía una solución de bromuro de etidio ( $1\mu\text{g mL}^{-1}$ ) durante 10 min, impidiendo el contacto con la luz.

Eliminado: <#>Tinción del gel de agarosa con bromuro de etidio¶

Eliminado:

Posteriormente se sacó y se sumergió en una charola con agua destilada. Por último, se observaron y fotografiaron las bandas en el gel mediante la transluminación de luz UV en un fotodocumentador (EpiChemi<sup>3</sup>, Biolumaging System). Las imágenes fueron ajustadas con el software LabWork<sup>MR</sup> versión 4.0.0.8 para obtener una mayor calidad de imagen.

Eliminado: s

Eliminado: .

### 6.5.4 Amplificación del ADN extraído por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se realizó en un termociclador Thermo electron Corp. Modelo PXE 0.2. Con el fin de llevar a cabo la identificación y la dinámica de las comunidades presentes en la biopelícula y en la fase líquida del RLFI, se realizaron las amplificaciones de fragmentos de los genes para el ARNr 16S (tanto para bacterias como para arqueas), a partir del ADN total extraído de las 13 muestras. Las amplificaciones para ambos géneros microbianos se llevaron a cabo mediante dos estrategias y se emplearon los oligonucleótidos que se muestran en la tabla 6.4.

**Tabla 6.4.** Oligonucleótidos usados para la amplificación de genes del ARNr16S.

Oligonucleótido	Región blanco	Localización <i>E. coli</i>	Secuencia 5'→3'
E9F	Universal	-	GAGTTTGATCCTGGCTCAG
E926R	Universal	-	CCGICIATTIITTTIAGTTT
PRBA338F <sup>a</sup>	Bacteria, V3	338-357	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
PRUN518R	Universal, V3	518-534	ATTACCGCGGCTGCTGG
PARCH340F <sup>a</sup>	Arquea, V3	340-357	CCCTACGGGG(C/T)GCA(G/C)CAG
PARCH519R	Arquea, V3	519-533	TTACCGCGGC(G/T)GCTG
GC-clamp	-	-	CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG

<sup>a</sup>, El GC-clamp fue unido al extremo 5' del oligonucleótido.

Muyzer, y col., (1993); Forney, y col., (2004); Nielszen, y col., (2002).

Las estrategias para la amplificación de los genes para el ARNr 16S fueron las siguientes:

*Amplificación mediante PCR anidado:* En este proceso, se realiza un PCR inicial y los productos de PCR resultantes sirven como ADN molde para una amplificación posterior, en la cual se utilizan oligonucleótidos específicos para género o incluso algún microorganismo específico. Este proceso se puede realizar repetidamente para obtener fragmentos muy específicos de ADN y realizar con mayor calidad los análisis posteriores como la DGGE.

A los ADN de las muestras se les realizó un PCR inicial para amplificar el gen que codifica para el gen del ARNr16S, para lo cual se empleó el par de oligonucleótidos E9F/E926R (tabla 6.3) y el programa de PCR 1 (tabla 6.5), con lo cual se obtuvieron segmentos de ADN amplificado de alrededor de 1,000 pb. Posteriormente, se emplearon como ADN blanco los productos de PCR de las amplificaciones anteriores para realizar los PCR anidados, de forma independiente tanto para bacterias y para arqueas. En los PCR anidados para bacterias y arqueas se usaron los siguientes pares de oligonucleótidos y programas de PCR (PPCR): PRBA338F/PRUN518R y PPCR 2; y PARCH340F/PARCH519R y PPCR 3, respectivamente (tablas 6.4 y 6.5). Las longitudes de los segmentos amplificados para bacterias y arqueas fueron aproximadamente de 236 y 233 pb, respectivamente. Por otra parte, se realizaron amplificaciones directas de ADN extraído de las 13 muestras como se describe a continuación.



## *Materiales y Métodos*

*Amplificación directa:* Este proceso consistió en amplificar el ADN extraído de la biopelícula y de la fase líquida del RLFI en una sola PCR, para lo cual se utilizaron los pares de oligonucleótidos y PPCR, PRBA338F/PRUN518, PPCR 2 y PARCH340F/PARCH519R, PPCR 3, para bacterias y arqueas respectivamente.

**Tabla 6.5.** Programas de temperatura usados para la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR).

Programas PCR	1 ciclo		30 ciclos		1 ciclo
	Pre-desnaturalización	Desnaturalización	Hibridación	Polimerización	Polimerización final
1	94°C, 2 min	94°C, 45 s	60°C, 30 s	72°C, 1.5 min	72°C, 10 min
2	94°C, 2 min	94°C, 30 s	55°C, 30 s	73°C, 1 min	72°C, 7 min
3	94°C, 4 min	94°C, 1 min	58°C, 1.5 min	72°C, 2 min	72°C, 7 min

Nielsen, y col., 2003.

Cabe mencionar que a los oligonucleótidos PRBA338F y PRUN518F se les adicionaron las secuencias GC-clamp, ya que son requeridos para analizar los productos de PCR posteriormente por DGGE.

La calidad de todos los productos de PCR obtenidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% y se comparó la longitud de los productos de PCR contra el marcador de peso molecular de PROMEGA<sup>MR</sup> Num. Cat. G3161, el cual contiene seis fragmentos de ADN con las siguientes longitudes: 50, 150, 300, 500, 750, 1000 pb.

Eliminado: 7

Los productos de PCR seleccionados para analizar la dinámica poblacional de la biopelícula fueron los que se realizaron de forma directa, ya que mostraban mejor calidad con respecto a los que se hicieron mediante PCR anidado.

### 6.5.5 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante

La electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, por sus siglas en inglés) se realizó en un equipo DCODE de BIO-RAD<sup>MR</sup>. Para el análisis de la dinámica poblacional en la biopelícula se prepararon dos geles de 16 X 16 cm y de 1 mm de espesor. Cada gel presentaba 16 pozos en la parte superior, en los cuales se puede cargar un volumen de entre

## Materiales y Métodos

5 a 15  $\mu$ L de muestra a analizar. En cada gel se cargaron 13 muestras, en uno se analizaron los productos de PCR amplificados de forma directa usando los oligonucleótidos específicas para *Bacteria* y en el otro gel los productos de PCR amplificados directamente en los cuales se usaron los oligonucleótidos específicos para arqueas.

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: *b*

A continuación se describe el procedimiento por el cual se llevó a cabo el análisis de la dinámica poblacional de la biopelícula durante el tiempo de operación del RLFI.

### 6.5.5.1 Preparación de las soluciones desnaturalizantes y geles de acrilamida

*Preparación de soluciones:* La concentración de acrilamida en el gel está en función del tamaño de los productos de PCR a separar. En el presente estudio se utilizó una concentración de acrilamida del 8% (concentración recomendada para separar fragmentos de entre 200 y 400 pb), ya que los fragmentos a separar (tanto para bacterias como para arqueas) contenían alrededor de las 230 pb. Por otra parte, el gradiente desnaturalizante de formamida-urea en los geles fue del 30 al 60% y no fue necesario probar otro porcentaje, pues se consideró que la separación de las bandas fue adecuada.

Una vez seleccionados los porcentajes de acrilamida y de desnaturalizante se prepararon las soluciones desnaturalizantes de “alta” y “baja”, conforme se indica en la tabla 6.6.

Con formato: Sin Tachado

**Tabla 6.6.** Componentes para preparar geles de acrilamida al 8% y soluciones desnaturalizantes.

Compuesto	Soluciones desnaturalizantes	
	Baja (30%)	Alta (60%)
Acrilamida/Bisacrilamida 40% (mL)	20	20
TAE 50X (mL)	2	2
Formamida (mL)	12	24
Urea (g)	12.6	25.2
Agua desionizada (mL)	c.s.p. 100 mL	c.s.p. 100 mL
Volumen total (mL)	100	100

una vez que las soluciones estuvieron preparadas, se filtraron con membranas de nylon con un diámetro de poro de 0.22  $\mu$ m y se desgasificaron durante 15 min. Por último, se conservaron a 4°C en frascos ámbar, para evitar el contacto con la luz.

*Preparación de geles:* Con el fin de evitar algún tipo de contaminación, se lavaron con detergente suave las placas de vidrio, los espaciadores y el peine, posteriormente se enjuagaron con agua destilada. Una vez seco el material, se limpiaron las placas de vidrio con etanol y se dejaron secar. En seguida, se montaron las placas de vidrio en el sistema de ensamblaje como lo describe el manual de BIO-RAD<sup>MR</sup>, se debe verificar con la “tarjeta de alineamiento” que exista el espacio suficiente para introducir las soluciones de alta y baja, y que el peine entre bien entre los cristales, así como, verificar con la burbuja niveladora que el sistema se encuentre sobre una superficie nivelada.

Además, se ajustó el sistema formador de gradiente a la graduación 15 para jeringas de 30 mL y se enjuagaron las jeringas, tuberías y agujas del sistema con agua desionizada.

Por otra parte, se prepararon las soluciones desnaturalizantes de alta y baja de la siguiente manera: en tubos Falcon de 50 mL se vertieron 20 mL de las soluciones desnaturalizantes de alta y baja (previamente preparadas), a cada tubo se le adicionaron 100 µL de PSA al 10% (preparar al momento de usarlo) y 10 µL de TEMED. Los tubos se agitaron manualmente. Posteriormente, se tomaron las soluciones desnaturalizantes con las jeringas y se desplazó el aire contenido en ellas, por último se ajustó el volumen en cada jeringa a 18 mL de líquido. Inmediatamente las jeringas se colocaron en la posición correcta (alta y baja) del sistema formador de gradiente y se conectaron a la tubería.

Una vez armado correctamente el sistema formador de gradiente se giró la rueda del sistema para desplazar el aire contenido en la tubería y llenar la cavidad de los cristales. Por último, se colocó el peine entre las cavidades y se dejó polimerizar durante aproximadamente 90 min. Durante este tiempo se recomienda preparar el tanque de electroforesis y precalentar la solución amortiguadora de corrida.

### **6.5.5.2 Preparación del tanque de electroforesis**

El tanque de electroforesis se enjuagó con agua destilada y se dejó secar. En el tanque se vertieron 7 L de amortiguador de corrida (TAE 1X) y se calentó durante 90 min a 60°C.

Los geles polimerizados se colocaron sobre el marco sujetador y se depositaron en el tanque de electroforesis con el amortiguador de corrida (se recomienda retirar cierto volumen para evitar derrames del amortiguador), el cual se siguió calentado a 60°C.

**Comentario [FJFP9]:** Pon el nombre entero, casi siempre aparece en las recetas como APS...

### **6.5.5.3 Preparación y carga de la muestra**

Al iniciar la preparación de las muestras a cargar, se recomienda aumentar la temperatura del tanque de electroforesis a 65°C, para que al finalizar la carga de las muestras en los pozos la temperatura del tanque se encuentre alrededor de los 60°C.

Las 26 muestras cargadas se prepararon de forma similar, es decir de cada muestra (productos de PCR tanto de bacterias como de arqueas) se tomaron 7.5 µL. A este volumen se le adicionaron 7.5 µL del amortiguador de carga 2X y se mezcló succionando y expulsando con ayuda de una micropipeta automática. Antes de cargar las muestras en los pozos, se retiró el peine cuidadosamente (se recomienda enjuagar cada pozo con 1 mL del amortiguador de electroforesis contenido en el tanque). Por último, se cargó en los pozos cada muestra preparada utilizando una punta ultra delgada nueva (desechar las puntas usadas), se vertió el amortiguador de electroforesis que se retiró para evitar derrames. Una vez que se cargaron todas las muestras en los dos geles, se cerró el equipo y se corrió la electroforesis durante 15 horas a 75 V y 60°C.

Al terminar el tiempo de electroforesis, el sistema de ensamblaje con las placas de vidrio se sacó del tanque de electroforesis. Se desmontó el sistema y se retiraron las placas de vidrio con sumo cuidado para evitar romper los geles de acrilamida. Los geles se depositaron en refractarios en donde se tiñeron con plata.

### **6.5.5.4 Tinción con plata de los geles de acrilamida**

Para la tinción con plata se requirió preparar las siguientes soluciones:

1. *Solución fijadora 8X*: Se mezclaron los siguientes compuestos; 200 mL de alcohol absoluto, 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua desionizada.
2. *Solución de nitrato de plata (para un gel)*: En 200 mL de agua destilada se disolvieron 0.4 g de nitrato de plata. La solución se almacenó en un recipiente cubierto con papel aluminio para evitar el contacto con la luz.
3. *Solución reveladora (para un gel)*: Se disolvieron en 200 mL de agua desionizada 3 g de NaOH, 0.75 mL de formaldehído al 37% y 10 mg de NaBH<sub>4</sub> (se adicionó al momento de usar la solución).

Procedimiento: A cada gel se le adicionó 200 mL de la solución fijadora (1X) y se dejó incubar durante 10 min agitando suavemente, la solución fijadora se retiró (no desecharla, pues se utilizará posteriormente). Posteriormente se adicionaron 200 mL de la solución de nitrato de plata, nuevamente se dejó incubar durante 10 min agitando suavemente y la solución se desechó en un recipiente especial. El gel se enjuagó tres veces con 100 mL de agua desionizada durante 1 min. A continuación se adicionaron 200 mL de la solución reveladora, se agitó suavemente hasta observar la aparición de las bandas en el gel. Inmediatamente, se desechó la solución y se paró la reacción con los 200 mL de la solución fijadora utilizada al inicio. Por último, se desechó esta solución y se adicionaron 200 mL de agua desionizada.

Los geles se observaron mediante la transluminación de luz blanca en un fotodocumentador (EpiChemi<sup>3</sup>, Bioluming System). Las imágenes fueron ajustadas con el software LabWork<sup>MR</sup> versión 4.0.0.8, [para obtener mayor calidad de imagen](#),

Eliminado: .

### **6.5.5.5 Recuperación del ADN de las bandas individuales**

Al analizar el patrón de distribución de bandas en el gel de DGGE, se seleccionaron las bandas más representativas, tomando en cuenta la permanencia, aparición y desaparición de las bandas durante las etapas de operación del RLFI. Las bandas seleccionadas fueron cortadas del gel con un bisturí estéril, en una campana de flujo laminar. Cada banda cortada fue depositada en un tubo Ependorff estéril de 600 µL y a los tubos se les adicionó agua desionizada estéril. Posteriormente, todos los tubos con las bandas se incubaron a 37°C durante una hora y se dejaron reposar 24 horas a 4°C. Por último, los tubos se congelaron a -20°C hasta que se realizó la amplificación del ADN. La amplificación se realizó de forma directa, como se describió en el punto 6.6.5, sin embargo, al oligonucleótido PRBA338F no se le adicionó la secuencia *GC-clamp* debido a que los productos de PCR resultantes fueron utilizados para el análisis de su secuencia de nucleótidos. Los productos de las PCR resultantes fueron purificados con el kit de purificación Wizard Genomic DNA de PROMEGA<sup>MR</sup> Num. Cat. A1120, tal como indica el manual del producto.

La calidad de los productos de PCR y de los purificados fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, como se describió anteriormente.

#### **6.5.5.6 Secuenciación y análisis de los productos purificados**

El análisis de la secuencia correspondiente a las bandas cortadas y purificadas fue llevado a cabo por la Dra. Alejandra Serrato del Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la UAM-I, mediante el método de secuenciación automática. En dicho método se utilizan cuatro diferentes terminadores de cadena marcados (correspondientes a cada uno de los cuatro nucleótidos que componen el ADN), realizándose la reacción en un solo tubo. Mediante este mecanismo se permite automatizar el proceso, ya que es posible leer al mismo tiempo los ADNs de nueva síntesis producto de las cuatro mezclas de reacción. Posteriormente, los productos de reacción se separan mediante electroforesis capilar y son detectados por un láser, que excita a los fluoróforos usados en el marcaje y manda la señal a un detector, el cual genera un registro de los cuatro perfiles de color, que combinados se interpretan como una secuencia.

Una vez que se obtuvieron las secuencias de las bandas seleccionadas, éstas fueron analizadas con el programa BLAST de la base de datos del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), lo cual permitió relacionar a los microorganismos presentes en la biopelícula del RLFI con algunos géneros microbianos ya reportados previamente.

Eliminado: a

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

### **7.1 Operación del Reactor de Lecho Fluidificado Inverso (RLFI)**

#### **7.1.1 Operación en lote del RLFI: inmovilización de la biopelícula**

El primer objetivo de este estudio fue lograr la formación de una biopelícula con actividad sulfato-reductora y sulfo-oxidante sobre partículas de polietileno dentro de un reactor de lecho fluidificado inverso (RLFI) operado en lote. El inóculo usado fue un lodo anaerobio procedente de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. El lodo con el que se inoculó el reactor contenía una concentración de sólidos volátiles (SV) de  $37 \text{ g L}^{-1}$ .

La operación en lote duró 57 días y fue alimentado con el medio mineral descrito en el apartado 6.1.2 (los recambios del medio mineral se hicieron diariamente). Al medio mineral se le adicionaron  $31.33 \text{ mM}$  de lactato ( $3 \text{ g L}^{-1}$  de DQO) y  $40.60 \text{ mM}$  de  $\text{SO}_4^{2-}$  ( $3.9 \text{ g L}^{-1}$ ), la relación másica de  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  fue de 0.7692 con el fin de favorecer el crecimiento de microorganismos sulfato-reductores, ya que de acuerdo con Visser (1995), con relaciones de  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  entre 1.7 y 2.7 existe una activa competencia por el consumo de la fuente de carbono entre las bacterias metanogénicas y sulfato-reductoras oxidadoras de acetato. El pH del medio se ajustó a 6.6 con  $\text{NaOH } 2 \text{ N}$  y el reactor se aireó a un flujo de  $1.7 \text{ L d}^{-1}$ .

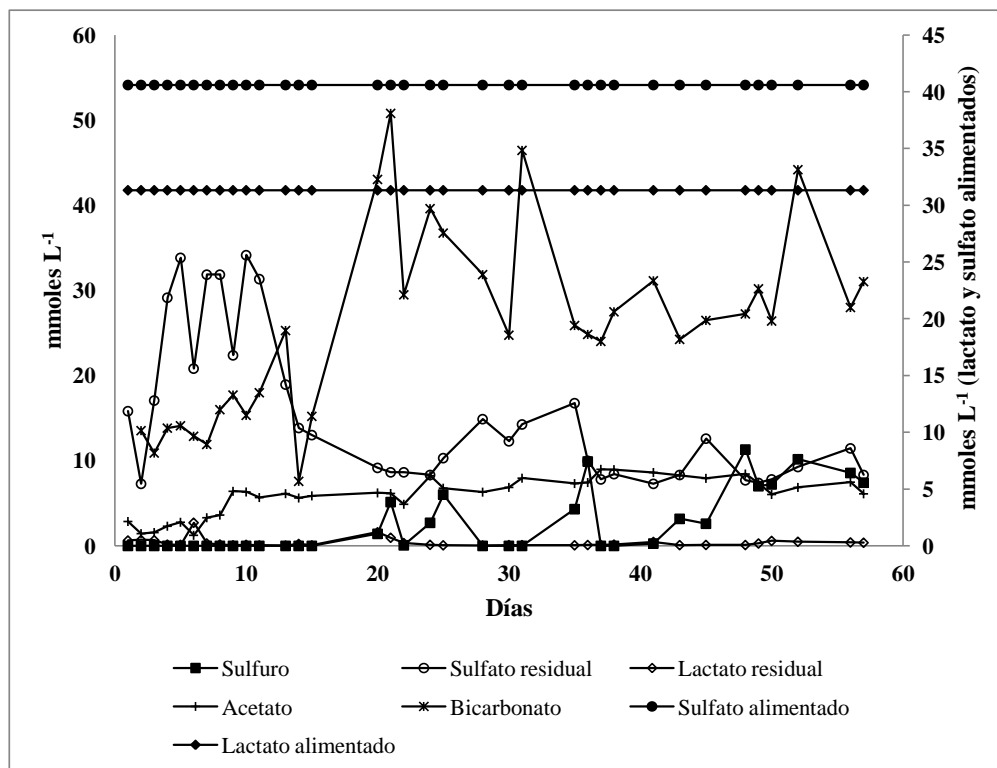
Alrededor de los seis días de operación del reactor, las partículas de polietileno tomaron un color grisáceo, lo cual indicó la colonización del empaque. La concentración de sólidos volátiles inmovilizados (SVI) en ese momento fue de  $16 \text{ kg m}^{-3}$  de soporte seco. Alrededor de los 12 días de operación, la concentración de SVI disminuyó hasta  $3 \text{ kg m}^{-3}$  de soporte seco, la cual se mantuvo constante durante aproximadamente 23 días. La disminución de la concentración de los SVI se atribuyó a la pérdida del exceso de lodo con el que se inoculó el reactor y no a la pérdida de biopelícula adherida al material de soporte.

La concentración de SVI de  $3 \text{ kg m}^{-3}$  de soporte seco es similar a la reportada por González-Blanco (2007) quien operó el mismo sistema bajo condiciones semejantes. Durante estos días el reactor presentó problemas de operación, que se atribuyeron principalmente a la corriente de aire que se alimentaba por la parte inferior de la columna (lo cual ocasionaba la compactación del lecho). La medida que se tomó fue el cambiar la

## Resultados y Discusión

alimentación del aire al reactor de la parte inferior de la columna a un expansor de flujo que estaba conectado a la recirculación del reactor. Sin embargo, con el cambio de la alimentación de aire se observó un efecto negativo en la concentración de SVI, ya que disminuyó de 3 a 1 kg m<sup>-3</sup> de soporte seco. La disminución de los SVI se atribuye principalmente a la limitación de oxígeno disuelto, ya que este compuesto es necesario para el desarrollo de los microorganismos aerobios presentes en la biopelícula. Posteriormente, la concentración de SVI de 1 kg m<sup>-3</sup> de soporte seco se mantuvo constante durante la operación en lote del reactor.

Por otra parte, a los 14 días de operación del reactor, la biopelícula mostró actividad sulfato-reductora (Figura 7.1).



**Figura 7.1** Perfil de compuestos azufrados y de carbono durante la operación en lote e inmovilización de la biopelícula en el RLF.



El lactato alimentado sirvió como donador de electrones para la reducción biológica de  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{H}_2\text{S}$ . Se observó que la eficiencia de consumo de  $\text{SO}_4^{2-}$  ( $\eta \text{SO}_4^{2-}$ ) fue aproximadamente del 75% del  $\text{SO}_4^{2-}$  alimentado (40.60 mM) y fue reducido a sulfuro ( $\text{HS}^-$ ), la velocidad específica de consumo fue de  $27.95 \text{ mmol SO}_4^{2-} \text{ gSVI}^{-1} \text{ d}^{-1}$ .

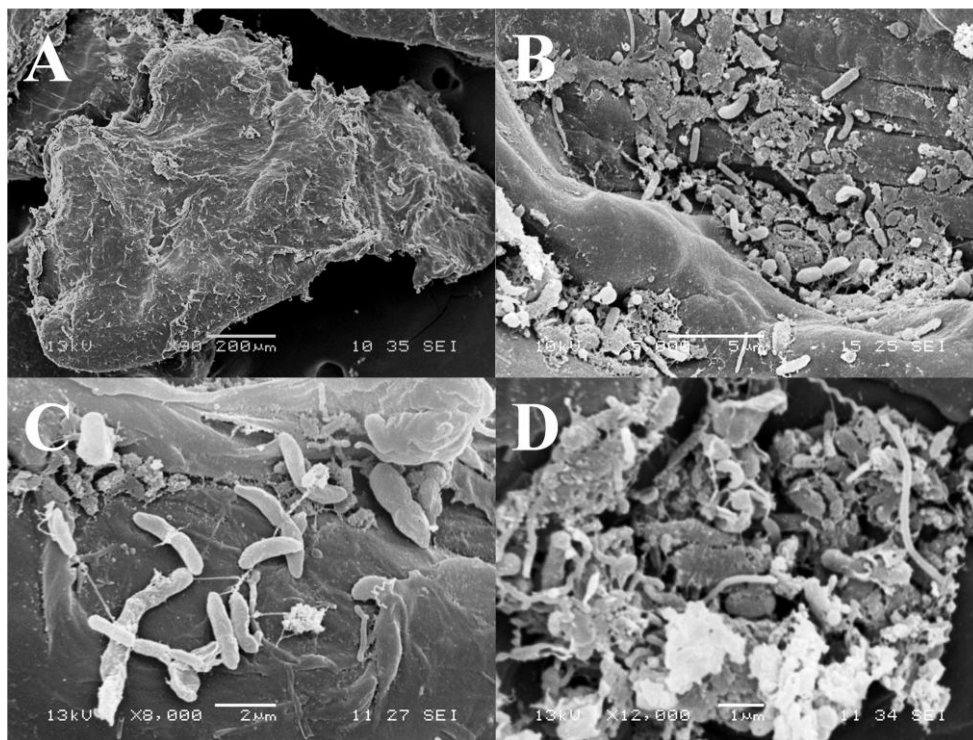
Durante esta etapa, también se apreció la formación de gránulos color amarillo paja, de un diámetro aproximado de 1 mm, presumiblemente azufre elemental ( $\text{S}^0$ ), lo cual fue corroborado mediante cianólisis y cromatografía de líquidos de alta resolución. Sin embargo, la producción del compuesto no fue constante, y la concentración varió de 0.12 a 12 mM de  $\text{S}^0$ . A pesar de la presencia de  $\text{S}^0$  en el sistema no existe evidencia que muestre que fue formado por la actividad de microorganismos sulfo-oxidantes presentes en la biopelícula, ya que este compuesto pudo ser producto de la oxidación química del sulfuro producido por el metabolismo sulfato-reductor (Jorgensen, 1990).

En cuanto al consumo de la fuente de carbono, se observó una eficiencia de consumo de lactato ( $\eta \text{ lactato}$ ) del 99% del alimentado (Figura 7.1). El lactato fue oxidado a acetato (7.16 mM) y  $\text{HCO}_3^-$  (30.29 mM). La velocidad específica de consumo de lactato fue de  $28.21 \text{ mmol g SVI}^{-1} \text{ d}^{-1}$ .

### **7.1.2 Análisis de la biopelícula inmovilizada por microscopía electrónica de barrido.**

Para determinar la presencia de microorganismos sobre las partículas de polietileno se realizó el análisis por medio de microscopía electrónica de barrido. El análisis mostró la colonización del soporte a partir de los seis días de operación en lote, tal como se indicó en el apartado anterior. La Figura 7.2 muestra las micrografías del soporte sin colonización y diferentes partículas de polietileno ya colonizadas por microorganismos. El soporte sin colonizar (Figura 7.2 A) presenta una superficie rugosa y con cavidades, características favorables para formación de biopelículas microbianas. En cuanto a las partículas de polietileno colonizadas podemos observar tanto células adheridas individualmente como en forma de agregados. Las células individuales tiene una longitud de  $1 \mu\text{m}$  aproximadamente y se presentan en forma de: bacilos, barras y cocobacilos (Figura 7.2 B); diplobacilos y

bastones (Figuras 7.2 C). Por otra parte, los agregados microbianos presentan morfologías del tipo: diplococo, espirilos, vibrios y espiroquetas (Figura 7.2 D).



**Figura 7.2** Micrografías de la biopelícula formada durante la etapa de inmovilización. (A) Partícula de polietileno sin colonizar (tomada de González-Blanco, 2007) (90X), (B) Bacilos, barras y cocobacilos (5,000X), (C) Diplobacilos y bastones (8,000X) y (D) Agregados microbianos (12,000X).

Algunos de los microorganismos presentes en la biopelícula muestran características morfológicas de los grupos sulfato-reductores (bacilos, cocoides, barras, entre otros) y sulfuro-oxidantes (vibrios y bacilos principalmente) (Parés y Juárez, 2002). Sin embargo, el análisis de microscopía electrónica de barrido no da la suficiente evidencia para confirmarlo.

### 7.1.2 Operación en continuo del RLFI

Al observar que la concentración de SVI en la biopelícula se mantenía constante ( $1 \text{ kg m}^{-3}$  de soporte seco) y que los procesos sulfato-reductor y sulfo-oxidante se llevaban a cabo, se decidió operar el reactor en régimen continuo. Durante esta etapa el reactor operó bajo las condiciones mostradas en la Tabla 7.1.

La relación de  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  fue de 0.66 para favorecer el proceso sulfato-reductor de forma desasimilativa y el TRH se fijó en dos días, con el fin de evitar el lavado de las bacterias sulfato-reductoras del reactor, ya que éstas pueden presentar tiempos de duplicación de hasta nueve días (Visser, 1995).

**Tabla 7.1.** Parámetros y etapas de operación en continuo del RLFI.

	Unidades	Etapas	
		I	II
Tiempo de operación	Días	41	31
TRH*	Días	2	2
Alimentación lactato-etanol	%	80-20	50-50
[Lactato]	$\text{g L}^{-1}$	1.95	1.22
[Etanol]	$\text{g L}^{-1}$	0.25	0.62
$\text{DQO}_{\text{Lactato}}$	$\text{g L}^{-1}$	2.08	1.3
$\text{DQO}_{\text{Etanol}}$	$\text{g L}^{-1}$	0.52	1.3
$\text{DQO}_{\text{Total}}$	$\text{g L}^{-1}$	2.6	2.6
$[\text{SO}_4^{2-}]$	$\text{g L}^{-1}$	3.9	3.9
$\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$	-	0.66	0.66
Flujo de aire	$\text{L d}^{-1}$	0.54	0.54
<b>Velocidades de carga</b>			
$B_v_{\text{Lactato}}$	$\text{mmol L}^{-1} \text{d}^{-1}$	10.84	6.78
$B_v_{\text{Etanol}}$	$\text{mmol L}^{-1} \text{d}^{-1}$	2.72	6.78
$B_v_{\text{DQO}_{\text{Total}}}$	$\text{g DQO L}^{-1} \text{d}^{-1}$	1.3	1.3
$B_v_{\text{SO}_4^{2-}}$	$\text{mmol SO}_4^{2-} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$	20.3	20.3
$B_v_{\text{O}_2}$	$\text{mmol O}_2 \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$	5	5

\*TRH, Tiempo de residencia hidráulico.

La operación en continuo se llevó a cabo durante 72 días: en los primeros 41 días (etapa I) la DQO total alimentada (2.6 g) la constituían lactato y etanol en una proporción de 80:20, respectivamente, en los 31 días restantes (etapa II) la proporción de lactato-etanol

## Resultados y Discusión

alimentada fue 50:50, nuevamente manteniendo la DQO total alimentada en 2.6 g (esto se realizó debido a la incertidumbre del método para la determinación de lactato durante la operación en lote).

Durante la operación en continuo el reactor no alcanzó el estado estacionario, lo cual se atribuye a dos causas: 1) a la formación de especies reactivas al oxígeno (como por ejemplo  $\text{H}_2\text{S}$  en presencia de  $\text{O}_2$ , el  $\text{CO}_2$  que a pH mayores a 7 se absorbe en el agua como  $\text{HCO}_3^-$ , entre otras); 2) a la manipulación del reactor, ya que durante la operación en continuo se tomó la mayor cantidad de muestras para el análisis molecular. Por otra parte, la concentración de SVI en las etapas I y II fueron  $1.46$  y  $1.34 \text{ kg m}^{-3}$  de soporte seco, prácticamente sin cambio con respecto a la etapa de inmovilización de la biopelícula ( $1.1 \text{ kg m}^{-3}$  de empaque seco). La fase líquida permaneció con coloración amarillenta (principalmente en la etapa I) debida a la formación de polisulfuros, como se mencionó anteriormente.

Al alimentar el reactor con una mezcla de lactato-etanol (etapa I), la eficiencia de eliminación del  $\text{SO}_4^{2-}$  disminuyó aproximadamente un 6% en comparación con la etapa de inmovilización. Sin embargo, al cambiar la proporción en la alimentación de lactato-etanol a 50:50 (etapa II), la eliminación de  $\text{SO}_4^{2-}$  se vio considerablemente disminuida, ya que sólo el 60% del  $\text{SO}_4^{2-}$  alimentado fue consumido (Figura 7.3).

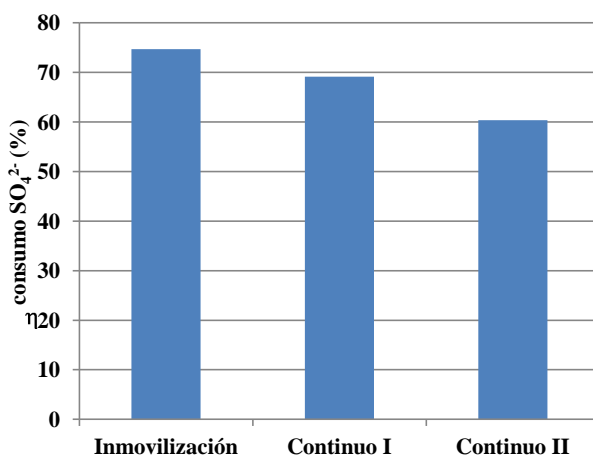


Figura 7.3 Eficiencias de consumo de  $\text{SO}_4^{2-}$  durante las diferentes etapas de operación del RFLI.

## Resultados y Discusión

Una de las posibles causas en la disminución de la eficiencia de consumo del  $\text{SO}_4^{2-}$  se debe en gran medida al cambio de la fuente de carbono, ya que al iniciar el enriquecimiento de las bacterias sulfato-reductoras se alimentó con lactato, favoreciendo a este grupo. Por otra parte, al iniciar la alimentación con etanol, otras bacterias presentes en la biopelícula, como es el caso de bacterias fermentativas, pudieron hacer uso de esta fuente de carbono sin que quedara disponible para la reducción del  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Es interesante observar que durante la operación en continuo se detectó la formación del ion sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) (Figura 7.4). Generalmente, el  $\text{SO}_3^{2-}$  no es un compuesto que esté presente en este tipo proceso, pues es un ión inestable y se encuentra en equilibrio con el ion  $\text{SO}_4^{2-}$ .

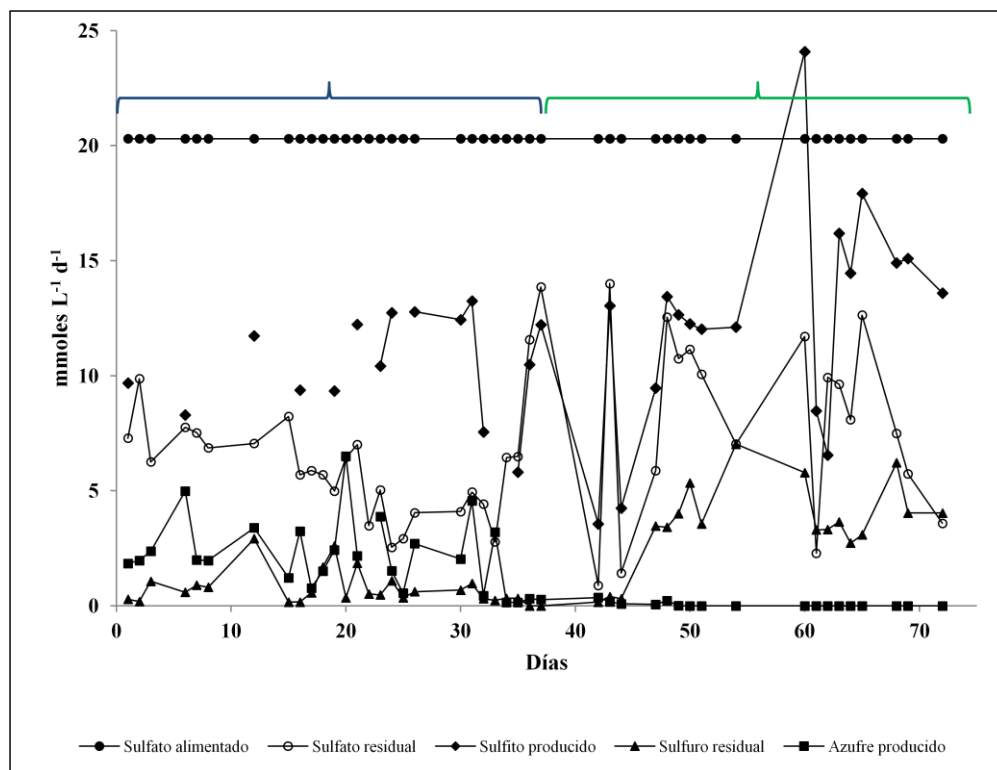


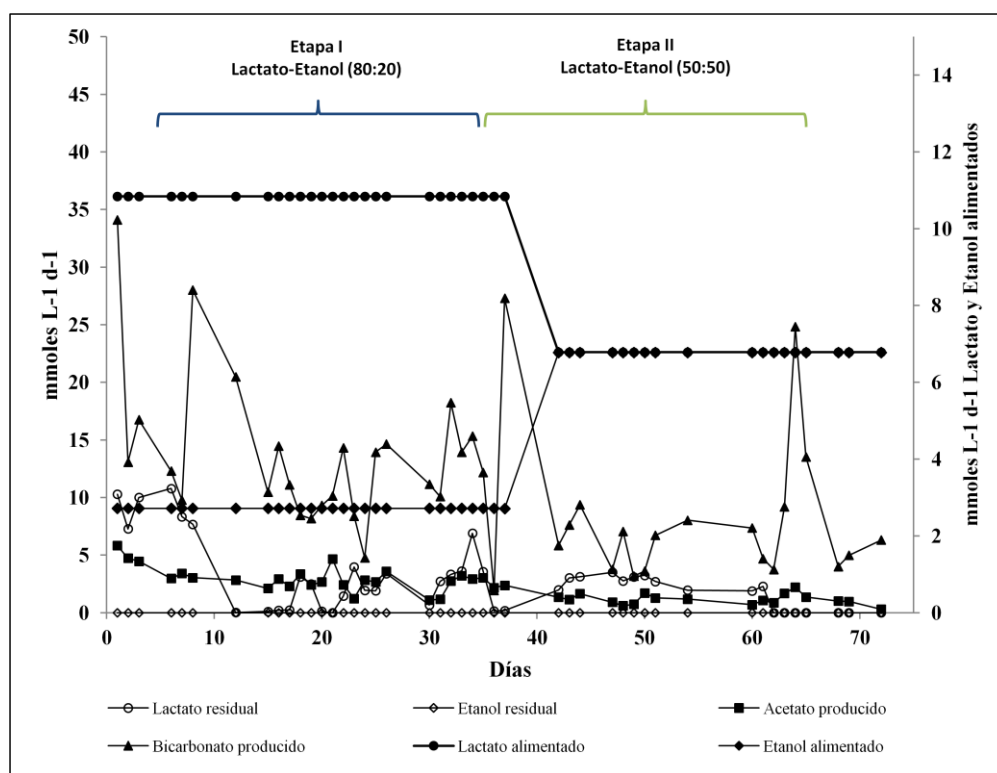
Figura 7.4 Perfiles de compuestos azufrados durante la operación en continuo del RLF1.

La formación de este compuesto en este sistema se atribuye a que se forma químicamente (ver punto 1.1) por la oxidación parcial del  $\text{H}_2\text{S}$  formado en la sulfato-reducción, pues en el

## Resultados y Discusión

sistema siempre hubo  $O_2$  presente. Así, también puede explicarse la pobre formación de  $S^0$ , pues al oxidarse de forma química el  $H_2S$ , la forma azufrada reducida tampoco estaba disponible para las bacterias sulfo-oxidantes.

Otro punto a considerar en la disminución de las eficiencias del  $SO_4^{2-}$  es el cambio en la relación de  $DQO/SO_4^{2-}$ : a pesar de que las fuentes de carbono fueron consumidas, el efecto fue negativo (Figura 7.5), lo cual puede sugerir que la cantidad de electrones donados por la DQO no fueron suficientes para lograr la completa reducción del  $SO_4^{2-}$  alimentado.



**Figura 7.5** Perfiles de consumo y formación de compuestos carbonados durante la operación en continuo del RLFI.

Sin embargo, si se analiza la cantidad de electrones que pueden donar el lactato, etanol y el acetato producido por la oxidación de los dos compuestos anteriores, se observa que la cantidad de  $SO_4^{2-}$  alimentado podría haber sido reducida en su totalidad (Tabla 7.2), ya que

## Resultados y Discusión

las cantidades que pueden ser reducidas durante las etapas I y II son de 25.97 y 23.86 mmol  $\text{SO}_4^{2-} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ , respectivamente.

**Tabla 7.2.** Cantidad de miliequivalentes de electrones donados por los compuestos orgánicos y mmol de  $\text{SO}_4^{2-}$  que pueden ser reducidos

Compuesto	$Bv$ (mmol $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ )		meq donados Etapa I	meq donados Etapa II
	Etapa I	Etapa II		
Lactato	10.84	6.78	10.84	6.78
Etanol	2.72	6.78	1.41	3.36
Acetato producido*	13.56	13.56	13.72	13.72
mmol $\text{SO}_4^{2-}$ reducibles	20.3	20.3	<b>25.97</b>	<b>23.86</b>

\*Considerando el consumo total de las fuentes de carbono.

Al realizar el balance molar de todos los compuestos (Tabla 7.3), se observa que a pesar de contar con la cantidad de electrones necesarios para reducir el  $\text{SO}_4^{2-}$  alimentado, no se llevó a cabo este proceso. Durante la etapa I, el consumo de  $\text{SO}_4^{2-}$  fue de  $14 \text{ mmol L}^{-1} \text{d}^{-1}$ , valor mayor al calculado teóricamente (pues de acuerdo a la cantidad consumida de lactato, etanol y acetato, se debieron consumir aproximadamente  $9.51 \text{ mmoles SO}_4^{2-} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ). Por otra parte, en la etapa II el consumo de  $\text{SO}_4^{2-}$  fue proporcional al consumo de los compuestos orgánicos.

Debe mencionarse que en el transcurso de la operación en continuo, la producción de  $\text{S}^0$  fue disminuyendo, como se mencionó anteriormente. La principal causa de ello fue la acumulación de  $\text{SO}_3^{2-}$  en el reactor, pues a pesar de que existían los nutrientes para que se llevara a cabo el proceso de sulfo-oxidación ( $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{O}_2$ ), la fuente de azufre probablemente ya había sido oxidada.

El pH, por otra parte, jugó un papel importante, ya que durante la operación en continuo se mantuvo en el intervalo de 7.5 a 8 unidades. Con estos valores de pH las especies azufradas reducidas se mantienen como polisulfuros, lo cual hace difícil su oxidación.

## *Resultados y Discusión*

**Tabla 7.3** Balance molar y de miliequivalentes de electrones durante la operación en continuo del RLF1

Compuesto	unidades	Etapa I				Etapa II			
		Influente	Efluente	meq e <sup>-</sup> donado	meq e <sup>-</sup> aceptados	Influente	Efluente	meq e <sup>-</sup> donado	meq e <sup>-</sup> aceptados
Lactato	mmol L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	10.84	3.50	7.34	0	6.78	2.69	4.11	0
Etanol	mmol L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	2.72	0	10.42	0	6.78	0	26.92	0
Acetato	mmol L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	0	2.94	0	0	0	1.12	0	0
Acetato cons.	mmol L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	0	10.06	58.27	0	0	10.87	78.59	0
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mmol L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	0	13.81	0	0	0	6.11	0	0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	mmol L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	20.3	6.27	0	76.03	20.3	8.05	0	109.62
S <sup>2-</sup>	mmol L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	0	0.74	0	0	0	3.55	0	0
SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mmol L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	0	10.56	0	0	0	12.45	0	0
S <sup>0</sup>	mmol L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	0	2.16	0	0	0	0.15	0	0



**7.2 ANÁLISIS MOLECULAR DE DIVERSIDAD MICROBIANA DE LA BIOPÉLÍCULA**

Otro objetivo importante de este trabajo fue realizar la dinámica poblacional de los microorganismos que formaban parte de la biopelícula bajo las diferentes condiciones de operación del reactor. Para este fin, se realizó la técnica de DGGE como técnica de biología molecular .

Las muestras analizadas se fueron recolectando durante el transcurso de operación del reactor y, principalmente, cuando se notaban cambios importantes en el mismo o cuando se realizaba el cambio de operación del reactor como se muestra en la tabla 7.4.

**Tabla 7.4** Características del muestreo para el análisis de biología molecular.

Muestra	Operación	Alimentación	Formación S <sup>0</sup>	Color biopelícula	Observaciones
1	-----	Lactato	-----	-----	Lodo adaptado (inoculo del reactor)
2	Lote	Lactato	Si, formación de gránulos	Negra	Operación en lote relación DQO/SO <sub>4</sub> = 0.76
3	Lote	Lactato	Si, formación de gránulos	Negra	Formación de <sup>-2</sup> S-Sn-S <sup>-2</sup>
4	Lote	Lactato	Si, formación de gránulos	Amarillo	Problemas de operación, formación de espuma
5	Inicio en Continuo	Lactato	Si, formación de gránulos más pequeños	Amarillo	
6	Continuo	Lactato/Etanol (80:20)	Poco apreciable	Negro	
7	Continuo	Lactato/Etanol (80:20)	Poco apreciable	Negro	Formación de <sup>-2</sup> S-Sn-S <sup>-2</sup>
8	Continuo	Lactato/Etanol (80:20)	Detectable por HPLC	Amarillo	
9	Continuo	Lactato/Etanol (80:20)	Detectable por HPLC	Gris	
10	Continuo	Lactato/Etanol (50:50)	No	Gris	
11	Continuo	Lactato/Etanol (50:50)	No	Gris	

## Resultados y Discusión

12	Continuo	Lactato/Etanol (50:50)	No	Gris
12L	Continuo	Lactato/Etanol (50:50)	No	Gris

Durante esta etapa, se realizó la extracción del ADN genómico de cada muestra. Posteriormente se realizaron ampliaciones de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando iniciadores específicos [\(como se describió en el punto 6.5.5\)](#). Tras amplificar las muestras, se procedió a analizar los fragmentos obtenidos mediante la técnica de DGGE. El resultado de esta técnica fueron bandas separadas mediante un gradiente desnaturizante, bandas que son representativas de los distintos microorganismos. Una vez, realizada la técnica de DGGE se seleccionaron las bandas más características [\(Figura 7.5\)](#) y fueron cortadas para el posterior análisis de su secuencia de nucleótidos. En la figura mencionada se muestran diversas bandas en los diferentes carriles (cada carril indica un punto de muestro, de acuerdo a la tabla 7.4). Como se puede apreciar, hay bandas que permanecen al mismo nivel, lo cual indica la permanencia de un género microbiano durante las etapas de operación del reactor. También se observan bandas que aparecen o desaparecen, lo que indica un cambio poblacional en la biopelícula de acuerdo a los cambios de operación del reactor.

Una vez obtenidas las secuencias de nucleótidos, se utilizó el programa Bioedit, para poder descodificarlas y posteriormente enfrentarlas con las secuencias contenidas en la base de datos del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

**Comentario [FJFP10]:** Referirte a las de Materiales y Métodos, no tiene sentido que las repitas...

**Eliminado:** tablas 7.5 y 7.6)

**Eliminado:** f

**Eliminado:** 6

**Eliminado:** l

**Eliminado:** e

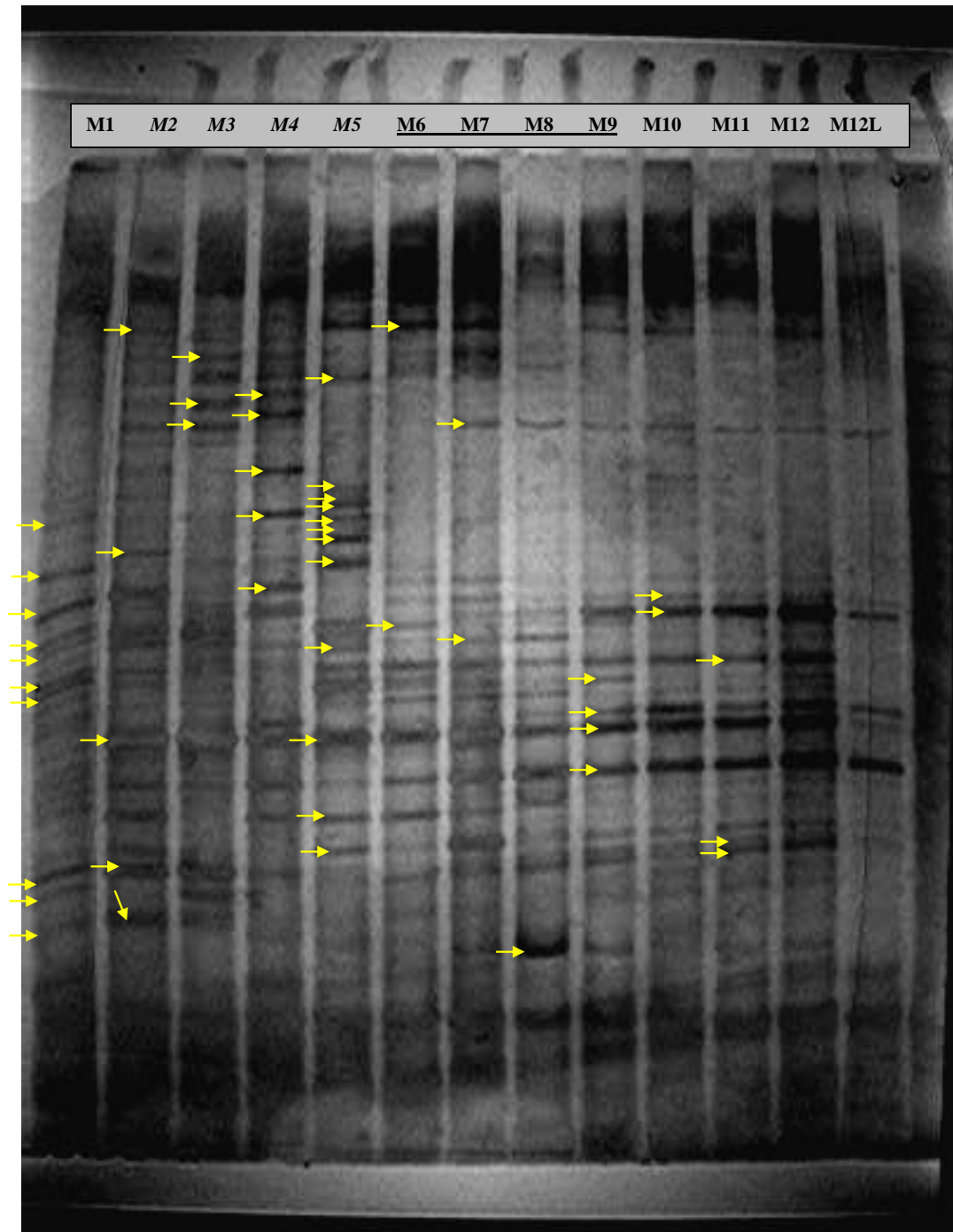


Figura 7.5. Gel de DGGE cargado con las diferentes muestras del RLFI. Las flechas indican las bandas seleccionadas para su posterior secuenciación.

Eliminado: 6

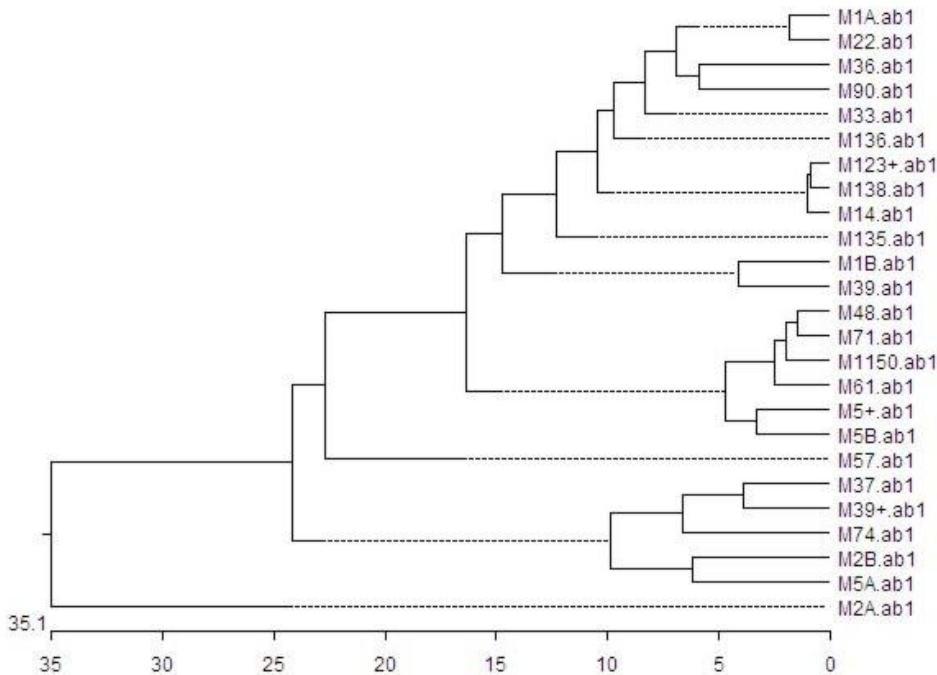
## Resultados y Discusión

Se introdujeron las secuencias individuales en el programa BLAST, el cual encuentra similitudes entre secuencias de ADN. Por otra parte, con esta herramienta se pueden obtener dendrogramas de las secuencias relacionadas, de acuerdo a su similitud. De esta forma, al realizar el análisis de las muestras obtenidas en el presente trabajo se obtuvo el siguiente dendrograma.

**Eliminado:** El análisis con esta base de datos consistió en introducir las secuencias individuales en el programa BLAST,

**Eliminado:** biológicas

**Eliminado:** arboles filogenéticos



**Figura 7.7** Dendrograma obtenido de la comparación de muestras obtenidas del RLF1 mediante el uso del programa Megablast.

Mediante el uso de este tipo de representación gráfica se pueden encontrar las relaciones y cambios evolutivos entre especies que hayan tenido un ancestro en común. De esta forma, se observa que a partir de este ancestro común se van ramificando diferentes grupos. Las líneas horizontales que unen a estos grupos presentan longitudes de acuerdo a la similitud del ancestro, así las líneas más largas muestran similitudes menores en comparación con los grupos que presentan las líneas más cortas.

**Eliminado:** mos

De esta manera, en la figura 7.7 se observan diferentes grupos. El primer grupo lo encabeza la muestra M1A en la cual se encontró una similitud del 93% para *Desulfomicrobium*.

## Resultados y Discusión

---

Dentro de este grupo también se encontraron las muestras M22, M36, M90, M33 y M136, que presentan porcentajes de similitud de al menos el 90%. Para este grupo, el género *Desulfomicrobium* es el mejor candidato, aunque el análisis también arroja como resultado alguna bacteria no cultivada. En cualquier caso, esas bacterias no cultivadas estarían muy estrechamente emparentadas con *Desulfomicrobium*, por lo que podría especularse con un papel metabólico similar para las bacterias no cultivadas.

Comentario [FJFP11]: Con qué???

Eliminado: .

Por otra parte, se observa otro bloque que comprende las muestras M123+. M138 y M14. M123+, las cuales presentan un porcentaje de similitud del 96% con *Desulfomicrobium* (para M138 el porcentaje es del 97% y para M14 de 94%, una diferencia del 3% en estos niveles es significativa: aunque posiblemente los dos microorganismos sean *Desulfomicrobium*, muy probablemente sean especies diferentes).

La muestra M135 se localiza como un grupo único, con un porcentaje de similitud con *Desulfomicrobium* del 93%. Posiblemente, la limitación impuesta por la escasez relativa de secuencias en la base de datos no permita encontrar un género diferente al que se pueda asociar a esta banda. El pequeño tamaño de las secuencias obtenidas también es tal vez responsable de la no obtención de porcentajes de similitud más elevados.

El siguiente grupo lo conforman las muestras M1B y M39, con porcentajes de similitud de 89% y 87% para *Desulfomicrobium*. Es muy probable que estas muestras pertenezcan a un microorganismo de un género diferente, muy relacionado con éste.

Lo mismo aplicaría para el siguiente grupo, que está comprendido por las muestras M48, M71, M1150 (86%), M61 (87%), M5+ (89%) y M5B (85%).

Comentario [FJFP12]: Poner porcentajes

La muestra M57 se encuentra claramente separada, esta muestra presenta una similitud del 84% con *Desulfovibrio*, sin embargo, este porcentaje es bajo para asegurar que corresponde a este género.

En cuanto al siguiente grupo, M37, M39+, M74, M2B y M5A se aprecia un porcentaje de similitud bajo (84%) con *Desulfomicrobium*.

Al final del gráfico se aprecian dos grupos interesantes, uno que contiene a la muestra M2B, con un porcentaje de similitud del 92% con *Geobacter* y 89% con *Desulfuromonas*. Y, por otro lado, la muestra M2A, la cual es muy diferente a los demás grupos además de presentar la ramificación desde el principio del árbol, esta muestra presenta un porcentaje

alto de similitud (94%) con *Petrimonas sulfuriphila* y con *Bacteroides* con el mismo porcentaje. Este género ha sido reportado en reactores con  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{S}^0$  y materia orgánica.

### 8. CONCLUSIONES

Se logró obtener una biopelícula con los procesos sulfato-reductor y sulfo-oxidante acoplados. Sin embargo, los procesos acoplados no fueron estables y tampoco eficientes, pues la relación de  $\text{DOQ}/\text{SO}_4^{2-}$  tiene un fuerte efecto sobre este proceso. Otro efecto relevante fue la selección de la fuente de carbono con la cual se inició el enriquecimiento, pues aunque las bacterias sulfato-reductoras tienen la capacidad de oxidar diferentes fuentes de carbono podrían predominar géneros que no puedan oxidar más que una sola. Sin embargo, hay que considerar la competencia por la fuente de carbono con bacterias que no la utilicen para reducir el  $\text{SO}_4^{2-}$  y sólo la empleen en una vía asimilativa.

Eliminado: a

En cuanto a la operación del reactor, al no tener control sobre el pH se generaron diferentes especies azufradas, como los polisulfuros, los cuales son difíciles de oxidar biológicamente. Las condiciones aerobias que se mantuvieron pudieron favorecer el crecimiento de bacterias fermentativas, y no precisamente de bacterias sulfo-oxidantes, además de limitar el metabolismo de las bacterias sulfato-reductoras (que aunque no son anaerobias estricta sí disminuyen su actividad en estas condiciones). El proceso sulfo-oxidante no se llevó a cabo con éxito, pues la formación de azufre se puede atribuir más a una vía química que a una biológica.

En el estudio de biología molecular se apreciaron pocos géneros microbianos (baja diversidad), que pertenecían principalmente a bacterias sulfato-reductoras. Los géneros encontrados fueron *Desulfomicrobium* y *Desulfovibrio*, principalmente, además de *Geobacter*, *Desulfuromonas* y/o *Petrimonas*. No se encontraron bacterias sulfo-oxidantes, lo cual apoyaría la idea de que la formación de azufre elemental se dio principalmente por vía química. Esto no indica, sin embargo, que no estuvieran presentes bacterias sulfo-oxidantes en el reactor, ya que pudieron estar en cantidades menores al 1% y no ser detectadas por las técnicas de biología molecular. Por otra parte, se observó que al identificar los géneros microbianos mediante estas técnicas se puede explicar el

Comentario [FJFP13]: El porcentaje no es tan alto como para que les des el rango de especie...

comportamiento del reactor con mayor certeza que sólo haciendolo con balances de materia y electrones, los cuales son afectados fuertemente por el potencial redox.

### 9. RECOMENDACIONES

1. Debido a los problemas de control de proceso sería conveniente realizar el estudio en sistemas separados, como un tren de tratamiento. De esta forma se podrían caracterizar de mejor manera los dos procesos.
2. También sería conveniente tener como variable de respuesta el potencial redox, pues los procesos microbianos se ven fuertemente afectados por esta variable (sobre todo en sistemas donde se forman productos muy inestables, como en este estudio).
3. Sería recomendable tomar las muestras del reactor en los estados estacionarios, pues es donde se aprecian mejor los cambios sufridos en las poblaciones. También realizar el estudio de dinámica poblacional con diferentes iniciadores, para tratar de identificar diferentes grupos.

**Comentario [FJFP14]:** Pero las arqueas ya las has trabajado... Tus resultados son sólo del dominio Bacteria o son de los dos y las juntaste??? Porque eso no lo dices y es importante!!!!

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Jorgensen BA. (1990) Thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. *Science* 249(4965):152-4.

Con formato: Fuente: Cursiva, Español (alfab. internacional)

Alcántara S. (2000). Estudio de la oxidación biológica de los compuestos reducidos del azufre utilizando un consorcio de microorganismos sulfoxidantes. Evaluación de los parámetros que determinan la oxidación parcial del tiosulfato en azufre elemental. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México. 138 pp.

Alcantára S., Velasco A., Muñoz A., Cid J., Revah S. y Razo E. (2004). Hydrogen sulfide oxidation by a microbial consortium in a recirculation reactor system: Sulfur formation under oxygen limitation and removal of phenols. *Environ. Sci. Technol.* **38**:918-923.

Amann R.I., Ludwin W. y Schleifer K.H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of industrial microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* **59**:143-169.

APHA-AWA-WPCF (1995). Standard methods for the examination of water and wastewater. 19<sup>a</sup> edición. *American Public Health Association*. Washington, D.C., U.S.A.

Arora S., Mino T. y Matsuo T. (1995). Mechanisms and favourable operating condition of organic substrate removal in microaerophilic upflow sludge bed reactor (MUSB). *Water Res.* **29**:1895-1901.

Atlas R.M. y Bartha R. (2002). Ciclos biogeoquímicos. En: *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson Educación. Madrid, España. pag. 283-296 y 381-455.

Bartlett J.K. y Skoog D.A. (1954). Colorimetric determination of elemental sulfur in hydrocarbons. *Anal. Chem.* **26**:1008-1011.

Barton L.L. y Tomei F.A. (1995). Characteristics and activities of sulfate reducing bacteria. En: *Sulfate reducing bacteria*. Barton L.L. (Editor). Plenum, New York, U.S.A. pag. 1-22.



- Basu R., Clausen E.C. y Gaddy J.L. (1996). Biological conversion of hydrogen sulphide into elemental sulphur. *Environ. Prog.* **15**(2):234-238.
- Boulégue J. (1978). Solubility of elemental sulfur in water a 298 K. *Phosphorus and sulfur.* **5**:127-128.
- Bozzola J. y Russell L. (1991). *Electron Microscopy*. Jones and Bartlet Publishers. U.S.A.
- Brüser T., Lens P.N.L., y Truper H. (2000). The biological sulfur cycle. En: *Environmental Technologies to treat sulfur pollution-Principles and Engineering*. Lens P.N.L. y Hulshoff Pol L. (Editores). International Water Association. Londres, Inglaterra. pag. 47-85.
- Buisman C., Post R., Ijspeert P. Geraats G. y Lettinga G. (1989). Biotechnological process for sulphide removal whit sulphur reclamation. *Acta Biotechnol.* **9**:225-267.
- Buisman C.J.L., Boer J.D., Boonstra J., Paaschens C.W.M. y Sopjes A. (1993a). A new biotechnological method for H<sub>2</sub>S removal from biogas. TAAPI proceeding. pag. 773.
- Buisman C.J.L., Ijspeert P., Janssen A.J.H. y Lettinga G. (1990). Kinetics of chemical and biological sulphide oxidation in aqueous solution. *Water Res.* **24**(5):667-671.
- Celis G.L. (2004). Bioeliminación de óxidos de azufre de efluentes. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México 123 pp.
- Cord-Ruwisch R. (1985). A quick method for the determination of dissolve and precipitated sulfide in cultures of sulfate reducing bacteria. *J. Microbiol. Meth.* **4**(1):33-36.
- Cypionka H. (2000). Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 827-848.
- Dolla A., Fourier M. y Dermoun Z. (2006). Oxygen defense in sulfate reducing bacteria. *J. Biotechnol.* **126**:87-100.
- Ehrlich H.L. (1995). *Geomicrobiology*. Marcel Dereck. New York, U.S.A.
- EPA: Environmental Protection Agency ([www.epa.gov](http://www.epa.gov)).
- Etchebehere C., Errazquin M.L., Daberte P., Moletta R. y Musi L. (2001). Evaluation of denitrifying microbiota of anoxic reactor. *FEMS Microb. Ecol.* **35**:259-267.
- Freeman S., Altinbas M., Smidt H., Strams A.J.M., Field J.A., Hollomgsworth J. y Sierra-Alvarez R. (2005). Characterization of microbial population in mesophilic and

**Comentario [FJFP15]:** No está en el texto...

**Eliminado:** Chuang S.H., Pai T.Y. y Horng R.Y. (2005). Biotreatment of sulfate rich wastewater in an anaerobic/micro-aerobic bioreactor system. *Environ. Techn.* **26**:993-1001.¶

**Comentario [FJFP16]:** En el texto es 2007, así estaría mña citada...

- termophilic sulfate reducing biofilm using molecular ecology technique. Memorias del VII taller y simposio latinoamericano sobre digestión anaerobia. Punta del Este, Uruguay. pag. 44-49.
- Friedrich C.G., Bardichewsky F., Rother D., Quentmeier A. y Fisher J. (2005). Prokariotic sulfur oxidation. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:253-259.
- González S.A. (2002). Operación, caracterización y modelado de un sistema de oxidación biológica de tiosulfato a azufre elemental. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México. 108 pp.
- Gonzalez-Blanco G. (2007). Conversión de sulfato a azufre elemental en un reactor de lecho fluidificado inverso bajo condiciones de limitación de oxígeno disuelto. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. 108 pp.
- Henshaw P.F., Bewtra J.K., y Biswas N. (1998). Hydrogen sulphide conversion to elemental sulphur in a suspended growth continuous stirred tank reactor using *Chlorobium limicola*. *Water Res.* **32**(6):1769-1778.
- Janssen A.J.H., Ma S.C., Lens P.N.L. y Lettinga G. (1997). Performance of a sulfide oxidizing expanded bed reactor supplied with dissolved oxygen. *Biotechnol. Bioeng.* **53**: 32-40.
- Jorgensen B.B. (1983). The microbial sulfur cycles. En: Microbial geochemistry. Krumbien W.E. (Editor). Blackwell, Oxford, Inglaterra. pag. 91-214.
- Jorgensen B.A. (1990) Thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. *Science* **249**(4965):152-4.
- Khanna P., Rajkumar B. y Jyothikumar N. (1996). Microbial recovery of sulphur from thiosulphate bearing wastewater with phototrophic and sulphate reducing bacteria. *Curr. Microbiol.* **32**(1):33-37.
- Kim B.W., Chang H.N., Kim I.K. y Lee K.S. (1992). Growth kinetics of the photosynthetic bacterium *Chlorobium thiosulphatophilum* in a fed batch reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **40**(5):583-592.
- Kobayashi H.A., Stenstrom M. y Mah R.A. (1983). Use of photosynthetic bacteria for H<sub>2</sub>S removal from anaerobic wastewater treatment effluent. *Water Res.* **17**(8):579-587.

**Eliminado:** Janssen A.J.H., Sleyster R., van der Kaa C., Jochemse A., Bontema J. y Lettinga G. (1995). Biological sulfide oxidation in a fed batch reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **47**:327-333.¶

## Bibliografía

---

- Krishnakumar B., Majumdr S., Manilal V.B. y Haridas A. (2005). Treatment of sulphide containing wastewater with sulphur recovery in a novel reverse fluidized loop reactor (RFLP). *Water Res.* **39**:639-647.
- Lapara T.M., Nakatsu C.H., Pantea L. y Alleman J.E. (2000). Phylogenetic analysis of bacteria communities in mesophilic and thermophilic bioreactor treating pharmaceutical wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(9):3951-3959.
- Lee M.C. y Sublette K.L. (1993). Microbial treatment of sulphide laden water. *Water Res.* **27**(5):839-846.
- Lens P.N.L., van den Bosch M., Hulshoff Pol. L. y Lettinga G. (1998b). The use of staged sludge bed reactor for the treatment of sulfate rich wastewater. *Water Res.* **32**:1178-1192.
- Lens P.N.L., Viser A., Janssen A.J.H., Pol L.W.H. y Lettinga, G. (1998a). Biotechnological treatment of sulfate rich wastewaters. *Crit. Rev. Environm. Sci. & Technol.*, **28** (1): 41-88.
- Liamleam, W. y Annachatre, A.P. (2007). Electron donor for biological sulfate reduction. *Biotechnol. Adv.* **25**:452-463.
- Madigan M. T., Martinko L.M. y Parker J. (2009). *Biología de los microorganismos*. 12ª edición. Pearson Educación. Madrid, España. pag. 363-365, 395-398, 560-563, 571-573 y 656-658.
- Matias P.M., Pereira I.A.C., Soares C.M. y Carrondo M.A. (2005). Sulphate respiration from hydrogen in *Desulfovibrio* bacteria: a structural biology overview. *Prog.Biophys.Mol. Biol.* **89**(3):292-329.
- McGuire M.M. y Hamers R.J. (2000). Extraction and quantitative analysis of elemental sulfur from sulfide mineral surface by high performance liquid chromatography. *Environ. Sci. Technol.* **34**:4651-4655.
- Meraz R. M. (1998). Inmovilización de bacterias anaerobias en un lecho fluidificado inverso. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México. 213 pp.
- Milby T.H. y Baselt R.C. (1999). Hydrogen sulfide poisoning: Clasification of some controversial issues. *Amer. J. Ind. Med.* **35**:192-195.

Con formato: Español (alfab. internacional)

## Bibliografía

---

- Muyzer G. y Smalla K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. **73**:127-141.
- Muyzer G. y Stams A. J. M. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Rev. Microbiol.* **6**: 441-454.
- Muyzer G., De Waal E.C. y Uitterlinden A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polimerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environm. Microbiol.* **59**(3):695-700.
- Nagpal S., Chuichulcherm S., Livingston A. y Peeva L. (2000). Ethanol utilization by sulfate reducing bacteria: an experimental and modeling study. *Biotech. Bioeng.* **70**(5):533-543.
- Nedwell D.B. y Reynolds P.J. (1996). Treatment of landfill leachate by methanogenic and sulphate reducing digestion. *Water Res.* **30**:21-28.
- O'Flaherty V. y Colleman E. (2000). Sulfur problem in anaerobic digestion. En: *Environmental technologies to treat sulfur pollution- principles and engineering*. Lens P.N.L. y Hulshoff Pol L. (Editores). International Water Association. London. pag. 467-489.
- Omil F., Lens P.N.L., Hulshoff Pol. L. y Lettinga G. (1996). Effect of upward velocity and sulfide concentration on volatile fatty acids degradation in a sulphidogenic granular sludge reactor. *Process Biochem.* **31**:699-710.
- Omil F., Lens P.N.L., Visser A., Hulshoff Pol L. y Lettinga G. (1998). Long competition between sulfate reducing and methanogenic bacteria in UASB reactor treating volatile fatty acids. *Biotech. Bioeng.* **57**:676-685.
- Omil F., Méndez R. y Lema J.M. (1995). Anaerobic treatment of saline wasterwaters under high sulfide and ammonia content. *Biores. Technol.* **54**:269-278.
- Oude Elferink SJWH, Visser A., Hulshoff Pol L.W. y Stam A.J.M. (1994). Sulfate reduction in metanogenesis bioreactors. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**:119-136.
- Parés R. y Juaréz A. (2002). *Bioquímica de los microorganismos*. Reverté S.A. Sevilla, España. pag. 201-212 y 285-290.

Con formato: Español (alfab. internacional)

## Bibliografía

Reis M.A.M., Almeda J.S., Lemos P.C. y Carrondo M.J.T. (1992). Effect of hydrogen sulfide on growth of sulfate reducing bacteria. *Biotech. Bioeng.* **40**:593-600.

Stefess G. (1993). Oxidation of sulfide to elemental sulfur by aerobic thiobacilli. Tesis de Doctorado. Universidad Técnica de Delf, Holanda.

Stuedel R. (1982). Homocyclic sulfur molecules. *Top. Curr. Chem.* **102**:149-176.

Stuedel R. (2000). The chemical sulfur cycle. En: *Environmental technologies to treat sulfur pollution-principles and engineering*. Lens P.N.L. y Hulshoff Pol L. (Editores). International Water Association. Londres, Inglaterra. pag. 1-32.

Stuedel R. y Holz B. (1988). Detection of reactive sulfur molecules ( $S_6$ ,  $S_7$ ,  $S_9$ ,  $S_\mu$ ) in commercial sulfur in sulfur mineral, and in sulfur melts slowly cooled to 20°C. *Z. Naturforsch. Part B.* **43**:581-589.

Tarvin D. y Buswell A. (1934). The methane fermentation of organic acids and carbohydrates. *J. Amer. Chem. Soc.* **56**: 1751-1755.

van den Enden F.P., Meier J. y van Gemerden H. (1997). Syntrophic growth of sulfate reducing bacteria and colorless sulfur bacteria during oxygen limitation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**:65-80.

Visser A. (1995). The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. Tesis de Doctorado. Universidad Agrícola de Wageningen, Holanda. 145 pp.

Visser A., Beeksmá I., van der Zee F., Stams A.J.M. y Lettinga G. (1993). Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulfate concentration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**:549-556.

Visser J.M., Stefess G.C., Robertson L.A. y Kuenen J.G. (1997). *Thiobacillus sp.* W5, the dominant autotroph oxidizing sulfide to sulfur in a reactor for aerobic treatment of sulfidic water. *Antonie van Leeuwenhoek.* **72**:127-134.

Watanabe T., Imaok H y Kuroda M. (1997). Neutralisation and sulfate removal of acids waters containing high strength sulfate ion by using electrode immobilized sulfate reducing bacteria on the surface. 8ª Conferencia Internacional en Digestión Anaerobia. Sendai, Japan. **3**:397-400.

Jorgensen BA. (1990) Thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. *Science* **249**(4965):152-4.

**Eliminado:** Stackebrandt E. Stahl D.A. y Richard D. (1995). Taxonomic relationship. En: *Sulfate reducing bacteria*. Barton L.L. (Editores). Plenum Press. New York, U.S.A. pag. 49-87.¶

**Con formato:** Español (alfab. internacional)

**Eliminado:** b

**Con formato:** Español (alfab. internacional)

**Con formato:** Español (alfab. internacional)

**Comentario [FJFP17]:** No está en el texto...

**Eliminado:** *Water Res.* Castro H.F., Williams N.H. y Ogram A. (2000). Phylogeny of sulfate reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**:1-9.¶

**Con formato:** Fuente: Cursiva

## Bibliografía

---

Jorgensen BA. (1990) Thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. *Science*  
249(4965):152

Con formato: Fuente: Cursiva

Jorgensen BA. (1990) Thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. *Science* 249(4965):152-4.

Con formato: Fuente: Cursiva

Jorgensen BA. (1990) Thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. *Science* 249(4965):152-4.

Con formato: Fuente: Cursiva

Jorgensen BA. (1990) Thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. *Science* 249(4965):Jorgensen BA. (1990) Thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. *Science* 249(4965):152-4.

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

# ANEXO

**ANEXOS**

**Tabla A.1** Secuencias de las bandas seleccionadas

Muestra	Secuencia
M1A	CGGAGGATTTGCGCATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGCCCGTGTGAGGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AACCTCTGTTCGGAAGGGAAGAACGGGGATGGTCTAATAGGCCTTTGTT
M1B	TGGGGTATTTGCGCATGGGCGAAGCCTGACGCAGCCACGCCCGTGTGAGGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AACCTCTGTTCGGAAGGGAAGAACGGGGGTGGTCTAATCGGCCTTTGTTGACCGTACCCTTTAGAAAGCCACCGGCTAACTCCGTGCCAGGGCCGAGTTA
M2A	TTGAGATTTGGTCATGGAGGCACTCTGACCAGCCAACGTCCCGCTGAAGGATGAAGGCTTACTGGATCTGTAACTTCCTTTTGAAGGGAATAAATGGGGGACGTGTCCTCTTTGTCATGTACCTTGCGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATAGGTATTA
M2B	TGGGGGATCTTGCGCATGGGCGCAAGCCTGACGCAGCAACGCCCGTGTGAGGGATGAGGCTTTCGGGTCGTA AACCTCTGTTCGGAAGGGAAGAAGCGGGGGGGTCTGTTCTCTTTGTGTGGACCTTGCCCTCAAGGGACGGCTCCCTCCATCTCCGTGCCCGCGCCGTATAATAAAA
M3B	TGGGGATTTGCGCATGGGCGAAGCCTGACGCAGCACGCCCGTGTGAGGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AACCTCTGTTCGGAAGGGAAGAAGCGGGATGGTCTAATAGGCCTTTGTTTGTGACGTACCCTCCGGAGGAAGCACCGGCTAACACCGTGCCAGCAGCCGCGTTATA
M14	CTGGGGCATTTGCGCATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCACGCCCGTGTGAGGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AACCTCTGTTCGGAAGGGAAGAAGCGGGATGGTCTAATAGGCCTTTGTTTGTGACGGCCCTTAGAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCCGCGCCGCGTTATA
M22	TGGAGGCATTTGCGCATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCCACGCCCGTGTGAGGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AACCTCTGTTCGGAAGGGAAGAAGCGGGATGGGCTAATCGGCCTTTGTTTGTGACGTACCCTCCAGAGGACCACCGGCTAACACCGTGCCCGCCCGCGGTTA
M39	CTGAGCATTTGCGCATGGGCGAACCCTGACGCAGCCCGCCCGTGTGAGGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AACCTCTGTTCGGAAGGGAAGAAGCGGGCTGGTCTAATCGCCCTTTGTGAC
M123*	CTGGGGCATTTGCGCATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCACGCCCGTGTGAGGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AACCTCTGTTCGGAAGGGAAGAAGCGGGATGGTCTAATAGGCCTTTGTTTGTGACGGTACCCTTAGAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCCGCCAGCCGCGTTATA
M135	TGGAGGATTTGCGCATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCCCGCCGTGTGAGGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AACCTCTGTTCGGAAGGGAAGAAGCGGGCTGGTCTAATCGGGTTTGTGTTGACGGTACCCTTGAGGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCCGCCGCGGTTA
M136	TGGGGATTTGCGCATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCACGCCCGTGTGAGGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AACCTCTGTTCGGAAGGGAAGAAGCGGGATGGTCTAATCGGCCTTTGTTTGTGACGGCCCTCCGGAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCCGCCGCGGTTATA
M138	CTGAGGCATTTGCGCATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCACGCCCGTGTGAGGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AACCTCTGTTCGGAAGGGAAGAAGCGGGGAATGGTCTAATAGGCCTTTGTTTGTGACGGTACCCTTAGAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
M139	TGAGGATTTGCGCATGGGCGAAGCCTGACGCAGCACGCCCGTGTGAGGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AACCTCTGTTCGGAAGGGAAGAAGCGGGAAATGGTCTAATAGGCCTTTGTTTGTGACGTACCCTTAGAAAGCGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGCGGTAATA
M151	CTGGGGCATTTGCGCATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCAACGCCCGTGTGAGGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AACCTCTGTTCGGAAGGGAAGAAGCGGGCAATGGTCTAATAGGCCTTTGTTTACGTTACCCTCCGGGAAAGCGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
M152	TGGGGATTTGCGCATGGGCGCAAGCCTGACGCAGCAACGCCCGTGTGAGGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AACCTCTGTTCGGAAGGGAAGAAGCGGGATGGTCTAATAGGCCTTTGTTTGTGACGGCCCTTAGGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGGCCCGCGGTTA
M222	TGGAGGATTTGCGCATGGGCGCAAGCCTGACGCAGCCAGCCCGTGTGAGGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AACCTCTGTTCGGAAGGGAAGAACGGGGTGGTCTAATCTCCCTTTGTTTGTGACGGTACCCTTAGAAAGGAAAGCCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGTGGTATAAAA



**Tabla A.1 (continuación).** Secuencias de las bandas seleccionadas (continuación)

Muestra	Secuencia
M247	CTGGGGCATTGCGCATGGGCGAAGCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACCTCTGTCGGAAGGGAAGAAG GGGGATGGTCTAATCGCCCTTTGTTGACGGTACCTTTTAGGAAGCCTCCGGCTCTACCGTGCCCCGCCCTAGTTA
M313	TGGGGATTGCGCATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACCTCTGTCGGAAGGGAAGAAGCGG GGTGGTCTAATCGCCCTTTGTTGACGTTACCTTAGAGGAAAGGACCGGCTAACACCGTGCCCCGGCCGCGGTTTA
M523	TTGGGGATTGCGCATGGGCGAACCCTGACCCAGCCCGCCGCGTGAGGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACCTCTGTCGCGGGGAGGAACCTACGT TGGTCTATTCTCTTTGTTGACCGTACCTTTAGAAAGGCTCCGGCTAACTCCGTGCCGGCCCGCGGTTAAG
M536.5	TGGAGGATCTTGCATGGGCGAAGCCTGACGCAGCCAGCCGCGTGAGGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACCTCTGTTTTCAAGGGAAGAAG GGGGTGGTCTATTCTCTTTGTTGACCGTGCCTTTCAGGATAGCGCCCGTCTAACTCCGTGCCGGCCCGCGGCGGTTATAAA
M546	CTGGAGGCATTGCGCATGGGCGCAAGCCTGACGCAGCACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACCTCTGTCGGAAGGGAAGAA CGGGCAATGGTCTAATAGGGCT

Jorgensen BA. (1990) Thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. *Science* 249(4965):152-4.

Con formato: Fuente: Cursiva