



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**“Enriquecimiento de comunidades sulfato  
reductoras degradadoras de acetato en  
condiciones ácidas”**

Tesis que presenta

**Tonatiuh Moreno Perlín**

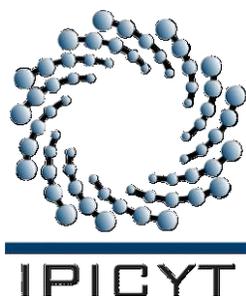
Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias Ambientales**

**Director de la Tesis:**

**Dra. María de Lourdes Berenice Celis García**

San Luis Potosí, S.L.P., agosto del 2014



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Enriquecimiento de comunidades sulfato reductoras degradadoras de acetato en condiciones ácidas**” presentada para obtener el Grado de de Maestro en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Tonatiuh Moreno Perlín** y aprobada el **23 de agosto de 2014** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

\_\_\_\_\_  
Dra. María de Lourdes Berenice Celis García  
(Directora de la tesis)

\_\_\_\_\_  
Dr. Ernesto I. Badano  
(Asesor de la tesis)

\_\_\_\_\_  
Dr. Ángel G. Alpuche Solís  
(Asesor de la tesis)



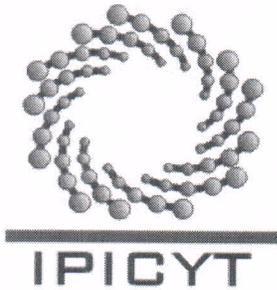
## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en los Laboratorios de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-490710).

Como parte del trabajo de investigación, se realizó una estancia académica internacional en el Laboratorio de Ecología Microbiana, del Instituto de Investigaciones Biológicas, Clemente Estable en Montevideo, Uruguay, bajo la supervisión de la Dra. Claudia Etchebehere. La estancia fue apoyada financieramente por una Beca Mixta-CONACYT (290751) y por el proyecto SEP-CONACYT-181809.

Este trabajo de investigación fue financiado por el proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACYT-181809 "Comunidades sulfatorreductoras de ambientes extremos: estructura y función a pH ácido" asignado a la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 014 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 1 días del mes de septiembre del año 2014, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Ernesto Iván Badano</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. María de Lourdes Berenice Celis García</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó el C.

**Tonatiuh Moreno Perlín**

sobre la Tesis intitulada:

*Enriquecimiento de comunidades sulfato reductoras degradadoras de acetato en condiciones ácidas*

que se desarrolló bajo la dirección de

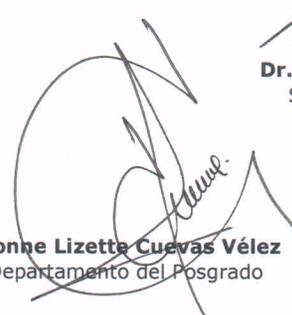
**Dra. María de Lourdes Berenice Celis García**

El Jurado, después de deliberar, determinó

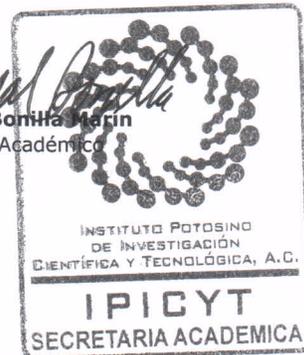
**APROBARLO**

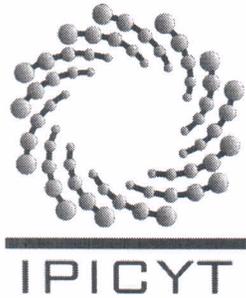
Dándose por terminado el acto a las 19:15 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 1 días del mes de septiembre de 2014.

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

  
**Dr. Marcial Bonilla García**  
Secretario Académico





## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis ***“Enriquecimiento de comunidades sulfato reductoras degradadoras de acetato en condiciones ácidas”*** presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Tonatiuh Moreno Perlín** y aprobada el **primero de septiembre del dos mil catorce** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dra. María de Lourdes Berenice Celis García**  
Directora de la tesis

**Dr. Ernesto Iván Badano**  
Miembro del Comité Tutorial

**Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís**  
Miembro del Comité Tutorial

*Para Rasheed y Aisha, mis grandes tesoros.*

## Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a mi comité tutorial, conformado por la Dra. Berenice Celis, el Dr. Ernesto Badano y el Dr. Ángel Alpuche. Les agradezco su tiempo, sus indicaciones, sus críticas, sus comentarios y la oportunidad de trabajar con ustedes. Trabajar bajo su dirección me ha representado un reto intelectual y me ha obligado a aceptar mi ignorancia e impericia en la difícil labor de hacer ciencia. A su vez, me he visto enriquecido con su conocimiento y experiencia. Por ello mis más sinceros agradecimientos.

Quisiera agradecer a la M. en C. Dulce I.F. Partida Gutiérrez, al M. en C. Guillermo Vidriales Escobar, al M. en C. Juan Pablo Rodas Ortiz, y a la I.Q. María del Carmen Rocha Medina, por su apoyo técnico. En particular, quisiera agradecer a la M. en C. Elizabeth Cortés Cedillo y a la L.P. Verónica Zárate por su apoyo en los análisis de biología molecular.

Asimismo, agradezco el uso de la infraestructura analítica del “Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola Médica y Ambiental”.

También me gustaría reconocer la labor que desempeñan Ivonne Cuevas y Edith Rodríguez en el Departamento de Posgrado del IPICYT; además de que me facilitaron la vida escolar desde el primer día, siempre lo hicieron con una sonrisa y de la manera más amable posible.

Por último, agradezco al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable de Montevideo y en particular a la Dra. Claudia Etchebere por aceptarme para trabajar en su laboratorio de Ecología Microbiana; también le agradezco al M. en C. Jorge Wenzel por su apoyo y orientación durante mi estadía.

Más allá del quehacer académico, quisiera agradecerles a Bere y Badano su amistad y consejos a lo largo de mi experiencia en el IPICYT; me han dado la oportunidad para poder crecer personalmente, a la par de que lo hice en lo académico. La confianza que depositaron en mis capacidades y su comprensión hacia mis necesidades familiares me facilitaron enormemente completar este trabajo, que hubiese sido mucho más complicado de no contar con dos personas tan sensibles. De todas las experiencias que tengo a su lado, la que más valoro es aprender lo feliz que se puede llegar a ser cuando realmente amas lo que haces y te esfuerzas por ello.

Quiero agradecer a todas las personas que han hecho tan grata mi experiencia en el IPICYT, empezando por mis compañeras de generación Ale, Dani, Esme, Marce y Mariana; también a Kevin, Livi, Ricardo, Esaú, Nohemí y Kary. Porque, sin su presencia, las horas dentro del IPICYT hubieran sido interminables y mi vida en San Luis Potosí no sería tan divertida.

Igualmente, quiero agradecer a las personas maravillosas que he conocido durante mi estancia en Montevideo. A Pata, Coco, y su gran familia, por su hospitalidad y por hacerme sentir como en casa comiendo asado cada vez que se podía. A Lolo y Vicky por su amistad, su compañía dentro y fuera del laboratorio y por enseñarme lo bello que es Montevideo. Y especialmente a Lisa, por acompañarme a descubrir Uruguay, por las largas horas de caminatas, las charlas interminables y los momentos compartidos que hicieron de mi estancia en Uruguay un viaje inolvidable.

Además, quisiera reconocer a todas las personas que siempre han estado muy cerca de mí y me han apoyado a lo largo de muchos años, empezando por mi madre, mi hermana y Ula, continuando con toda mi maravillosa familia; por ser mi apoyo incondicional durante toda mi vida. Sin su ayuda y su amor definitivamente no sería la persona que soy ahora. De igual forma, quiero agradecer el apoyo de mis amigos Christian y Maritza que siempre han estado al pendiente de mí para todo lo que pudiera necesitar, un regaño, un consejo, una palabra de aliento, un cómplice... me hace muy feliz que sean parte de mi vida.

También quiero agradecer a mis hermosos hijos Rasheed y Noor Aisha por colmarme de dicha con su risa, por acompañarme en todo momento, por enseñarme lo sencillo que es la vida cuando amas, pero, sobre todo, por darme la inspiración y felicidad necesaria para salir todos los días al trabajo con una sonrisa, sin importar lo difícil que parezca la situación.

Para finalizar, quiero reconocer a la persona más importante en la realización de este trabajo, Paty. Porque sin su ayuda, apoyo y confianza jamás hubiera intentado siquiera iniciar esta empresa. Porque a lo largo del tiempo siempre estuvo presente motivándome y haciendo todo lo que fuera necesario para que pudiera continuar. Por haber cuidado de nuestros hijos de una manera tan esmerada, en particular cuando yo no pude estar a su lado. Muchas gracias, siempre estaré agradecido.

# Contenido

	Página
Índice de Tablas	x
Índice de Figuras	xi
Índice de Anexos	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1 Ciclo del Azufre	4
2.1.1 Drenaje Ácido de Mina	5
2.1.2 Tratamiento del Drenaje Ácido de Mina	6
2.2 Tecnologías Basadas en la Sulfato Reducción	7
2.3 Bacterias Sulfato Reductoras	8
2.4 Comunidades de BSR	10
2.5 Atributos de las Comunidades	12
2.6 Ecología Microbiana	13
2.6.1 Herramientas Moleculares	14
2.7 Ecología Microbiana en Reactores Sulfato Reductores	15
3. Justificación	19
4. Hipótesis	20
5. Objetivos	21
6. Materiales y Métodos	22
6.1 Sedimento	22
6.2 Medio	22
6.3 Diseño Experimental	23
6.3.1 Microcosmos	24
6.3.1.1 Presión Selectiva	24
6.3.1.2 Aclimatación	24
6.3.2 Seguimiento de los Microcosmos	25
6.4 Análisis	25
6.4.1 Parámetros Físicoquímicos del Sedimento y de la Columna de Agua	25
6.4.2 Composición Elemental	26
6.4.3 Carbono Orgánico, Inorgánico y Total	26
6.4.4 Sulfuro Disuelto	26
6.4.5 Ácidos Grasos Volátiles y Sulfato	27
6.5 Análisis de Biología Molecular	28
6.5.1 Extracción de ADN	28
6.5.2 PCR	28
6.5.3 T-RFLP	29
6.6 Análisis Estadísticos	30
7. Resultados y Discusiones	31
7.1 Muestreo	31
7.2 Enriquecimientos	33

7.2.1 Presión Selectiva	34
7.2.2 Aclimatación	39
7.2.3 Aclimatación contra Presión Selectiva	42
7.3 Extracción de ADN, PCR y T-RFLP	46
9. Conclusiones	57
10. Referencias Bibliográficas	59
Anexo I. Características Físicoquímicas del Drenaje Ácido de Mina	69
Anexo II. Métodos de extracción de DNA	70

## Índice de tablas

	Página
Tabla 2.1. Métodos para el tratamiento del drenaje ácido de minas.	6
Tabla 2.2. Clasificación filogenética de las bacterias sulfato reductoras y algunas de sus características de interés.	8
Tabla 2.3. Reacciones de oxidación mediante sulfato reducción de acetato, lactato y glicerol y su energía libre de Gibbs.	9
Tabla 6.1. Condiciones de cultivo empleadas en cada tratamiento.	23
Tabla 6.2. Parámetros fisicoquímicos de la columna de agua y del sedimento.	25
Tabla 7.1. Parámetros fisicoquímicos del sedimento, de la columna de agua y del agua de poro del sedimento.	31
Tabla 7.2. Composición elemental del agua de poro del sedimento.	32
Tabla 7.3. Cambio del pH del medio con fuerza iónica de 15 mM.	33
Tabla 7.4. Resumen del desempeño de cada tratamiento.	44
Tabla 7.5. Métricas de Diversidad para cada enriquecimiento y el sedimento original (T0).	52
Tabla All.1. Procesos más importantes de las extracciones realizadas mediante el método de lisis suave propuesto por Gabor et al. 2003, y el kit comercial Power Soil DNA Isolation Kit.	70

## Índice de figuras

	Página
Figura 2.1. Principales procesos microbiológicos dentro del ciclo del azufre.	4
Figura 2.2.. Procesos microbiológicos durante la degradación de la materia orgánica en reactores anaerobios.	11
Figura 6.1. Programa empleado para la amplificación del gen 16S rDNA.	29
Figura 7.1. Producción de sulfuro normalizada, con respecto al máximo teórico, en los tratamientos de presión selectiva a lo largo del proceso de enriquecimiento.	35
Figura 7.2. Cambio de pH para los tratamientos sometidos a presión selectiva, a lo largo del proceso de enriquecimiento.	36
Figura 7.3. Acumulación de acetato normalizada para los tratamientos sometidos a presión selectiva, a lo largo del proceso de enriquecimiento.	38
Figura 7.4. Producción de sulfuro y consumo de acetato residual a lo largo del proceso de aclimatación para los diferentes sustratos.	40
Figura 7.5. Resultados de la producción de sulfuro normalizada, acumulación de acetato normalizada y cambio de pH para los tratamientos a pH 3 enriquecidos mediante aclimatación.	41
Figura 7.6. Comparación del desempeño entre los tratamientos de aclimatación y presión selectiva.	43
Figura 7.7. Gel de calidad de la extracción de ADN de diferentes matrices empleando el kit comercial Power Soil y el método propuesto por Gabor et al. (2003).	46
Figura 7.8. Gel de los productos de la amplificación del gen 16S rDNA empleando templados obtenidos de diferentes matrices mediante dos métodos de extracción: el kit comercial Power Soil y el método propuesto por Gabor et al (2003).	47
Figura 7.9. Gel de los productos de amplificación del gen 16S rDNA empleando dos diferentes concentraciones de templado.	48
Figura 7.10. Perfiles de abundancias relativas de los fragmentos de restricción del gen 16S rDNA proveniente de muestras enriquecidas por presión selectiva bajo diferentes condiciones de acidez y donadores de electrones.	51
Figura 7.11. Resumen de los resultados de la diversidad ( $H'$ ) y el log de la riqueza de las comunidades provenientes de los tratamientos enriquecidos mediante presión selectiva.	54
Figura 7.12. Resultados de desempeño y diversidad para los enriquecimientos cultivados mediante presión selectiva.	55
Figura Al.1. Concentraciones típicas de metales en el drenaje ácido de mina a diferentes niveles de acidez.	69
Figura Al.2. Concentraciones típicas de sulfato en el drenaje ácido de mina a diferentes niveles de acidez.	69

## Índice de Anexos

Anexo I. Características Físicoquímicas del Drenaje Ácido de Mina	Página 69
Anexo II. Métodos de extracción de ADN	70

**Moreno Perlín Tonatiuh (2014). Enriquecimiento de comunidades sulfato reductoras degradadoras de acetato en condiciones ácidas. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. México.**

## **Resumen**

El drenaje ácido de mina (DAM) es un flujo de agua proveniente de jales mineros, que se caracteriza por presentar pH ácido y altas concentraciones de sulfatos y metales. Debido a sus características fisicoquímicas, el DAM es una amenaza para el ambiente y requiere ser tratado de una manera adecuada. Para su tratamiento, se pueden emplear reactores sulfato reductores. En estos procesos, las bacterias sulfato reductoras (BSR) aprovechan el sulfato y lo reducen a sulfuro, el cual es empleado para precipitar los metales presentes en el medio. El desarrollo de esta tecnología tiene dos limitantes: baja eficiencia en pH ácido y la acumulación de acetato. Ambas limitantes se deben a características propias de las BSR, por lo que se ha propuesto emplear comunidades sulfato reductoras en lugar de cepas puras. El objetivo de este trabajo fue establecer si es posible enriquecer comunidades sulfato reductoras que sean capaces de degradar acetato y desarrollarse en condiciones ácidas, empleando muestras ambientales como inóculo. Además, se intentó determinar la estructura de dichas comunidades mediante técnicas de biología molecular.

Con este fin, se realizaron enriquecimientos empleando como inóculo un sedimento con un historial de exposición a DAM. En los enriquecimientos se examinaron los efectos de tres donadores de electrones: acetato, lactato y glicerol, los cuales fueron empleados en tres diferentes niveles de acidez, pH: 3, 4 y 5. Por último, se evaluaron dos técnicas de cultivo para enriquecimientos a pH = 3: aclimatación y presión selectiva. Para determinar el desempeño de la comunidad, se llevó a cabo un seguimiento de la producción de sulfuro y del consumo de acetato a lo largo del tiempo. Para determinar la estructura de las comunidades presentes en los enriquecimientos se empleó la técnica de PCR/T-RFLP.

El desempeño de los enriquecimientos resultó estar estrechamente relacionado con el pH inicial, el donador de electrones y la técnica de cultivo. En los experimentos de presión selectiva, el glicerol resultó ser un sustrato adecuado para la sulfato reducción a los tres niveles de acidez, aunque favoreció la acumulación de acetato. En cambio, se observó inhibición del crecimiento cuando se empleó acetato (tratamientos con pH >5) y lactato (tratamientos con pH >4) como donadores de electrones.

En los enriquecimientos aclimatados, se observó sulfato reducción a pH = 3, tanto con acetato como con lactato. Por su parte, el empleo de glicerol favoreció otros procesos metabólicos en lugar de la sulfato reducción. No se pudieron obtener productos de amplificación de ADN de todas las muestras por lo que fue imposible realizar un análisis molecular adecuado de las comunidades en cada tratamiento.

En este trabajo se demostró la viabilidad de obtener enriquecimientos de comunidades sulfato reductoras capaces de degradar acetato a condiciones de pH = 3, mediante un proceso de aclimatación al pH y con acetato como único donador de electrones, lo cual no ha sido reportado en la literatura y puede tener aplicaciones en las tecnologías para la bio-remediación de efluentes de la industria minera.

**Moreno Perlín Tonatiuh (2014 Enrichment of an acetate-consuming, sulfate-reducing community under acidic conditions. Master thesis. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. México.**

**Abstract**

The acid mine drainage (AMD) is the outflow of acidic water from mine tailings. It can reach extremely low pH values and usually contains elevated concentrations of heavy metals and sulfate. Therefore, acid mine drainages can be very recalcitrant and toxic, and should be treated appropriately. Recently, several efforts have been made to develop sulfate reduction-based processes in order to treat AMD. Sulfate reduction processes rely on the metabolic activities of sulfate-reducing bacteria (SRB), which are responsible for the sulfide production. The sulfide produced is used to precipitate the metals present in the AMD. The main limitations observed in sulfate-reducing processes are the acetate accumulation and the inhibition of SRB at low pH. Both limitations are related to the metabolism of SRB. Therefore, it has been proposed the use of sulfate reducing communities from naturally acidic environments to overcome these limitations. The objective of this work was to obtain acetate consuming-sulfate reducing communities at low pH, using environmental samples as inoculum.

In order to achieve this goal, microbial cultures were enriched from sediments of a water course generated from the tailings of an abandoned sulfur mine. The composition of the media was based on the minimum sulfate reduction medium. Enrichments were performed employing three electron donors (acetate, lactate or glycerol), and two cultivation strategies (acclimation or selection) during 90 days. Selective pressure enrichments were performed at three acidity levels (pH = 3, 4 and 5). Acclimated enrichments were developed as follows: samples were first incubated at pH 5 during 50 days and then at pH 4 for another 50 days. Finally samples were incubated at pH 3 for 90 days. At every change of pH, the medium was removed by decantation and fresh medium at the desired pH was added to the bottles. All microcosms were made by quintuplicates and sampled every 10 days to measure pH, sulfide production and acetate consumption in order to evaluate the performances of the enrichments. T-RFLP analyses were conducted to establish the microbial communities' structure present in the enrichments.

The results showed that the performance of the microbial communities was closely related to the initial pH, electron donor, and cultivation technique employed during the enrichment process. In the selective pressure treatments, glycerol demonstrated to be an option for sulfate reduction at acidic pH. Nevertheless, glycerol promoted the accumulation of acetate, which resulted in low efficiencies of the process. Whereas, acclimation resulted to be a promising option to achieve acetate consuming-sulfate reducing communities at pH = 3.

In this work we obtained enrichments able to produce up to 60% of the theoretical maximum sulfide expected using acetate as the sole electron donor. Such consortia have never been previously reported and are a very promising finding in order to remediate AMD.

# 1. Introducción

El aumento de las actividades humanas ha propiciado cambios significativos en los ciclos biogeoquímicos de la Tierra; dichos cambios conllevan desbalances en el flujo de materia y energía a lo largo de los ecosistemas, lo que produce severos problemas ambientales. Uno de los ciclos biogeoquímicos afectado por la actividad antropogénica es el ciclo del azufre. Las alteraciones de este ciclo tienen varios efectos dañinos, los más destacados son la formación de lluvia ácida y del drenaje ácido de mina (Lens y Kuenen, 2001).

El drenaje ácido de mina es un flujo de agua ácida que se produce en algunos yales mineros como resultado del contacto de ciertos minerales con factores ambientales como la lluvia. Generalmente, este flujo es altamente tóxico debido a que presenta un pH extremadamente bajo, además de altas concentraciones de sulfato y de metales pesados. El tratamiento del drenaje ácido de minas es de gran relevancia ambiental, ya que se trata de una amenaza a la vida de la mayoría de los animales y plantas que pudieran entrar en contacto con su flujo (Hudson-Edwards et al., 2011).

Comúnmente, se emplean tratamientos fisicoquímicos para tratar el drenaje ácido de mina; estos procesos poseen dos principales desventajas: la primera, es que se requiere de instalaciones grandes y costosas; la segunda, es que se produce un residuo en el cual se concentran los tóxicos que fueron removidos del agua. Dicho residuo es inestable y tóxico, por lo que es necesario un manejo especial para poder ser desechado de manera adecuada (Johnson y Hallberg, 2005).

En la actualidad, se buscan alternativas al tratamiento tradicional del drenaje ácido de minas. Una de estas alternativas es el empleo de biotecnologías relacionadas con la sulfato reducción. Dichas tecnologías se basan en el metabolismo de los organismos sulfato reductores, los cuales son capaces de metabolizar el sulfato presente en el medio y convertirlo en sulfuro. El sulfuro es un compuesto muy reactivo que tiene particular afinidad por los metales, con los

cuales forma precipitados metálicos. En las tecnologías sulfato reductoras se busca obtener ventaja de estas reacciones, de tal forma que se favorece la producción de sulfuro para que éste precipite los metales presentes en el agua. Mediante estos procesos, se eliminan del flujo tanto el sulfato, como los metales, además de que se neutraliza el pH (Tchobanoglous et al., 2003).

La principal limitante para el empleo de la sulfato reducción es la acumulación de acetato en el efluente, lo que ocasiona una baja eficiencia en el proceso (Lens et al., 1998). Para el caso particular del tratamiento del drenaje ácido de mina, el pH es otra limitante, debido a que prácticamente todos los organismos sulfato reductores conocidos son neutrófilos, por lo que no pueden desarrollarse de manera adecuada en ambientes ácidos (Hamilton, 1998).

Es importante destacar que ambas limitantes son intrínsecas a los organismos sulfato reductores conocidos, por ello en este trabajo se ha propuesto trabajar con comunidades sulfato reductoras. Las comunidades sulfato reductoras son aquellas que llevan a cabo la producción de sulfuro de manera preferencial, aunque pueden contener poblaciones de organismos que no son sulfato reductores, por ejemplo bacterias fermentadoras o arqueas metanogénicas. Los organismos no sulfato reductores suelen interactuar con las bacterias sulfato reductoras mediante el intercambio de sustratos clave, a través de relaciones simbióticas. En las comunidades sulfato reductoras se aprovecha la diversidad metabólica de diferentes tipos de microorganismos para realizar los procesos de sulfato reducción en condiciones adversas (Koschorreck, 2008).

Cuando se trabaja con comunidades que poseen microorganismos que no son sulfato reductores, las condiciones ambientales son un factor clave para propiciar la sulfato reducción; ya que el ambiente modifica las respuestas metabólicas de los organismos y sus interacciones con otros miembros de la comunidad (Kato y Watanabe, 2010).

En el presente trabajo se buscó analizar el comportamiento de una comunidad sulfato reductora, proveniente de un sedimento expuesto a drenaje ácido de mina, al ser sometida a diferentes condiciones ambientales de acidez y empleando diferentes sustratos como donadores de electrones. Se evaluó el

consumo de acetato y producción de sulfuro como parámetros indicativos del desempeño de las comunidades y se buscó analizar, mediante técnicas de biología molecular, el cambio en la estructura de la comunidad al final del proceso de adecuación a las diferentes condiciones ambientales impuestas. Este tipo de conocimiento es relevante para el desarrollo de las tecnologías sulfato reductoras en general y para el tratamiento del drenaje ácido en particular.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Ciclo del Azufre

El ciclo de azufre es un conjunto de procesos biológicos, físicos y químicos mediante los cuales el azufre se mueve a través de los componentes bióticos y abióticos de los ecosistemas.

En la Figura 2.1 se presentan los procesos microbiológicos que intervienen en este ciclo, se puede observar que los microorganismos cambian la disponibilidad del azufre en el medio al cambiar su estado de oxidación.

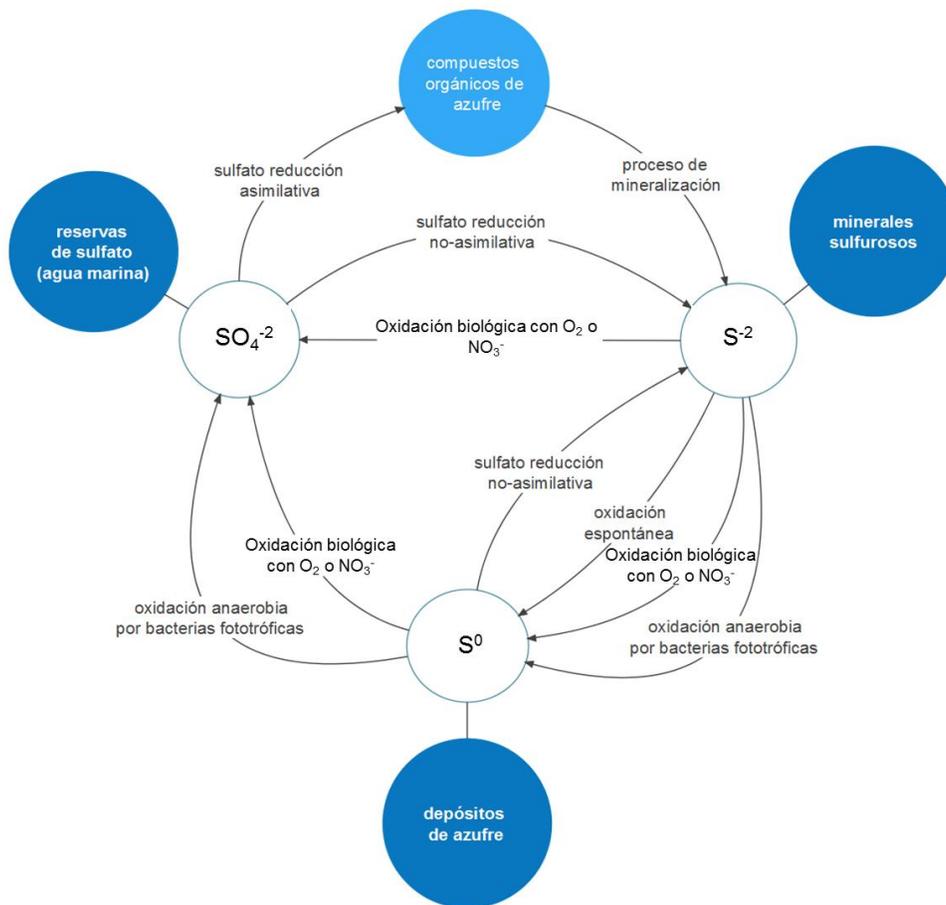


Figura 2.1. Principales procesos microbiológicos dentro del ciclo del azufre (modificado de Lens y Kuenen, 2001).

Dentro del ciclo del azufre se distinguen dos tipos principales de procesos microbiológicos: los asimilativos y los no asimilativos (Fig. 2.1). En los asimilativos, el azufre pasa a formar parte de los componentes celulares de los organismos; en cambio, en los no asimilativos, el azufre no se incorpora al material celular ya que es empleado como un donador o aceptor de electrones durante el metabolismo de algunos procariontes con el fin de obtener energía. Por ello, en los procesos no asimilativos, el azufre es liberado al ambiente con un estado de oxidación diferente al del inicio del proceso. Los compuestos de azufre que pueden ser empleados por los procariontes son varios, entre los cuales destacan: sulfato, sulfito, tiosulfatos, y azufre elemental. Cada compuesto requiere de procesos metabólicos específicos para su utilización, por lo que diferentes microorganismos se pueden diferenciar dependiendo del sustrato que empleen y del proceso que lleven a cabo, ya sea de reducción (bacterias sulfato reductoras) o de oxidación (bacterias sulfuro oxidantes) (Lens y Kuenen, 2001; Rabus et al., 2006).

Durante los últimos dos siglos, las actividades humanas como la minería, la agricultura y la industria han ocasionado serios desbalances en el ciclo del azufre, lo cual ha propiciado diferentes tipos de contaminación. Las formas de contaminación más sobresalientes son la lluvia ácida y el drenaje ácido de mina (Lens y Kuenen, 2001).

### 2.1.1 Drenaje Ácido de Mina

El drenaje ácido de mina (DAM) es un flujo de agua proveniente de minas o de jales mineros que es generado por la oxidación acelerada de la pirita ( $\text{FeS}_2$ ) u otro mineral azufrado. Este proceso ocurre por la exposición de estos minerales a la intemperie, lo que ocasiona que el oxígeno y/o el agua oxiden al azufre a una tasa mayor de lo que se reduce, promoviendo la movilización del azufre y de los metales que formaban parte del mineral. El DAM se caracteriza por poseer un alto nivel de acidez ( $\text{pH} < 5.6$ ), elevadas concentraciones de sulfatos, de metales (principalmente hierro, aluminio y manganeso) y de algunos metaloides (arsénico

por ejemplo) (Johnson y Hallberg, 2005; Anexo I). Estas características hacen que el DAM sea recalcitrante y muy tóxico.

Por ejemplo, el DAM más ácido que se ha reportado proviene de una mina en California, Estados Unidos, en la cual el agua alcanza un pH de -3.6, la concentración total de metales disueltos es de 200g/L y la de sulfato de 760 g/L (Nordstrom et al., 2000). El DAM tiene efectos negativos en miles de kilómetros de cursos de agua a lo largo de todo el planeta Tierra, afectando a la vida acuática y terrestre circundante, por lo cual se le ha llegado a considerar como el problema ambiental más grande que enfrenta la industria minera (Hudson-Edwards et al., 2011).

### 2.1.2 Tratamiento del Drenaje Ácido de Minas

Existen diferentes métodos para el tratamiento del DAM, los cuales pueden separarse de acuerdo a su naturaleza: fisicoquímicos o biológicos, y a la energía que requieren para llevarse a cabo: pasivos o activos (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Métodos para el tratamiento del drenaje ácido de mina (modificado de Johnson y Hallberg, 2005).

<b>Fundamento</b>	<b>Energía</b>	<b>Ejemplo</b>
Fisicoquímico	Pasivos	Drenajes de cal anóxicos
	Activos	Aireación y neutralización
Biológico	Pasivos	Humedales, barreras permeables
	Activos	Biorreactores sulfurogénicos

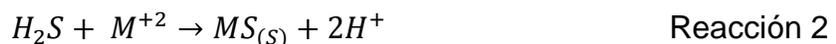
El método de tratamiento de DAM más utilizado es el proceso fisicoquímico activo de neutralización y precipitación; dicho proceso varía en su costo y efectividad de acuerdo a los reactivos empleados, por lo general se le considera un proceso costoso. Además, tiene la gran desventaja de que genera un residuo

que es de difícil manejo y que debe de ser desechado de manera adecuada (Lens et al., 1998).

Una tecnología que representa un enfoque radicalmente diferente a las tecnologías tradicionales es el empleo de reactores sulfato reductores para el tratamiento del DAM. Este tipo de proceso tiene tres ventajas sobre los tratamientos tradicionales: su desempeño es más predecible y controlable, permite la recuperación de los metales del DAM y se elimina el sulfato del medio (Johnson y Hallberg, 2005).

## 2.2 Tecnologías Basadas en la Sulfato Reducción

Los reactores sulfato reductores o sulfurogénicos conforman un tipo de proceso biotecnológico que toma ventaja del metabolismo de las bacterias sulfato reductoras (BSR) para eliminar los metales y el sulfato del medio. En estos procesos, los microorganismos emplean al sulfato como aceptor final de electrones, al reaccionar con algún donador de electrones ( $\text{CH}_2\text{O}$  o  $\text{H}_2$ ) produciendo sulfuro (Reacción 1). El sulfuro reacciona con los metales ( $\text{M}^{2+}$ ) presentes en el medio y propicia la formación de sulfuros metálicos, los cuales son precipitados insolubles en el medio y pueden ser fácilmente removidos (Reacción 2) (Tchobanoglous et al., 2003).



Los procesos biotecnológicos sulfurogénicos dependen completamente de la actividad metabólica de las BSR y de su capacidad para producir el sulfuro.

## 2.3 Bacterias Sulfato Reductoras

Las bacterias sulfato reductoras son un gremio muy diverso de procariontes que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y, a pesar de su nombre, incluyen tanto a organismos del dominio Archaea como del Bacteria. Las BSR son anaerobios estrictos y su principal característica es que obtienen energía para su catabolismo acoplando la oxidación de compuestos orgánicos (CH<sub>2</sub>O) o hidrógeno (H<sub>2</sub>) a la reducción del sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) a sulfuro (H<sub>2</sub>S, HS<sup>-</sup>) (Rabus et al., 2006).

Las BSR se distribuyen a lo largo de tres grandes ramas del reino Eubacteria: delta proteobacterias, gram positivas y la rama conformada por *Thermodesulfobacterium* y *Thermodesulfovibrio*. Además, se encuentran representadas en el reino Archea por el género *Archeoglobus* (Rabus et al., 2006). En la Tabla 2.2 se muestra la clasificación más frecuente de las BSR, los géneros representativos y algunas características fisiológicas relevantes para este estudio.

Tabla 2.2. Clasificación filogenética de las bacterias sulfato reductoras y algunas de sus características de interés (modificada de Castro et al., 2000).

	<b>Géneros representativos</b>	<b>Oxidación de acetato</b>	<b>Temperatura óptima (°C)</b>
Mesofílicas Gram Negativas	<i>Desulfobulbus</i>	No	25-40
	<i>Desulfomicrobium</i>	No	25-40
	<i>Desulfomonas</i>	No	30-40
	<i>Desulfovibrio</i>	No	25-40
	<i>Desulfobacter</i>	Si	20-33
	<i>Desulfobacterium</i>	Si	20-35
	<i>Desulfococcus</i>	Si	28-35
	<i>Desulfomonile</i>	Si	37
	<i>Desulfonema</i>	Si	28-32
	<i>Desulfosarcina</i>	Si	33
Gram positivas formadoras de esporas	<i>Desulfotomaculum</i>	Si/No	25-40, 40-65
	<i>Desulfosporosinus</i>	No	30-37
Bacterias termofílicas	<i>Thermodesulfobacterium</i>	No	65-70
	<i>Thermodesulfovibrio</i>	No	65

Las BSR suelen ser clasificadas en base a su capacidad para mineralizar completamente la fuente de carbono; por lo que se clasifican como BSR completas a aquellas que producen CO<sub>2</sub> como único producto final de la oxidación de la materia y BSR incompletas a las que producen CO<sub>2</sub> y acetato (Liamleam y Annachhatre, 2007). En otras palabras, las BSR completas son capaces de oxidar acetato y las incompletas no.

La incapacidad de las BSR para degradar el acetato se debe a las limitaciones energéticas que presenta la oxidación de acetato al ser acoplada a la reducción del sulfato. Como se puede observar en la Tabla 2.3, este proceso genera muy poca energía, por lo que no es viable que los microorganismos lleven a cabo el ciclo de los ácidos tricarbóxicos por completo en un proceso exergónico; aquellas BSR que son capaces de mineralizar el acetato poseen modificaciones en dicho ciclo lo que les permite llevar a cabo la mineralización completa del sustrato y obtener energía en el proceso (Hamilton, 1998).

Tabla 2.3. Reacciones de oxidación mediante sulfato reducción de acetato, lactato y glicerol y la energía libre de Gibbs asociada (Liamleam y Annachhatre, 2007; Kimura et al., 2006; Rittmann y McCarty, 2001).

Sustrato	Reacción	$\Delta G'^{\circ}$
Acetato	$CH_3COOH + SO_4^{2-} \rightarrow HCO_3^- + HS^- + H_2CO_3$	-39.5 kJ/mol
Lactato	$CH_3CHOHCOOH + 0.5 H_2SO_4 \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + 0.5 H_2S + H_2O$	-34.2 kJ/mol
Glicerol	$C_3H_8O_3 + 0.75 SO_4^{2-} + 1.5 H^+ \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + 0.75 H_2S + 2 H_2O$	-202.0 kJ/mol

Las BSR emplean como sustratos compuestos orgánicos de bajo peso molecular y altamente reducidos como los ácidos grasos volátiles (AGV), alcoholes, compuestos aromáticos polares e incluso hidrocarburos. Entre los sustratos típicos para sulfato reducción se encuentran lactato, acetato, etanol, propionato e hidrógeno (Liamleam y Annachhatre, 2007).

En la naturaleza, las BSR forman parte importante de diversos ambientes anaerobios, principalmente en los sedimentos de los cuerpos de agua. En estos sitios, sus actividades contribuyen al ciclo del azufre y a la mineralización de la materia orgánica, contribuyendo de manera significativa en los últimos pasos del ciclo del carbono. Estudios ecológicos han reportado que casi 50% de la materia orgánica mineralizada en los sedimentos marinos corresponde a la actividad de BSR (Jørgensen, 1982).

#### 2.4 Comunidades de BSR

Como ya se ha mencionado, la sulfato reducción es un proceso que tiene relevancia en las últimas etapas de la degradación de la materia orgánica. Esto tiene lugar, en parte, porque el empleo de un donador de electrones externo permite aprovechar subproductos finales desechados por otros microorganismos, que están altamente reducidos o son de cadena muy corta (Rabus et al., 2006). No obstante, en ausencia de sulfato las BSR pueden desarrollar otros tipos de metabolismo. Por ejemplo, se ha reportado que las BSR pueden crecer en ambientes marinos carentes de sulfato mediante la fermentación de ácidos orgánicos y alcoholes o estableciendo relaciones sintróficas con organismos metanogénicos. Una relación sintrófica es aquella en la cual organismos diferentes unen sus metabolismos para degradar un compuesto que no podría degradar ninguno de ellos por separado. En este caso, las BSR emplean al  $H_2$  como aceptor final de electrones favoreciendo la formación de metano y acetato por bacterias metanogénicas y acetogénicas (Plugge et al., 2011) .

Las interacciones que ocurren entre las BSR y otros gremios durante la digestión anaerobia han sido ampliamente estudiada en reactores anaerobios. En la Figura 2.2 se observa un diagrama de los intermediarios clave en las últimas etapas de la digestión anaerobia y los procesos metabólicos que intervienen en su degradación, además de la sulfato reducción.

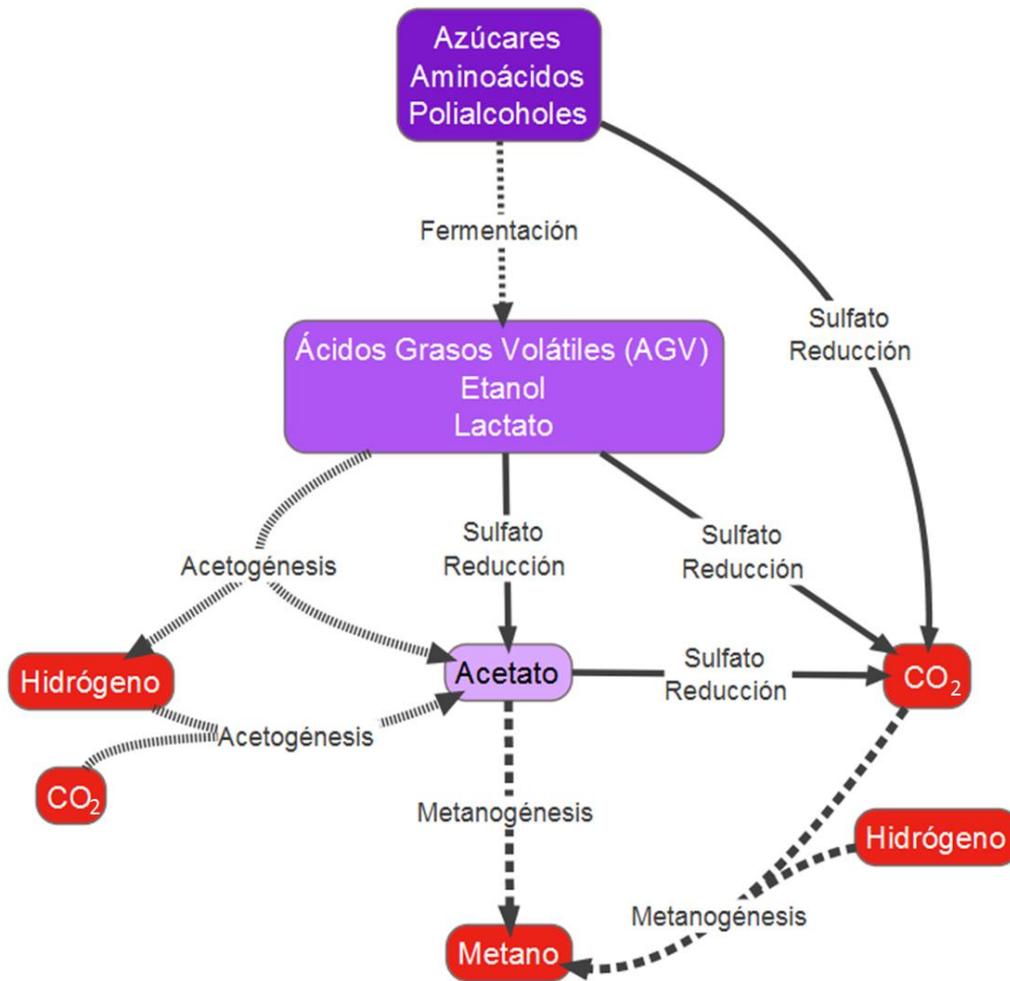


Figura 2.2. Procesos microbianos durante la degradación de la materia en reactores anaerobios (modificado de Lens et al., 1998).

En los reactores anaerobios, los procesos metabólicos que se llevan a cabo durante la degradación de la materia dependen de diferentes factores; pero para el caso de los reactores sulfurogénicos, la disponibilidad del sulfato es esencial. Se ha demostrado empíricamente que la relación entre el sulfato y la materia orgánica, medida como demanda química de oxígeno (DQO), debe de ser mayor a 1.6, para favorecer al proceso de la sulfato reducción; de lo contrario ocurren de manera preferente otros procesos, particularmente el de metanogénesis. En condiciones óptimas, las cinéticas de crecimiento de las BSR son más rápidas que

las de las bacterias metanogénicas, por lo que las BSR aventajan a las metanogénicas en el consumo de sustratos comunes como acetato, hidrógeno y formiato, pero para ello deben de disponer del sulfato necesario (Lens et al., 1998).

Además de la disponibilidad de sulfato, existen otros factores ambientales, que juegan un papel relevante durante el desempeño de la sulfato reducción en los reactores sulfurogénicos como el pH y la temperatura. Por otra parte, otros aspectos que no se relacionan con las condiciones ambientales y que son de relevancia para el proceso sulfato reductor son: la estructura de la comunidad, las abundancias relativas de las bacterias y las características metabólicas de las bacterias (Giloteaux et al., 2012; Koschorreck, 2008; Oude Elferink et al., 1994).

## 2.5 Atributos de las Comunidades

Existen diferentes atributos que definen la estructura de una comunidad, uno de ellos, y de gran relevancia, es la riqueza. La riqueza es el número de especies diferentes que están presentes en una comunidad en un momento determinado (Lozupone y Knight, 2008). Además de la riqueza, la equidad es otro atributo que es de gran utilidad para describir a una comunidad. La equidad describe la manera en que se distribuyen los individuos entre las especies que constituyen a la comunidad (Lozupone y Knight, 2008). Se esperan mayores valores de equidad si los individuos se distribuyen equitativamente entre las diferentes especies de la comunidad; en cambio, cuando una o algunas especies se encuentran sobre representadas entre los individuos, la equidad disminuye (Smith y Wilson, 1996; Tuomisto, 2012).

La riqueza y la equidad son los componentes clave de las medidas de la diversidad de una comunidad, por lo que el incremento en cualquiera de las dos conlleva un aumento en la diversidad de la misma (Stirling y Wilsey, 2001).

La diversidad es un atributo clave de una comunidad, ya que se relaciona con su estabilidad, su productividad y su estructura (Stirling y Wilsey, 2001). Pero las relaciones que existen entre la diversidad de una comunidad y su productividad no son del todo claras y existen diferentes hipótesis al respecto, pero la evidencia parece indicar que esta relación depende del sistema que se estudia (Giller y O'Donovan, 2002).

En comunidades altamente competitivas, como es el caso de los reactores anaerobios, se ha sugerido que la relación entre diversidad y funcionamiento es positiva, debido a que es más probable que las comunidades más diversas posean a una especie clave que pueda desempeñar una función que ninguna otra pueda realizar o llevar a cabo funciones comunes pero a tasas excepcionales (Giller y O'Donovan, 2002). También es posible que una elevada diversidad aumente la posibilidad de incluir especies clave que faciliten la función de otras mediante interacciones positivas como el sintrofismo (Mulder et al., 2001).

Por último, se debe tomar en cuenta que la diversidad promueve la redundancia; lo cual evita que desaparezcan funciones dentro del ecosistema ya que si una población particular desaparece es más probable que alguna otra población pueda llevar a cabo la misma función. En este caso en particular, cabe destacar que si bien, la diversidad promueve la estabilidad de la comunidad en general, al mismo tiempo disminuye la estabilidad temporal de las poblaciones pertenecientes a los mismos grupos funcionales (Lehman y Tilman, 2000).

## 2.6 Ecología Microbiana

El impacto de la diversidad en el funcionamiento de las comunidades es un tema que ha sido ampliamente estudiado en la ecología; sin embargo, el conocimiento derivado de estos estudios no ha permeado en el desarrollo de procesos biotecnológicos. La relevancia de las ciencias ecológicas para la biotecnología ambiental recae en el hecho de que el desempeño de los reactores (procesos biotecnológicos) puede ser analizado de manera análoga en que se analiza el

funcionamiento de un ecosistema determinado. De tal manera, se puede proponer desempeño de un reactor u otro sistema, es una consecuencia directa del desempeño de la comunidad presente al interactuar con las condiciones ambientales a las cuales es sometida (Rittmann et al., 2006).

Por ello, el uso de los conceptos derivados de la ecología para el desarrollo de hipótesis en la investigación de bioingeniería proporcionaría un marco teórico más amplio y sólido para analizar los fenómenos que se observan en los reactores. La metáfora de la caja negra es muy apropiada en este caso. El empleo de un marco teórico apropiado y con la ayuda de las herramientas adecuadas, podría traer luz a la caja negra que son los procesos microbiológicos, ayudándonos a resolver sus misterios (Zarraonaindia et al., 2013).

Pero, más allá de “iluminar la caja negra”, llegar a un entendimiento sólido del funcionamiento de estos sistemas nos podría indicar el camino para manipularlo y lograr que cubra nuestras necesidades (Rittmann et al., 2006).

El primer paso para poder estudiar la ecología microbiana de reactores, es la identificación de los organismos presentes en una comunidad. Esta labor se ha desarrollado gracias a las técnicas de biología molecular, las cuales permiten no sólo identificar, sino cuantificar e incluso analizar la ubicación espacio-temporal de los microorganismos que están presentes en las comunidades en un momento determinado (Röling et al., 2010).

### 2.6.1 Herramientas Moleculares

Al estudio de varios genomas a la vez se le denomina “metagenómica”, y su desarrollo ha sido de gran utilidad para la ecología microbiana. La ecología microbiana ha sufrido dos grandes revoluciones en las últimas cuatro décadas gracias a la metagenómica: la primera, cuando se inició el empleo del gen 16S rDNA como un parámetro para detectar y diferenciar las unidades taxonómicas que conforman a las comunidades (Olsen et al., 1986). La segunda ocurrió cuando surgieron las técnicas de secuenciación masiva, las cuales permitieron analizar de

manera rápida y a bajo costo una gran cantidad de secuencias al mismo tiempo; aumentando la cantidad de información que se puede recolectar para un estudio de una manera nunca antes pensada (Tyson et al., 2004).

Entre las técnicas metagenómicas de mayor utilidad para la ecología microbiana se encuentran las técnicas de “fingerprinting”, éstas se basan en una característica que es general para todos los organismos pero que difiere de manera significativa entre los diferentes grupos taxonómicos. De tal manera que se puede emplear como una “huella digital” para diferenciar entre diferentes organismos dentro de las comunidades.

Las técnicas de fingerprinting más usadas son aquellas que se basan en el gen 16S rDNA; este gen es el responsable de codificar la subunidad pequeña del ribosoma por lo que es ubicuo en los procariontes. No obstante, posee regiones denominadas hipervariables que son distinguibles entre las diferentes unidades taxonómicas, por lo que es útil para identificar a microorganismos procariontes con una gran resolución (Weisburg et al., 1991).

En el proceso de fingerprinting primero se obtienen muchas copias del gen 16S rDNA proveniente de todos los organismos presentes en la comunidad y posteriormente se emplean métodos adecuados para distinguir entre las diferentes secuencias de dichos genes, teóricamente, cada secuencia del gen 16S rDNA corresponde a una unidad taxonómica operacional (OTU) diferente dentro de una comunidad (Muyzer et al., 1993).

Estas herramientas se han empleado de manera extensiva para analizar el comportamiento de comunidades microbiológicas durante la operación de reactores (Rittmann et al., 2006).

## 2.7 Ecología microbiana en reactores sulfato reductores

En el caso de los reactores sulfurogénicos, se han realizado diferentes investigaciones sobre los organismos presentes en el proceso, en diferentes etapas del proceso y en condiciones de acidez. Además, se han analizado el

efecto en las comunidades del empleo de diferentes tipos de reactores, donadores de electrones y otros aspectos operativos de interés para la ingeniería ambiental (Celis et al., 2013; Dar et al., 2009; Jameson et al., 2010; Montoya et al., 2013).

Estudios previos han determinado que una opción viable para el tratamiento del drenaje ácido en reactores sulfato reductores es el empleo de reactores de lecho fluidizado con flujo descendente, los cuales permiten recuperar los precipitados metálicos de manera sencilla empleando el mismo reactor en que se lleva a cabo el proceso de la sulfato reducción (Gallegos-Garcia et al., 2009). No obstante se ha observado que el pH y la baja eficiencia en la remoción de materia se vuelven un problema en este tipo de configuraciones.

La baja eficiencia en los reactores sulfurogénicos se debe a la acumulación de acetato, lo cual es ocasionado por un proceso incompleto durante la mineralización de los sustratos por parte de las BSR (Laanbroek et al., 1984; Gallegos-Garcia et al., 2009; Jing et al., 2013). Para solucionar este problema se han empleado diferentes donadores de electrones con el fin de promover el crecimiento de organismos que sean capaces de consumir acetato (Celis et al., 2013; Liamleam y Annachhatre, 2007; Montoya et al., 2013).

Por otra parte, la inhibición en condiciones ácidas ocurre debido a que las BSR son neutrófilas, por lo cual no pueden crecer de manera óptima en pH ácido (Küsel et al., 2001). Además, algunos subproductos de los procesos anaeróbicos como el sulfuro y los ácidos orgánicos (por ejemplo el lactato y el acetato) son conocidos por su toxicidad en condiciones ácidas. No obstante, se ha reportado actividad sulfato reductora a pH de 4 (Koschorreck, 2008). En años recientes se han empleado sustratos no ionizables por ejemplo etanol y glicerol, como donadores de electrones adecuados para los procesos de sulfato reducción en condiciones ácidas (Johnson, 1998; Kimura et al., 2006; Koschorreck, 2008).

Otra perspectiva para superar la limitante del pH es empleando inóculos que provengan de sitios con altos niveles de acidez; Sánchez-Andrea (2013), empleó muestras de sedimento del Río Tinto como inóculo para enriquecimientos y encontró que las comunidades presentes poseían las capacidad de crecer bajo condiciones ácidas (pH  $\approx$  4) empleando glicerol, metanol o hidrógeno como

donadores de electrones. Otros sustratos promovieron el crecimiento de BSR en condiciones moderadas de acidez ( $\text{pH} > 4.5$ ).

Por otra parte, Kimura et al. (2006), observó que si formaba un consorcio con dos cepas aisladas de muestras ambientales, el consorcio era capaz de llevar a cabo la mineralización del sustrato mediante sulfato reducción a pH ácido ( $\approx 4.0$ ) empleando glicerol como donador de electrones. Además se observó que las cepas por separado presentaban metabolismos diferentes que cuando se encontraban en consorcio, lo cual sugiere posibles interacciones sintróficas.

En general, la información que se ha recolectado en los últimos años de la ecología microbiana ha sido abundante; pero carece de la estructura y organización debida para entender de manera adecuada los fenómenos que se estudian. Para lograr este objetivo es necesario que la investigación que se realice tenga bases en la teoría ecológica (Prosser et al., 2007).

Como se ha mencionado, la baja eficiencia y la sensibilidad al pH son restricciones inherentes a las BSR y su metabolismo. En este trabajo se propuso que ambas limitaciones se podrían resolver empleando comunidades sulfato reductoras que hayan sido enriquecidas con la técnica de cultivo adecuada, en el pH más bajo posible y empleando un donador de electrones adecuado.

El donador de electrones afecta al número de gremios que pueden participar en el proceso: entre más complejo es el donador mayor es el número de gremios que pueden aprovecharlo (Figura 2.2); por lo tanto, se esperaría observar una mayor diversidad empleando donadores de electrones más complejos. De igual manera, el pH afecta a la diversidad promoviendo el crecimiento de diferentes tipos de organismos: entre más ácido sea, será menos probable que crezcan organismos neutrófilos, dando preferencia a los acidófilos; en cambio a pH moderadamente ácido, es posible que crezcan tanto organismos neutrófilos como los moderadamente acidófilos. Este fenómeno es típico de zonas de transición en las cuales se pueden encontrar organismos provenientes de dos biomas diferentes (Gaston et al., 2001)

Por último, existen dos tipos de técnicas de cultivo que son ampliamente usadas en el desarrollo de procesos biotecnológicos: la aclimatación y la presión

selectiva. Dichas técnicas afectan a la diversidad de manera diferente, de acuerdo con el proceso biológico en que se basa cada una.

La aclimatación se logra haciendo pequeños cambios en las condiciones ambientales creando un gradiente hacia las condiciones deseadas; en estos casos, sólo se cambia una variable que generalmente es restrictiva en las condiciones deseadas (concentración de un inhibidor, cantidad de materia orgánica, pH), de tal forma que se permite que los organismos ajusten sus características fisiológicas a las condiciones del medio (Wilson y Franklin, 2002). Por otra parte, la técnica de presión selectiva es una técnica agresiva en la que se busca seleccionar solamente a los organismos que sean capaces de sobrevivir en un conjunto de condiciones deseadas (Sánchez-Andrea et al., 2013).

Estos tres factores (pH, donador de electrones y técnica de cultivo) afectan directamente las condiciones ambientales de la comunidad, por lo que se esperaría que modifiquen la estructura de la comunidad y por lo tanto el desempeño de la misma.

### **3. Justificación**

El desarrollo de los reactores sulfurogénicos como una alternativa para el tratamiento del drenaje ácido de minas es de gran relevancia ambiental y económica. Las principales limitantes de este tipo de tecnologías se relacionan con los microorganismos que se emplean para inocular estos reactores; por lo que es de gran utilidad evaluar diferentes métodos para obtener enriquecimientos sulfato reductores que sean adecuados para inocular biorreactores sulfurogénicos.

Por otra parte, un conocimiento más profundo sobre los fenómenos ecológicos que ocurren en las comunidades sulfato reductoras, sería de gran utilidad para desarrollar procesos biotecnológicos con fundamentos más sólidos dentro de un marco teórico más amplio.

Uno de los principales atributos ecológicos para describir una comunidad y su funcionamiento es la diversidad de la misma. Por lo que conocer los cambios en la diversidad de las comunidades sulfato reductoras después del proceso de enriquecimiento es un primer paso para poder entender el complejo sistema de relaciones entre la estructura de estas comunidades y su desempeño en procesos biotecnológicos.

## 4. Hipótesis

1. La productividad, medida como consumo de acetato y producción de sulfuro, de las comunidades sulfato reductoras, enriquecidas en condiciones ácidas, se relaciona con el pH inicial del enriquecimiento por presión selectiva.
2. La productividad, medida como consumo de acetato y producción de sulfuro, de las comunidades sulfato reductoras, enriquecidas en condiciones ácidas, se relaciona con el donador de electrones empleado durante el enriquecimiento.
3. La productividad, medida como consumo de acetato y producción de sulfuro, de las comunidades sulfato reductoras, enriquecidas a pH 3, se relaciona con la técnica de cultivo empleada durante el enriquecimiento.

## 5. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es establecer si es posible enriquecer comunidades sulfato reductoras, que sean capaces de consumir acetato y producir sulfuro de una manera eficiente, en un medio con pH ácido, empleando sedimentos con un historial de exposición a drenaje ácido de mina. Los objetivos específicos son:

1. Determinar y comparar la eficiencia de las comunidades sulfato reductoras para la producción de sulfuro y consumo de acetato, en un gradiente de acidez empleando diferentes donadores de electrones.
2. Establecer si la diversidad de las comunidades sulfato reductoras se relaciona con el consumo de acetato y con la producción de sulfuro, en un gradiente de acidez empleando diferentes donadores de electrones.
3. Establecer si la eficiencia de las comunidades sulfato reductoras, para producir sulfuro y consumir acetato, se relaciona con la técnica de cultivo empleada durante su enriquecimiento.

## 6. Materiales y Métodos

### 6.1 Sedimento

Se recolectaron muestras de sedimento, provenientes de un curso de agua que es generado por infiltración a través de jales mineros, de una mina de azufre abandonada localizada en Villa de Juárez, San Luis Potosí, México (22°10'53.2" N, 100°16'30.2" O). Se tomaron cinco muestras de sedimento a una profundidad aproximada de 5 cm, con las cuales se conformó una mezcla compuesta. La muestra compuesta fue cribada empleando un tamiz del número 12 (1.7 mm). Se realizó una caracterización de los parámetros fisicoquímicos de mayor relevancia de la muestra compuesta del sedimento y de la columna de agua, tal como se especifica en la sección 6.4.1.

### 6.2 Medio

Para los cultivos se empleó medio mínimo anaerobio (modificado de Stams et al., 1993). El medio se preparó en solución amortiguadora de fosfatos y contenía 10 mM de fuente de carbono (donador de electrones), 0.45 M de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.41 M de  $\text{NaCl}$ , 40 mM de  $\text{MgCl}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 75 mM de  $\text{CaCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1 mL/L de solución de elementos traza (50mM de  $\text{HCl}$ , 1mM de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.5 mM de  $\text{MnCl}_2$ , 7.5 mM de  $\text{FeCl}_2$ , 0.5 mM de  $\text{CoCl}_2$ , 0.1 mM de  $\text{NiCl}_2$  y 0.5 mM de  $\text{ZnCl}_2$ ), 10 mM de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y 0.1 g/L de extracto de levadura. Como donadores de electrones se emplearon soluciones concentradas de 100 mM de acetato de sodio, glicerol o lactato de sodio las cuales fueron diluidas.

Después de ser preparado, el medio era esterilizado en autoclave y posteriormente se le agregaban 2 mM de  $\text{Na}_2\text{S}$  estéril como agente reductor. La fuerza iónica del buffer para el medio era 15 mM, el pH se ajustó con ácido

clorhídrico empleando la ecuación de Henderson–Hasselbalch de acuerdo a lo requerido para cada tratamiento.

### 6.3 Diseño Experimental

Para evaluar el efecto del donador de electrones y pH inicial sobre la productividad y la diversidad en los enriquecimientos sulfato reductores, se emplearon microcosmos que fueron enriquecidos bajo diferentes condiciones. Los microcosmos fueron cultivados con acetato, lactato o glicerol como donadores de electrones y se emplearon tres diferentes valores de pH: 5, 4 y 3. De tal forma, se crearon nueve tratamientos uno con cada donador de electrones ajustado a cada uno de los pH empleados. Además, para cada pH se realizó un control negativo al cual no se le añadió el donador de electrones.

Por otra parte, para analizar el efecto del proceso de aclimatación se realizaron enriquecimientos (uno para cada donador de electrones) en los cuales el pH fue reducido gradualmente de 5 a 3.

En la Tabla 6.1 se puede ver un resumen de los doce tratamientos que se realizaron, los donadores de electrones y el pH inicial. Cada tratamiento se realizó por quintuplicado.

Tabla 6.1. Condiciones de cultivo empleadas en cada tratamiento.

Método de Cultivo	pH inicial	Donador de electrones		
		Acetato	Lactato	Glicerol
Presión Selectiva	pH 5	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
	pH 4	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>
	pH 3	T <sub>7</sub>	T <sub>8</sub>	T <sub>9</sub>
Aclimatación	pH 5 → 3	T <sub>10</sub>	T <sub>11</sub>	T <sub>12</sub>

### 6.3.1 Microcosmos

Los enriquecimientos y los controles se realizaron en microcosmos, empleando botellas serológicas de 120 mL de capacidad, las cuales se inocularon con 7.5 mL de la mezcla compuesta del sedimento y 80 mL del medio esterilizado correspondiente; luego fueron sellados herméticamente con tapones de hule sellados con arillos metálicos. Por último, se les intercambiaron la atmósfera con una mezcla CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>.

Los microcosmos se incubaron a una temperatura controlada de 32±1 °C, en condiciones de oscuridad y sin agitación.

#### 6.3.1.1 Presión Selectiva

Los microcosmos que se sometieron a presión selectiva fueron enriquecidos durante 90 días, en cada botella se colocó el sedimento con el medio correspondiente de acuerdo a la Tabla 6.1. Durante el periodo de enriquecimiento no se modificó ninguna condición ambiental del microcosmo de manera externa.

#### 6.3.1.2 Aclimatación

Los microcosmos que fueron sometidos al proceso de aclimatación se enriquecieron durante 50 días a pH 5 para cada sustrato; posteriormente, se retiró el medio y se cambió por medio fresco y estéril recién preparado con un pH de 4 y con el sustrato correspondiente, las botellas fueron selladas herméticamente y se les intercambiaron la atmósfera para ser enriquecidos por otros 50 días a pH 4. Por último, se les volvió a cambiar el medio, esta vez por uno a pH 3, empleando el mismo procedimiento antes mencionado. El enriquecimiento a pH 3 se efectuó por 90 días. Los microcosmos sometidos al proceso de aclimatación fueron enriquecidos durante 190 días en total.

### 6.3.2 Seguimiento de los Microcosmos

Para analizar la productividad de los microcosmos, las botellas fueron muestreadas cada diez días durante el periodo de enriquecimiento. Para cada muestreo se tomaron aproximadamente 1.8 mL del medio empleando una jeringa. Primero se tomaban tres muestras de 0.1 mL para analizar el sulfuro disuelto y posteriormente se tomaba una muestra de 1.5 mL, a esta muestra se le medía el pH y después se almacenaba a -20 °C en tubos de polipropileno, hasta el momento en que se realizaba el análisis de sulfato y ácidos grasos volátiles.

### 6.4 Análisis

#### 6.4.1 Parámetros Físicoquímicos del Sedimento y de la Columna de Agua

En la Tabla 6.2 se muestran los parámetros físicoquímicos que se analizaron para la muestra compuesta del sedimento, el agua de poro del sedimento y de la columna de agua.

Tabla 6.2. Parámetros físicoquímicos de la columna de agua y del sedimento analizados en este estudio.

Parámetro	Sedimento	Agua de Poro	Columna de agua
Oxígeno disuelto			<b>X</b> ( <i>in situ</i> )
pH	<b>X</b>		<b>X</b> ( <i>in situ</i> )
Temperatura			<b>X</b> ( <i>in situ</i> )
Conductividad			<b>X</b> ( <i>in situ</i> )
Sólidos disueltos Totales			<b>X</b> ( <i>in situ</i> )
Sólidos Totales	<b>X</b>		
Sólidos Volátiles Totales	<b>X</b>		
Sólidos Fijos Totales	<b>X</b>		
Carbono Total	X	X	
Carbono Orgánico Total	X	X	
DQO			<b>X</b>
Composición elemental		<b>X</b>	

Los parámetros *in situ* fueron tomados con un equipo multiparámetro calibrado (YSI 556 MPS, YSI Life Sciences, E.U). La demanda química de oxígeno se analizó de acuerdo al método estandarizado de reflujo cerrado (USEPA, 2001). De igual manera, los sólidos fueron analizados de acuerdo a los métodos estandarizados (APHA, 1998).

#### 6.4.2 Composición Elemental

Se realizó una caracterización parcial de los elementos presentes en el agua de poro de la mezcla compuesta del sedimento. El agua de poro fue extraída mediante centrifugación a 10,500 *g* a partir de 200 g del sedimento durante 30 minutos. El agua de poro fue filtrada empleando filtros de 0.22  $\mu\text{m}$  y acidificada con HCl 0.1N hasta alcanzar el pH = 4. Para el análisis se empleó un sistema de ICP-AES, los análisis fueron realizados en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA), San Luis Potosí, México.

#### 6.4.3 Carbono Orgánico, Inorgánico y Total

El carbono orgánico (COT), inorgánico (CI) y total (CT) del agua de poro fue cuantificado empleando el sistema TOC-Vcsn (Shimadzu, Japón), para la mezcla compuesta del sedimento se empleó el módulo de muestras sólidas SSM-50004 (Shimadzu, Japón). Los análisis se realizaron de acuerdo a las sugerencias del fabricante.

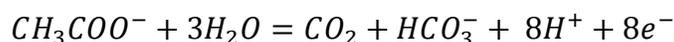
#### 6.4.4 Sulfuro Disuelto

La cuantificación de sulfuro se realizó mediante el método de Cord-Ruwisch (1985); en resumen, se tomaba una muestra de 0.1 mL del medio, el cual se hacía reaccionar con 4 mL de una solución ácida de  $\text{CuSO}_4$ , el resultado se mezclaba y se cuantificaba su absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Spectronic) a una longitud de onda de 480 nm. Previamente, se preparaba una

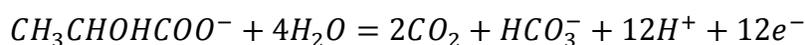
curva de calibración con Na<sub>2</sub>S con las concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 mM. Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

Para comparar la producción de sulfuro entre los diferentes donadores de electrones, se normalizaron los resultados con respecto al máximo teórico para cada sustrato. Dado que la reducción de sulfato (S<sup>6+</sup>) a sulfuro (S<sup>2-</sup>) requiere de ocho electrones, se pueden calcular los máximos teóricos empleando las siguientes ecuaciones que corresponden a la oxidación total de cada donador de electrones (Rittmann y McCarty, 2001):

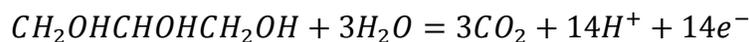
Acetato:



Lactato:



Glicerol:



De acuerdo a estas reacciones, por cada mol de acetato se puede producir un mol de sulfuro; para el lactato y glicerol son 1.5 y 1.75 moles, respectivamente.

#### 6.4.5 Ácidos Grasos Volátiles y Sulfato

Las muestras almacenadas se descongelaban a temperatura ambiente, posteriormente se tomaba 1 mL de muestra y se agregaba a un tubo nuevo, junto con 1 mL de agua desionizada. La mezcla era centrifugada a 10 000 g y filtrada empleando un filtro GSWP de 0.22 µm. Se recolectaban 0.8 mL del filtrado en viales de polipropileno para electroforesis capilar. Las muestras se analizaron en un Sistema de Electroforesis Capilar Agilent (Agilent Technologies) de acuerdo al método propuesto por Soga y Ross (1999).

## 6.5 Análisis de Biología Molecular

Una vez concluidos los enriquecimientos, el contenido total de cada microcosmos fue almacenado a -20 °C para ser analizados posteriormente mediante técnicas de biología molecular. El método de fingerprinting empleado fue el de PCR/T-RFLP, por lo que primero se extraía el ADN genómico total de la comunidad, para luego amplificar el gen 16S rDNA de sus componentes, los fragmentos resultantes fueron separados empleando el método de T-RFLP con el objetivo de obtener índices de abundancia relativa, además de los de presencia/ausencia.

### 6.5.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se descongelaron las muestras almacenadas y se procedía a realizar la extracción de ADN. Se evaluaron dos métodos diferentes de extracción, el propuesto por Gabor et al. (2003) y el kit comercial de extracción Power Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA). El protocolo del fabricante se siguió empleando las modificaciones para muestras con células difíciles de lisar (Anexo III).

### 6.5.2 PCR

Se amplificó el gen 16S rDNA de las muestras de los enriquecimientos. Para ello, se emplearon los iniciadores 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1522R (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA). El iniciador 27F iba marcado con una sonda para los ensayos de T-RFLP.

El buffer de reacción contenía 1x de buffer de PCR, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 mM de cada iniciador, 0.025 U/μL de Taq polimerasa y 0.8 μg/μL de BSA. Se trabajó con un volumen de reacción de 50 μL.

En la Figura 6.1 se puede observar el programa empleado para el termociclador. Cada muestra fue amplificada en dos PCR y posteriormente se mezclaron los productos para obtener 100  $\mu$ L de producto por muestra.

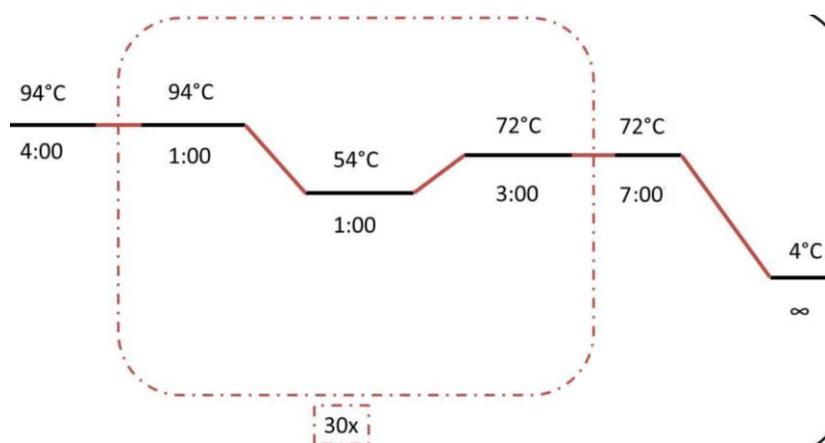


Figura 6.1. Programa empleado en este estudio para la amplificación del gen 16S rDNA.

### 6.5.3 T-RFLP

Los amplicones obtenidos de cada muestra fueron purificados empleando DNA Clean & Concentrator (Zymo Research, Orange, CA), utilizando las instrucciones del fabricante; el ADN se resuspendió en 35  $\mu$ L del buffer de elución y posteriormente fue cuantificado empleando el espectrofotómetro (Nano Drop Technologies, Wilmington, DE).

Se realizaron restricciones de los fragmentos purificados, para ello se emplearon 50 ng de ADN de muestra, como buffer de restricción se utilizó Tango 1x, la enzima fue *MspI*. Las restricciones se llevaron a cabo en un volumen de 10  $\mu$ L durante una noche a 37 °C y después a 70 °C por diez minutos.

Para el análisis de los fragmentos se utilizó un secuenciador automático de cuatro capilares (ABI3130 de Applied Biosystems), como marcador de peso se usó el estándar 1200 LIZ. Los análisis se llevaron a cabo en el Instituto Pasteur de

Montevideo, Montevideo, Uruguay. Los fragmentos fueron visualizados en el software de Peak Scanner TM (Applied Biosystems), para su análisis se empleó la herramienta en línea T-Rex (Culman et al., 2009). Tanto las reacciones de PCR como los perfiles de T-RFLP se realizaron bajo la supervisión de la Dra. Claudia Etchebehere en el Laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.

## 6.6 Análisis Estadísticos

Para comparar el desempeño entre los resultados obtenidos a través de las dos técnicas de cultivo, se empleó un análisis de covarianza (ANCOVA) considerando la técnica de cultivo como la principal variable explicativa; de manera simultánea y con objeto de comparar el desempeño de las comunidades a lo largo del proceso, el tiempo fue empleado como variable de regresión concomitante en el análisis antes mencionado (Badano et al., 2002). Los análisis estadísticos descritos los realizó el Dr. Ernesto I. Badano.

## 7. Resultados y Discusiones

### 7.1 Muestreo

Las características fisicoquímicas del sedimento, de la columna de agua y del agua de poro se enlistan en la Tabla 7.1; en la Tabla 7.2 se observa la composición elemental del agua de poro del sedimento.

Tabla 7.1. Parámetros fisicoquímicos del sedimento, de la columna de agua y del agua de poro del sedimento

	Agua de poro	Columna de Agua	Sedimento
Oxígeno Disuelto	--	2.95 mg/L	--
pH	--	3.59	5.6
Temperatura	--	25.68 °C	--
Conductividad	--	31 mS/cm	--
Potencial Óxido-Reducción	--	396 mV	--
Sólidos Disueltos Totales	--	19.89%	--
Sólidos Totales	--	--	0.631 g/g
Sólidos Volátiles Totales	--	--	0.516 g/g
Sólidos Fijos Totales	--	--	0.115 g/g
Carbono Orgánico Total (COT)	< LD*	--	7 ppm
Carbono Total (CT)	6 ppm	--	7 ppm
Carbono Inorgánico Total (CI)	6 ppm	--	< LD*
DQO	< LD*	--	--
Sulfato disuelto	2081 ppm	>3000 ppm	--

\*menos de 2ppm

En estudios previos, se han reportado las características fisicoquímicas presentes en otros drenajes ácidos de mina, las cuales resultan similares a las encontradas en este estudio: una alta concentración de sulfatos, bajo pH, baja cantidad de materia orgánica disuelta y un potencial óxido-reductor bajo, pero positivo (Johnson y Hallberg, 2005; Sánchez-Andrea et al., 2011). Sin embargo,

para que se lleve a cabo la sulfato reducción, se requiere de condiciones reductoras, es decir un potencial óxido-reductor negativo. Por ello se tomaron muestras de sedimento a una profundidad aproximada de cinco centímetros, en los cuales se esperaba la ausencia de oxígeno disuelto y un ambiente adecuado, como se ha observado en otros estudios.

Tabla 7.2. Composición elemental del agua de poro del sedimento.

	Concentración (ppm)
Ca	175.34
Na	40.43
Mg	38.97
K	47.12
Si	4.97
Fe	9.57
Otros	15.68

El agua de poro del sedimento resultó con una presencia significativa de iones como el sulfato, calcio, sodio y magnesio; estas observaciones son parecidas a otras previamente reportadas (Herzprung et al., 2002). Por último, resulta interesante que mientras que el agua de poro carecía de COT, el sedimento no tuviera Cl. El COT incluye los compuestos orgánicos de carbono, como ácidos húmicos, materia en descomposición y biomasa; mientras que el Cl mide el CO<sub>2</sub> y otros compuestos de ácidos carbónicos. Por ello, se podría suponer que el Cl del agua de poro corresponde al CO<sub>2</sub> o HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> proveniente del metabolismo de los microorganismos presentes en el sedimento, lo cual a su vez explicaría la presencia de COT en el sedimento, que correspondería a la biomasa y otros compuestos típicos de sedimentos como los ácidos húmicos. Los resultados de la Tabla 7.2 aunados a los del sulfato disuelto (Tabla 7.1) sugieren que el medio contiene principalmente yeso (CaSO<sub>4</sub>) y otros sulfatos.

## 7.2 Enriquecimientos

Las muestras de sedimento fueron mezcladas y tamizadas empleando un tamiz de 1.7 mm; posteriormente se empleó para inocular los enriquecimientos. Como medio se empleó medio mínimo anaerobio (Stams et al., 1993) al cual se le modificó la fuerza iónica de 6 mM a 15 mM. Esto fue con el fin de preservar el pH ácido por el mayor tiempo posible, ya que se observó que el pH del medio tendía a equilibrarse con el pH del sedimento o del primer pKa del sulfuro (6.9), dependiendo de la cantidad de sulfuro producido. En la Tabla 7.3 se observan los resultados en los cambios de pH después de aumentar la fuerza iónica.

Tabla 7.3. Cambio del pH del medio con fuerza iónica de 15 mM.

pH ajustado	pH antes del autoclave	pH después del autoclave	pH 10 días después de inoculado
5.00	5.02	4.92	5.92
4.00	4.09	3.99	4.44
3.00	3.00	3.12	4.02

Previamente se ha reportado que la sulfato reducción está asociada a un aumento del pH del medio (Johnson, 2012; Meier et al., 2012; Sánchez-Andrea et al., 2013). Sánchez-Andrea et al. (2013), comprobaron que la fuerza iónica del medio era de gran relevancia para los enriquecimientos acidofílicos, al observar que si se controlaba el pH del medio empleando un buffer de mayor fuerza iónica, se observaba un menor crecimiento y una menor tasa de sulfato reducción que en los enriquecimientos que no tenían el pH controlado. No obstante, pocas veces se toma en consideración este aumento en el diseño experimental y se le considera como una consecuencia natural, incluso cuando se realizan enriquecimientos acidofílicos.

En el caso de los enriquecimientos realizados en el presente trabajo, se buscó amortiguar el pH por el mayor tiempo posible sin aumentar de manera considerable la presión osmótica del medio. Debido a ello, la fuerza iónica del buffer sólo se aumentó hasta 15 mM; sin embargo, esto no fue suficiente para

mantener el pH constante durante todo el enriquecimiento. A pesar del aumento eventual del pH, el pH permaneció en el nivel deseado por el tiempo suficiente para realizar los análisis pertinentes y observar el efecto del pH ácido en la sulfato reducción.

### 7.2.1 Presión Selectiva

La presión selectiva es un tratamiento agresivo que tiene como objetivo inhibir o eliminar a los microorganismos que sean incapaces de sobrevivir en el conjunto de condiciones ambientales impuestas.

En la Figura 7.1 se muestran los resultados de producción de sulfuro normalizada para los enriquecimientos que fueron sometidos a presión selectiva, de acuerdo al donador de electrones (7.1a-c) y al pH inicial (7.1d-f).

En estudios anteriores se ha reportado la presencia de sustrato endógeno en muestras de sedimentos (LlobetBrossa et al., 2002), en este estudio se observó más sulfuro que el esperado en la mayoría de los tratamientos, incluso en las botellas control, en las cuales se pudo observar la producción endógena de sulfuro, la cual llegó a casi 4 mM a pH 5, y poco más de 3 mM en los experimentos a pH 4 y 3 (resultados no mostrados).

Otro factor que se deben considerar en los resultados de sulfuro observado es que se midió únicamente el sulfuro disuelto y que a los resultados obtenidos de esas mediciones se les restaron 2 mM, correspondientes al sulfuro que se añadía al medio de cultivo; este hecho puede dar lugar a concentraciones negativas, las cuales nos indican que el medio tenía menos de 2 mM de sulfuro en un momento determinado. La disminución de sulfuro en el medio se pudo llevar a cabo por fenómenos de precipitación con metales, o por un cambio en su estado de oxidación.

Como se puede observar en la Figura 7.1, los tres donadores de electrones fueron sustratos adecuados para la producción de sulfuro.

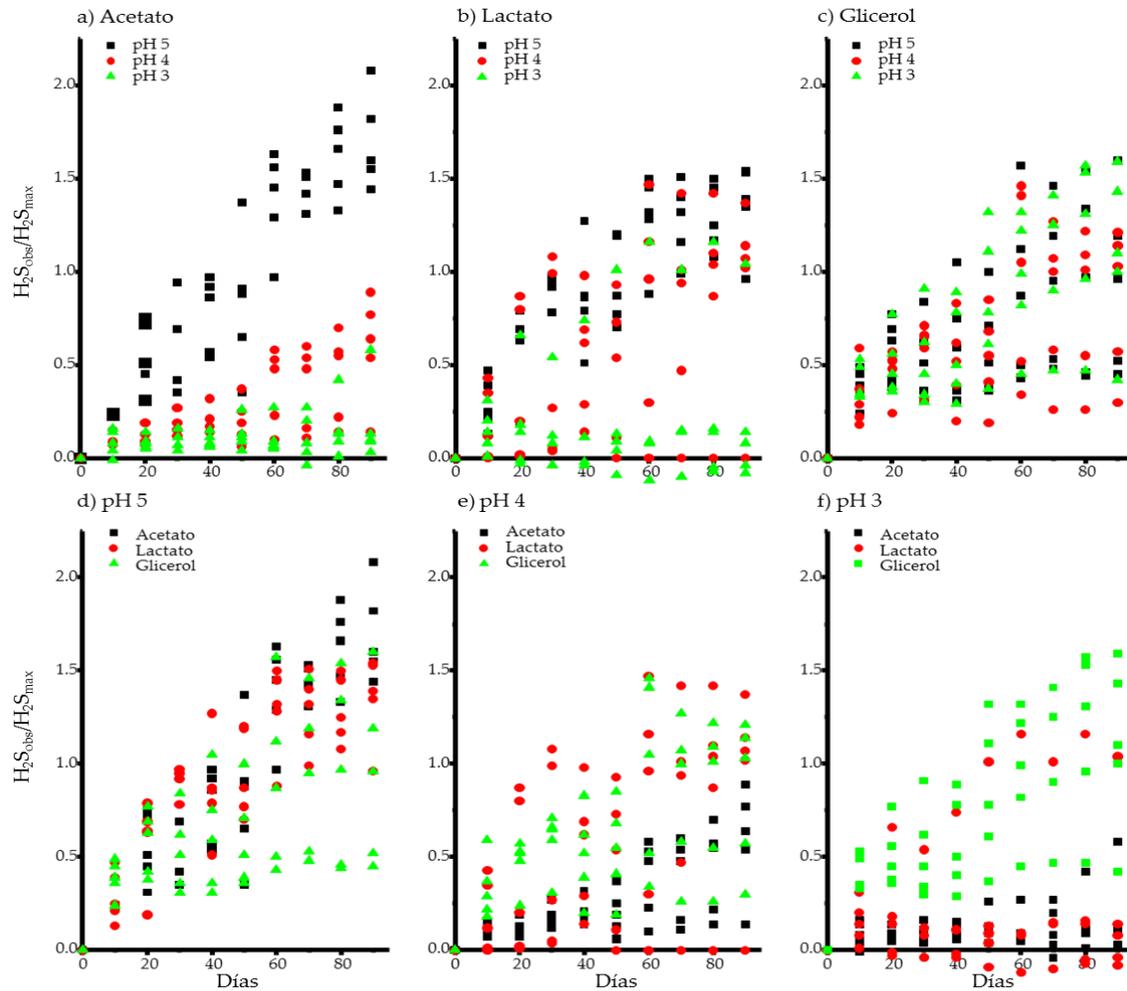


Figura 7.1. Producción de sulfuro normalizada, con respecto al máximo teórico, en los tratamientos de presión selectiva a lo largo del proceso de enriquecimiento. En la fila superior se muestran los resultados con respecto al donador de electrones [a) acetato, b) lactato, c) glicerol] y en la fila inferior de acuerdo al pH inicial [d) pH 5, e) pH 4, f) pH3].

No obstante, la sulfato reducción, con acetato (Fig. 7.1a) y lactato (Fig. 7.1b) fue dependiente del pH inicial en condiciones de acidez ( $pH < 5$ ). Cuando se empleó acetato como donador de electrones (Fig. 7.1a), la sulfato reducción se inhibió a  $pH < 5$  teniendo sólo 50% de eficiencia en la producción de sulfuro a pH 4 con respecto al  $pH = 5$ ; en  $pH = 3$  la producción de sulfuro fue inhibida por completo. Para el caso del lactato, el pH solamente fue un factor importante a  $pH = 3$ .

Por último, cuando se empleó glicerol como donador de electrones, no se observaron cambios significativos en la producción de sulfuro entre los diferentes niveles de pH, lo cual lo convierte en un sustrato adecuado para los procesos de sulfato reducción a pH ácido.

En la Figura 7.2 se presentan los cambios de pH a lo largo de los enriquecimientos en los tratamientos de presión selectiva. Es posible apreciar que los tratamientos en los que se produjo sulfuro (acetato pH 5, lactato pH 5 y 4 y los de glicerol), el pH subió más que en los ensayos en los que no hubo sulfato reducción.

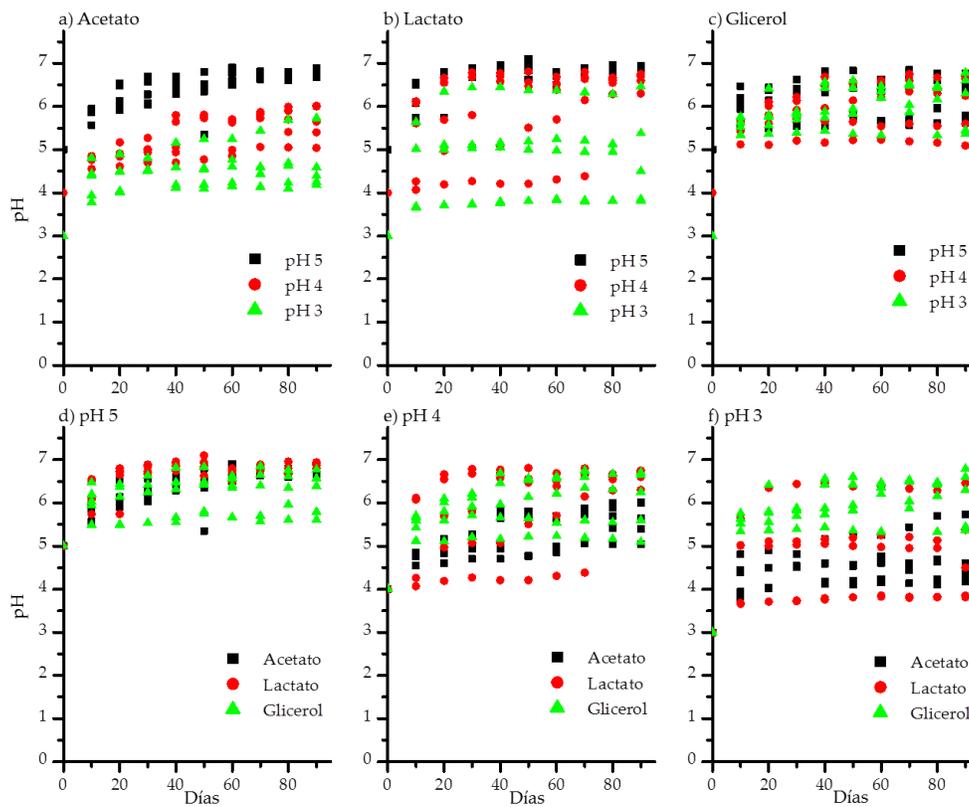


Figura 7.2. Cambio de pH para los tratamientos sometidos a presión selectiva, a lo largo del proceso de enriquecimiento. En la fila superior se agrupan los resultados por sustrato [a) acetato, b) lactato, c) glicerol], en la inferior de acuerdo al pH inicial [d) pH 5, e) pH 4, f) pH 3].

El fenómeno de aumento de pH durante la sulfato reducción ha sido ampliamente reportado en la literatura y se explica debido a la producción de carbonatos y del mismo sulfuro, ambos sustratos intervienen en el equilibrio ácido-base del sistema (Gallegos-García et al., 2009; Meier et al., 2012; Sánchez-Andrea et al., 2013)

La inhibición de la sulfato reducción a pH menor de 5 para lactato y acetato se puede explicar por su toxicidad a pH bajo. Se ha establecido que las bacterias sulfato reductoras son sensibles a la presencia de ácidos grasos de cadena corta en condiciones ácidas (Ghose y Wikén, 1955). Este fenómeno de toxicidad se debe a que los ácidos grasos protonados son capaces de difundir a través de la membrana celular y desacoplar la cadena respiratoria (Koschorreck, 2008). Por lo tanto, sería de esperarse que el acetato, que tiene un pka de 4.6 sea tóxico a pH < 5, dado que a estos valores de pH la mayoría del acetato se encuentra en su forma protonada. Por otra parte, el lactato que tiene un pka de 3.86, sólo sería tóxico en el tratamiento iniciado a pH = 3, cuando la mayoría del sustrato se encuentre en su forma no ionizada (Sánchez-Andrea et al., 2013). Estas consideraciones corresponden con lo observado en este trabajo.

Este fenómeno de toxicidad también podría explicar por qué, aun cuando el pH haya subido lo largo de los enriquecimientos (Figuras 7.2d,e,f ), el pH inicial sea determinante del desempeño de los enriquecimientos en los diferentes tratamientos, sin importar el pH al cual se encuentren a lo largo del tiempo. Por lo que la inhibición ocasionada por estos sustratos resultó irreversible durante el tiempo que duraron los enriquecimientos.

En la Figura 7.3 se observan los resultados de acumulación de acetato residual para los diferentes tratamientos. Se consideró que la oxidación incompleta del lactato y del glicerol mediante sulfato reducción producen acetato de manera equimolar al sustrato consumido. Así pues, el máximo teórico de acetato acumulable para estos sustratos es de 10 mM.

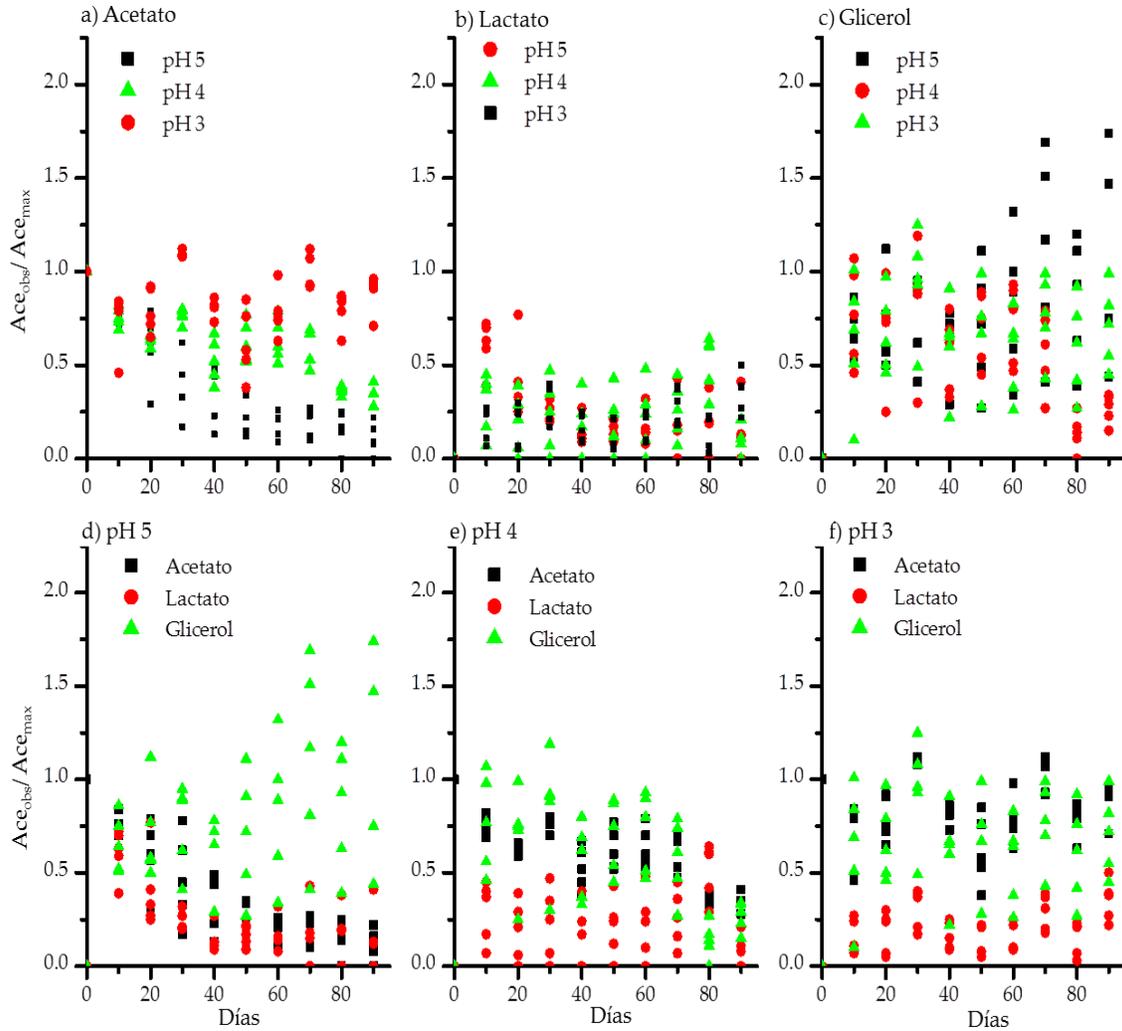


Figura 7.3. Acumulación de acetato normalizada para los tratamientos sometidos a presión selectiva, a lo largo del proceso de enriquecimiento. En la fila superior se agrupan los resultados por sustrato, en la inferior por pH

De tal forma, en la Figura 7.3 también se puede ver la presencia de sustrato endógeno, particularmente para el glicerol, en el cual el acetato residual alcanza casi 2 veces el máximo teórico (Fig. 7.3c). Por otra parte, es posible observar que, para el caso del lactato, la disminución del pH afecta de manera negativa la degradación de acetato (Fig. 7.3b), aunque no afecta la producción de sulfuro concomitante (Fig. 7.1b).

Previamente, se ha reportado que el empleo de glicerol como donador de electrones, promueve preferencialmente el crecimiento de bacterias sulfato

reductoras incapaces de metabolizar acetato (Qatibi et al., 1991; Sen y Johnson, 1999). Esta misma tendencia se observó en los tratamientos con glicerol a pH 5, no obstante, a pH 4 la acumulación de acetato fue menor que a pH 3; lo cual resulta interesante, ya que la producción de sulfuro fue similar en ambos tratamientos. Esto podría sugerir que cuando se emplea glicerol como donador de electrones y a pH inicial de 4, se desarrollan otros gremios además de los sulfato reductores, los cuales contribuyeron con la degradación del donador de electrones sin la producción de sulfuro inherente a la sulfato reducción.

Los resultados de los tratamientos de enriquecimiento bajo presión selectiva indican que el glicerol es un donador de electrones adecuado para llevar a cabo la sulfato reducción en condiciones ácidas (Kimura et al., 2006; Sánchez-Andrea et al., 2013), incluso a pH inicial de 3; no obstante, favorece la acumulación de acetato. Por lo cual se podrían llevar a cabo estrategias como mezclar el glicerol con acetato de tal manera que se lleve a cabo un enriquecimiento de BSR completas (Celis et al., 2013) o empleando los consorcios adecuados (Kimura et al., 2006).

### 7.2.2 Aclimatación

El objetivo del proceso de aclimatación es permitir que los organismos tengan el tiempo adecuado para ajustar sus parámetros fisiológicos a una condición adversa presente en su ambiente (Wilson y Franklin, 2002). En este estudio, el proceso de aclimatación se realizó durante 100 días; en este tiempo los organismos fueron sometidos a un gradiente de pH: el pH se modificó una unidad cada 50 días, cada vez que se cambiaba el pH se cambiaba el medio completo, removiendo posibles subproductos tóxicos para evitar la inhibición por producto. Durante este periodo de aclimatación se llevó a cabo un seguimiento cada diez días, en el cual se obtenía una muestra del medio para cuantificar acetato y sulfuro (Figura 7.4).

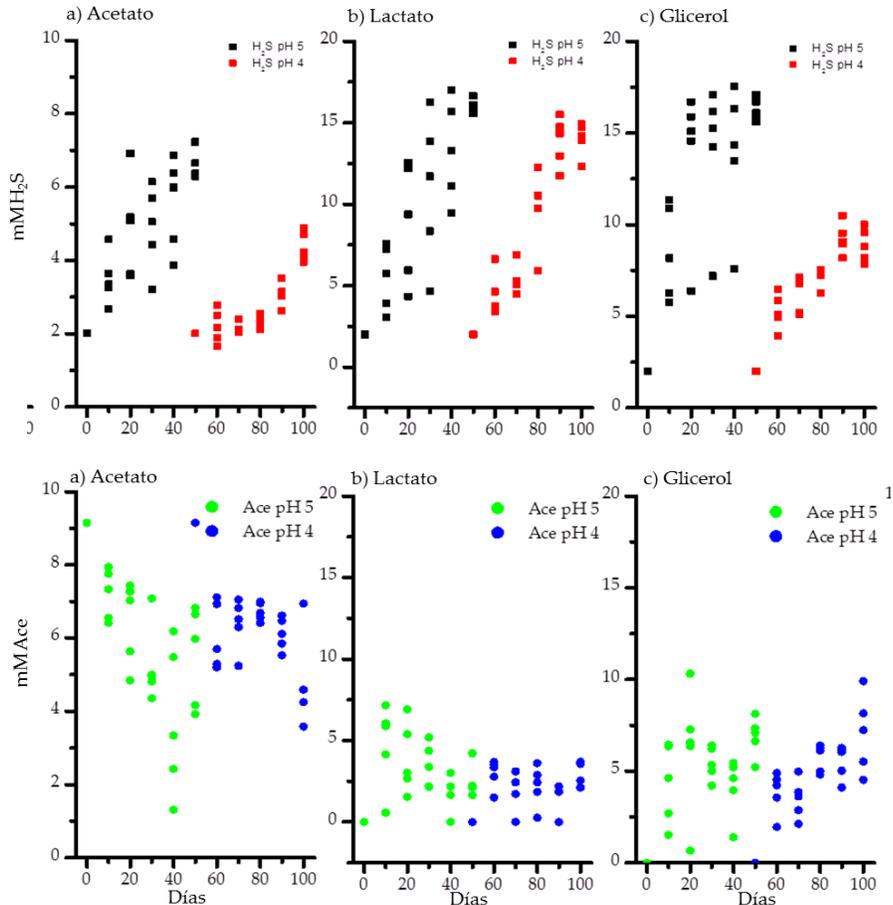


Figura 7.4. Producción de sulfuro y consumo de acetato residual a lo largo del proceso de aclimatación (disminución de pH 5 a 4) para los diferentes sustratos. En la fila superior se observa la concentración de sulfuro en el medio para cada uno de los sustratos [a) Acetato, b) Lactato y c) Glicerol]. En la fila inferior se observa la concentración de acetato residual [d) Acetato, e) Lactato y f) Glicerol].

Como se puede observar en la Figura 7.4, el proceso de aclimatación promovió una uniformidad en el desempeño de los enriquecimientos; por lo que la variación en el desempeño de las réplicas disminuyó durante el proceso. También se observó la presencia de sustrato endógeno, cuya degradación se reflejó en una concentración de sulfuro disuelto mayor que la esperada.

En los tratamientos con glicerol como donador de electrones, la eficiencia para producir sulfuro y consumir acetato se conservó durante el proceso de aclimatación. En contraste, para el acetato y el lactato el cambio de pH 5 a 4

conllevo a una reducción en la producción de sulfuro; además, se promovió una fase de aclimatación más larga, sin llegar a observarse una inhibición completa de la actividad sulfato reductora (Figs. 7.4a y 7.4b). Después del proceso de aclimatación, se reemplazó el medio de los microcosmos por medio fresco a pH 3 y se inició con el periodo de 90 días de enriquecimiento. En la Figura 7.5 se observan los resultados normalizados de estos tratamientos.

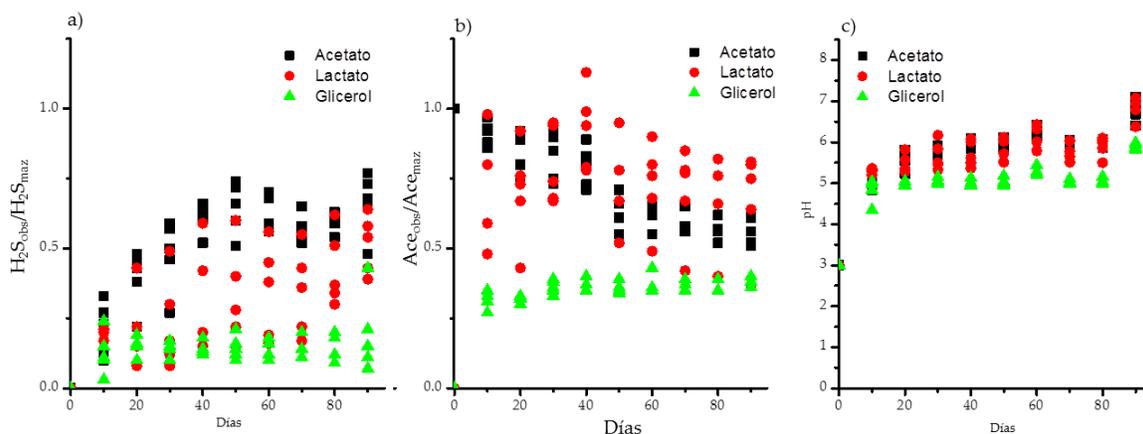


Figura 7.5. Resultados de la producción de sulfuro normalizada (a), acumulación de acetato normalizada (b) y cambio de pH (c) para los tratamientos a pH 3 enriquecidos mediante aclimatación.

Es de gran relevancia destacar que se observó una producción significativa de sulfuro empleando acetato como único donador de electrones a pH inicial de 3, la cual incluso llegó a ser más de 70% del máximo teórico (Fig. 7.5a). Estudios previos han reportado la sulfato reducción en reactores con cultivos puros a pH > 3 empleando H<sub>2</sub> como donador de electrones (Jameson et al., 2010) y en enriquecimientos a pH de ≈3.5 empleando H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (Meier et al., 2012) y glicerol (Kimura et al., 2006; Sánchez-Andrea et al., 2013), pero no se ha reportado la sulfato reducción a pH inicial de 3 empleando acetato como único donador de electrones.

Al igual que con el acetato, el proceso de aclimatación favoreció la sulfato reducción empleando al lactato como donador de electrones a pH de 3. No

obstante, el acetato se acumuló, indicando el crecimiento de BSR incompletas. La sulfato reducción empleando al lactato como donador de electrones no había sido previamente reportada a pH inicial de 3, sin embargo, existen reportes de reactores sulfato reductores que emplean lactato a un pH de 4 (Jong y Parry, 2006; Kaksonen et al., 2004).

Por último, se observa que en los microcosmos alimentados con glicerol hubo consumo de sustrato sin la producción correspondiente de sulfuro. Esto nos indica que la sulfato reducción dejó de ser el proceso metabólico dominante en estos microcosmos. Este fenómeno es particularmente evidente para el caso del tratamiento con glicerol, el cual sólo produjo 10% del sulfuro máximo teórico, no obstante se acumuló el 60% del acetato máximo teórico, cuando en teoría la relación entre sulfuro producido y acetato residual debería de ser 0.75:1 mol (Tabla 2.1). Como se mostró en la Figura 2.2, el glicerol puede ser aprovechado por el gremio de los fermentadores para producir acetato sin sulfato reducción.

### 7.2.3 Aclimatación contra Presión Selectiva

Para comparar estadísticamente las diferencias en la producción de sulfuro, el consumo de acetato y aumento de pH entre las dos técnicas de cultivo, se empleó un análisis de covarianza (ANCOVA). Los resultados se muestran en la Figura 7.6.

Como se observa, existen diferencias significativas en todos los indicadores del desempeño entre los tratamientos que fueron aclimatados desde pH 5 a 3 con respecto a los tratamientos sometidos a pH 3 desde el principio (presión selectiva).

La producción de sulfuro se favoreció por el proceso de aclimatación en los enriquecimientos cultivados con acetato (Fig. 7.6a) y lactato (Fig. 7.6d), en cambio, la aclimatación tuvo un efecto negativo en los tratamientos que fueron cultivados con glicerol (Fig. 7.6g). En cuanto al consumo de acetato residual, la diferencia entre las estrategias de enriquecimiento es de gran relevancia, ya que el único tratamiento en el cual se observó un consumo significativo de acetato fue en el tratamiento de aclimatación con acetato como donador de electrones (Fig. 7.6b).

En el resto de los tratamientos se observa que la tendencia fue de acumular el acetato

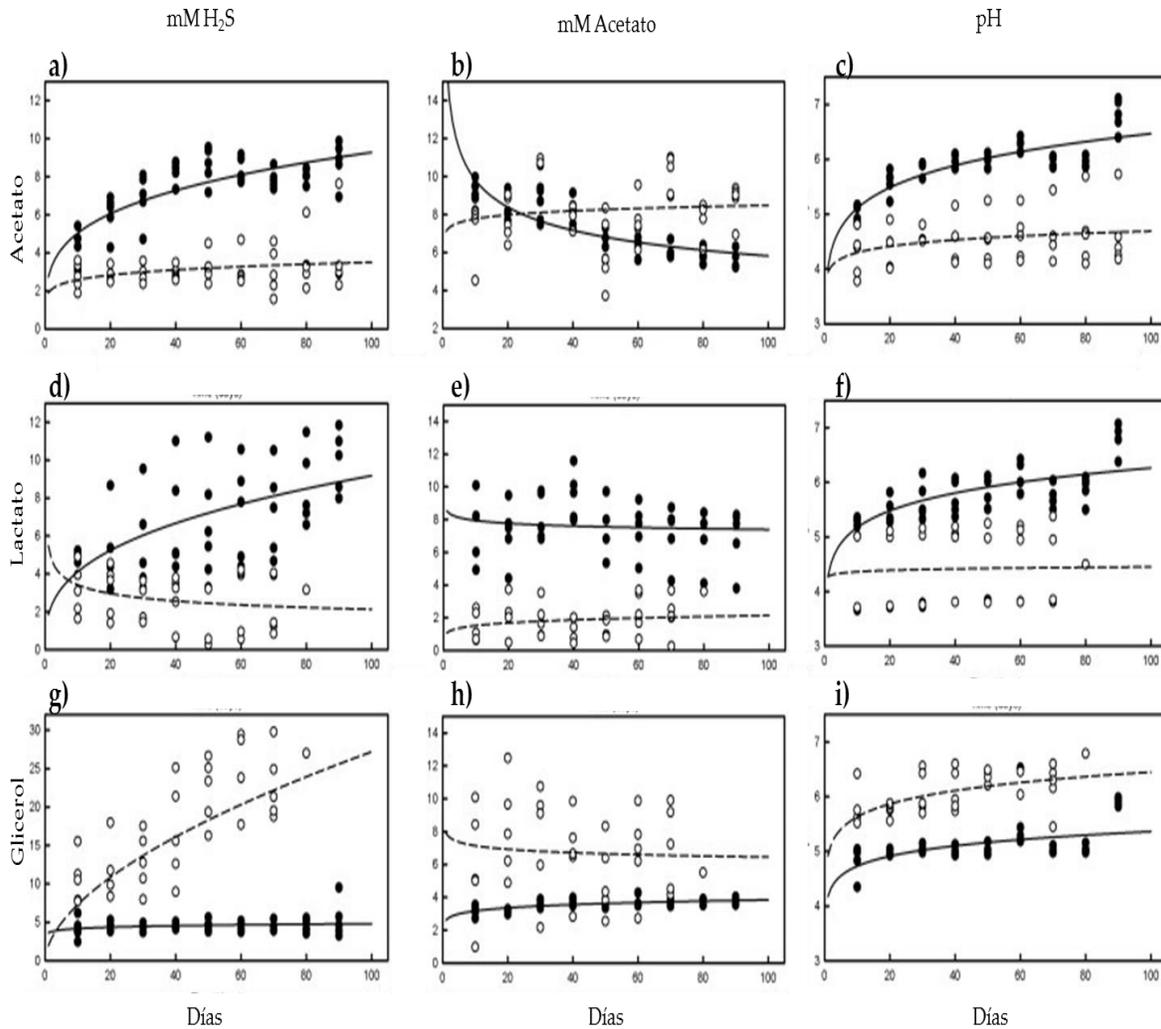


Figura 7.6. Comparación del desempeño entre los tratamientos de aclimatación (puntos negros-línea continua) y presión selectiva (puntos blancos-línea punteada) a pH 3 ( $P > 0.05$ ). En la columna izquierda se observan los resultados para producción de sulfuro, al centro para el acetato residual y a la derecha para el pH.

Como ya se ha mencionado, el aumento del pH está estrechamente relacionado con la producción de sulfuro, por lo que los resultados del pH son similares a los de sulfuro, observándose un efecto positivo para los tratamientos

aclimatados con acetato (7.6c) y lactato (7.6f) como donador de electrones, y un efecto negativo para los de glicerol (7.6 i).

En la Tabla 7.4 se presenta un resumen cualitativo del desempeño de los microcosmos para cada tratamiento, tanto de la producción de sulfuro como del consumo de acetato.

Tabla 7.4 Resumen del desempeño de cada tratamiento realizado en este trabajo.

Tratamiento	Proceso	Sustrato		
		Acetato	Lactato	Glicerol
pH 5 Presión Selectiva	Producción de H <sub>2</sub> S	✓	✓	✓
	Consumo de Acetato	✓	✗	✗
pH 4 Presión Selectiva	Producción de H <sub>2</sub> S	✗	✓	✓
	Consumo de Acetato	✗	✗	✗
pH 3 Presión Selectiva	Producción de H <sub>2</sub> S	✗	✗	✓
	Consumo de Acetato	✗	✗	✗
pH 3 Aclimatación	Producción de H <sub>2</sub> S	✓*	✓	✗
	Consumo de Acetato	✓*	✓	✗

\*  
Nunca antes reportado

El empleo de glicerol como donador de electrones se ha reportado para la sulfato reducción a pH < 4; no obstante, su uso promueve el desarrollo de BSR incompletas lo que tendría la desventaja de producir efluentes de baja calidad con un alto contenido de carga orgánica en potenciales aplicaciones tecnológicas.

Cuando se empleó lactato o glicerol como fuente de carbono la eficiencia de la aclimatación es cuestionable. En el caso del glicerol promovió el crecimiento de

organismos no sulfato reductores ya que se degradó hasta 60% del glicerol, el cual fue convertido a acetato, pero sólo se produjo 20% del acetato esperado, lo cual es 40% menos de lo esperado si el glicerol se hubiera degradado mediante sulfato reducción. En el caso del lactato, el proceso de aclimatación permitió la sulfato reducción a pH inicial de 3, lo cual no ocurrió en los tratamientos de presión selectiva; pero, los organismos promovidos fueron BSR incompletas, por lo que se observó una acumulación de acetato.

Se pueden proponer dos posibles explicaciones fisiológicas por las cuales la aclimatación es benéfica para el desarrollo de BSR completas. Una de ellas es porque, bajo el principio de la Hipótesis de Aclimatación Benéfica, la aclimatación da el tiempo suficiente a los microorganismos para desarrollar los mecanismos necesarios para sobrevivir en condiciones de acidez (Wilson y Franklin, 2002). Las bacterias acidofílicas poseen una serie de modificaciones fisiológicas que les permiten desarrollarse a pH bajos como bombas de protones y cambios en la composición de proteínas de membrana (Ferguson y Ingledew, 2008), dichas modificaciones requieren energía, por lo que los microorganismos crecen de manera más lenta.

Otra posible explicación del éxito de la aclimatación es la Hipótesis del Desarrollo Óptimo, la cual indica que aquellos organismos que se desarrollan en condiciones óptimas están mejor preparados para enfrentarse en condiciones adversas que los que se desarrollaron fuera de su óptimo (Huey et al., 1999).

Ninguna de estas dos hipótesis ha sido evaluada en microorganismos por lo que es imposible argumentar a favor de alguna; además, también puede ser que la aclimatación no actué a nivel de los microorganismos en particular, sino de la comunidad en general. Ya se ha señalado previamente que es posible conceptualizar a las comunidades como unidades reproductivas, convirtiéndolas en el punto de acción sobre el cual la selección natural ejerce presión (Konopka, 2009; Zarraonaindia et al., 2013).

### 7.3 Extracción de ADN, PCR y T-RFLP

Para analizar la diversidad de las comunidades presentes en los enriquecimientos se empleó la técnica de PCR/T-RFLP. Para llevar a cabo esta técnica, es necesario contar con ADN genómico de alta calidad, el cual represente de la mejor manera posible al total de OTUs presentes en la muestra (Avis et al., 2006). Por ello, se evaluaron dos métodos para la extracción de ADN, el método de Gabor et al. (2003), que fue desarrollado específicamente para muestras ambientales de suelo y sedimentos y el kit comercial de MoBio para suelos. También se evaluaron las posibles matrices de extracción: sedimento, medio, y el licor mezclado (mezcla del sedimento con el medio). En la Figura 7.7 se muestra el gel de calidad de la extracción de ADN para cada una de las matrices empleando los dos diferentes métodos de extracción.

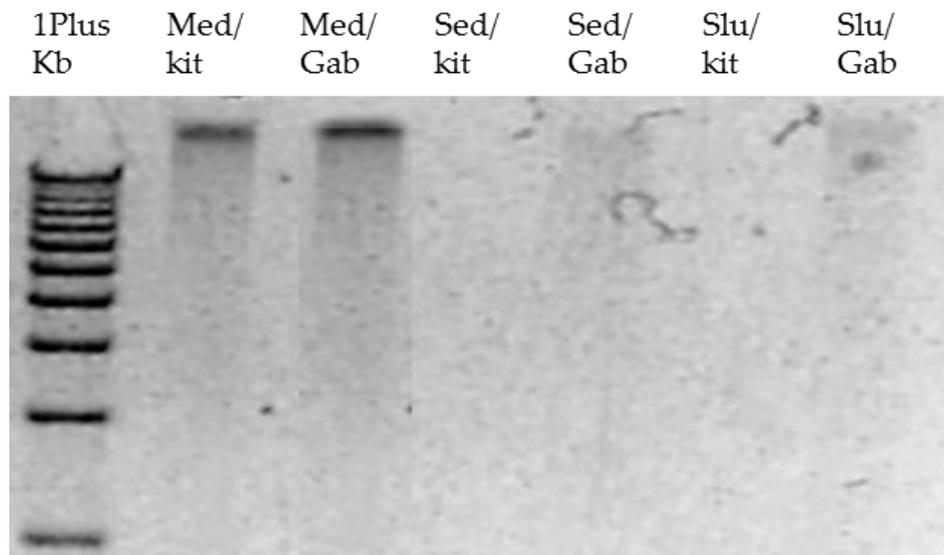


Figura 7.7. Gel de calidad de la extracción de ADN de diferentes matrices empleando el kit comercial Power Soil DNA (kit) y el método propuesto por Gabor et al. (2003) (Gab). 1PlusKb= Marcador de peso molecular, Med = Medio de cultivo, Sed = Sedimento, Slu = medio + sedimento.

Después de la extracción de ADN, se prosiguió a la amplificación del gen 16S rDNA, el gel de los productos de amplificación se muestra en la Figura 7.8.

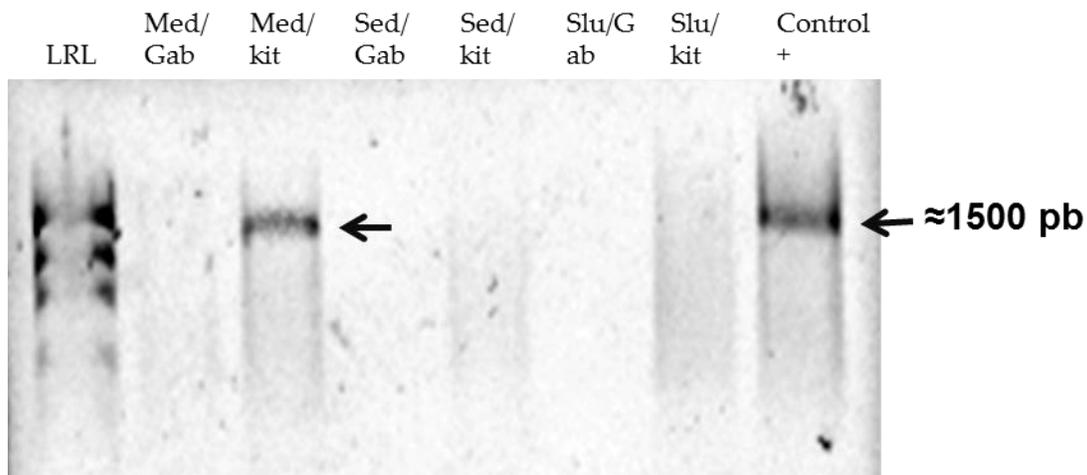


Figura 7.8. Gel de los productos de la amplificación del gen 16S rDNA empleando templados obtenidos de diferentes matrices mediante dos métodos de extracción: el kit comercial Power Soil DNA (kit) y el método propuesto por Gabor et al (2003) (Gab). Med = Medio de cultivo, Sed = Sedimento, Slu = medio + sedimento. LRL = Low Range Ladder.

A pesar de que mediante el método de Gabor y colaboradores se obtenían concentraciones más altas de ADN (18 ng/μL) que con el kit (8 ng/μL), el ADN extraído por el método de Gabor y col. resultó ser inadecuado para la amplificación (Figura 7.8). Por otra parte, los resultados de la amplificación revelaron que el sedimento inhibía la PCR de algún modo, por lo que las muestras de sedimento y licor mezclado siempre daban negativas para la amplificación, sin importar el método de extracción. Por ello se decidió emplear el medio de cultivo como matriz de extracción y al kit de extracción de MoBio (Power Soil DNA) como método de extracción.

Se ha observado que la cantidad de muestra empleada en la amplificación por PCR afecta la intensidad de la señal en los electroferogramas de los T-RFLP (Abdo et al., 2006), por lo que se prefieren concentraciones altas de templado para que las señales de los electroferogramas sean lo más claras posibles. Debido a esto, se examinaron 2 diferentes condiciones de concentración del templado: 1 y 2

$\mu\text{L}$  por reacción ( $\approx 8$  ó  $16$  ng) el gel de calidad de estas amplificaciones se muestra en la Figura 7.9.

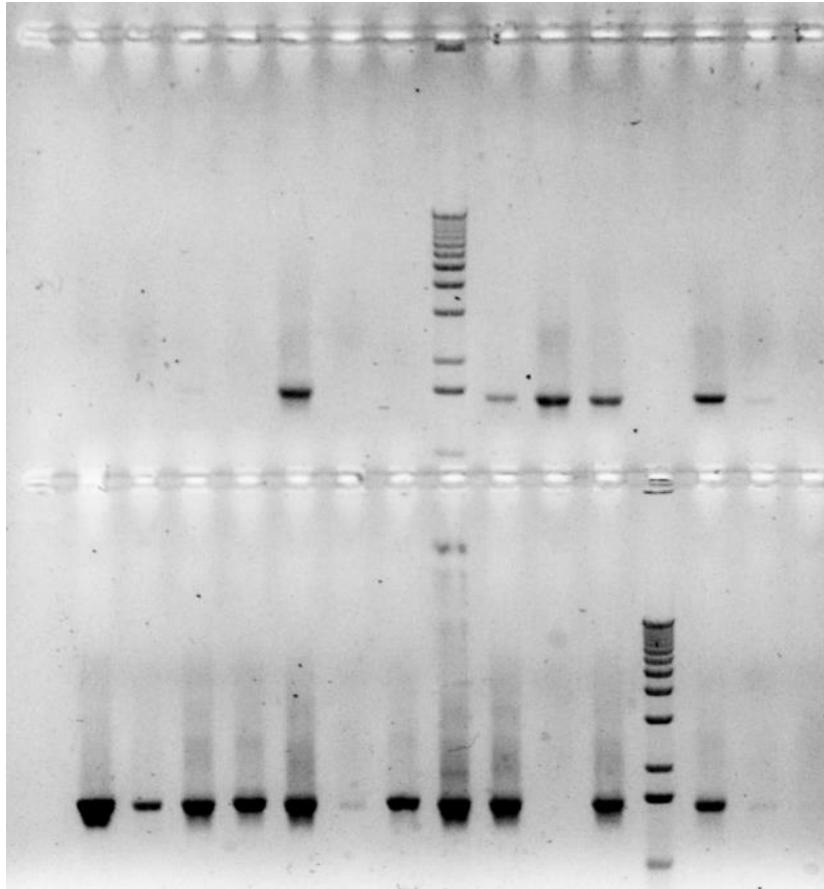


Figura 7.9. Gel de los productos de la amplificación del gen 16S rDNA empleando dos diferentes concentraciones de templado. En los carriles de arriba se observan los resultados empleando 8 ng, en los de abajo 16 ng de templado. Las extractos de ADN fueron los mismos para ambos casos.

En la Figura 7.9 se observa que cuando se emplearon 16 ng de DNA de templado se obtuvieron mejores resultados, se obtenía producto de PCR para la mayoría de las muestras y la concentración era elevada, lo cual no ocurría con sólo 8 ng, posteriormente se evaluó el efecto de incrementar un poco más la concentración de templado hasta 20 ng pero no se observaron diferencias

significativas ni en el gel ni en la cuantificación por espectrofotometría (resultados no mostrados). Por lo que se optó por trabajar con 16 ng de templado.

Una vez seleccionadas las condiciones de la PCR, se procedió a realizar la amplificación de cada muestra de enriquecimiento (5 réplicas por 12 tratamientos más una muestra del sedimento original) por duplicado. No obstante, no fue posible obtener producto de PCR de todas las muestras; en particular fue imposible obtener amplicones de los extractos de ADN provenientes de los tratamientos de aclimatación, por lo que estas muestras fueron descartadas para los análisis de diversidad.

Cada muestra fue amplificada por duplicado, y los productos se mezclaban conformando un volumen total de 100  $\mu$ L de productos de PCR; después, se purificaba la mezcla empleando el kit DNA Clean & Concentrator de Zymo Research, siguiendo las instrucciones del fabricante para purificar fragmentos del tamaño de amplicon deseado ( $\approx$ 1500 pb). Después de este proceso, las muestras fueron cuantificadas espectrofotométricamente y posteriormente fueron digeridas empleando la enzima *MspI*. La restricción se realizó empleando dos diferentes concentraciones de ADN, 50 y 100 ng e incluyendo o no un paso de desecado previo a su envío para secuenciación. Los resultados de la secuenciación indicaron que no existían diferencias significativas entre estas variables, por lo que se optó por emplear 50 ng de ADN en la restricción y no desecar las muestras (resultados no mostrados).

Los resultados de las secuenciaciones se visualizaron y alinearon empleando el software Peak Scanner de Applied Biosystems. Como marcador de peso molecular se empleó la escalera de 1200LIZ, como método de análisis se utilizó el método de NNP que ofrece el distribuidor modificando las siguientes variables: la altura mínima del pico se ajustó a 20 y el rango de análisis se limitó entre 50-650 pb.

Existen varias dificultades para estandarizar los resultados de los T-RFLP, las más importantes se refieren a la lectura de los electroferogramas, en los cuales las señales de ruido y el corrimiento de los picos suelen ser importantes fuentes

de error (Culman et al., 2009). Por ello se empleó la herramienta en línea T-Rex para solucionar ambos problemas de una manera automatizada.

Para limpiar el ruido de los resultados se prefirió el método de Abdo et al. (2006), el cual considera que los picos “reales” son aquellos cuya altura o área es mayor a la desviación estándar de todas las señales multiplicada por un factor elegible, posteriormente, se repite el proceso con los picos “falsos” hasta que no se encuentran nuevos picos “verdaderos”. Para este estudio se eligió la altura como señal de respuesta y el factor se mantuvo en 1.

Para identificar los posibles fenómenos de corrimiento de los picos entre las diferentes muestras se empleó el método de T-Align (Smith et al., 2005), en el cual se identifica el pico de menor tamaño entre todas las muestras y después agrupa a todos los picos que están dentro de un umbral elegible y los identifica como el mismo fragmento, el proceso es iterativo hasta que todos los picos han sido agrupados y asociados a un fragmento. En este estudio, se empleó un umbral de 2pb, dado que es el límite de detección que reporta el laboratorio responsable de llevar a cabo las secuenciaciones.

Los resultados fueron descargados en formato .fasta para construir matrices de abundancias relativas para cada muestra. Los fragmentos que representaban menos del 2% del total de la comunidad fueron eliminados.

En la Figura 7.10 se observan los patrones de abundancias relativas de los enriquecimientos con presión selectiva y el patrón del sedimento original que se empleó como inóculo. Se puede observar que existen ciertas OTUs que son representativas para cada donador de electrones. Así mismo, existen OTUs que se ven representadas en casi todas las muestras.

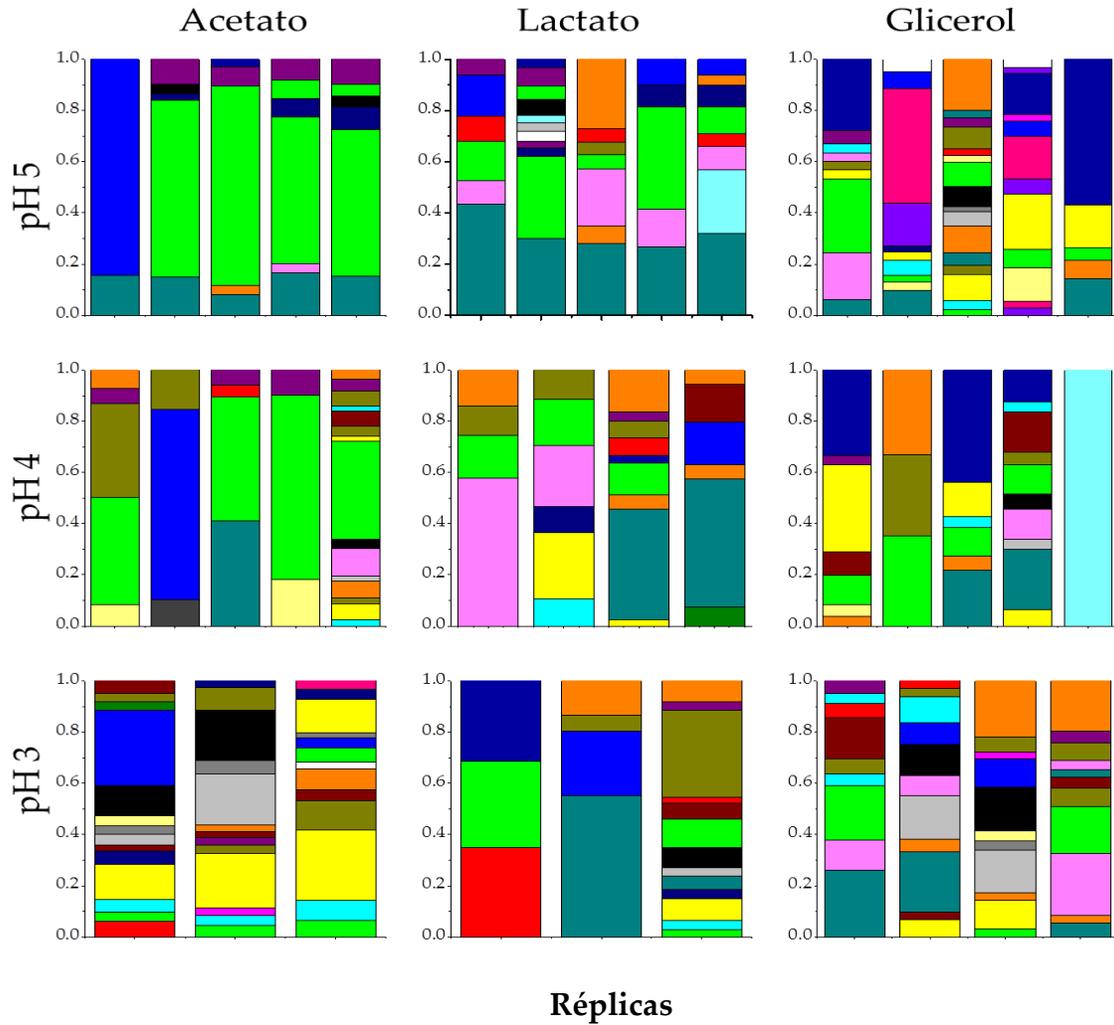


Figura 7.10. Perfiles de abundancias relativas de los fragmentos de restricción del gen 16S rDNA proveniente de muestras enriquecidas por presión selectiva bajo diferentes condiciones de acidez y donadores de electrones.

Con los datos de riqueza y las abundancias relativas se obtuvieron diferentes métricas de la diversidad de los enriquecimientos: el Índice de Shannon-Wiener ( $H'$ ), la equidad (expresada como  $H'/H_{\max}$ ) y la dominancia (expresada como la abundancia relativa más alta de la muestra). Los resultados se muestran en la Tabla 7.5 y se resumen en la Figura 7.11.

Tabla 7.5. Métricas de Diversidad para cada enriquecimiento y el sedimento original (T0). La primera letra indica el donador de electrones empleado en el cultivo y el número el pH inicial del medio. Los siguientes dos caracteres denotan las réplicas. Riqueza (S), índice de Shannon-Wiener (H'), Equidad (E), y Dominancia (D).

Muestra	S	H'	E	D
T0	6	1.63	0.91	0.40
A51A	2	0.43	0.62	0.84
A54A	6	1.32	0.74	0.57
A55A	6	1.33	0.74	0.57
A52B	5	0.99	0.61	0.69
A53B	5	0.82	0.51	0.78
L54A	5	1.44	0.89	0.40
L51B	6	1.56	0.87	0.43
L52B	11	1.90	0.79	0.32
L53B	7	1.69	0.87	0.28
L55B	8	1.82	0.88	0.32
G51A	9	1.82	0.83	0.29
G55A	5	1.23	0.77	0.57
G52B	10	1.79	0.78	0.45
G53B	16	2.55	0.92	0.20
G54B	12	2.21	0.89	0.22
A41B	5	1.30	0.81	0.42
A42B	3	0.74	0.68	0.74
A43B	4	1.03	0.74	0.49
A44B	3	0.77	0.70	0.72
A45B	15	2.22	0.82	0.38
L41B	4	1.14	0.82	0.58
L42B	6	1.72	0.96	0.26
L43B	9	1.75	0.80	0.43
L44B	6	1.44	0.80	0.50
G41B	7	1.59	0.81	0.34

Tabla 7.5 (continuación). Métricas de Diversidad para cada enriquecimiento y el sedimento original (T0). La primera letra indica el donador de electrones empleado en el cultivo y el número el pH inicial del medio. Los siguientes dos caracteres denotan las réplicas. Riqueza (S), índice de Shannon-Wiener (H'), Equidad (E), y Dominancia (D)

Muestra	S	H'	E	D
G42B	3	1.10	1.00	0.35
G43B.	6	1.50	0.84	0.44
G44B	10	2.14	0.93	0.23
G45B	1	0.00	0.00	1.00
A33B	14	2.31	0.87	0.30
A34B	13	2.20	0.86	0.21
A35B	13	2.28	0.89	0.28
L31B	3	1.10	1.00	0.35
L32B	4	1.12	0.81	0.55
L35B	13	2.21	0.86	0.34
G32B	9	1.96	0.89	0.26
G33B	11	2.19	0.91	0.23
G34B	11	2.14	0.89	0.22
G35B	11	2.11	0.88	0.24

Es importante destacar que en algunas de las muestras se observa una riqueza mayor que la del sedimento original. Esto se explica por las limitaciones de las técnicas de biología molecular empleadas: ya que la amplificación se hace con cebadores inespecíficos, las OTUs que se encuentran pobremente representadas difícilmente son detectadas; aunque, es evidente que todas las OTUs se encuentran en el sedimento original, se encuentran tan pobremente representadas o están en un estado latente por lo que es imposible detectarlas por PCR (Osborn et al., 2000).

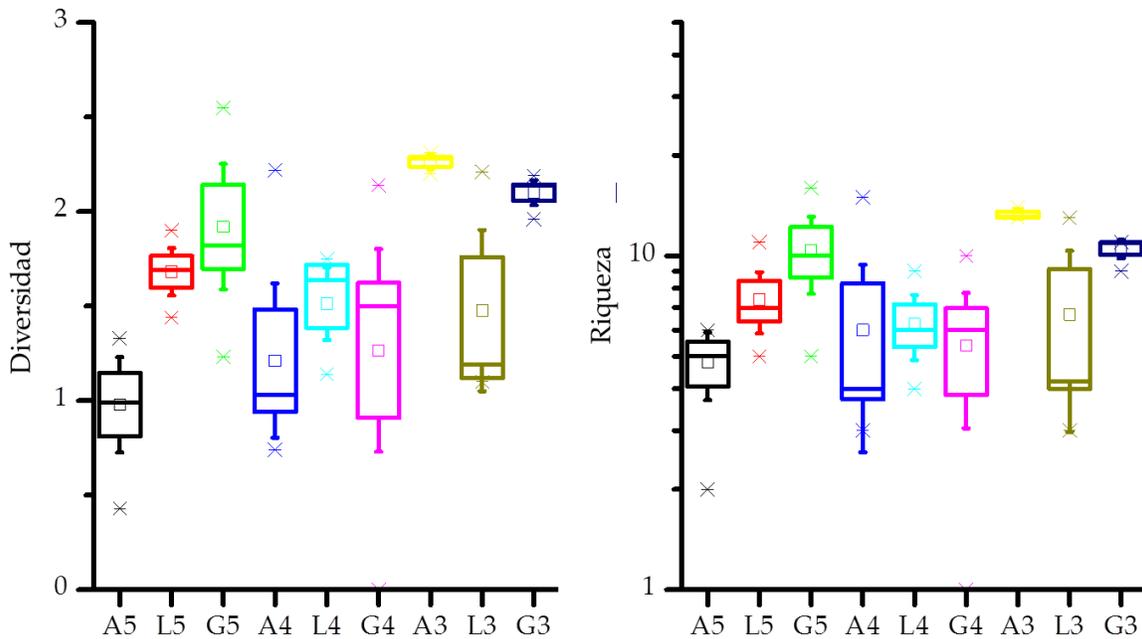


Figura 7.11. Resumen de los resultados de la diversidad ( $H'$ ) y el log de la riqueza de las comunidades provenientes de los tratamientos enriquecidos mediante presión selectiva. La primera letra indica el donador de electrones y el número el pH inicial.

En la Figura 7.12 se presenta un resumen de todos los resultados obtenidos para los tratamientos enriquecidos mediante presión selectiva. La producción de sulfuro y el acetato residual están normalizados con respecto al máximo teórico. En los resultados globales presentados en la Figura 7.12 se observa que solamente a pH 5 se podría relacionar a la diversidad con el donador de electrones. Como se esperaba, a este pH el donador de electrones que fomenta una mayor diversidad es el glicerol y el que presenta una menor, el acetato; mostrando una concordancia con el número de gremios capaces de participar en la degradación para cada sustrato (Fig. 2.2). Para los demás niveles de acidez no parece existir una relación entre diversidad y donador de electrones. Debido a la imposibilidad de realizar las amplificaciones para todas las muestras no se pudo realizar una prueba estadística adecuada para sustentar estas aseveraciones, porque en algunos de los tratamientos sólo fue posible amplificar muestras de 3 réplicas, de las 5 que se realizaron.

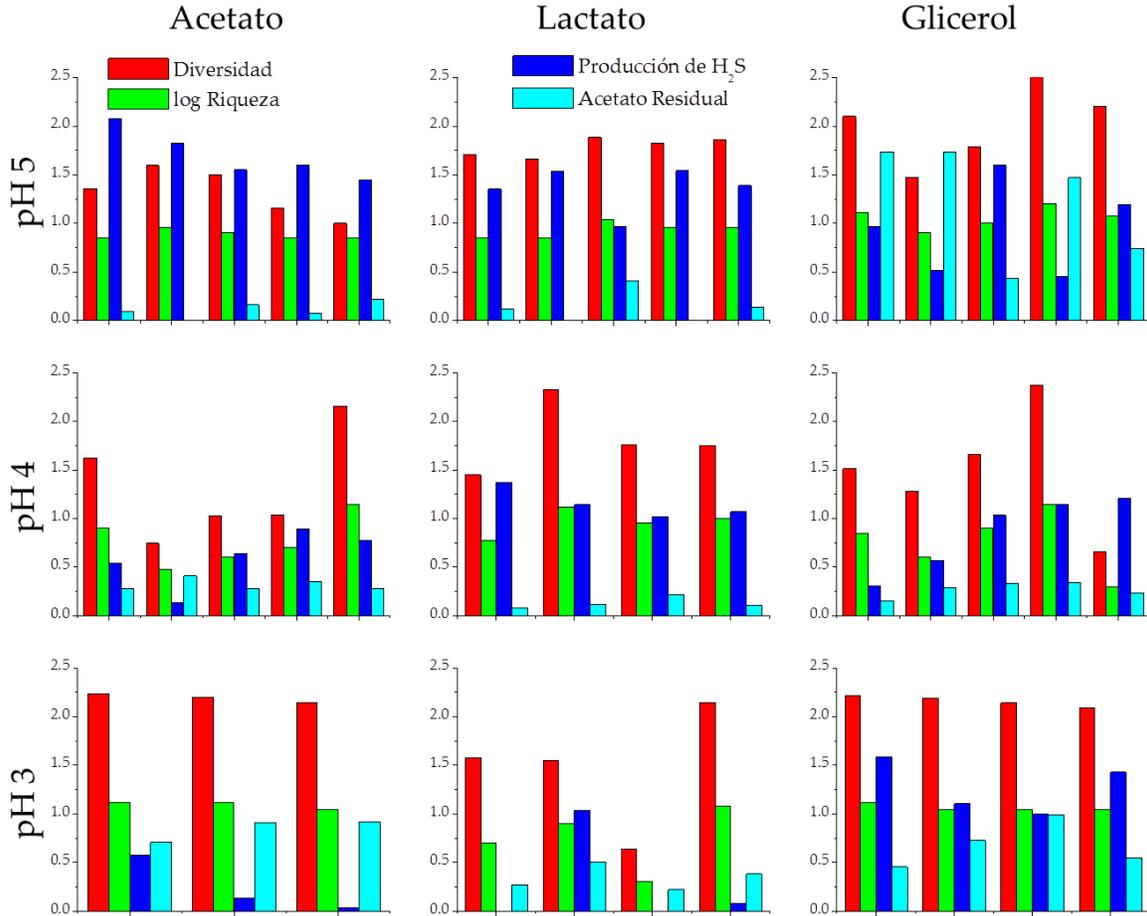


Figura 7.12. Resultados de desempeño y diversidad para los enriquecimientos cultivados mediante presión selectiva. La diversidad está indicada como el Índice de Shannon-Wiener, y la producción de sulfuro y acumulación de acetato están normalizados con respecto al máximo teórico. No se indican los resultados de desempeño para las muestras que no se pudieron analizar mediante PCR/T-RFLP.

Los resultados indican que el glicerol promovió los niveles más altos de riqueza de especies, pero su diversidad no fue particularmente alta debido a la gran dominancia que se observó por parte de algunas especies.

Por último, resulta interesante que las muestras que fueron expuestas a pH 3 tuvieran una mayor riqueza de especies que aquellas cultivadas a un pH mayor, lo anterior se puede explicar por dos razones: por una parte, a pH más cercano a

la neutralidad es probable que la competencia haya sido menor y unas cuantas especies hayan dominado; además, a pH 3 se alcanza un pH óptimo para el desarrollo de bacterias acidófilas, por lo que podría ser que la gran diversidad en estas condiciones se debe a que se cultivaron bacterias acidófilas que se encontraban en condiciones óptimas de desarrollo y no las bacterias sulfato reductoras que se esperaba cultivar. Otra sugerencia que apoya esta teoría es la baja producción de sulfuro en estos tratamientos, la cual va acompañada de la acumulación de acetato (Figura 7.1f y 7.3f); lo anterior indica que se está consumiendo el donador de electrones, pero no mediante la sulfato reducción.

Con los datos de longitud de los fragmentos obtenidos se intentó realizar un análisis *in silico* para comparar el tamaño de los fragmentos con secuencias de interés previamente reportadas, y así encontrar secuencias putativas de BSR que coincidieran con los resultados obtenidos (Bell et al., 2012; Rodríguez et al., 2006); pero no se encontraron resultados congruentes con lo esperado. Es decir, en las muestras provenientes de tratamientos en los cuales se observó sulfato reducción no se encontraron fragmentos relacionados a BSR previamente reportadas (Resultados no presentados).

Esto se puede deber a las limitaciones de la base de datos en la cual se realizó la búsqueda. Para este análisis se empleó la base de datos del Ribosomal Data Base Project (RDP; R10, U27) provista por la herramienta en línea MiCA, la cual contiene 1519357 secuencias del gen 16S rDNA bacteriano, (Shyu et al., 2007). En estudios previos se ha denotado que la clasificación filogenética de las BSR se encuentra particularmente incompleta, y se ha sugerido que muchos de los grupos de BSR que no han sido caracterizados pertenecen a BSR presentes en ambientes extremos (Castro et al., 2000) como los que se esperaría encontrar en este estudio.

## 9. Conclusiones

En este estudio, se evaluó la posibilidad de emplear acetato, lactato, o glicerol como donador de electrones en procesos de sulfato reducción a  $\text{pH} \leq 5$ . El glicerol resultó ser un sustrato adecuado para trabajar en condiciones ácidas en enriquecimientos cultivados mediante presión selectiva, incluso a  $\text{pH}=3$ ; no obstante, su empleo promovió el crecimiento de bacterias sulfato reductoras incompletas, lo que resultó en la acumulación de acetato.

A su vez, el empleo de acetato y el lactato en enriquecimientos por presión selectiva resultó en una inhibición de la sulfato reducción en valores de pH iguales o menores a su  $\text{pK}_a$  (4 para acetato y 3 para lactato).

Por otra parte, los resultados indican que el proceso de aclimatación es adecuado para promover el crecimiento de comunidades sulfato reductoras degradadoras de acetato en condiciones de acidez ( $\text{pH} = 3$ ), cuando se emplea acetato como única fuente de carbono. En este tratamiento se observó una producción de hasta 60% del sulfuro máximo teórico con el consumo de acetato concomitante.

El enriquecimiento de BSR capaces de consumir acetato como única fuente de carbono a  $\text{pH} = 3$  no había sido reportado previamente, y es de gran relevancia; este tipo de consorcios podrían ser empleados en aplicaciones tecnológicas para el tratamiento de efluentes provenientes de la industria minera, aumentando la eficiencia de dichos procesos.

Los resultados de los T-RFLP indican la presencia de OTUs dominantes que parecieran ser característicos para los diferentes donadores de electrones y niveles de acidez. Contrariamente a lo que se esperaba, para todos los donadores de electrones, se observó una riqueza de especies mucho mayor a pH de 3 que en los niveles más altos de pH. Además, se encontraron niveles de riqueza más elevada en los tratamientos cultivados con glicerol como fuente de carbono que en el resto de los tratamientos.

Desafortunadamente fue imposible obtener ADN de los tratamientos de aclimatación, por lo que fue imposible comparar los atributos de las comunidades enriquecidas bajo las diferentes técnicas de cultivo.

Tampoco fue posible realizar un análisis *in silico* de los fragmentos obtenidos, el problema fue que no se encontraron secuencias reportadas de BSR para las longitudes de fragmentos que se encontraron en este estudio, por lo que se desistió en realizar un análisis de esta naturaleza.

## 10. Referencias Bibliográficas

- Abdo, Z., Schüette, U. M. E., Bent, S. J., Williams, C. J., Forney, L. J., y Joyce, P. (2006). Statistical methods for characterizing diversity of microbial communities by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. *Environmental Microbiology*, 8(5), 929-938. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00959.x
- APHA. (1998). Total, fixed and volatile solids in solid and semisolid samples. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. (20a. ed., pp. 2-59).
- Avis, P. G., Dickie, I. A., y Mueller, G. M. (2006). A 'dirty' business: testing the limitations of terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) analysis of soil fungi. *Molecular Ecology*, 15(3), 873-882. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02842.x
- Badano, E. I., Molina-Montenegro, M. A., Quiroz, C., y Cavieres, L. A. (2002). Efectos de la planta en cojín *Oreopolus glacialis* (Rubiaceae) sobre la riqueza y diversidad de especies en una comunidad alto-andina de Chile central. *Revista chilena de historia natural*, 75(4), 757-765. doi:10.4067/S0716-078X2002000400011
- Bell, S. L., Allam, B., McElroy, A., Dove, A., y Taylor, G. T. (2012). Investigation of Epizootic Shell Disease in American Lobsters (*Homarus americanus*) from Long Island Sound: I. Characterization of Associated Microbial Communities. *Journal of Shellfish Research*, 31(2), 473-484. doi:10.2983/035.031.0207
- Castro, H. F., Williams, N. H., y Ogram, A. (2000). Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 31(1), 1-9. doi:10.1111/j.1574-6941.2000.tb00665.x
- Celis, L. B., Gallegos-Garcia, M., Vidriales, G., y Razo-Flores, E. (2013). Rapid start-up of a sulfidogenic biofilm reactor: overcoming low acetate consumption. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88, 1672-1679. doi:10.1002/jctb.4018

- Cord-Ruwisch, R. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 4(1), 33-36. doi:10.1016/0167-7012(85)90005-3
- Culman, S. W., Bukowski, R., Gauch, H. G., Cadillo-Quiroz, H., y Buckley, D. H. (2009). T-REX: software for the processing and analysis of T-RFLP data. *BMC Bioinformatics*, 10, 171. doi:10.1186/1471-2105-10-171
- Dar, S. A., Bijmans, M. F. M., Dinkla, I. J. T., Geurkink, B., Lens, P. N. L., y Dopson, M. (2009). Population dynamics of a single-stage sulfidogenic bioreactor treating synthetic zinc-containing waste streams. *Microbial ecology*, 58(3), 529-537. doi:10.1007/s00248-009-9509-9
- Ferguson, S. J., y Ingledew, W. J. (2008). Energetic problems faced by micro-organisms growing or surviving on parsimonious energy sources and at acidic pH: I. Acidithiobacillus ferrooxidans as a paradigm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777(12), 1471-1479. doi:10.1016/j.bbabi.2008.08.012
- Gabor, E. M., de Vries, E. J., y Janssen, D. B. (2003). Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 44(2), 153–163. doi:10.1016/S0168-6496(02)00462-2
- Gallegos-Garcia, M., Celis, L. B., Rangel-Méndez, R., y Razo-Flores, E. (2009). Precipitation and recovery of metal sulfides from metal containing acidic wastewater in a sulfidogenic down-flow fluidized bed reactor. *Biotechnology and bioengineering*, 102(1), 91-99. doi:10.1002/bit.22049
- Gaston, K. j., Rodrigues, A. s. I., Van Rensburg, B. j., Koleff, P., y Chown, S. I. (2001). Complementary representation and zones of ecological transition. *Ecology Letters*, 4(1), 4-9. doi:10.1046/j.1461-0248.2001.00196.x

- Ghose, T. K., y Wikén, T. (1955). Inhibition of Bacterial Sulphate-Reduction in Presence of Short Chain Fatty Acids. *Physiologia Plantarum*, 8(1), 116-135. doi:10.1111/j.1399-3054.1955.tb08965.x
- Giller, P., y O'Donovan, G. (2002). Biodiversity and Ecosystem Function: Do Species Matter? *Biology & Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*, 102(3), 129-139. doi:10.3318/BIOE.2002.102.3.129
- Giloteaux, L., Duran, R., Casiot, C., Bruneel, O., Elbaz-Poulichet, F., y Goñi-Urriza, M. (2012). Three-year survey of sulfate-reducing bacteria community structure in Carnoulès acid mine drainage (France), highly contaminated by arsenic. *FEMS Microbiology Ecology*, n/a–n/a. doi:10.1111/1574-6941.12028
- Hamilton, W. A. (1998). Sulfate-reducing bacteria: Physiology determines their environmental impact. *Geomicrobiology Journal*, 15(1), 19-28. doi:10.1080/01490459809378059
- Herzprung, P., Friese, K., Frömmichen, R., Göttlicher, J., Koschorreck, M., Jr, W. V. T., y Wendt-Potthoff, K. (2002). Chemical Changes in Sediment Pore-Waters of an Acidic Mining Lake After Addition of Organic Substrate and Lime for Stimulating Lake Remediation. *Water, Air and Soil Pollution: Focus*, 2(3), 123-140. doi:10.1023/A:1019987125589
- Hudson-Edwards, K. A., Jamieson, H. E., y Lottermoser, B. G. (2011). Mine Wastes: Past, Present, Future. *Elements*, 7(6), 375-380. doi:10.2113/gselements.7.6.375
- Huey, R. B., Berrigan, D., Gilchrist, G. W., y Herron, J. C. (1999). Testing the Adaptive Significance of Acclimation: A Strong Inference Approach. *American Zoologist*, 39(2), 323-336. doi:10.1093/icb/39.2.323
- Jameson, E., Rowe, O. F., Hallberg, K. B., y Johnson, D. B. (2010). Sulfidogenesis and selective precipitation of metals at low pH mediated by *Acidithiobacillus* spp. and

- acidophilic sulfate-reducing bacteria. *Hydrometallurgy*, 104(3–4), 488-493.  
doi:10.1016/j.hydromet.2010.03.029
- Jing, Z., Hu, Y., Niu, Q., Liu, Y., Li, Y.-Y., y Wang, X. C. (2013). UASB performance and electron competition between methane-producing archaea and sulfate-reducing bacteria in treating sulfate-rich wastewater containing ethanol and acetate. *Bioresource Technology*, 137, 349-357. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.137
- Johnson, D. B. (1998). Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology*, 27(4), 307–317. doi:10.1111/j.1574-6941.1998.tb00547.x
- Johnson, D. B. (2012). Reductive dissolution of minerals and selective recovery of metals using acidophilic iron- and sulfate-reducing acidophiles. *Hydrometallurgy*, 127–128, 172-177. doi:10.1016/j.hydromet.2012.07.015
- Johnson, D. B., y Hallberg, K. B. (2005). Acid mine drainage remediation options: a review. *Science of The Total Environment*, 338(1–2), 3-14.  
doi:10.1016/j.scitotenv.2004.09.002
- Jong, T., y Parry, D. L. (2006). Microbial sulfate reduction under sequentially acidic conditions in an upflow anaerobic packed bed bioreactor. *Water research*, 40(13), 2561-2571. doi:10.1016/j.watres.2006.05.001
- Jørgensen, B. B. (1982). Ecology of the bacteria of the sulphur cycle with special reference to anoxic-oxic interface environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 298(1093), 543-561.
- Kaksonen, A. H., Plumb, J. J., Franzmann, P. D., y Puhakka, J. A. (2004). Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acidic metal- and sulfate-containing wastewater. *FEMS Microbiology Ecology*, 47(3), 279–289. doi:10.1016/S0168-6496(03)00284-8
- Kato, S., y Watanabe, K. (2010). Ecological and Evolutionary Interactions in Syntrophic Methanogenic Consortia. *Microbes and Environments*, 25(3), 145-151.

- Kimura, S., Hallberg, K. B., y Johnson, D. B. (2006). Sulfidogenesis in Low pH (3.8–4.2) Media by a Mixed Population of Acidophilic Bacteria. *Biodegradation*, 17(2), 57-65. doi:10.1007/s10532-005-3050-4
- Konopka, A. (2009). What is microbial community ecology? *The ISME journal*, 3(11), 1223-1230. doi:10.1038/ismej.2009.88
- Koschorreck, M. (2008). Microbial sulphate reduction at a low pH. *FEMS Microbiology Ecology*, 64(3), 329–342. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00482.x
- Küsel, K., Roth, U., Trinkwalter, T., y Peiffer, S. (2001). Effect of pH on the anaerobic microbial cycling of sulfur in mining-impacted freshwater lake sediments. *Environmental and Experimental Botany*, 46(3), 213-223. doi:10.1016/S0098-8472(01)00103-4
- Laanbroek, H. J., Geerligs, H. J., Sijtsma, L., y Veldkamp, H. (1984). Competition for Sulfate and Ethanol Among *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, and *Desulfovibrio* Species Isolated from Intertidal Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(2), 329-334.
- Lehman, C. L., y Tilman, D. (2000). Biodiversity, Stability, and Productivity in Competitive Communities. *The American Naturalist*, 156(5), 534-552. doi:10.1086/303402
- Lens, P. N., y Kuenen, J. G. (2001). The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 44(8), 57-66.
- Lens, P. N. L., Visser, A., Janssen, A. J. H., Pol, L. W. H., y Lettinga, G. (1998). Biotechnological Treatment of Sulfate-Rich Wastewaters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 28(1), 41-88. doi:10.1080/10643389891254160

- Liamleam, W., y Annachhatre, A. P. (2007). Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnology advances*, 25(5), 452-463. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.05.002
- LlobetBrossa, E., Rabus, R., Bttcher, M. E., Kneke, M., Finke, N., Schramm, A., Meyer, R. L., et al. (2002). Community structure and activity of sulfate-reducing bacteria in an intertidal surface sediment: a multi-method approach. *Aquatic Microbial Ecology*, 29(3), 211-226. doi:10.3354/ame029211
- Lozupone, C. A., y Knight, R. (2008). Species Divergence and the Measurement of Microbial Diversity. *FEMS microbiology reviews*, 32(4), 557-578. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00111.x
- Meier, J., Piva, A., y Fortin, D. (2012). Enrichment of sulfate-reducing bacteria and resulting mineral formation in media mimicking pore water metal ion concentrations and pH conditions of acidic pit lakes. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(1), 69–84. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01199.x
- Montoya, L., Celis, L. B., Gallegos-García, M., Razo-Flores, E., y Alpuche-Solís, Á. G. (2013). Consortium diversity of a sulfate-reducing biofilm developed at acidic pH influent conditions in a down-flow fluidized bed reactor. *Engineering in Life Sciences*, 13(3), 302–311. doi:10.1002/elsc.201200047
- Mulder, C. P. H., Uliassi, D. D., y Doak, D. F. (2001). Physical stress and diversity-productivity relationships: The role of positive interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), 6704-6708. doi:10.1073/pnas.111055298
- Muyzer, G., Waal, E. C. de, y Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695-700.

- Nordstrom, D. K., Alpers, C. N., Ptacek, C. J., y Blowes, D. W. (2000). Negative pH and Extremely Acidic Mine Waters from Iron Mountain, California. *Environmental Science & Technology*, 34(2), 254-258. doi:10.1021/es990646v
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R., y Stahl, D. A. (1986). Microbial Ecology and Evolution: A Ribosomal RNA Approach. *Annual Review of Microbiology*, 40(1), 337-365. doi:10.1146/annurev.mi.40.100186.002005
- Osborn, A. M., Moore, E. R. B., y Timmis, K. N. (2000). An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2(1), 39–50. doi:10.1046/j.1462-2920.2000.00081.x
- Oude Elferink, S. J. W. H., Visser, A., Hulshoff Pol, L. W., y Stams, A. J. M. (1994). Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiology Reviews*, 15(2-3), 119–136. doi:10.1111/j.1574-6976.1994.tb00130.x
- Plugge, C. M., Zhang, W., Scholten, J. C. M., y Stams, A. J. M. (2011). Metabolic Flexibility of Sulfate-Reducing Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 2. doi:10.3389/fmicb.2011.00081
- Prosser, J. I., Bohannon, B. J. M., Curtis, T. P., Ellis, R. J., Firestone, M. K., Freckleton, R. P., Green, J. L., et al. (2007). The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology*, 5(5), 384-392. doi:10.1038/nrmicro1643
- Qatibi, A.-I., Bories, A., y Garcia, D. J.-L. (1991). Sulfate reduction and anaerobic glycerol degradation by a mixed microbial culture. *Current Microbiology*, 22(1), 47-52. doi:10.1007/BF02106212
- Rabus, R., Hansen, T. A., y Widdel, F. (2006). Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. En M. D. P. Dr, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, y E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 659-768). Springer New York.

Recuperado a partir de [http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/0-387-30742-7\\_22](http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/0-387-30742-7_22)

- Rittmann, B. E., Hausner, M., Löffler, F., Love, N. G., Muyzer, G., Okabe, S., Oerther, D. B., et al. (2006). A vista for microbial ecology and environmental biotechnology. *Environmental science & technology*, 40(4), 1096-1103.
- Rittmann, B. E., y McCarty, P. L. (2001). *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. (p. pp 135-7). McGraw-Hill.
- Rodríguez, C., Lang, L., Wang, A., Altendorf, K., García, F., y Lipski, A. (2006). Lettuce for Human Consumption Collected in Costa Rica Contains Complex Communities of Culturable Oxytetracycline- and Gentamicin-Resistant Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5870-5876. doi:10.1128/AEM.00963-06
- Röling, W. F., Ferrer, M., y Golyshin, P. N. (2010). Systems approaches to microbial communities and their functioning. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(4), 532-538. doi:10.1016/j.copbio.2010.06.007
- Sánchez-Andrea, I., Rodríguez, N., Amils, R., y Sanz, J. L. (2011). Microbial Diversity in Anaerobic Sediments at Río Tinto, a Naturally Acidic Environment with a High Heavy Metal Content. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6085-6093. doi:10.1128/AEM.00654-11
- Sánchez-Andrea, I., Stams, A. J. M., Amils, R., y Sanz, J. L. (2013). Enrichment and isolation of acidophilic sulfate-reducing bacteria from Tinto River sediments. *Environmental Microbiology Reports*, n/a–n/a. doi:10.1111/1758-2229.12066
- Sen, A. M., y Johnson, B. (1999). Acidophilic sulphate-reducing bacteria: candidates for bioremediation of acid mine drainage. En R. Amils and A. Ballester (Ed.), *Process Metallurgy, Biohydrometallurgy and the Environment Toward the Mining of the 21st Century - Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium* (Vol.

- Volume 9, pp. 709-718). Elsevier. Recuperado a partir de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S157244099980073X>
- Shyu, C., Soule, T., Bent, S. J., Foster, J. A., y Forney, L. J. (2007). MiCA: A Web-Based Tool for the Analysis of Microbial Communities Based on Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphisms of 16S and 18S rRNA Genes. *Microbial Ecology*, 53(4), 562-570. doi:10.1007/s00248-006-9106-0
- Smith, B., y Wilson, J. B. (1996). A Consumer's Guide to Evenness Indices. *Oikos*, 76(1), 70. doi:10.2307/3545749
- Smith, C. J., Danilowicz, B. S., Clear, A. K., Costello, F. J., Wilson, B., y Meijer, W. G. (2005). T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. *FEMS microbiology ecology*, 54(3), 375-380. doi:10.1016/j.femsec.2005.05.002
- Soga, T., y Ross, G. A. (1999). Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 837(1-2), 231-239. doi:10.1016/S0021-9673(99)00092-8
- Stams, A. J. M., Dijk, J. B. V., Dijkema, C., y Plugge, C. M. (1993). Growth of Syntrophic Propionate-Oxidizing Bacteria with Fumarate in the Absence of Methanogenic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), 1114-1119.
- Stirling, G., y Wilsey, B. (2001). Empirical Relationships between Species Richness, Evenness, and Proportional Diversity. *The American Naturalist*, 158(3), 286-299. doi:10.1086/321317
- Tchobanoglous, G., Burton, F. L., y Stensel, H. D. (2003). *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. McGraw-Hill Education.
- Tuomisto, H. (2012). An updated consumer's guide to evenness and related indices. *Oikos*, 121(8), 1203-1218. doi:10.1111/j.1600-0706.2011.19897.x

- Tyson, G. W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardson, P. M., Solovyev, V. V., et al. (2004). Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, *428*(6978), 37-43. doi:10.1038/nature02340
- USEPA. (2001). National Management Measures Guidance to Control Nonpoint Source Pollution from Marinas and Recreational Boating. United States Environmental Protection Agency, Office of Water.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., y Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, *173*(2), 697-703.
- Wilson, R. S., y Franklin, C. E. (2002). Testing the beneficial acclimation hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution*, *17*(2), 66-70. doi:10.1016/S0169-5347(01)02384-9
- Zarraonaindia, I., Smith, D. P., y Gilbert, J. A. (2013). Beyond the genome: community-level analysis of the microbial world. *Biology & Philosophy*, *28*(2), 261-282. doi:10.1007/s10539-012-9357-8

## Anexo I Características Físicoquímicas del Drenaje Ácido de Mina

En las Figuras Al.1 y Al.2 se muestran dos características de gran relevancia en el tratamiento del Drenaje Ácido de Mina: la concentración de metales y de sulfato (The International Network for Acid Prevention (INAP), 2009. Global Acid Rock Drainage Guide (GARD Guide).<http://www.gardguide.com>). Ambas características están estrechamente relacionadas con el pH, debido a diferentes fenómenos físicoquímicos. Se puede observar que el pH puede llegar a tomar valores negativos cuando las concentraciones de estos compuestos son muy elevadas.

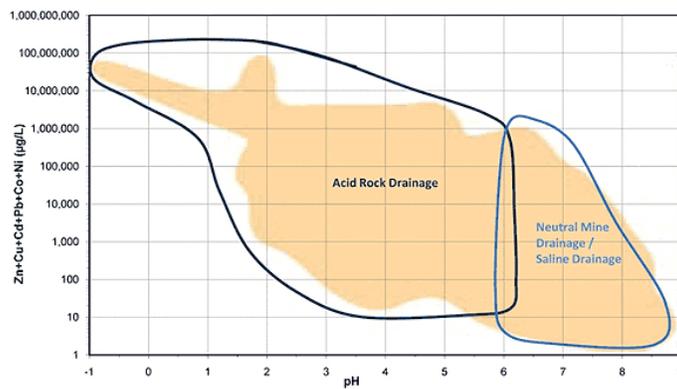


Figura Al.1. Concentraciones típicas de metales en el drenaje ácido de mina (en este caso se le denomina Acid Rock Drainage) a diferentes niveles de acidez.

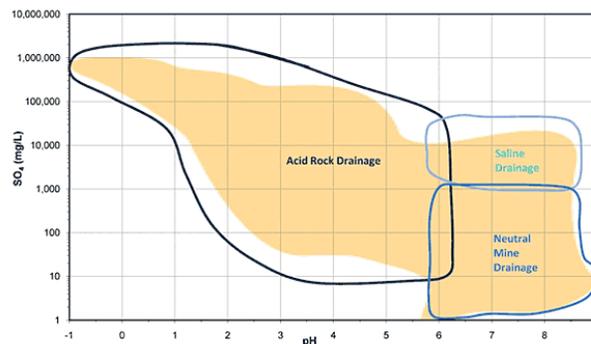


Figura Al.2 Concentraciones típicas de sulfato en el drenaje ácido de mina (en este caso se le denomina Acid Rock Drainage) a diferentes niveles de acidez.

## Anexo II Métodos de extracción de DNA

Cada uno de los métodos evaluados de extracción de ADN empleados en este protocolo involucra diversos procesos. En la Tabla AIII.1 se enumeran y comparan los procesos más importantes de cada método.

Tabla AIII.1. Procesos más importantes de las extracciones realizadas mediante el método de lisis suave propuesto por Gabor et al. 2003, y el kit comercial Power Soil DNA Isolation Kit.

	Gabor et al., 2003	Power Soil DNA Isolation Kit
Lisis mecánica	No	Si
Lisis química	Si	Si
Lisis enzimática	Si	No
Extracción	Cloroformo-Isopropanol	Columnas

De los métodos de extracción reportados por Gabor et al. (2003), se empleó el método indirecto de lisis suave, el cual no incluye lisis mecánica.

Debido a que el fabricante no es explícito en el contenido de las soluciones empleadas en el procedimiento, se recurrió a la información presente en el protocolo del kit para determinar el tipo de lisis empleada.