



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

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**Enriquecimiento y cultivo de un consorcio sulfato-reductor  
acidotolerante con capacidad de consumir acetato**

Que presenta

**Nohemi Graciela Campos Quevedo**

Para obtener el grado de

**Maestría en Ciencias Ambientales**

Directora de la Tesis:

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García

San Luis Potosí, S.L.P., noviembre 2015



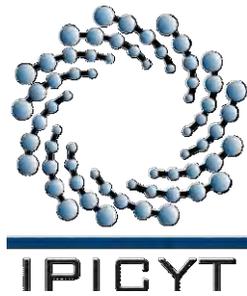
## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis **“Enriquecimiento y cultivo de un consorcio sulfato-reductor ácido-tolerante con capacidad de consumir acetato”** presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Nohemí Graciela Campos Quevedo** y aprobada el **veinte de noviembre del dos mil quince** 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

**Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano**  
Miembro del Comité Tutorial

**Dr. Alejandro López Cortés**  
Miembro del Comité Tutorial



### **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 la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-296784).

Este trabajo de investigación fue financiado por el proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACYT-181809 “Comunidades sulfato-reductoras 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 027 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 20 días del mes de noviembre del año 2015, se reunió a las 11:50 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano</b>	<b>Presidenta</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. María de Lourdes Berenice Celis García</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>

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

**MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó la C.

**Nohemí Graciela Campos Quevedo**

sobre la Tesis intitulada:

*Enriquecimiento y cultivo de un consorcio sulfato-reductor ácido-tolerante con capacidad de consumir acetato*

que se desarrolló bajo la dirección de

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

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 13:35 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 20 días del mes de noviembre de 2015.

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

**Dr. Marcial Benito Marín**  
Secretario Académico

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

A mis papás que han sido mi motor..

“Love what you do and do what you love. Don't listen to anyone else who tells you not to do it. You do what you want, what you love. Imagination should be the center of your life.”

— Ray Bradbury

## **Agradecimientos**

Quisiera agradecer a la Dra. Berenice Celis, primero por darme la oportunidad de trabajar en un proyecto que presentó muchos retos pero a su vez brindó muchas satisfacciones. También le agradezco la confianza y el tiempo que me dedicó para poder sacar adelante este trabajo. Agradezco a la Dra. Esmeralda López que me ayudó a analizar las secuencias y a caracterizar las comunidades, por sus comentarios acertados y por el tiempo brindado, muchas gracias. Al Dr. Alejandro López quien realizó comentarios muy atinados que enriquecieron el trabajo.

De una manera muy especial quisiera agradecer a la M. en C. Elizabeth Cortés Cedillo quien fue una persona muy importante en este proyecto, ya que me ayudó con las técnicas moleculares, desde la extracción de DNA hasta el proceso de secuenciación.

Asimismo, quisiera agradecer a la Dra. Angélica Aguilar Aguilar y al M. en C. Guillermo Vidriales Escobar por su apoyo técnico.

También agradezco a cada uno de mis compañeros de la maestría, Frank, Erik, Neto, Charlie, Rene, Gaby, Erika, Clau, Edgardo, Ángel, Víctor, Miriam, Yare, Ara, Dalia, Irma, Edith y Laura, que al final del día se convirtieron en amigos y espero conservar su amistad por muchos años, pues me es muy grata y enriquecedora.

Quisiera agradecer a las personas que se ganaron mi amistad, respeto y admiración cada uno de ellos hizo mi estancia mas agradable en el IPICYT: Lalo, Auris, Lupita, Charlie, Ale, Ale C., Dani, Esme, Karen, Deny, Itzel, Lalo, Gerardo.... (espero no haber olvidado a ninguno).

De igual forma quisiera agradecer a las personas que de una forma u otra fueron particularmente especiales al realizar este proyecto que son: Tona muchas gracias por la paciencia y los consejos. Sobretudo gracias por la amistad, espero que dure mucho años puesto que la considero muy valiosa y los momentos a tu

lado los considero únicos e invaluable, gracias por hacer este viaje mas placentero. Liz (“mamá”) gracias por tu paciencia y amistad, sin ti “mamá” no hubiera sido posible realizar este trabajo. Gracias por salvarme de tantas que yo ya ni recuerdo cuantas veces, gracias de corazón.

Agradezco a mis papás y a mi hermano la confianza brindada y el gran apoyo que representaron para poder realizar este trabajo. Gracias por entender las desveladas y las largas jornadas. Gracias por creer en mi y entender que lo que hago es lo mejor para mi. A Mami Grande que siempre ha sido mi amiga gracias por siempre estar ahí y por darme todo el apoyo, la quiero mami.

**Campos Quevedo, Nohemi Graciela (2015). “Enriquecimiento y cultivo de un consorcio sulfato-reductor ácido-tolerante con capacidad de consumir acetato” Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. San Luis Potosí, S.L.P., México.**

## **Resumen**

El drenaje ácido de mina (DAM) es una corriente generada del intemperismo de residuos mineros y causa varios problemas ambientales, ya que presenta altas concentraciones de sulfato disuelto (g/L), bajo pH (<4), además de contener metales disueltos. Se ha tratado de remediar por diferentes técnicas tanto fisicoquímicas como biológicas. Las técnicas fisicoquímicas presentan algunas desventajas entre el alto costo y el manejo de residuos. En contraste, los métodos biológicos basados en la actividad de las bacterias sulfato-reductoras (BSR) representan una alternativa viable. Las BSR han sido utilizadas en bio-reactores para remediar el DAM debido a su capacidad de reducir el sulfato a sulfuro y el sulfuro al interaccionar con metales forma sulfuros metálicos que precipitan, lo que permite su recuperación. Adicionalmente el proceso biológico aumenta el pH del medio como consecuencia de la producción de bicarbonato. Existen BSR que pueden degradar por completo los sustratos, hasta CO<sub>2</sub>, siendo esto una importante ventaja sobre aquellas BSR que solo degradan el sustrato hasta acetato, ya que el acetato a pH < 4 puede llegar a ser tóxico e inhibitorio ya que actúa como desacoplador de membrana inhibiendo así la respiración celular.

En este trabajo se propone obtener enriquecimientos formados por comunidades sulfato-reductoras provenientes de un ambiente naturalmente ácido con altas concentraciones de sulfato, se busca que dichas comunidades sean capaces de consumir acetato a pH bajo mediante el proceso de sulfato-reducción. Mediante técnicas microbiológicas tradicionales (cultivos sucesivos) para su posterior caracterización molecular.

Se emplearon dos grupos de comunidades enriquecidas previamente por más de 365 días, el pH inicial del grupo 1 fue de 4 y el del grupo 2 era de 3, en ambos grupos se utilizaron 3 diferentes donadores de electrones: glicerol, lactato, o acetato. Se evaluaron diferentes aproximaciones de cultivo para poder obtener los consorcios sulfato-reductores, una fue inocular con sobrenadante líquido de las botellas (20%) o bien con una suspensión formada por el sedimento y el líquido (10 ó 20%). En los cultivos se evaluó cada 5 días la producción de sulfuro, densidad óptica, pH y consumo de sustrato. Se realizaron 5 transferencias sucesivas de los cultivos. A partir de la quinta transferencia se realizaron ensayos por triplicado para corroborar que los cultivos producían sulfuro y consumían acetato. También se intentó encontrar el pH favorable para realizar la actividad sulfato-reductora de los consorcios, asimismo se llevó a cabo la caracterización molecular de las comunidades.

De las 177 botellas de enriquecimientos iniciales sólo se logró obtener 7 consorcios resultaron cultivables hasta la transferencia 5, se obtuvieron 3 consorcios alimentados con lactato usando 20% de suspensión como inóculo y pH inicial de 4; otros 3 consorcios fueron alimentados con lactato con 20% de suspensión y pH inicial de 3; solo se recuperó 1 consorcio alimentado con glicerol y 10% de suspensión a pH inicial de 3. No fue posible recuperar ningún consorcio usando acetato como sustrato. A partir de éstos se intento obtener el pH favorable para realizar actividad sulfato-reductora de cada consorcio el cual mostró que los consorcios son potencialmente acidofílicos. Los ensayos por triplicado mostraron que era reproducible la actividad sulfato-reductora y la caracterización molecular arrojó varios géneros (*Clostridium*, *Spirochetas*, *Desulfovibrio*, *Desulfotomacolum*...) de microorganismos los cuales ya se habían descrito con actividad sulfato-reductora en ambientes ácidos.

Con este trabajo se pudo observar que hubo una disminución en los tiempos de consumo de sustrato (glicerol o lactato), así como la producción de sulfuro que estuvo asociada a este. Tomar como inóculo suspensión al 20% resultó ser más adecuado para obtener un consorcio sulfato-reductor. También se pudo conocer que el utilizar lactato o glicerol como donadores de electrones promovió la obtención de consorcios sulfato-reductores consumidores de acetato a pH ácido. Se logró caracterizar los diferentes consorcios por técnicas moleculares y así conocer su diversidad.

**Campos Quevedo, Nohemi Graciela (2015) "Enrichment and culture of an acid tolerant sulfate-reducing consortium with the ability to consume completely acetate. Master in Sciences Thesis. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. San Luis Potosi, S.L.P. México.**

### **Summary**

Acid mine drainage (AMD) a current generated by the intemperism of mining residues represents several environmental problems due to the high concentrations of dissolved sulfate (g / L), low pH (<4) and the content of dissolved metals. A possible solution to these problems has been proposed using either physicochemical or biological techniques. The physicochemical techniques have some disadvantages the most important is the high cost and waste management. In contrast we have biological methods, which are based on the activity of certain groups of microorganisms that generate alkalinity. Among these we highlight the sulfate-reducing bacteria (SRB), which have been used in bioreactors to solve the AMD due to its ability to reduce sulfate to sulfide, and the sulfur can interact with metals to form metallic sulphides. Furthermore generated  $\text{HCO}_3$  increases the pH of the environment. And it has been described that SRB can degrade substrates completely, this being a major advantage as the acetate at pH <4 can be toxic and inhibitory because it acts as decoupling membrane and cellular respiration is not possible. The aim of this work was to obtain culturable community enrichments of sulfate-reducing microorganisms retrieved from a naturally acidic environment with high concentrations of sulfate. And the possibility that these communities are able to consume acetate at low pH by sulfate reduction process. This will be possible by microbiological techniques (transfers) for further molecular characterization.

Two groups of communities enriched for more than 365 days were used, the main difference between these groups was the initial pH of each one (Group 1 initial pH 4 and Group 2 initial pH of 3). In both groups 3 different donors were used electron were glycerol, lactate and acetate. Different cultivation techniques were tested to obtain sulfate-reducing consortium, supernatant (20%) or slurry (10 or 20%). The evaluated parameters were sulfide production, OD, pH and substrate consumption these parameters were measured every 5 days. Five transfers were made to observe the evaluated parameters. From the fifth transfer tests were conducted to obtain favorable pH, and the triplicates to discard artifacts and molecular assays to characterize the microbial community. At the end of this work 177 bottles were used for 7 consortia: 3 bottles were fed lactate with 20% slurry at initial pH of 4, 3 bottles that were fed with lactate with 20% slurry at initial pH of 3 and 1 bottle which was fed with 10% glycerol slurry to initial pH of 3. From these consortiums the favorable pH was attempted, which showed that the consortiums were potentially acidophilic. Triplicate assays showed that the sulfate-reducing activity was reproducible and molecular characterization throw various genres (*Clostridium*, *Spirochetas*, *Desulfovibrio*, *Desulfotomacolum* ...) of microorganisms which had already been described with sulfate-reducing activity in acidic environments.

With this work, it was observed that there was a decrease in the time of substrate consumption (glycerol or lactate) and sulfide production that was associated with it. To take as inoculum slurry to 20% proved to be the most suitable inoculum for a sulfate-reducing consortium. It was also found that the use of lactate or glycerol as electron donors promoted a sulfate-reducing consortium that consumed acetate at acidic pH. It was possible to characterize the different consortia by molecular techniques and to know their diversity.

## Contenido

1	Introducción	1
1.1	El azufre y su relevancia en el ciclo biogeoquímico	1
1.2	Drenaje ácido de mina (DAM)	3
1.3	Técnicas de remediación del drenaje ácido de mina	4
1.4	Bacterias sulfato-reductoras (BSR)	6
1.4.1	Generalidades	6
1.4.2	Sustratos	8
1.4.3	pH	13
1.5	Hábitats de bacterias sulfato-reductoras acidotolerantes	14
1.6	Ambientes donde se pueden encontrar BSR	15
1.7	Filogenia de las BSR	15
1.8	Asociaciones de BSR y su relevancia.	17
1.9	Técnicas de cultivo y moleculares para recuperar microorganismos de ambientes naturales	21
1.10	Descripción de las aproximaciones de cultivo	22
1.11	Aproximaciones moleculares	24
1.12	Aproximaciones de cultivo	25
2.	Justificación, hipótesis y objetivos	27
2.1	Justificación	27
2.2	Hipótesis	28
2.3	Objetivos	28
2.3.1	Objetivos específicos	28
3.	Materiales y Métodos	29
3.1	Enriquecimientos iniciales	29
3.2	Medio de cultivo	29
3.3	Cultivo de los consorcios	30
3.4	Transferencias sucesivas	31
3.5	Enriquecimiento y cultivos sucesivos	32
3.6	Adición de medio para comprobación de actividad sulfato-reductora	35
3.7	Confirmación de la actividad sulfato-reductora (triplicados)	35
3.8	Determinación de pH favorable para realizar actividad sulfato-reductora en los consorcios obtenidos	35
3.9	Determinación de velocidades máximas de producción de sulfuro y consumo de sustrato	36
3.10	Caracterización Molecular de los consorcios sulfato-reductores.	36
3.10.1	Extracción de DNA	37
3.10.2	PCR	37
3.10.3	Clonación	38
3.10.4	Secuenciación	39
3.11	Análisis	39
3.11.1	Sulfuro disuelto	39
3.11.2.	Ácidos grasos volátiles y sulfato	39
3.11.3.	pH	40
3.11.4.	Densidad óptica	40
4.	Resultados y Discusión	41
4.1	Enriquecimientos usando suspensión o medio líquido (sobrenadante) como inóculo	41

4.2 Transferencias sucesivas de los enriquecimientos	44
4.3 Consumo de acetato	46
4.4 Comparación del desempeño entre las transferencias 1 y 5	49
4.5 Comprobación de la actividad sulfato-reductora	52
4.6 Perfiles cinéticos de los consorcios finales	53
4.7 Determinación del pH favorable para realizar actividad sulfato reductora	56
4.8 Amplificación del gen 16s rRNA por PCR	62
4.9 Análisis bioinformático de los consorcios a nivel Phylum.	66
4.10 Análisis bioinformático de los consorcios a nivel de género	69
5. Conclusiones	73
6. Perspectivas	75
Bibliografía	76
Anexos	83

## Índice tablas

<b>Tabla 1.1</b> Estequiometría y energía libre de Gibbs para la conversión biológica del azufre.	2
<b>Tabla 1.2</b> Diferentes sustratos consumidos por BSR, rendimientos e inóculos	10
<b>Tabla 1.3</b> Ejemplos de consorcios sulfato-reductores y aplicación.	20
<b>Tabla 3.1</b> Enriquecimientos iniciales cultivados con acetato, lactato o glicerol en medio mínimo anaerobio.	29
<b>Tabla 3.2</b> Oligos utilizados para recuperar el gen 16s rRNA de bacterias y su secuencia.	38
<b>Tabla 4.1</b> Nomenclatura del consorcio obtenido en la transferencia 5, sustrato y tratamiento aplicado para obtenerlo.	49
<b>Tabla 4.2</b> Velocidades de los consorcios obtenidos, producción de sulfuro y fase lag.	50
<b>Tabla 4.3</b> Velocidades de producción de sulfuro y de consumo de acetato en los ensayos por triplicado de cada uno de los consorcios ( $\pm$ desviación estándar).	55
<b>Tabla 4.4</b> Porcentaje de sustrato utilizado para realizar sulfato-reducción de los consorcios obtenidos.	56
<b>Tabla 4.5</b> Número de clones obtenido y su identificación para cada uno de los consorcios.	63

## Índice Figuras

<b>Figura 1.1</b> Diagrama que ilustra los distintos tipos de cultivo que podrían obtenerse a partir de una muestra ambiental.	23
<b>Figura 3.1</b> Ilustración de las diferentes partes de los enriquecimientos que se usaron como inóculo.	30
<b>Figura 3.2</b> Diagrama que resume la estrategia de cultivo que se usó para los enriquecimientos.	32
<b>Figura 3.3</b> Cronograma del Grupo 1, pH inicial de 4, inoculado con 20% de suspensión.	33
<b>Figura 3.4</b> Cronograma del Grupo 2, pH inicial de 3, inoculado con 20% de suspensión.	34
<b>Figura 3.5</b> Cronograma del Grupo 2, pH inicial de 3, inoculado con 10% de sobrenadante.	34
<b>Figura 3.6</b> Diagrama general de la caracterización molecular.	37
<b>Figura 4.1</b> Perfiles de producción de sulfuro (cuadrado), consumo de sustrato lactato (círculo) y pH (triángulo). A) botella inoculada con 20% de suspensión. B) botella inoculada 20% de sobrenadante. Los datos corresponden a la transferencia 1.	42
<b>Figura 4.2</b> Perfiles de producción de sulfuro (cuadrado), consumo de sustrato acetato (círculo) y aumento de pH (triángulo). Botella inoculada con 10% de suspensión, donador de electrones glicerol. Los datos corresponden a la transferencia 1.	44
<b>Figura 4.3</b> Perfiles del Consorcio 1. A) producción de sulfuro; B) pH; C) consumo de lactato y D) consumo de acetato. Cada serie representa una transferencia distinta. Triángulo: transferencia 1, círculo: transferencia 2, cuadrado: transferencia 3, rombo: transferencia 4 y triángulo invertido: transferencia 5	46
<b>Figura 4.4</b> Perfiles de concentración de acetato (círculo) y de evolución del pH (triángulo) de tres distintos enriquecimientos. A) Enriquecimiento alimentado con glicerol. B) y C) Enriquecimientos alimentados con lactato. Todos los perfiles que se presentan tienen un origen distinto y corresponden a la transferencia 3. El acetato que se muestra es producto de la oxidación incompleta del glicerol o lactato.	48
<b>Figura 4.5</b> Perfiles de las distintas transferencias después de la reposición del medio para comprobar la actividad sulfato-reductora. A) producción de sulfuro; B) pH; C) consumo de lactato; D) concentración de acetato. Cada serie representa un cultivo distinto. Triángulo: transferencia 1, círculo: transferencia 2, cuadrado: transferencia 3 y rombo: transferencia 4. Los datos corresponden al Consorcio 1.	53

<b>Figura 4.6</b> Perfiles por triplicado. A) producción de sulfuro (cuadro); B) concentración de sustrato lactato (círculo relleno) y acetato (círculo sin relleno), C) pH (triángulo) y D) densidad óptica (rombo). Los datos corresponden al Consorcio 1 alimentado con lactato.	54
<b>Figura 4.7.</b> Tasa de producción de sulfuro (cuadrado) y densidad óptica (círculo) con respecto al pH inicial de los ensayos. A) y B) Consorcio 1; C) y D) Consorcio 2; E) y F) Consorcio 3.	58
<b>Figura 4.8.</b> Tasa de producción de sulfuro (cuadrado) y densidad óptica (círculo) con respecto al pH inicial de los ensayos. A) y B) Consorcio 4; C) y D) Consorcio 5; E) y F) Consorcio 6.	60
<b>Figura 4.9.</b> Tasa de producción de sulfuro (cuadrado) y densidad óptica (círculo) con respecto al pH inicial de los ensayos. A) y B) Consorcio 7.	62
<b>Figura 4.10</b> Gel de calidad de los productos de PCR.	63
<b>Figura 4.11</b> Bandas correspondientes a las clonas 1-39, obtenidas a partir del DNA plasmídico.	64
<b>Figura 4.12</b> Bandas correspondientes a las clonas 40-76, obtenidas a partir del DNA plasmídico.	65
<b>Figura 4.13</b> Bandas correspondientes a las clonas 77-122, obtenidas a partir del DNA plasmídico.	65
<b>Figura 4.14</b> Composición de la comunidad bacteriana de los diferentes consorcios obtenida mediante PCR-clonación de 1465 pb del gen 16S rRNA.	68
<b>Figura 4.15</b> Curva de rarefacción de las clonas obtenidas para el consorcio1.	68

## Índice Anexos

<b>Anexo 1.</b> Perfiles de los consorcios obtenidos a lo largo de las 5 transferencias	83
<b>Anexo 2.</b> Perfiles de consumo de sustrato, producción de sulfuro e incremento de pH, transferencias 1 y 5	89
<b>Anexo 3.</b> Perfiles de consumo de sustrato, producción de sulfuro e incremento de pH, de la reposición de medio	92
<b>Anexo 4.</b> Triplicados consorcios sulfato-reductores	98
<b>Anexo 5.</b> Taxa clonas secuenciadas	104
<b>Anexo 6.-</b> Porcentaje de secuencia obtenidas por cada consorcio de cada Phylum	112
<b>Anexo 7.-</b> Porcentajes de similitud obtenidos con base de datos NCBI	112
<b>Anexo 8</b> Secuencias completas de aquellas que pudieron ser identificadas	116
<b>Anexo 9</b> Curvas de rarefacción	118

## 1 Introducción

### 1.1 El azufre y su relevancia en el ciclo biogeoquímico

El azufre es uno de los elementos más abundantes en la tierra. Los reservorios mas grandes se encuentran en rocas en forma de sulfuros de hierro, pirita y yeso, pero también se encuentra en forma de sulfato en el agua de mar (Sánchez-Andrea et al., 2004). A su vez, se puede encontrar en diferentes formas minerales como: Marcasita ( $\text{FeS}_2$ ), Calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), Calcocita ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ), Esfalerita ( $\text{ZnS}$ ), Galena ( $\text{PbS}$ ), Millerita ( $\text{NiS}$ ) y Arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ) (Muyzer y Stams, 2008).

El azufre se encuentra también en diferentes estados de oxidación, desde su estado más reducido (-2, en el sulfuro) hasta su estado más oxidado (+6, en el sulfato) y en diferentes formas como son: sulfuro ( $\text{H}_2\text{S}$ ), azufre elemental ( $\text{S}^0$ ), sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ), entre otros. La transformación del azufre puede ocurrir tanto por reacciones químicas como biológicas:

- Transformación química del azufre: se refiere a procesos redox atmosféricos y terrestres. El sulfato generalmente es el producto final de la oxidación de compuestos orgánicos, que se puede acumular en minerales en el océano. Fuentes que emiten azufre directamente a la atmósfera como son: erupciones volcánicas o la evaporación del agua, o bien antropogénicas como puede ser la actividad minera (Muyzer y Stams, 2008).
- Transformación biológica del azufre: los microorganismos forman parte esencial del ciclo del azufre, ya que realizan tanto la oxidación como reducción de compuestos que contienen azufre. El azufre puede participar en reacciones asimilativas (en las que el azufre pasa a formar parte del material celular) o no-asimilativas (el azufre se usa como aceptor final de electrones), como en el caso de la sulfato-reducción (Sánchez-Andrea et al., 2014; Sousa et al., 2014; Worm et al., 2013). Las reacciones

biológicas que modifican los estados de oxidación del azufre, dentro del ciclo biogeoquímico, se resumen en la Tabla 1.1.

**Tabla 1.1** Estequiometría y energía libre de Gibbs para la conversión biológica del azufre. (Sánchez-Andrea et al., 2014).

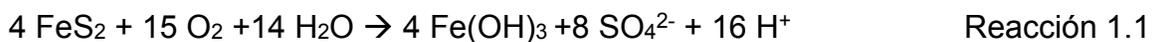
Reacciones	$\Delta G^\circ$ kJ/mol
<b>Oxidación de sulfuro</b>	
$\text{HS}^- + 3/2 \text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{S}^0 + \text{H}_2\text{O}$	-210
$\text{HS}^- + 2 \text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+$	-709
$\text{HS}^- + \text{Fe}_3^+ \rightarrow \text{S}^0 + \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+$	-47
$\text{HS}^- + 2/5 \text{NO}_3^- \rightarrow 1/5 \text{N}_2 + 6/5 \text{H}_2\text{O}$	-214
<b>Oxidación de azufre elemental</b>	
$\text{S}^0 + 3/2 \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 2 \text{H}^+$	-490
$\text{S}^0 + 6/5 \text{NO}_3^- + 2/5 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 3/5 \text{N}_2 + 4/5 \text{H}^+$	-510
<b>Dismutación</b>	
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{HS}^- + \text{H}^+$	-22
$\text{S}^0 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 1/4 \text{SO}_4^{2-} + 3/4 \text{HS}^- + 5/4 \text{H}^+$	9.5
$\text{SO}_3^{2-} + 2/3 \text{H}^+ \rightarrow 2/3 \text{SO}_4^{2-} + 1/3 \text{S}^0 + 1/3 \text{H}_2\text{O}$	-7.6
<b>Sulfato-reducción</b>	
$^a\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2 \text{HCO}_3^- + \text{HS}^-$	-48
$4 \text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4 \text{H}_2\text{O}$	-151.9
<b>Reducción del Azufre</b>	
$1/4 ^a\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} + \text{S}^0 \rightarrow 1/2 \text{HCO}_3^- + 5/4 \text{H}^+ + \text{HS}^-$	-13
$\text{H}_2 + \text{S}^0 \rightarrow \text{HS}^- + \text{H}^+$	-27.8
<sup>a</sup> El acetato fue utilizado como compuesto orgánico representativo, pero otros compuestos orgánicos también pueden ser utilizados.	

## 1.2 Drenaje ácido de mina (DAM)

Algunas de las transformaciones del azufre, tanto químicas como biológicas, pueden provocar la acidificación de los residuos generados a partir de la explotación de minerales por la industria minera, ya que se exponen grandes cantidades de minerales sulfurosos al intemperismo lo que resulta en la oxidación de fierro y de azufre, desencadenando una serie de reacciones químicas que dan lugar a la formación del drenaje ácido de mina. (Kaksonen et al., 2004; Lomert y Johnson, 2001; Church et al., 2007; Papirio et al., 2007; Kimura et al., 2005).

El proceso de generación de DAM es ampliamente conocido y ocurre mediante la combinación de procesos químicos y biológicos, en los cuales los sulfuros metálicos son convertidos a sulfatos e hidróxidos de metales cuando se exponen al agua y al oxígeno a condiciones de pH ácido (Neculita y Zagury, 2007; Papirio et al., 2007; Sánchez-Andrea et al., 2007).

La pirita ( $\text{FeS}_2$ ), el mineral de sulfuro más abundante en la corteza terrestre y puede servir como ejemplo para demostrar la formación de DAM (Sánchez-Andrea et al., 2007).



En la Reacción 1.1, podemos observar que la pirita es oxidada por la acción del oxígeno y el agua provenientes del intemperismo. El fierro se compleja y se libera sulfato en grandes concentraciones que pueden ser de g/L, además se observa que se libera una gran cantidad de protones. Estos protones hacen que el pH disminuya progresivamente resultando en la movilización de metales al DAM logrando un  $\text{pH} < 4.0$  (Johnson y Hallberg, 2005; Papirio et al., 2007). Las actividades mineras son conocidas por incrementar dramáticamente las tasas de oxidación de fierro ya que exponen grandes cantidades de material pirítico al intemperismo (Zagury y Neculita, 2007; Sánchez-Andrea et al., 2007).

La mineralogía principalmente y otros factores, hacen difícil predecir la formación de DAM ya que es muy variable y cambia de sitio a sitio, debido a esto solo se pueden predecir los problemas que éste podría causar como su costo de tratamiento (Papirio et al., 2007; Zagury y Neculita, 2007).

El DAM puede afectar la biogeoquímica de los ecosistemas acuáticos en muchas formas, puede aumentar la acidez y destruir el sistema de buffer de bicarbonato, causar sedimentación y precipitación de metales, incrementar la salinidad, puede causar toxicidad crónica y aguda, modificar la calidad del agua potable y modificar la cadena trófica (Sánchez-Andrea et al., 2007; Church et al., 2007; Papirio et al., 2007; Sousa et al., 2014).

Además de afectar la acidez del agua superficial, el DAM puede causar que algunos metales como arsénico, cromo, plomo, cadmio, cobre, plata y zinc se lixivien en el agua. Algunos de estos metales se pueden incorporar a la cadena trófica y reabsorberse en organismos vivos incluyendo el humano causando serios problemas de salud (Johnson y Hallberg, 2005). Actualmente el manejo adecuado y la remediación del DAM es una gran preocupación, y se han propuesto diferentes técnicas o estrategias para remediarlo.

### **1.3 Técnicas de remediación del drenaje ácido de mina**

Con la finalidad de resolver la problemática causada por el DAM se han propuesto diferentes estrategias de remediación o mitigación de daños, la primera opción es evitar su formación (Sánchez-Andrea et al., 2014). Mientras la formación del DAM aumenta por la acción de microorganismos acidofílicos, algunas tecnologías se basan en eludir su actividad evitando que el oxígeno, agua o ambos tengan contacto con el mineral. También existen métodos fisicoquímicos y biológicos, los métodos fisicoquímicos incluyen: Adsorción, sedimentación, coagulación-floculación, intercambio iónico, separación por membrana y precipitación. Sin embargo, estas tecnologías presentan algunas desventajas como son la gran producción de lodos y su disposición, la gran

cantidad de reactivos necesarios, remoción ineficiente y alto costo. La mayoría de las industrias que utilizan el proceso de precipitación utilizan principalmente carbonatos o hidróxidos debido a su simplicidad y fácil control. Sin embargo este método presenta algunas desventajas en términos de aplicación y efectividad, ya que los hidróxidos o carbonatos de metales que se producen son inestables y poco apropiados para la recuperación de metales además de que requieren una disposición adecuada, lo que hace que este método aumente su costo (Kolmert et al., 2001; Sánchez-Andrea et al., 2004; Celis y Villa-Gómez, 2008, Kaksonen et al., 2004; Papirio et al., 2007).

Los métodos biológicos están basados en la actividad de ciertos grupos de microorganismos que generan alcalinidad (Sousa et al., 2014). Algunas tecnologías son aplicadas *in-situ* (preferentemente utilizadas debido a su durabilidad, limpieza y costo) como en humedales anaerobios y barreras reactivas permeables, o se pueden aplicar *ex-situ* como biorreactores de composta o biorreactores con actividad sulfurogénica.

Para los tratamientos *in-situ*, la elección del compuesto orgánico dependerá de su disponibilidad y su previa efectividad ya que es crucial la degradación del sustrato. Algunos de estos sustratos pueden ser mezclas o sustratos individuales como: composta de hongos, estiércol, turba, paja, aserrín, entre otros (Kolmert et al., 2001; Chruch et al., 2007; Sánchez-Andrea et al., 2004).

Para aplicaciones *ex-situ* se utilizan biorreactores en donde los parámetros puedan ser controlados y se pueda obtener un mejor rendimiento. Existen diferentes escalas y configuraciones, tanto a escala laboratorio como piloto. Estos biorreactores se basan en la actividad de las bacterias sulfato-reductoras ya que presentan diferentes ventajas como son su bajo costo, su capacidad para poder obtener sulfuros metálicos estables y recuperar así la calidad del agua (Kolmert et al., 2001; Sánchez-Andrea et al., 2004; Kaksonen et al., 2004; Celis et al., 2009; Papirio et al., 2007). La principal limitante de estos reactores es la baja eficiencia, que se presenta debido a la acumulación de acetato, esto representa un problema ya que si se opera el reactor a un pH menor o cercano

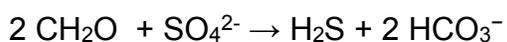
al pKa del ácido acético (4.8) se inhibirá la actividad sulfato-reductora (Kimura et al., 2005; Sánchez-Andrea et al., 2004).

## 1.4 Bacterias sulfato-reductoras (BSR)

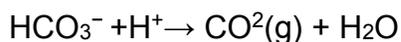
### 1.4.1 Generalidades

Las bacterias sulfato-reductoras (BSR) son un grupo único de procariotas, que trabajan en condiciones anaerobias estrictas o facultativas y son generalmente neutrófilas (pH 6 a 8). La sulfato-reducción biológica se basa en la oxidación de un donador de electrones, que puede ser un sustrato orgánico ó hidrógeno molecular, acoplada a la reducción del sulfato (aceptor terminal de electrones). En este proceso el azufre no se asimila, por lo que se trata de un proceso de respiración anaerobia mediante el cual se produce sulfuro como producto de la reducción del sulfato, la estequiometría general de la sulfato-reducción se presenta en la Reacción 1.2, en donde el sustrato orgánico se representa como CH<sub>2</sub>O. Para la reducción del sulfato son necesarios 8 electrones (e<sup>-</sup>) mismos que provienen de la materia orgánica o donador de electrones. (Madigan et al., 1997; Kaksonen A. et al., 2004; Papirio et al., 2013). Como producto del metabolismo se genera CO<sub>2</sub> que

El sulfuro producido puede reaccionar con metales pesados (representados como M<sup>2+</sup> en la reacción 1.4) tales como Fe<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Cu<sup>2+</sup> ó Cd<sup>2+</sup>, que conduce a la precipitación de sulfuros metálicos insolubles. Los sulfuros metálicos precipitados se pueden recuperar y volver a utilizar en otros procesos industriales. De esta forma se puede tomar ventaja del metabolismo de las BSR para depurar aguas ácidas que contienen concentraciones de metales pesados y altas concentraciones de sulfato.



Reacción 1.2

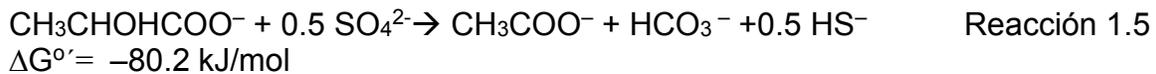


Reacción 1.3

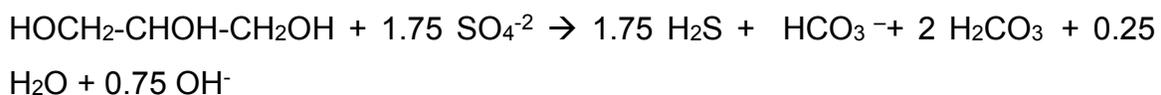
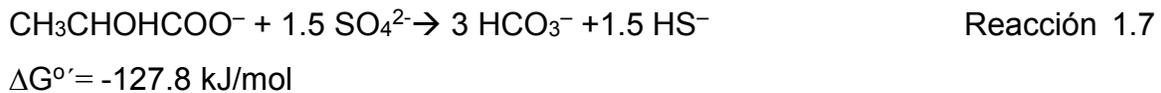


Se han reportado dos grupos de bacterias sulfato-reductoras que se distinguen según su capacidad para oxidar sustratos:

- a) Bacterias sulfato-reductoras incompletas: son aquellas que como producto final de la oxidación del sustrato generan acetato debido a su oxidación incompleta (Reacción 1.5), debido a que no tienen un mecanismo para poder oxidar acetil-CoA (Rabus et al., 2006). Dentro de este grupo se encuentran los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* y *Thermodesulfobacterium* (Madigan et al., 1997; Jing et al., 2013; Hansen et al., 1994).



- b) Bacterias sulfato-reductoras completas: son aquellas que oxidan el sustrato de manera completa hasta  $\text{CO}_2$  (Reacciones 1.6, 1.7 y 1.8). A este grupo de bacterias pertenecen los géneros *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema* y *Desulfobacterium* (Madigan et al., 1997; Jing et al., 2013; Hansen et al., 1994).



Los procesos sulfurogénicos completos abren nuevas posibilidades ya que se puede utilizar una gama más amplia de sustratos para las BSR, incluyendo sustancias tóxicas orgánicas tales como aromáticos, alcanos, compuestos clorados y ácidos grasos de cadena larga. Ya que las bacterias que oxidan

completamente el sustrato pueden realizar modificaciones sutiles de los sustratos, como desmetilaciones. Sin embargo, sustratos relativamente oxidados como formiato y glicina pueden ser metabolizados casi completamente hasta CO<sub>2</sub> por BSR incompletas (Hansen et al., 1994).

### **1.4.2 Sustratos**

Generalmente en el DAM se encuentran cantidades bajas de carbono orgánico (10 mg/L), es por esto que la adición de electrones es importante para propiciar la actividad microbiana. En la Tabla 1.2 se muestran algunos ejemplos de sustratos utilizados por BSR, desde moléculas sencillas como es el formiato hasta moléculas mas complejas como son las melazas. Se muestran las ventajas y desventajas que presentan así como los rendimientos obtenidos al utilizar el sustrato y la fuente del inóculo utilizado. El acetato presenta la ventaja de ser una molécula sencilla, sin embargo su aplicabilidad a pH bajos no es eficiente pues presenta toxicidad, a valores menores al pKa (4.8) el ácido acético se encuentra como una molécula neutra que atraviesa la membrana celular e inhibe la respiración celular (Koschorreck et al, 2004; Kimura et al., 2005). Debido a esta limitante los cultivos de BSR alimentados con acetato no consumen más de 40% del sustrato (Kaksonen et al., 2004; Kaksonen et al., 2003). El lactato es utilizado debido a su bajo costo y porque propicia una alta producción de biomasa, sin embargo la principal desventaja es su oxidación incompleta hasta acetato (50%). El glicerol es una molécula compleja que se ha usado con éxito como sustrato de las BSR, sobre todo cuando éstas se cultivan a pH ácido (pH < 4.0) ya que no se ioniza, sus eficiencias de consumo son mayores de 90% y el acetato residual es menor a 10%. Como se puede observar el inóculo obtenido de la mayoría de los estudios presentados en la Tabla 1.2 provienen de ambientes naturales. El uso de sustratos alternativos para enriquecer comunidades sulfato-reductoras han tenido mas éxito, por ejemplo en el año 1999, Sen y Johnson utilizaron glicerol como donador de

electrones para enriquecer BSR de sedimentos geotérmicos y una mina de cobre abandonada (Kimura et al., 2005).

**Tabla 1.2** Diferentes sustratos consumidos por BSR, rendimientos e inóculos

Fuente de Carbono	Ventajas	Desventajas	Acetato residual	Eficiencia de remoción/ DQO	Inoculo	Referencia
<b>Formiato</b>	BSR que utilizan H <sub>2</sub> son capaces de utilizar el formiato como única fuente de carbono	Metanógenos pueden prevalecer en condiciones termófilicas	65-10% de DQO 65-75°C nd	>99% 2.45 – 3.45 g DQO/L	Lodo granular anaerobio de un reactor UASB (agua residual de la industria del papel) (Eerbeek, The Netherlands)	Vallero et al., 2004
<b>Metanol</b>	Bajo costo A condiciones termófilicas prevalencia de BSR	Pocas BSR lo pueden oxidar Crecimiento lento	65-75°C nd	92%	Lodo granular anaerobio de un reactor UASB (agua residual de la industria del papel) (Eerbeek, The Netherlands)	Vallero et al., 2003; Vallero et al., 2004; Weijma y Stams. 2001
<b>Etanol</b>	Altas eficiencias de conversión de sulfato	Acumulación de acetato	50%	99.9%	Lodo granular metanogénico y sedimentos (Outokumpu Pyhä - mina salmi, Finlandia) enriquecido durante 2 años en un reactor de lecho fluidizado sulfato-reductor (drenaje ácido)	Kaksonen et al., 2004; Kaksonen et al., 2003.
<b>Lactato</b>	Bajo costo , producción de alcalinidad y biomasa	Acumulación de acetato	50% de la DQO inicial	54 % DQO	Reactor de lecho fluidizado de flujo descendente. (biopelícula)	Gallegos-Garcia et al., 2009

<b>Acetato</b>	Su oxidación produce bicarbonato	Competencia con microorganismos metanogénico, inhibición a altas concentraciones y pH bajo y dificultad para oxidar acetato en cultivos enriquecidos.	>43%	8°C – <10% 65 °C—55.2%	Cultivo enriquecido de mina ártico y caliente.	Sahinkaya et al., 2007
<b>Mezcla de ácidos grasos</b>	Es mayormente utilizado por BSR y a altas concentraciones de sulfato	Competencia con microorganismos metanogénicos y producción de acetato como intermediario	50%	>90%	Lodo granular de reactor UASB proveniente de una industria de patata ( Steenderen, The Netherlands)	Visser et al, 1993; Celis-Garcia et al., 2007
<b>Glucosa y fructosa</b>	Fácilmente degradable y produce H <sub>2</sub> ,	Producción de ácidos grasos como intermediarios y competencia con microorganismos metanogénicos a pH bajos.	--	ETOH >99%	Cultivo mixto de BSR (derivadas de cultivos de enriquecimiento de diferentes fuentes)	White y Gadd, 1996
<b>Hidrocarburos aromáticos</b>	Degradación de compuestos peligrosos (benceno y fenol)	Pequeño cambio en la energía libre	< 5%	>97%	Cultivo enriquecido mesofilico anaerobio proveniente de la fase acuosa un tanque de petróleo del Mar del Norte (Wilhelmshaven, Alemania).	Harms et al., 1999
<b>Melazas</b>	Alta disponibilidad y altos costos	Contenido no biodegradable y competencia con microorganismos metanogénicos	--	60-70%	Cultivo anaerobio proveniente de una laguna de tratamiento de tapioca.	Annachhatre y Suktrakoolvait, 2001

<b>Mezclas reactivas de residuos orgánicos</b>	Alta tasa de sulfato-reducción debido a la alta concentración de carbono y costo efectivo	Remoción de metales pesados: 51-84% níquel 73-93% zinc  Mas susceptible su aplicabilidad a pH bajos y costo efectivo	<10%	Cultivo anaerobio proveniente de sitio contaminado	Weijma y Stams. 2001
--	---	---	------	--	----------------------

### 1.4.3 pH

El pH influye directamente en las comunidades microbianas que se desarrollan en los reactores. Como ya se mencionó anteriormente el DAM tiene un pH bajo ( $< 4.0$ ) es por esto que el pH es un factor crucial cuando se trata de recuperar microorganismos capaces de llevar a cabo su metabolismo a pH ácido. La mayoría de las BSR son neutrófilos donde su pH óptimo es entre 6 y 8. Para las BSR, trabajar a un pH menor implica una mayor inversión de energía en el bombeo de protones a través de la membrana citoplasmática. Es por esto que en algunas ocasiones se modifica el pH de entrada de los reactores aumentando su costo. Sin embargo, la existencia de BSR ácido tolerantes y acidófilas que sean capaces de resistir pH por debajo de 4.0 y llevar a cabo la sulfato-reducción hace posible el uso de estas comunidades para remediar efluentes ácidos. (Koschorreck, 2008; Chruch et al., 2007; Hard et al., 1997; Kimura et al., 2006).

En efluentes ácidos (con valores de pH por debajo del pKa de los ácidos alifáticos) los ácidos grasos volátiles se encuentran predominantemente en sus formas no disociadas, en esta condición son lipófilos y como tal, pueden atravesar las membranas bacterianas (actúan como desacopladores), se disocian en el citoplasma de la célula, causando desequilibrio y la afluencia de más ácido no disociado y por lo tanto la acidificación del citoplasma. Las concentraciones de ácidos orgánicos a una concentración menor de 1mM son letales para microorganismos acidofílicos. (Koschorreck et al., 2004; Kimura et al., 2005).

Los microorganismos que se denominan acidofílicos son aquellos que crecen con un pH óptimo de 3 o por debajo de éste, mientras que los microorganismos ácido-tolerantes crecen en un pH óptimo entre 3 y 6 (Sánchez-Andrea et al., 2015; Sousa. et al., 2014).

Si se pudieran aislar BSR acidofílicas o ácido tolerantes estas ofrecerían la posibilidad de tratar directamente agua ácida, sin previa neutralización

(Sánchez-Andrea et al., 2004; Church et al., 2007; Papirio et al., 2007). La sulfato-reducción llevada a cabo por las BSR se considera un proceso muy importante para la remoción de metales en el DAM (Celis y Villa-Gómez, 2008; Papirio et al., 2013; Sahinkaya et al., 2011).

### **1.5 Hábitats de bacterias sulfato-reductoras acidotolerantes**

En muchas partes del mundo se encuentran ambientes ácidos extremos, que tienen valores de  $\text{pH} < 3$ , y su origen puede ser natural o antropogénico. La comunidad biológica de ambientes antropogénicos ácidos como son efluentes mineros, jales de carbón, aguas residuales domésticas han recibido una creciente atención en las últimas décadas. Un gran número de microorganismos procariotas recuperados de estos ambientes han sido estudiados por razones biotecnológicas (Gross S. y Robbins, 2000). El inóculo es muy importante para fines específicos, en donde la biorremediación de ambientes naturales es necesaria ya que la composición de la comunidad microbiana se ha comprobado que tiene un efecto significativo en la degradación de la materia orgánica (Papirio et al., 2007). En el año 2010 Bijmans y colaboradores utilizaron una comunidad de BSR neutrófila para la remediación de un efluente ácido, y observaron que si el sistema se operaba por debajo de un  $\text{pH}$  de 4.0, ocurría inhibición de la actividad sulfato-reductora. En cambio en el año 2012 Nancuqueo y Johnson, utilizaron una comunidad mixta de BSR acidofílica obtenida de ambientes naturales extremadamente ácidos,  $\text{pH}$  de 2.2 a 2.5 logrando operar su reactor a estos valores de  $\text{pH}$  sin problema. El sustrato utilizado fue glicerol y el inóculo se obtuvo de una corriente de una mina de cobre abandonada. Otro grupo de investigación analizó diferentes comunidades microbianas y su función en condiciones termofílicas. El cultivo enriquecido proveniente de una mina fue utilizado para bioaumentar un reactor, el cultivo estaba compuesto principalmente por especies de *Desulfomicrobium apsheronum* que son capaces de oxidar diferentes compuestos orgánicos hasta acetato. Cuando el reactor de lecho fluidificado inverso se operó a largo plazo en

presencia de acetato no se enriqueció la comunidad, al cambiar de condiciones de operación (temperatura de 8 °C a 65 °C) cambió la comunidad microbiana y se comprobó por análisis de DGGE, donde solamente pocos eran BSR (Papirio et al., 2007). Es por esto que es necesario realizar un proceso de preselección, para obtener una comunidad microbiana ya adaptada a las condiciones que se requieren para que puedan ser utilizadas en aplicaciones biotecnológicas.

### **1.6 Ambientes donde se pueden encontrar BSR**

Las BSR son notablemente adaptables y pueden ser encontradas en numerosos ambientes terrestres y acuáticos en los que se ha agotado el oxígeno, debido a la descomposición aerobia de la materia orgánica. Se encuentran principalmente en ambientes anóxicos ricos en sulfatos. Debido a esto las BSR se han encontrado también en ambientes extremos y en ambientes naturales muy diversos como son manantiales salinos, alcalinos y hábitats termales. Lo que habla de su capacidad para adaptarse y sobrevivir en estos sitios ya que normalmente forman parte de los consorcios de esos hábitats. Algunos hábitats antropogénicos pueden considerarse como un tipo de ambiente extremo, estos hábitats incluyen pilas de compostaje de residuos domiciliarios, calentadores de agua y efluentes termales de plantas eléctricas. Las comunidades de microorganismos que se encuentran en dichos hábitats ya sean naturales o de fuentes antropogénicos, son utilizadas como inóculos ya que provienen de condiciones extremas, a las cuales se puede presentar la actividad deseada que en nuestro caso es la actividad sulfato-reductora (Kaksonen et al., 2004; Kimura et al., 2004).

### **1.7 Filogenia de las BSR**

La clasificación filogenética de BSR por análisis de secuencias de 16S rRNA tiene algunas ventajas, como es que provee información acerca de los orígenes evolutivos de la reducción del sulfato en especies distantes y a su vez facilita el desarrollo de sondas y oligos específicos para estudios ecológicos. Las BSR son

un grupo fisiológico complejo el cual se puede clasificar en 4 grupos: 1) BSR mesofílicas Gram-negativas, 2) BSR formadoras de esporas Gram-positivas, 3) BSR termofílicas y 4) archaeas sulfato-reductoras termofílicas. En estos grupos se encuentran clasificados aquellos microorganismos que usan al sulfato como aceptor terminal de electrones durante la respiración anaerobia.

- 1) **BSR mesofílicas Gram-negativas:** este grupo de BSR se encuentra localizado en la subdivisión  $\delta$ -Proteobacteria. En algún momento de su historia evolutiva, la subdivisión  $\delta$  cambió de un fotótrofo ancestral común y los miembros de la subdivisión  $\delta$  perdieron su capacidad fotosintética y se convirtieron en heterótrofos. La subdivisión  $\delta$  incluye BSR como bacterias reductoras de azufre (*Desulfurella*, *Desulfuromusa* y *Desulfuromonas*), *Mixobacterias*, *Bdellovibrio*, *Pelobacter* y *Geobacter*. Se han propuesto dos familias de BSR dentro del  $\delta$ - Proteobacteria: la *Desulfovibrionaceae* y la *Desulfobacteriaceae*. La familia *Desulfovibrionaceae* incluye los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium*.
- 2) **BSR formadoras de esporas Gram-positivas:** Este grupo en general está dominado por el género *Desulfotomaculum*, y se coloca dentro de las bacterias Gram-positivas, tales como *Bacillus* y *Clostridium*. Estos incluyen a las únicas BSR conocidas por formar endoesporas resistentes al calor, un rasgo compartido con muchas especies de *Bacillus* y *Clostridium*. En contraste con las BSR mesofílicas, algunas especies de *Desulfotomaculum* son termófilas, aunque sus temperaturas de crecimiento óptimo son más bajas que las de las Archaeas sulfato-reductoras termofílicas y de las BSR mesofílicas Gram-negativas. Diferentes especies dentro del género *Desulfotomaculum* exhiben una gran versatilidad en el tipo de donadores de electrones que son capaces de utilizar para el crecimiento, dentro de estos podemos encontrar: acetato, anilina, succinato, catecol, indol, etanol, fenol, acetona,

estearato, entre otros. Dependiendo de la especie los sustratos orgánicos se oxidan de forma incompleta a acetato o completamente a CO<sub>2</sub>.

- 3) **BSR termofílicas:** Las dos especies más características en este grupo de BSR son *Thermodesulfobacterium comuna* y *Thermodesulfovibrio yellowstonii*. Ambas fueron aisladas de aguas de ventanas hidrotermales del Parque Nacional de Yellowstone, sus temperaturas óptimas de crecimiento son superiores a las descritos para BSR formadoras de esporas, pero inferiores a las de las arqueas sulfato-reductoras termofílicas.
- 4) **Archaeas sulfato-reductoras termofílicas:** Las temperaturas óptimas de crecimiento son por encima de 80 °C. Sólo dos especies han sido descritas, los cuales fueron aisladas de los sistemas hidrotermales marinos: *Archaeoglobus fulgidus* y *A. profundus*. Las principales diferencias entre las dos especies son que *A. fulgidus* poseen flagelos y son quimiotoautótrofas facultativas y producen pequeñas cantidades de metano. Mientras *A. profundus* no poseen flagelos y son quimiolitoheterótrofos obligados y no producen metano.

Aunque las BSR actualmente sólo se dividen en cuatro grupos filogenéticos, nuevas divisiones podrían añadirse conforme más información se logre obtener acerca de la diversidad de BSR en ambientes naturales y en algunos casos ambientes naturales extremos (Castro et al., 2000; Sánchez-Andrea y Stams, 2015; Kimura et al., 2005).

### **1.8 Asociaciones de BSR y su relevancia**

Las asociaciones entre BSR y otros microorganismos es la muy conocida, ya que se lleva a cabo en ambientes anaerobios contaminados (Morris et al., 2013). En dichos ambientes pueden existir varios aceptores de electrones disponibles como nitrato, sulfato, hierro, manganeso, seleniato y arsénico que pueden ser utilizados para llevar a cabo la respiración celular. Como ya se mencionó el

proceso de sulfato-reducción no asimilativa es aquel en donde se utiliza el sulfato como aceptor terminal de electrones que conduce a rendimientos energéticos mayores que la metanogénesis. Generalmente las BSR compiten con microorganismos metanogénicos por acetato o hidrógeno siempre y cuando el sulfato esté disponible. En ambientes marinos como en ambientes de agua dulce los microorganismos metanogénicos y sulfato reductores guardan una relación muy estrecha ya que se ha corroborado su cooperación en la asimilación de sustratos complejos o bien en condiciones no favorables para algunos de ellos (Worm et al., 2013; Stams et al., 2006; Morris et al., 2013).

Cuando diferentes microorganismos cooperan entre ellos se puede hablar de sintrofia. Si se considera la sintrofia en la degradación de materia orgánica, los degradadores primarios sintróficos estarían asociados a la clase  $\delta$ -Proteobacteria (como son *Syntrophus* o *Desulfovibrio*) o Clostridia (*Desulfotomaculum*). Algunos microorganismos de la clase  $\delta$ -proteobacteria son capaces de crecer sintróficamente, son microorganismos estrictamente anaerobios con la capacidad de fermentación en co-cultivos y generalmente son sulfato-reductores (*Desulfuromonadales*, *Desulfovibrio*) utilizando como aceptor terminal el sulfato (Sallam y Steinbuchel, 2009).

Una comunidad microbiana o consorcio hace referencia a un conjunto de microorganismos filogenéticamente diverso, que puede o no incluir microorganismos desconocidos (no-cultivables) y cuya interacción está basada en cierto intercambio de nutrientes o de ciertas sustancias necesarias para su sobrevivencia.

En varios casos, la interacción de diferentes metabolismos microbianos se requiere para degradar compuestos complejos y para almacenar energía. Como por ejemplo en la degradación de compuestos del petróleo, específicamente de compuestos alifáticos y aromáticos, en donde microorganismos metanogénicos y BSR cooperan, es importante considerar esta interacción para que la mineralización pueda ocurrir.

Un ejemplo de esto puede ser la primera BSR secuenciada que degrada alcanos que es *Desulfatibacillum alkenivorans* que en presencia de *Methanospirillum hungatei* (que utiliza hidrógeno/formiato) y en ausencia de sulfato puede llevar a cabo la mineralización, a este proceso se le llama cooperación microbiana. La cooperación microbiana sucede cuando por ejemplo las comunidades forman colonias ya que les permite una interacción dentro de la comunidad, la cooperación microbiana también puede promover un mecanismo protector frente a factores ambientales hostiles.

Otro ejemplo pueden ser los co-cultivos de bacterias verdes del azufre (*Chlorobium*) y BSR (*Desulfuromonas*) que han mostrado condiciones estables de crecimiento para ambas, y cuya cooperación se basa en la transferencia de azufre y sulfuro. En cultivos puros *Desulfuromonas*, que usa acetato como donador de electrones, es inhibida por la generación de sulfuro a concentraciones bajas de biomasa celular, en cambio *Chlorobium spp.* puede crecer con altas concentraciones de sulfuro. Cuando estos microorganismos trabajan juntos promueven un sistema estable ya que *Chlorobium* oxida el sulfuro a azufre elemental que es utilizado como aceptor de electrones por *Desulfuromonas* durante la oxidación de acetato, esto permite que sea un sistema auto-suficiente (Stams et al., 2006; Morris et al., 2013). En la Tabla 1.3 se muestran algunos ejemplos de cooperación microbiana en donde las BSR están involucradas debido a la versatilidad que éstas presentan.

**Tabla 1.3** Ejemplos de consorcios sulfato-reductores y su aplicación.

Consorcio	Sustrato	Inóculo	Objetivo	Referencia
Consorcio metanogénico y sulfato-reductor	Glicerol	Lodo proveniente de proceso de destilería	Degradación de glicerol	Qatib A. Et al, 1991
Consorcio sulfato-reductor	Lactato	Agua proveniente de refinería Chengdu, China	Reducción de Cr (VI)	Fude I. Et al, 1994
Consorcio sulfato-reductor	Lactato	Sedimento marino	Reducción de Cr <sup>+6</sup> a Cr <sup>+3</sup>	Cheung K. H. & Gu Dong Ji, 2003
Consorcio sulfato-reductor	--	Sedimento contaminado con petróleo Artburkill, NY, USA	Mineralización de compuestos del petróleo	Perez-Jimenez J. R. At al 2001.
Consorcio sulfato-reductor	Lactato	Sedimento campo petrolero Louisiana, USA.	Investigar la corrosión de tuberías	Abbas Al. Et al, 2013

Se han utilizado consorcios microbianos en diferentes procesos biotecnológicos, como es la remediación de suelos y efluentes, debido a las diferentes ventajas como son:

- Permiten tener un sistema robusto.
- Permiten la degradación de compuestos complejos que pueden llegar hasta su mineralización.
- Presentan alta eficiencia.
- Permiten superar limitantes metabólicas como es la alta concentración de sulfuro o bien la acumulación de acetato (Stams et al., 2006; Morris et al., 2013).

La mayoría de las BSR, como ya se mencionó, son neutrófilas ya que su pH óptimo va de 6 a 8 sin embargo, algunas BSR han sido aisladas de ambientes extremos como sitios contaminados con petróleo, minas abandonadas, etc. (Sánchez y Stams, 2015; Kimura et al., 2005).

En el año 2005 Kimura y colaboradores describieron actividad sulfato-reductora a un pH bajo (3.08 - 4.02) por una población mixta compuesta por varios grupos de BSR acetogénicas y una cepa de *Acidocella*, la cual presenta una relación sintrófica, ya que facilita la reducción de sulfato a pH bajo (Kimura et al., 2005).

### **1.9 Técnicas de cultivo y moleculares para recuperar microorganismos de ambientes naturales**

Casi toda la información actual acerca de las procariotas se basa en observaciones realizadas en menos de 5 000 especies aisladas, que únicamente representan ~ 0.1 % de la diversidad total estimada de las procariotas en la biósfera. En el planeta Tierra existen hábitats complejos que incluyen variaciones extremas de temperatura, luz, pH, presión, salinidad y de compuestos inorgánicos y orgánicos representados por materiales que van desde el azufre elemental al amoníaco, gas de hidrógeno y metano, así como sustratos complejos como celulosa y lignina, grasas, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y sustancias húmicas (Madsen, 2005).

Debido a esto en los últimos años se han realizado esfuerzos significativos para idear métodos de cultivo para las especies que aún no han sido cultivadas. En la última década, se han tratado de recuperar microorganismos no cultivables de hábitats diversamente poblados como son el suelo y sistemas acuáticos (marinos y de agua dulce) (Vartoukian et al., 2010).

Tal como lo han propuesto diversos autores (Alain y Querellou, 2009; Sekieguchi, 2006; Vartoukian et al., 2010; Kimura et al., 2005), los métodos moleculares evolucionan rápido y son extraordinariamente útiles, pero dichos

autores también señalan que los enfoques para el cultivo exitoso de microorganismos serán la respuesta principal a muchas preguntas, como son:

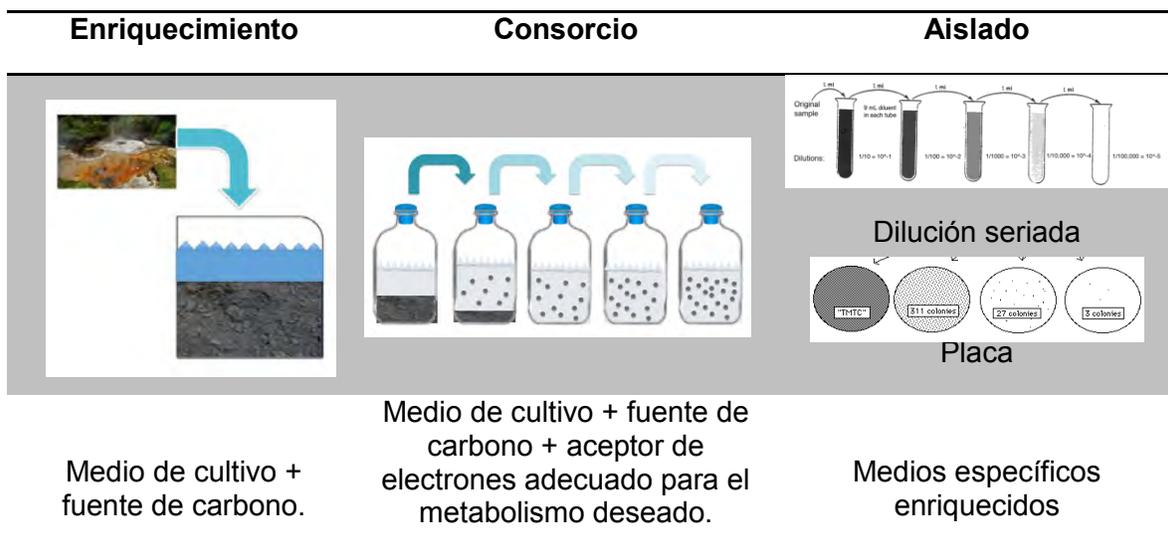
- El conocimiento de los requerimientos específicos del cultivo (pH, sustrato, temperatura de incubación, niveles de oxígeno, etc.)
- La química de hábitats naturales.
- La existencia de microorganismos que deben mantenerse en equilibrio para sobrevivir (cooperación entre especies para nutrientes específicos).

Únicamente una fracción de los microorganismos son cultivables bajo ciertas condiciones, esto se debe a que ningún medio podrá recrear las condiciones naturales de tal manera que todos los microorganismos en las muestras ambientales sean capaces de crecer (Overmann, 2006).

### **1.10 Descripción de las aproximaciones de cultivo**

En la Figura 1.1 se pueden observar los requerimientos para poder obtener un enriquecimiento, un consorcio o bien un aislado microbiano. El enriquecimiento proviene de una muestra (inóculo) de una comunidad microbiana de origen natural para el crecimiento en laboratorio en un medio que está diseñado para seleccionar un pequeño subconjunto de la comunidad inicial. La estrategia detrás de un cultivo de enriquecimiento, consiste en encontrar aquellas condiciones de crecimiento óptimo que permitan a los miembros particulares de la comunidad crecer y finalmente predominar dentro de la población mixta que estaba presente inicialmente (Madsen, 2005) .

**Figura 1.1** Diagrama que ilustra los distintos tipos de cultivo que podrían obtenerse a partir de una muestra ambiental.



Muchos procesos biogeoquímicos no son catalizados por microorganismos individuales ya que varios microorganismos cooperan entre sí, a esto se le llama consorcio. Para poder obtener un consorcio, el enriquecimiento se tiene que especializar mediante transferencias sucesivas, aquí se puede destacar la principal diferencia de las transferencias que se realizan para obtener un consorcio y un aislado. El porcentaje de inóculo para poder obtener un consorcio va de 20 a 30% y para obtener un aislado se encuentra entre 1 y 15%. Para lograr obtener un aislado microbiano se pueden utilizar dos métodos: uno es por dilución seriada y otro es por cultivo en placa (Madsen, 2005; Sekieguchi, 2006)

Es importante señalar que las comunidades microbianas de origen natural utilizadas como inóculos son típicamente diversas y por lo tanto no se pueden llegar a caracterizar en su totalidad por medios de cultivo y la mayoría de ellas tampoco por métodos moleculares (Madsen, 2005).

## 1.11 Aproximaciones moleculares

Las técnicas moleculares, como la secuenciación, metagenómica, pirosecuenciación, entre otras, pueden proporcionar alguna información independiente de la capacidad para cultivar microorganismos. Las herramientas ómicas en general hacen posible que se pueda comprender a los organismos sin necesidad de cultivarlos. Sin embargo para llegar a una verdadera comprensión de la fisiología de los microorganismos y su papel en la ecología, su influencia sobre la salud del huésped o su papel en la producción de productos naturales, se requiere de su cultivo en el laboratorio (Sekiguchi, 2006). Es por esto que se busca que los microorganismos sean cultivables, ya permite que la actividad deseada sea reproducible y que pueda ser utilizada en alguna aplicación biotecnológica, esto puede ser posible gracias a las técnicas de cultivo y las herramientas moleculares. A continuación se describen brevemente algunas metodologías que permiten caracterizar comunidades microbianas sin tener que cultivarlas previamente.

**Secuenciación del gen 16s rRNA:** El uso del gen 16s rRNA codifica para la subunidad pequeña del ribosoma por lo que es ubicuo en las procariontas, permite estudiar la filogenia y taxonomía bacteriana, éste ha sido el marcador genético de selección más común utilizado por las siguientes razones: 1) Su presencia en todas las bacterias; 2) es una región conservada 3) el gen 16s rRNA (1500 pb) es lo suficientemente grande para los propósitos de bioinformática; 4) Poca evidencia de transferencia horizontal; 5) ya que posee una longitud, 1500 bp tiene validez estadística (Janda y Abbott, 2007).

**Metagenómica:** es el estudio del conjunto de genomas de un determinado entorno (metagenoma) directamente a partir de muestras de ese ambiente, sin necesidad de aislar y cultivar las especies. Proporciona acceso a los genes que forman parte de la composición de las comunidades microbianas y por lo tanto permite una descripción mucho más amplia que los perfiles filogenéticos que se basan sólo en la diversidad de un gen, como es el gen 16S rRNA. La metagenómica también puede proveer información genética sobre nuevos

biocatalizadores o enzimas, los vínculos entre la función genómica y la filogenia de los organismos y así conocer a los que estén presentes en mayor proporción (Thomas et al., 2012).

**Gen funcional *dsrAB*:** El metabolismo de los gremios microbianos esenciales en el ciclo del azufre se basa en un tipo de enzima sulfito reductora (no asimilatoria) que cataliza la reducción de sulfito a sulfuro durante la respiración anaerobia de sulfato, sulfito y organosulfonato, o bien actúa a la inversa durante la oxidación del azufre. El gen funcional *dsrAB* se ha utilizado para poder identificar BSR y así corroborar su actividad (Muller et al., 2015).

### **1.12 Aproximaciones de cultivo**

Se ha propuesto que las técnicas de cultivo novedosas para microorganismos anaerobios ayudarán a obtener cultivos de interés biotecnológico y ambiental, sin embargo la mayoría de los medios de cultivo utilizados hasta la fecha han sido medios enriquecidos en nutrientes. Actualmente se piensa que estas condiciones pueden favorecer el crecimiento de bacterias de crecimiento más rápido a expensas de especies de crecimiento lento, algunas de las cuales se desarrollan en entornos pobres de nutrientes que podrían ser inhibidos por las concentraciones altas de sustratos, es por esto que en algunos casos el proceso de enriquecimiento de las poblaciones de microorganismos provenientes de ambientes naturales se ha realizado con medios mayormente diluidos (pobres en nutrientes) para poder obtener estos microorganismos (Vartoukian et al., 2010).

La importancia de cultivar microorganismos recuperados de ambientes naturales extremos radica en que solo cultivándolos se podrán conocer las capacidades metabólicas de dicho microorganismo, de esta forma los cultivos exitosos podrían ser usados en aplicaciones biotecnológicas. En materia de biotecnología ambiental se podrían diseñar procesos anaerobios para el tratamiento de aguas

residuales, procesos de biorremediación, o la conversión de biomasa a energía en digestores anaerobios, como ejemplos.

La cooperación microbiana (consorcio) se encuentra en todas partes y por si sola garantiza que los microorganismos sobrevivan a pesar de las limitaciones biológicas y termodinámicas. Las interacciones microbianas sirven a la comunidad microbiana, desde procesos subcelulares hasta procesos globales y por lo tanto asegura la supervivencia en cada nivel trófico. Es por esto que se han tratado de aislar microorganismos de interés mediante diferentes técnicas de cultivo, para posteriormente, junto con las técnicas moleculares mejorar la comprensión del funcionamiento de comunidades microbianas y su proceso en la biorremediación. El fin último de la combinación tanto de las estrategias moleculares y de cultivo es conocer el metabolismo y que éste sea reproducible para que pueda ser aplicado con un fin en particular (Stams et al., 2006; Morris et al., 2013).

## **2. Justificación, hipótesis y objetivos**

### **2.1 Justificación**

Uno de los principales problemas relacionados con la industria minera es la formación de drenaje ácido de mina, que como ya se explicó causa graves problemas ambientales, debido principalmente al contenido de metales y sulfato así como al pH ácido, que usualmente es menor a 4. Esto puede llegar a afectar la biogeoquímica de los sistemas y la calidad del agua. Una de las estrategias para remediar el drenaje ácido de mina es hacerlo mediante procesos fisicoquímicos, los cuales presentan dos principales desventajas que son el alto costo y el manejo de residuos, por la gran cantidad de sólidos que deben disponerse. Los métodos biológicos representan otra alternativa y se prefieren sobre los fisicoquímicos ya que son más amigables con el ambiente, además brindan la ventaja de poder recuperar ciertos minerales de interés, en forma de sulfuros metálicos. Los métodos biológicos se basan en aprovechar el proceso anaerobio de sulfato-reducción en los que, como ya se ha dicho, se puede reducir el sulfato hasta sulfuro y éste último al reaccionar con metales disueltos forma precipitados estables; adicionalmente, mediante el proceso biológico se logra aumentar el pH del sistema. Sin embargo los sistemas biológicos presentan una problemática ya que el acetato residual, producto de la oxidación incompleta del sustrato, disminuye la eficiencia global de degradación de materia orgánica. Otro problema es que el pH ácido de la corriente a tratar puede afectar negativamente el proceso de sulfato-reducción, limitándolo.

Por lo anterior, en este trabajo se propone recuperar consorcios de bacterias sulfato-reductoras de ambientes naturalmente ácidos, donde el pH ácido no sea una limitante para la actividad bacteriana y el acetato pueda ser consumido completamente. Los consorcios recuperados, al ser cultivables podrán reproducirse y mantenerse bajo condiciones controladas, de esta forma los consorcios podrían usarse como inóculo o para la bioaumentación de la microbiota en reactores sulfato-reductores, con lo que eventualmente se lograría incrementar la eficiencia del proceso.

## **2.2 Hipótesis**

Si las condiciones a las cuales se obtuvieron enriquecimientos de muestras de sedimento a pH ácido fueron las adecuadas, entonces, mediante técnicas microbiológicas tradicionales se podrán obtener consorcios sulfato-reductores que consuman por el completo el sustrato a pH ácido.

Si los consorcios recuperados después de las transferencias sucesivas son cultivables, entonces, su actividad productora de sulfuro y de consumo de sustrato será reproducible.

## **2.3 Objetivos**

Obtener y caracterizar consorcios sulfato-reductores con tolerancia a pH ácido y con capacidad de consumir acetato para su posterior uso en el tratamiento de efluentes ácidos en biorreactores.

### **2.3.1 Objetivos específicos**

- Mantener la actividad sulfato-reductora detectada en enriquecimientos previos para conocer la velocidad de producción de sulfuro y consumo de acetato a  $\text{pH} < 4.0$ .
- Propagar los cultivos enriquecidos con diferentes sustratos, acetato, lactato y glicerol, para determinar con cuál de ellos se logra obtener un consorcio sulfato-reductor que consuma acetato a pH ácido ( $\leq 4.0$ ).
- Realizar transferencias sucesivas de los cultivos en los que se detecte consumo de acetato y producción de sulfuro para obtener consorcios cultivables en medios sintéticos.
- Determinar el pH óptimo de cada consorcio para establecer el tipo de consorcio que se obtuvo.

- Recuperar secuencias de ADN que codifican para el gen 16S rRNA a partir de los consorcios seleccionados y analizarlas para caracterizar las comunidades sulfato-reductoras cultivables.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1 Enriquecimientos iniciales

El inóculo original se obtuvo a partir de un sedimento proveniente de jales mineros, de una mina de azufre abandonada localizada en Villa de Juárez, San Luis Potosí. El trabajo experimental de esta tesis se inició a partir de dos diferentes juegos de cultivos enriquecidos previamente, sus características se muestran a continuación en la Tabla 3.1. se enriquecieron con medio de cultivo para favorecer la actividad sulfato-reductora.

**Tabla 3.1** Enriquecimientos iniciales cultivados con acetato, lactato o glicerol en medio mínimo anaerobio.

Tratamiento	pH	Número de botellas	Tiempo de enriquecimiento
Grupo 1	4	18	335 días
Grupo 2	3	20	370 días

#### 3.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó fue un medio mínimo anaerobio (modificado de Stams et al., 1993). El medio se suplementó con 10 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como aceptor de electrones y como donador de electrones se adicionó la cantidad estequiométrica necesaria para reducirlo (ver reacciones 1.6, 1,7 y 1.8). Los donadores de electrones fueron acetato (10 mM), lactato (6.6 mM) o glicerol (5.71 mM). La composición del medio mineral era la siguiente: 0.45 M de NH<sub>4</sub>Cl, 0.41 M de NaCl, 40 mM de MgCl·6H<sub>2</sub>O, 75 mM de CaCl·2H<sub>2</sub>O, 1 mL/L de solución de elementos traza (50mM de HCl, 1mM de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.5 mM de MnCl<sub>2</sub>,

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  $\text{ZnCl}_2$ , y 0.1 g/L de extracto de levadura. Se usaron como sustratos glicerol, acetato de sodio o lactato de sodio, se suplementaron a partir de soluciones stock individuales a una concentración de 1 M.

### 3.3 Cultivo de los consorcios

Todos los cultivos se realizaron en botellas serológicas de 120 mL, que contenían 80 mL de medio mínimo suplementado con el sustrato correspondiente. Las botellas se sellaron herméticamente con tapones de hule y con anillos metálicos y se les intercambiaron la atmósfera con una mezcla de  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  (80:20). Posteriormente cada botella se inoculaba con 10% ó 20% del cultivo previo y nuevamente se intercambiaba la atmósfera para propiciar un ambiente anaerobio. Los cultivos se incubaron a una temperatura controlada de  $30^\circ\text{C}$ , en condiciones de oscuridad y sin agitación. Durante el seguimiento de los cultivos se buscaba que produjeran sulfuro y que además tuvieran la capacidad de consumir el sustrato completamente, es decir, que el acetato producido (de la oxidación incompleta de lactato o glicerol) o el acetato suplementado se consumiera (entre 30 y 60 días).



**Figura 3.1** Ilustración de las diferentes partes de los enriquecimientos que se usaron como inóculo.

Para propagar los enriquecimientos iniciales, se tomaron alícuotas del medio o sobrenadante (líquido sin combinar con el sedimento), del sedimento y de la suspensión (mezcla de medio y sedimento), como se puede apreciar en la Figura 3.1, dichas alícuotas se usaron como inóculo para hacer la transferencia cero.

El seguimiento de los cultivos se hizo determinando el consumo de lactato o acetato, y la producción de acetato (en el caso del glicerol), también se cuantificó la producción de sulfuro y consumo de sulfato. Los cultivos que consumían acetato y producían sulfuro eran cultivados de nuevo.

### **3.4 Transferencias sucesivas**

Posteriormente a partir de la transferencia cero que cumpliera con los parámetros establecidos (producción de sulfuro y consumo completo de sustrato), se tomaron 8 ó 16 mL como inóculo (10-20%) para realizar una nueva transferencia del cultivo. Cada 5 ó 7 días se determinaba el consumo de sustratos (acetato, lactato, sulfato), la producción de sulfuro, y el pH, hasta observar la estabilidad en la producción de sulfuro (aproximadamente a los 30 días). Los cultivos que consumían acetato y producían sulfuro eran cultivados nuevamente en medio fresco con el sustrato con el que originalmente fueron enriquecidos, de esta forma se obtenía otra transferencia. Aquellos cultivos que no producían sulfuro y no consumían acetato eran descartados. Se realizaron al menos 5 transferencias sucesivas de aquellos cultivos que consumieron acetato y produjeron sulfuro. En la Figura 3.2 se presenta un diagrama con la estrategia experimental.



**Figura 3.2** Diagrama que resume la estrategia de cultivo que se usó para los enriquecimientos.

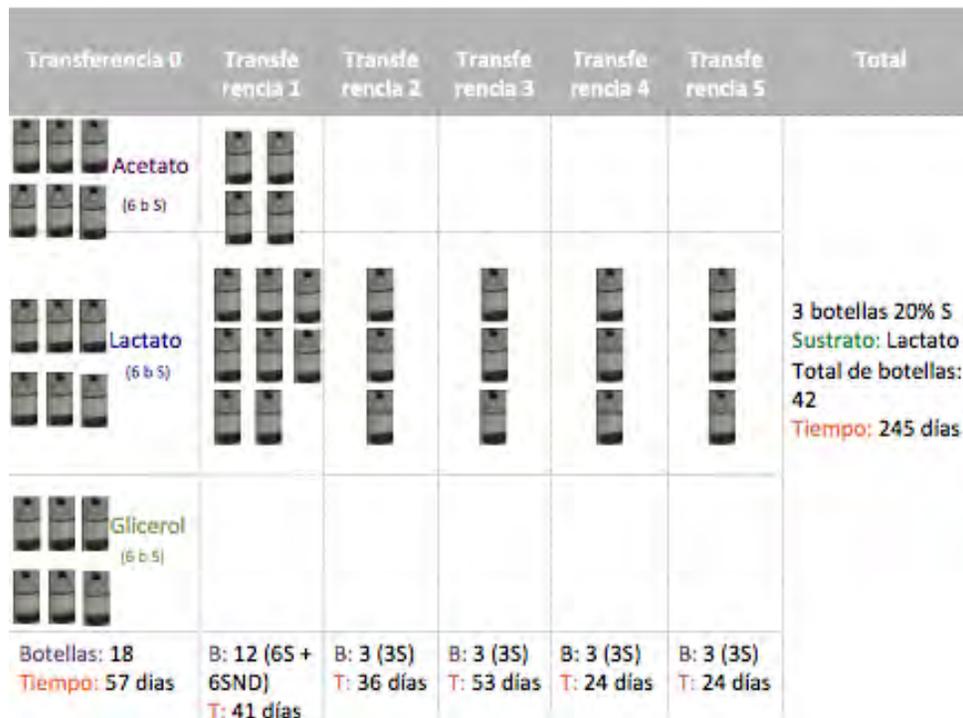
### 3.5 Enriquecimiento y cultivos sucesivos

Los enriquecimientos iniciales y a partir de los cuales se originaron las transferencias sucesivas contenían sedimento y medio de cultivo con distintos sustratos. En total se partió de 38 botellas divididas en dos grupos de acuerdo al pH, ya sea pH 4.0 (18 botellas) ó 3.0 (20 botellas). Todos estos enriquecimientos originales se reactivaron durante aproximadamente 70 días, a este paso se le llamó Transferencia 0, y fue a partir de la cual se realizaron las transferencias posteriores.

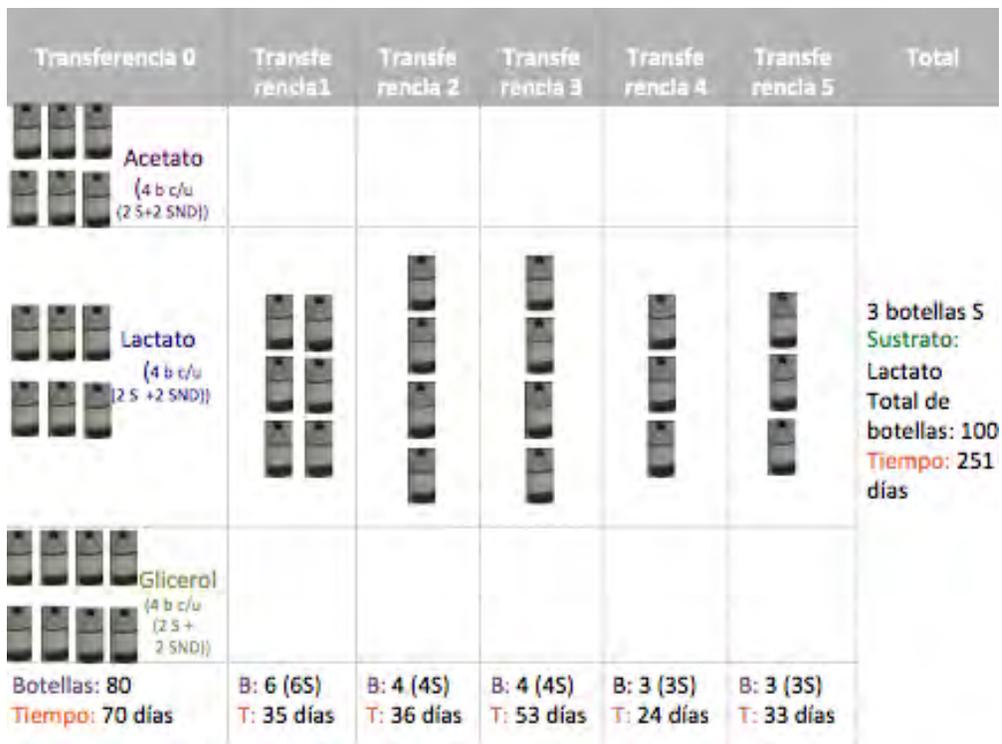
Para realizar los cultivos sucesivos (transferencias) a partir de los enriquecimientos iniciales se usó como inóculo suspensión (sedimento y líquido mezclados) a una proporción de 20% (Madsen, 2005). Los enriquecimientos del Grupo 1, incubados a pH 4.0, se componían de 18 botellas en total divididas en grupos de 6 botellas con cada uno de los siguientes sustratos: lactato, acetato o glicerol. Las botellas del Grupo 2 se componían de 20 botellas en total divididas

en 6 botellas que fueron alimentadas con lactato, 6 botellas que fueron alimentadas con acetato y 8 botellas que fueron alimentadas con glicerol. En el Grupo 2 se decidió evaluar dos estrategias: 1) inocular con 10% sobrenadante e 2) inocular con 20% de suspensión (sedimento y líquido mezclados), esto fue posible ya que la reactivación de este grupo fue promisoría (reactivación: adición de medio mínimo anaerobio + fuente de carbono).

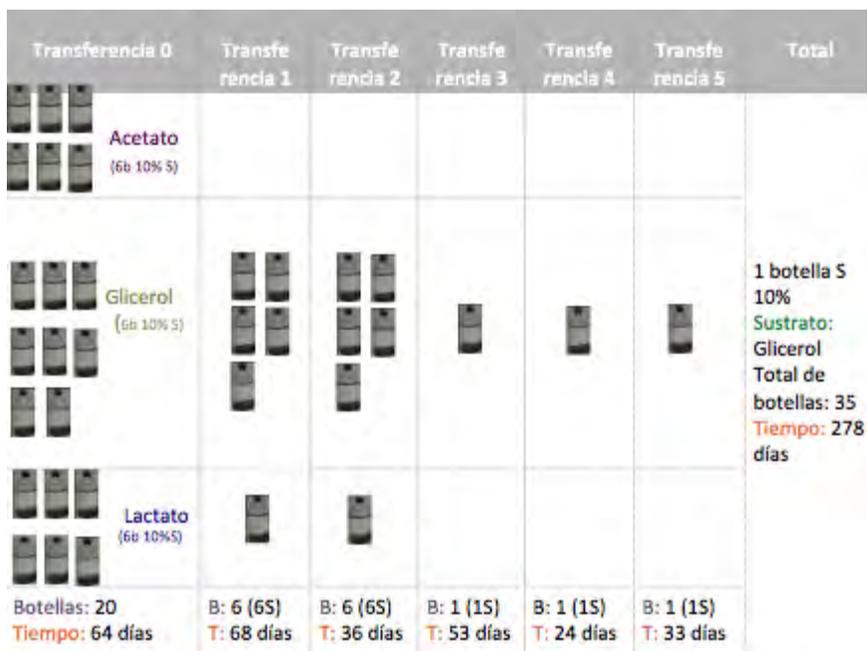
A continuación y para mayor claridad, se muestran los “cronogramas” de los diferentes grupos y estrategias utilizados a manera de resumen y que proporcionan una idea de los recursos utilizados y el tiempo invertido para al final obtener 7 consorcios (Figuras 3.3, 3.4 y 3.5).



**Figura 3.3** Cronograma del Grupo 1, pH inicial de 4, inoculado con 20% de suspensión.



**Figura 3.4** Cronograma del Grupo 2, pH inicial de 3, inoculado con 20% de suspensión.



**Figura 3.5** Cronograma del Grupo 2, pH inicial de 3, inoculado con 10% de sobrenadante.

### **3.6 Adición de medio para comprobación de actividad sulfato-reductora**

Para comprobar la actividad sulfato-reductora de los cultivos que cumplían con las características de consumir acetato y producir sulfuro, una vez que se había realizado la siguiente transferencia, a cada botella se le añadía medio de cultivo nuevamente, con el sustrato y pH correspondientes. En esas botellas también se le daba seguimiento cada 5 días a la producción de sulfuro, pH y consumo de sustrato, para verificar que los perfiles de estos parámetros se mantuvieran similares y fueran reproducibles.

### **3.7 Confirmación de la actividad sulfato-reductora (triplicados)**

Para comprobar la actividad sulfato-reductora a partir de la última transferencia 5, se realizaron triplicados de los 7 consorcios obtenidos. El medio fue el antes ya descrito y se midieron los siguientes parámetros cada 5 días: producción de sulfuro, consumo de sustrato (ya sea acetato o lactato dependiendo del consorcio que se tratara), producción de acetato (en el caso de glicerol o lactato), pH y densidad óptica.

### **3.8 Determinación del pH favorable para realizar actividad sulfato-reductora en los consorcios obtenidos**

Después de 5 transferencias sucesivas se lograron recuperar 7 consorcios que consumían acetato y producían sulfuro. Estos consorcios fueron usados como inóculos (20%) en ensayos para determinar el pH favorable para la actividad sulfato-reductora, como se detalla a continuación.

Los consorcios se cultivaron bajo las mismas condiciones de crecimiento de la transferencia 5 pero variando el pH. El medio mínimo anaerobio (sección 3.2) se ajustó a diferentes valores de pH dependiendo del grupo que se trataba, para

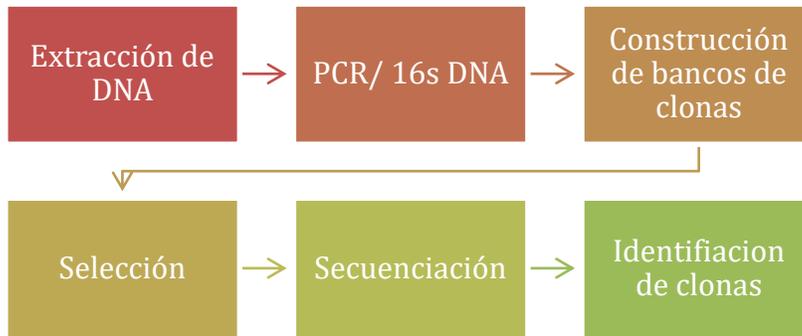
ajustar el pH se usaron soluciones stock de HCl y NaOH 1N. Para los cultivos pertenecientes al grupo 1 (Tabla 3.1) el pH se ajustó a valores de 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 7.0. Para los cultivos obtenidos del grupo 2 el pH se ajustó a 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 7.0. De tal forma que se tenían tantas botellas como valores de pH, estas botellas fueron inoculadas con el cultivo correspondiente. Cada 5 días se realizaron mediciones de sulfuro disuelto y de densidad óptica. La tasa de reducción de sulfato se obtuvo a partir de la pendiente de la curva de producción de sulfuro contra tiempo. Posteriormente se graficaron las tasas obtenidas a cada valor de pH y de esa forma se pudo obtener el pH favorable de cada consorcio. Se tomó el valor máximo de la pendiente que coincidiera con la máxima velocidad de crecimiento en cada uno de los consorcios.

### **3.9 Determinación de velocidades máximas de producción de sulfuro y consumo de sustrato**

Para determinar las velocidades máximas de consumo de sustrato y producción de sulfuro de los consorcios obtenidos en las transferencias 1 y 5 así como de los triplicados, se procedió como se describe a continuación. A partir de los perfiles en el tiempo de la concentración de sulfuro, la concentración de lactato y la concentración de acetato, se identificó la porción exponencial de la curva a partir de la cual se realizó un ajuste lineal para obtener el valor de la pendiente.

### **3.10 Caracterización Molecular de los consorcios sulfato-reductores.**

Para obtener mas información acerca de los consorcios obtenidos a partir de la Transferencia 5, se realizaron estrategias moleculares. En el Figura 3.3 se muestra el diagrama general de las estrategias utilizadas para llevar acabo la caracterización molecular.



**Figura 3.6** Diagrama general de la caracterización molecular.

### 3.10.1 Extracción de DNA

Para realizar la identificación molecular, se extrajo DNA de cada uno de los consorcios recuperados, es decir de aquellos consorcios que fueron transferidos 5 veces sucesivas. Esto fue posible ya que se obtuvieron de 15 a 20 mL de inóculo de los cultivos, se centrifugaron a 8000 rpm y se obtuvo un pellet de un peso aproximado de 0.1 a 0.3 g. La extracción de DNA se realizó mediante el Kit Power Soil DNA Isolation Kit (MOBIO) con las siguientes modificaciones sobre las instrucciones del fabricante:

- Después del paso 4 del protocolo del Kit se incubó en el thermomixer a 70 °C por 5 min (sin agitar).
- Se colocaron los tubos en el vórtex de forma horizontal y se dejaron en agitación, dependiendo de cada muestra, hasta que se obtuviera una coloración blanquecina.
- Se incubó nuevamente en el thermomixer a 70 °C por 5 min (sin agitar).
- Se llevaron a hielo durante 5 min.
- Se siguió el paso 9 del protocolo del Kit

### 3.10.2 PCR

Se realizaron reacciones de 50  $\mu$ L que contenían: 36.750  $\mu$ L de agua, 5  $\mu$ L de buffer 10x (25mM), 3  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1  $\mu$ L dNTPs (10mM), oligos sentido y antisentido 1  $\mu$ L de cada uno (Tabla 3.2), Taq (5 U/ $\mu$ L) 0.250  $\mu$ L, suero de albumina bovina (BSA) 1  $\mu$ L y 5  $\mu$ L de muestra de ADN. Se utilizó el siguiente

programa en el termociclador: Pre calentamiento a 94 °C durante 4 min, desnaturalización a 94°C durante 4 min, alineamiento a 54°C durante 1 min, una extensión a 72°C durante 3 min esto se repitió 30 ciclos para terminar con una extensión final a 72°C durante 7 min.

**Tabla 3.2** Oligos utilizados para recuperar el gen 16S rRNA de bacterias y su secuencia.

<b>Oligo</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492 R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT

### 3.10.3 Clonación

Los productos de PCR con el tamaño esperado (1465 pb) se ligaron usando el vector pGEM-T Easy ( Promega ) siguiendo las instrucciones del fabricante por 24 hrs, y la transformación se realizó por choque térmico en células competentes de *E. coli* TOP- 10F. La ligación se puso en una placa de agar LB con ampicilina (100 mg LB/ 1 mg de ampicilina) y como medio de selección IPTG (2.38 mg/ mL) y Xgal (40 mg/ mL). Las colonias blancas positivas se picaron y se pusieron a crecer en medio liquido LB con ampicilina durante 12 hrs a 37°C. El DNA plasmídico se purificó usando el método de lisis alcalina (miniprep). El DNA plasmídico se visualizó en un gel de agarosa 1%, y la concentración del mismo se cuantificó por espectrofotometría (Nanodrop). El criterio que se utilizó para enviar secuenciar fue observar una banda aproximadamente del peso deseado (1465 pb). A partir de esto se ajustó a la concentración deseada por el laboratorio seleccionado (LANBAMA) al igual que la concentración del oligo sentido (27F).

### **3.10.4 Secuenciación**

Después de obtener las secuencias, se limpió cada una de las 122 secuencias obtenidas con el software BioEdit (gratuito). Se guardaron en formato Fasta para su posterior análisis.

Para el análisis de las librerías de 16S rRNA se utilizó el software de código abierto Mothur (v 1.15.0) para el procesamiento, agrupación y clasificación de los datos de la secuencia de calidad. Las secuencias fueron examinadas para encontrar quimeras utilizando Chimera.Uchime y la base de datos de la plantilla SILVA (26%). Las secuencias fueron alineadas con la base de datos SILVA 16S rRNA utilizando el algoritmo de terminación de alineación más cercana (NAST) y se clasificaron de acuerdo a esta base de datos (López-Lozano et al, 2013).

### **3.11 Análisis**

#### **3.11.1. Sulfuro disuelto**

El sulfuro disuelto se cuantificó mediante la técnica de Cord-Ruwisch (1985). Se preparó una curva de calibración de 10 puntos (0-20 mM) de Na<sub>2</sub>S por triplicado. Posteriormente se tomaba 0.1 ml de muestra y se hacía reaccionar con una solución de CuSO<sub>4</sub> (0.5 M) en medio ácido (HCl 1 M). La solución se agitaba por unos segundos y se cuantificaba su absorbancia a una longitud de onda de 480 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Spectronic).

#### **3.11.2. Ácidos grasos volátiles y sulfato**

Se tomaba 1ml de muestra y se ponía en un tubo eppendorf y se le añadía 1 ml de agua desionizada y se centrifugaba a 10,000 g y posteriormente se filtraba con un filtro GSWP de 0.22 µm. Se tomó del filtrado el volumen suficiente para llenar los viales de polipropileno para electroforesis capilar. Las muestras se analizaron en un equipo de electroforesis capilar Agilent (Agilent Technologies)

con el método adecuado para obtener los analitos de interés (Acetato, lactato y sulfato).

### **3.11.3. pH**

A cada una de las muestras durante las transferencias se les midió el pH con un potenciómetro Thermo Scientific™ Orion™ VersaStar, esta medición se realizaba cada 5 días.

### **3.11.4. Densidad óptica**

Para poder conocer la formación de biomasa se realizó una medición indirecta la cual correspondía a la densidad óptica. Se tomaba 1 ml de muestra y se leía en el espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Spectronic) a una longitud de onda de 600 nm. Esta lectura al igual que todos los parámetros se realizaba cada 5 días, esta cuantificación únicamente se realizó para la transferencia 5 y en los triplicados.

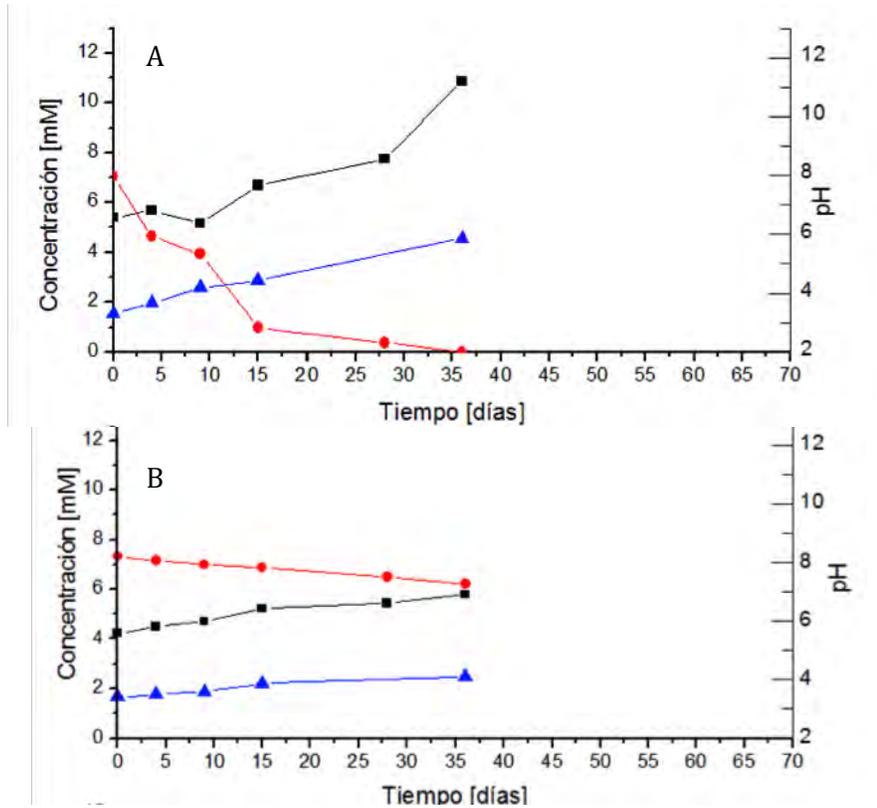
## **4. Resultados y Discusión**

Para obtener los consorcios sulfato-reductores, consumidores de acetato a pH ácido se necesitaron 177 botellas y más de 245 días. Lo que demuestra la complejidad de obtener microorganismos especializados, ya que se lograron superar limitantes como requerimientos específicos del cultivo (pH, sustrato, temperatura de incubación, etc.), sintrofia entre comunidades microbianas entre otras (Vartoukian et al., 2010; Kimura et al., 2005; Stams et al., 2006; Morris et al., 2013). Como se mencionó anteriormente fue un proceso tardado y complejo ya que se dio seguimiento a todas y cada una de las 177 botellas, además se realizaban mediciones cada 5 días de pH, sulfuro, acetato, lactato y sulfato. Tal y como ha sido señalado por otros autores el cultivo de microorganismos que no han sido previamente caracterizados es una tarea difícil y tardada (Sekiguchi, 2006). Este trabajo propone una estrategia para obtener consorcios especializados que sirvan como punto de partida para obtener consorcios cultivables con actividad sulfato-reductora a partir de muestras naturales.

### **4.1 Enriquecimientos usando suspensión o medio líquido (sobrenadante) como inóculo**

Para obtener un consorcio a partir de un enriquecimiento proveniente de una muestra natural, que alberga diversos microorganismos, se deben mantener las condiciones que favorezcan el crecimiento de un tipo fisiológico particular de microorganismos, lo que permite favorecer a cierto grupo de microorganismos (Overmann, 2006). Los enriquecimientos se iniciaron a partir de botellas que contenían sedimento y medio de cultivo, y para inocular la transferencia siguiente se usó suspensión (10-20%) o sobrenadante (10-20%) como inóculo. Los resultados indicaron que al realizar la transferencia 1 las botellas que fueron inoculadas con suspensión (20% como inóculo) fueron exitosas, es decir, mostraron la producción de H<sub>2</sub>S, indicativo de actividad sulfato-reductora (Fig 4.1 A). En contraste las botellas que fueron inoculadas con sobrenadante (10 o 20% de inóculo) presentaron valores mínimos de producción de sulfuro y poco

consumo de sustrato (Fig 4.1 B).



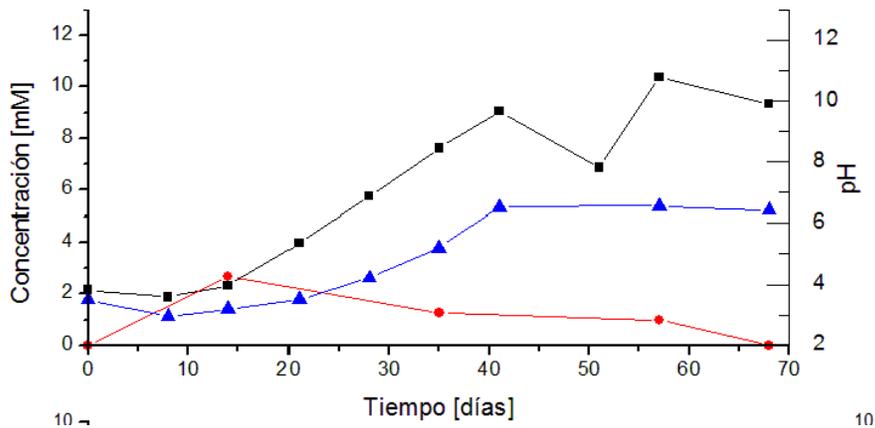
**Figura 4.1** Perfiles de producción de sulfuro (cuadrado), consumo de sustrato lactato (círculo) y pH (triángulo). A) botella inoculada con 20% de suspensión. B) botella inoculada 20% de sobrenadante. Los datos corresponden a la transferencia 1.

Se observa que el cultivo inoculado con 20% de suspensión produjo más de 10 mM de sulfuro a los 36 días (Figura 4.1A), así como un consumo completo del sustrato que era lactato. Si recordamos la ecuación 1.2, cuando se oxida la materia orgánica se reduce sulfato y se produce sulfuro, entonces la producción de sulfuro asociada con el consumo de sustrato indica que se está llevando a cabo el proceso de sulfato-reducción no asimilativo (Madigan et al., 1997; Kaksonen A. et al., 2004; Papirio et al., 2007, 2013). Con respecto al pH se observa que aumentó gradualmente desde el pH inicial de 3.0 hasta aproximadamente un pH de 6.0. En la botella que fue inoculada con 20% de sobrenadante (Fig. 4.1B) se observa que la producción de sulfuro fue mínima únicamente llegando a un valor cercano de 6 mM, el consumo de sustrato (lactato) no fue significativo, asimismo se observa que el pH se mantuvo

alrededor del mismo valor, lo que indicaba que en dicho cultivo no había un proceso de sulfato-reducción importante, posiblemente por la poca concentración de BSR presentes en el sobrenadante que se usó como inóculo.

En el caso del grupo 2, a partir de los 20 cultivos iniciales (sedimento + medio) se tomó 10% de sobrenadante como inóculo, 5 de las botellas que utilizaron glicerol como donador de electrones, presentaron actividad sulfato-reductora. En la Figura 4.2 (como ejemplo), se pueden observar los perfiles de producción de sulfuro y consumo de acetato, en estos cultivos se usó glicerol como sustrato por lo que el acetato que se observa provino de la oxidación incompleta del glicerol, también se presenta la evolución del pH. Se puede observar que a los 68 días se utilizó el acetato producido, aunque no se pudo dar seguimiento a la evolución de la concentración de glicerol se puede inferir que este se consumió incompletamente ya que se observó la producción de acetato. En los cultivos inoculados con 20% de suspensión (Figura 4.1) se pueden observar los perfiles de consumo de sustrato, aumento de pH y producción de sulfuro. El consumo de sustrato al utilizar 20% de suspensión fue más rápido que el utilizar 10% de sobrenadante, es por esta razón que se eligió tomar como inóculo 20% de suspensión para las siguientes transferencias, ya que como había sido reportado para obtener un consorcio el tamaño de inóculo tiene que ser mayor al 15% (Overmann, 2006).

Se puede observar que tanto en la Figura 4.1A y 4.2 el incremento de pH, independientemente del grupo al cual perteneciera, aumentó hasta un valor de pH cercano a 7.0 lo cual puede deberse a la liberación de  $\text{HCO}_3^-$  al medio y a que el pKa del sulfuro es 6.9 y esto podría contribuir a que el pH aumente. En contraste se puede observar que en la Figura 4.1.B en la cual no hubo consumo de sustrato, ni producción de sulfuro y por lo tanto no hubo producción de bicarbonato, que esta asociado a la actividad sulfato-reductora, no aumentó el valor del pH (Madigan et al., 1997; Kaksonen et al., 2004; Papirio et al., 2007,2013).



**Figura 4.2** Perfiles de producción de sulfuro (cuadrado), consumo de sustrato acetato (círculo) y aumento de pH (triángulo). Botella inoculada con 10% de suspensión, donador de electrones glicerol. Los datos corresponden a la transferencia 1.

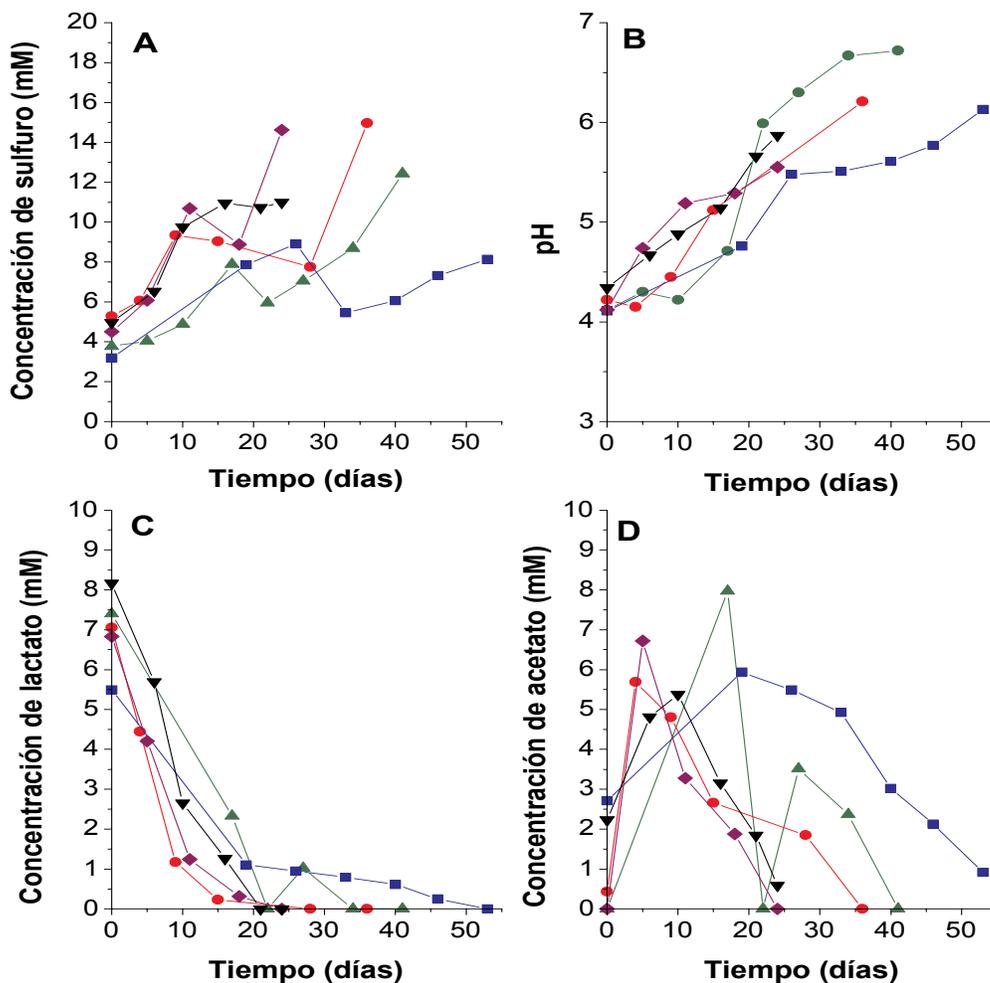
#### 4.2 Transferencias sucesivas de los enriquecimientos

El objetivo principal de este trabajo fue obtener consorcios sulfato-reductores ácido tolerantes capaces de consumir acetato. Con esto en mente, una vez que se realizaba una nueva transferencia se daba seguimiento a la producción de sulfuro, incremento de pH y al consumo de sustrato; si el cultivo en cuestión mostraba producción de sulfuro y consumo completo de acetato se realizaba una nueva transferencia sucesiva.

De esta forma se aseguraba que la sulfato-reducción consumidora de acetato se mantuviera. Siguiendo esta metodología se lograron hacer 5 transferencias, de las cuales se obtuvieron sólo 7 consorcios, capaces de consumir acetato y producir sulfuro. Cada uno de estos consorcios resultó ser único, es decir no se tenían duplicados del mismo. El seguimiento de la sulfato-reducción mediante la cuantificación de la producción de sulfuro y consumo de sustrato ha sido reportado por otros autores (Sánchez-Andrea et al., 2013; Celis et al., 2008; Montoya, et al., 2012) los cuales relacionaron que el consumo de sustrato está acoplado a la producción de sulfuro y así poder dilucidar si se está llevando a cabo actividad sulfato-reductora. En la Figura 4.3, a modo de ejemplo, se

presentan los resultados del Consorcio 1, donde se muestran los perfiles del consumo de sustrato (lactato), producción de sulfuro e incremento de pH durante las cinco transferencias. También se presentan los perfiles de la concentración de acetato que es producto de la oxidación incompleta del lactato por sulfato-reducción. Cada serie representa un cultivo diferente, único y originado de un enriquecimiento particular. Se observa que en todas las transferencias se pudo corroborar que había consumo de acetato y producción de sulfuro. Con respecto al lactato éste se consumió en su totalidad ya que después del día 30 (Fig. 4.3C) y como resultado de su oxidación incompleta se observó la producción de acetato, posteriormente ese acetato también se consumió (Fig. 4.3D).

Los perfiles correspondientes de producción de sulfuro, pH, consumo de lactato y de acetato para los Consorcios 2, 3, 4, 5, 6, y 7, resultaron ser muy similares y se presentan en detalle en el Anexo 1. De estos resultados también se observó que a partir de la tercera transferencia se comenzó a observar una tendencia más homogénea tanto en la producción como en el consumo de sustrato.



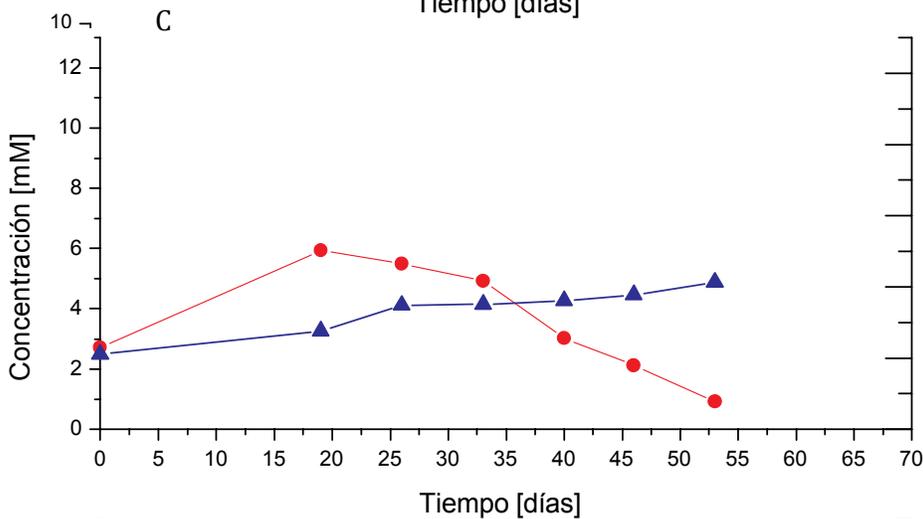
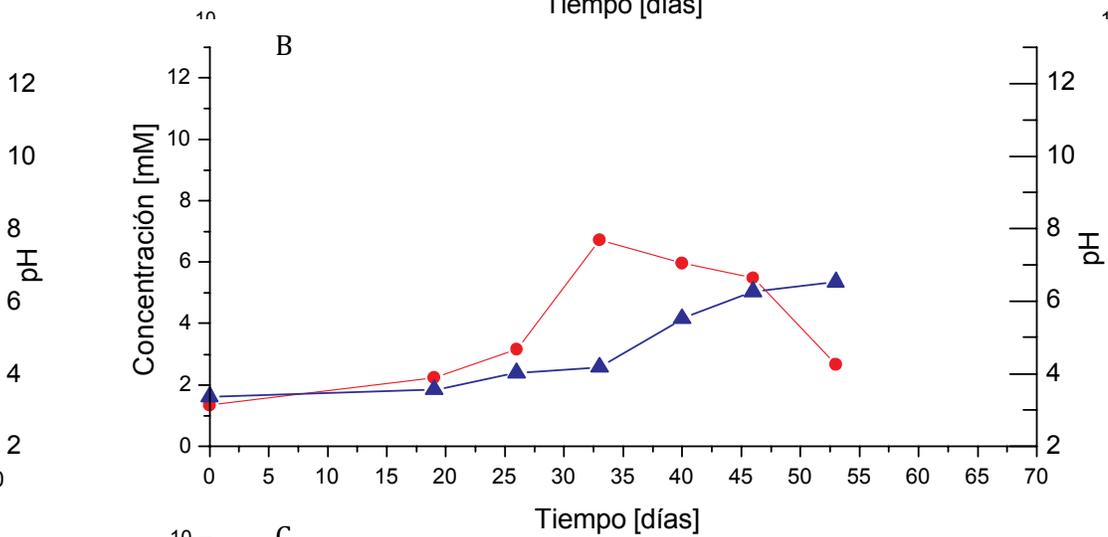
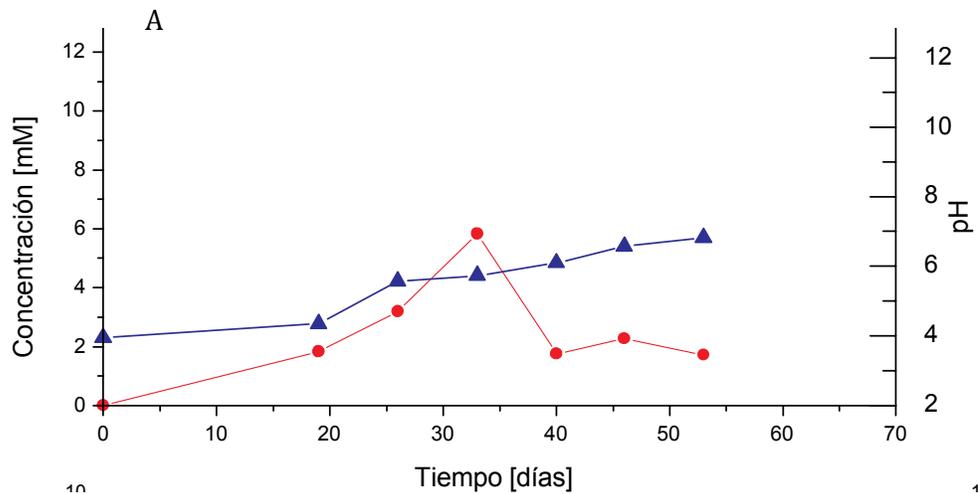
**Figura 4.3** Perfiles del Consorcio 1. A) producción de sulfuro; B) pH; C) consumo de lactato y D) consumo de acetato. Cada serie representa una transferencia distinta. Triángulo: transferencia 1, círculo: transferencia 2, cuadrado: transferencia 3, rombo: transferencia 4 y triángulo invertido: transferencia 5.

### 4.3 Consumo de acetato

Aunque se usó acetato como único sustrato o donador de electrones, este sustrato no fue favorable para obtener cultivos de consorcios con actividad sulfato-reductora. Sin embargo, a partir del uso de glicerol o lactato como donador de electrones se pudo observar el consumo de acetato. Dicho acetato fue producto de la oxidación incompleta del lactato o glicerol de los consorcios recuperados. En este estudio se pudo observar a lo largo de las 5 transferencias que el acetato producido era consumido a un pH >5.5, esto fue observado en ambos grupos de enriquecimientos, es decir los cultivados a pH inicial de 3 ó 4.

Para ejemplificar este comportamiento, en la Figura 4.4 se presentan los perfiles de acetato obtenidos en la transferencia 3 y que corresponden a tres distintos consorcios, cultivados ya sea con lactato o glicerol como sustratos. Se puede apreciar que se obtuvo una acumulación de acetato desde el día 15 y en un periodo de 41 días, los diferentes consorcios llegaron a consumir completamente el acetato. También se observó que la acumulación máxima de acetato ocurrió entre los días 30 y 35 en los cuales el pH fue mayor a 4.4. El valor de pH de 5.5 supera el pKa del ácido acético, lo que disminuyó su toxicidad y por lo tanto los diferentes consorcios fueron capaces de consumir el acetato.

De forma general se puede decir que los ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético, entre otros) son inhibitorios a pH bajo ( $< 4.0$ ) ya que pueden atravesar la membrana celular cuando están en su forma no disociada y bajar el pH intracelular. Su toxicidad depende de sus constantes de disociación. Por ejemplo, el pKa del ácido láctico es 3.08 y el del ácido acético es de 4.38. Si recordamos las botellas del Grupo 1 tenían un pH inicial de 4 y las del Grupo 2 un pH inicial de 3, lo que representó una limitante, sin embargo el objetivo del trabajo era precisamente poder recuperar consorcios sulfato-reductores a dichos valores de pH ya que son cercanos a los valores de pH de los drenajes ácidos de mina (Koscorreck et al, 2004; Kimura S. et al., 2005). Sánchez-Andrea y colaboradores (2003) reportaron la inhibición de la actividad sulfato-reductora por ácido láctico a un pH menor a 4.5, sin embargo reportaron que los sustratos no iónicos (glicerol,  $H_2$  y metanol) permitieron la reducción de sulfato a un valor de pH 4.0. Dada la complejidad del glicerol y que no es tóxico a pH ácido, debido a que no se ioniza, éste ha sido utilizado para obtener consorcios sulfato-reductores provenientes de ambientes naturales (Kimura et al., 2005; Qatib et al., 1991; Sánchez-Andrea et al., 2013).



**Figura 4.4** Perfiles de concentración de acetato (círculo) y de evolución del pH (triángulo) de tres distintos enriquecimientos. A) Enriquecimiento alimentado con glicerol. B) y C) Enriquecimientos alimentados con lactato. Todos los perfiles que se presentan tienen un origen distinto y corresponden a la transferencia 3. El acetato que se muestra es producto de la oxidación incompleta del glicerol o lactato.

#### 4.4 Comparación del desempeño entre las transferencias 1 y 5

Los cultivos que mostraron producción de sulfuro y consumo de acetato después de cinco transferencias sucesivas fueron 7, los cuales se enlistan a continuación en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1** Nomenclatura del consorcio obtenido en la transferencia 5, sustrato y tratamiento aplicado para obtenerlo.

Nomenclatura consorcio	Sustrato	Tratamiento
1	Lactato	Grupo 1 pH inicial 4 (inóculo 20%)
2	Lactato	Grupo 1 pH inicial 4 (inóculo 20%)
3	Lactato	Grupo 1 pH inicial 4 (Inóculo 20%)
4	Lactato	Grupo 2 pH inicial 3 (Inóculo 20%)
5	Lactato	Grupo 2 pH inicial 3 (Inóculo 20%)
6	Lactato	Grupo 2 pH inicial 3 (Inóculo 20%)
7	Glicerol	Grupo 2 pH inicial 3 (Inóculo 10%)

Con la finalidad de comparar los consorcios obtenidos se calcularon las velocidades de consumo de sustrato y producción de sulfuro a partir de los perfiles que se presentan en el Anexo 2. Las velocidades obtenidas se presentan en la Tabla 4.2, y corresponden a las velocidades de producción de sulfuro, así como a las velocidades de consumo de acetato y lactato. Además se pudo comparar la fase lag o fase de retardo que es donde los microorganismos se aclimatan y logran adecuarse a las condiciones del medio.

Las velocidades sirvieron para comparar el desempeño de los cultivos en la transferencia 1 y la última transferencia, siendo ésta la 5. Como podemos

observar en la Tabla 4.2 en todos los casos la fase lag disminuyó a más de la mitad debido a que en la Transferencia 1 la comunidad no estaba especializada y se encontraban mas microorganismos los cuales podían competir por el sustrato, en cambio en la transferencia 5, los microorganismos sulfato-reductores ya se habían seleccionado. La mayor diferencia, en la duración de la fase lag, se observó en el consorcio 7 ya que de tener una fase lag de 20 días disminuyó a menos de 5 días, lo que puede indicar que el cultivo a lo largo de las transferencia se fue seleccionando hacia un consorcio predominantemente sulfato-reductor.

**Tabla 4.2** Velocidades de producción de sulfuro de los consorcios obtenidos y duración de la fase lag.

Nomenclatura consorcio	Fase lag (días)	Velocidad de producción de sulfuro (mM /día)	Velocidad de consumo de acetato (mM/día)	Velocidad de consumo de lactato (mM/día)
1 (lactato) (Transferencia 1)	11	0.14	0.34	0.22
1 (lactato) (Transferencia 5)	5	0.47	0.35	0.33
2 (lactato) (Transferencia 1)	12	0.40	0.38	0.19
2 (lactato) (Transferencia 5)	5	0.26	0.30	0.39
3 (lactato) (Transferencia 1)	11	0.35	0.37	0.19
3 (lactato) (Transferencia 5)	5	0.44	0.39	0.28
4 (lactato) (Transferencia 1)	13	0.53	0.18	0.12
4 (lactato) (Transferencia 5)	5	0.21	0.47	0.21
5 (lactato) (Transferencia 1)	11	0.20	0.36	0.28
5 (lactato) (Transferencia 5)	5	0.75	0.35	0.80
6 (lactato) (Transferencia 1)	7	0.96	0.53	0.44
6 (lactato) (Transferencia 5)	5	0.62	0.56	0.56
7 (glicerol) (Transferencia 1)	20	0.56	0.22	-
7 (glicerol) (Transferencia 5)	<5	0.77	0.56	-

Como podemos observar en 4 de los 7 consorcios (consorcios 1, 3, 5, y 7) la velocidad de producción de sulfuro fue mayor en la transferencia 5 que en la transferencia 1, lo que nos podría indicar que los consorcios eran más especializados.

Sin embargo este no fue el caso para los consorcios 2, 4 y 6, ya que se obtuvo una mayor velocidad de producción de sulfuro en la transferencia 1, esto podría ser explicado ya que en la transferencia 1 aún se contaba con sedimento, el cual pudo actuar como micro-nicho de algunos microorganismos los cuales podrían facilitar su supervivencia o las asociaciones entre ellos que promoverían la actividad sulfato-reductora (Kaksonen et al., 2004; Sousa et al., 2014).

En aquellos consorcios en los que se obtuvo mayor velocidad de producción de sulfuro en la transferencia 5, posiblemente la comunidad que se encontraba presente en la transferencia 1 estaba menos especializada en cuanto a la actividad sulfato-reductora y el sustrato podría haberse consumido por otros microorganismos. En cambio en la transferencia 5 la comunidad microbiana se especializó más, ya que se observó que el consumo de sustrato estaba acoplado a la producción de sulfuro y era capaz de llevar a cabo el proceso de sulfato-reducción preferentemente.

Cuando se analizaron los perfiles de consumo de lactato y acetato, así como los de la producción de sulfuro (Anexo 2), se pudieron corroborar las ventajas de utilizar un consorcio sulfato-reductor, ya que permitió la degradación de compuestos complejos (glicerol o lactato) y tóxicos o inhibitorios (acetato a pH ácido) hasta su mineralización. Los consorcios obtenidos en la transferencia 5 presentaron una disminución en el tiempo de producción de sulfuro y consumo de sustrato (glicerol o lactato) en comparación de sus correspondientes en la transferencia 1, lo que también sugiere la especialización de los consorcios.

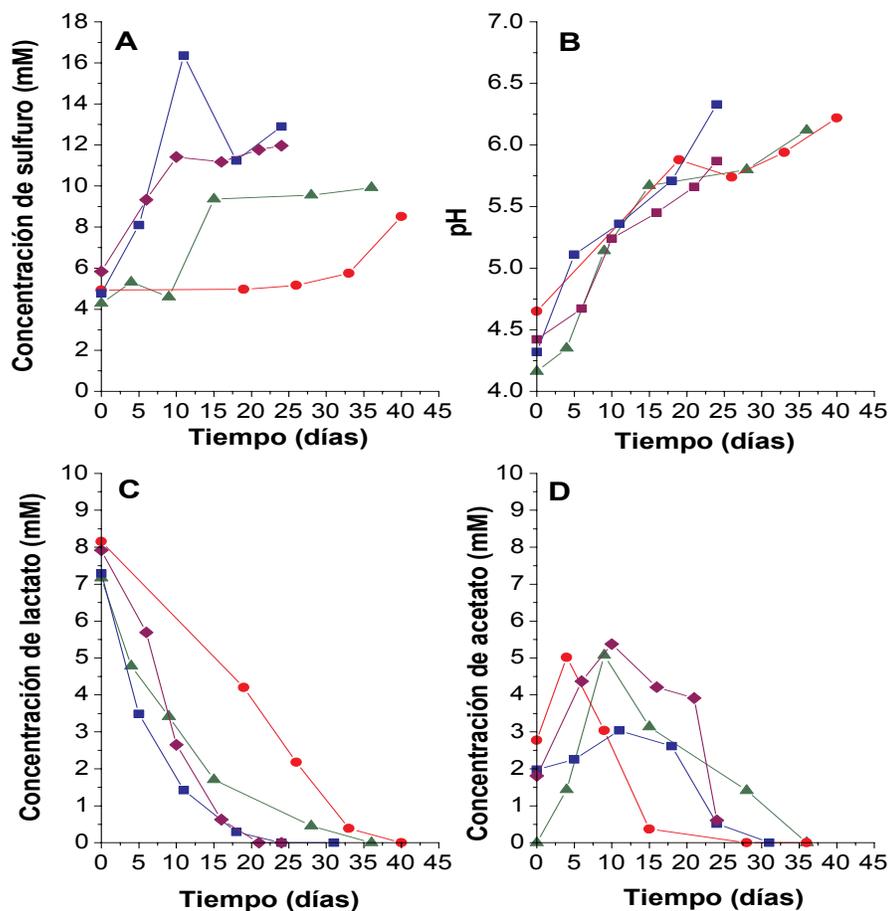
#### **4.5 Comprobación de la actividad sulfato-reductora**

Para corroborar la actividad sulfato reductora de los consorcios que se iban obteniendo mediante las diferentes transferencias, se les añadió medio de cultivo nuevamente a las botellas que cumplían con los parámetros necesarios (producción de sulfuro, consumo de sustrato e incremento de pH) y a partir de las cuales ya se había hecho una nueva transferencia.

Se obtuvieron los perfiles para cada una de las botellas antes descritas, en cada una de las botellas que se les repuso medio se pudo comprobar la actividad sulfato-reductora que ocurría nuevamente, el consumo de sustrato estaba acoplado a la producción de sulfuro y aumento de pH. Esto se hizo con el afán de conocer si esta actividad era reproducible y por lo tanto los cultivos que se iban obteniendo eran capaces de conservar su actividad en estas condiciones.

Esto deriva la importancia de cultivar microorganismos recuperados de ambientes naturales y que estén aclimatados a condiciones adversas como son las altas concentraciones de sulfato y un pH ácido. Se sabe que a partir de consorcios cultivables se podrá obtener más información acerca de los microorganismos presentes y podrían ser usados en aplicaciones biotecnológicas (Vartoukian et al., 2010; Overmann, 2006). En la Figura 4.5, a manera de ejemplo, se presentan los perfiles correspondientes a la reposición de medio, que se realizó a cada una de las transferencias, para obtener el consorcio 1, los perfiles de los demás consorcios se encuentran en el Anexo 3.

Como se puede observar en la Figura 4.5, se corroboró la reproducibilidad del de la producción de sulfuro y consumo de sustrato, la única diferencia notable entre cada una de las transferencias fue el tiempo en el cual se consumió el sustrato y se produjo sulfuro. Por ejemplo, las transferencias 3 y 4 presentan similitud en cuanto al comportamiento para llevar a cabo el consumo completo de sustrato, también se puede observar la disminución del tiempo en cada una de las transferencias esto se debe a que el consorcio era más especializado en llevar a cabo la sulfato-reducción.

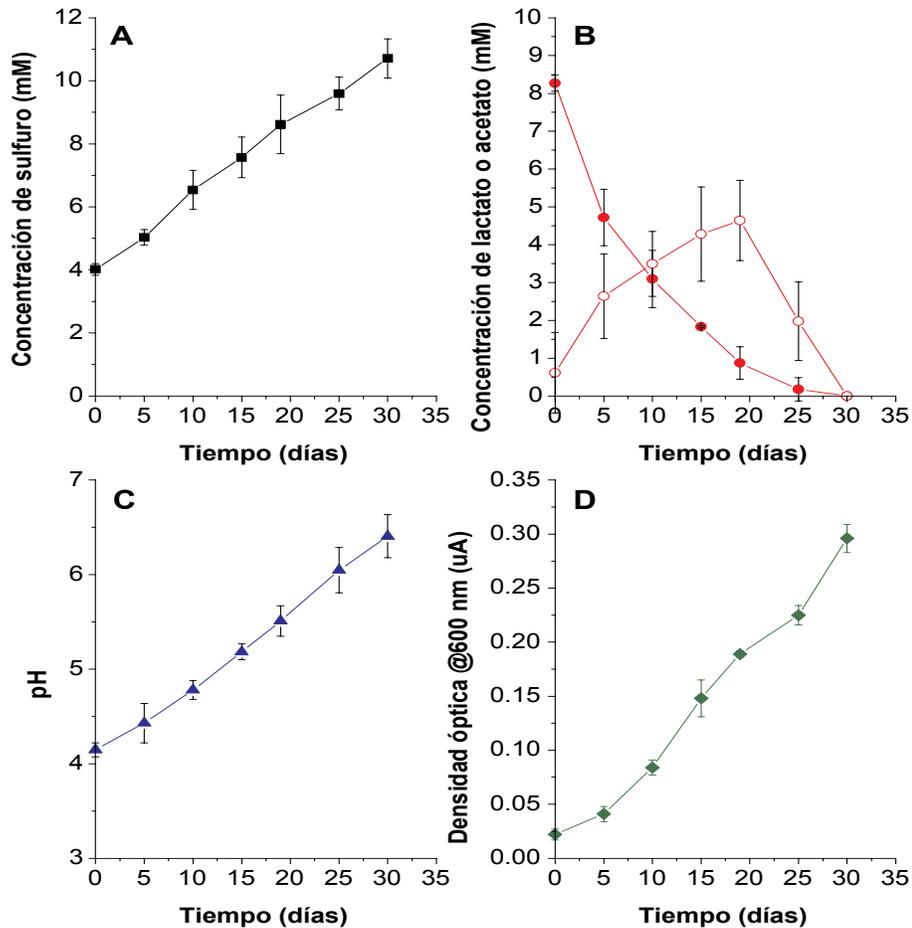


**Figura 4.5** Perfiles de las distintas transferencias después de la reposición del medio para comprobar la actividad sulfato-reductora. A) producción de sulfuro; B) pH; C) consumo de lactato; D) concentración de acetato. Cada serie representa un cultivo distinto. Triángulo: transferencia 1, círculo: transferencia 2, cuadrado: transferencia 3 y rombo: transferencia 4. Los datos corresponden al Consorcio 1.

#### 4.6 Perfiles cinéticos de los consorcios finales

Para corroborar la actividad de los 7 consorcios obtenidos se realizó una nueva transferencia, esta vez se inoculó por triplicado tomando como inóculo la transferencia 5. A continuación únicamente se muestra un ejemplo que corresponde al Consorcio 1 (Figura 4.6). Los datos de los demás consorcios (Consortios 2 a 7) se muestran en el Anexo 4 de este trabajo. A partir de las cinéticas se calcularon las velocidades de consumo de acetato y de producción de sulfuro, los datos se muestran en la Tabla 4.3 y lo que se pudo observar es

que estos valores se encuentran en el mismo orden de magnitud que los que se habían obtenido en la transferencia 5 sin réplicas (Tabla 4.2), lo anterior indica la reproducibilidad del comportamiento entre las últimas transferencias y lo más importante es que la actividad sulfato-reductora se mantuvo en los cultivos, de tal forma que se pueden considerar consorcios cultivables y estables.



**Figura 4.6** Perfiles por triplicado. A) producción de sulfuro (cuadro); B) concentración de sustrato lactato (círculo relleno) y acetato (círculo sin relleno), C) pH (triángulo) y D) densidad óptica (rombo). Los datos corresponden al Consorcio 1 alimentado con lactato.

Como se puede observar en la Figura 4.6, se repite la actividad sulfato-reductora antes descrita en la transferencia 5, esto ocurre en todos los consorcios desde el 1 hasta el 7 (datos Anexo 4), en donde podemos observar los puntos más importantes que son el consumo de sustrato sea lactato o glicerol y la

producción y posterior consumo de acetato. En todos los casos se puede observar una acumulación de acetato y su consumo de acetato a un pH de 5.5, también se puede observar que la producción de sulfuro esta acoplada al consumo de sustrato. Asimismo, se observa que el crecimiento celular estuvo acoplado a la producción de sulfuro, lo que nos indica la generación de biomasa conforme se consumía el sustrato. Los valores de densidad óptica pueden parecer bajos, sin embargo se sabe que una de las dificultades de cultivar microorganismos anaerobios es precisamente su lento crecimiento ya que obtienen solo una pequeña cantidad de energía para crecimiento (Sekiguchi 2006). En los microorganismos anaerobios mediante cálculos de bioenergética se ha determinado que la mayoría del sustrato es utilizado para mantenimiento (80% de los electrones que podrían donarse), en cambio para síntesis de biomasa se destina solo un 20% de dichos electrones (Ritmann y McCarty, 2001). Esto coincide con lo reportado por Sánchez-Andrea y colaboradores (2015), donde reportaron una densidad óptica de 0.14, para un cultivo puro de *Desulfosporosinus acididurans* recuperado de un ambiente natural a pH ácido. La velocidad de consumo de acetato que se muestra en la Tabla 4.3 no es exclusiva de las BSR, ya que también incluye el consumo de acetato debido a otros microorganismos que forman parte de los consorcios obtenidos a partir de la última transferencia, lo que sugiere la posible diversidad de microorganismos que forman parte de cada uno de los consorcios.

**Tabla 4.3** Velocidades de producción de sulfuro y de consumo de acetato en los ensayos por triplicado de cada uno de los consorcios ( $\pm$  desviación estándar).

<b>Consorcio</b>	<b>Velocidad de producción de sulfuro (mM Sulfuro/día)</b>	<b>Velocidad de consumo de acetato (mM Acetato/día)</b>
1 (lactato)	0.30 $\pm$ 1.44	0.44 $\pm$ 0.37
2 (lactato)	0.31 $\pm$ 0.30	0.46 $\pm$ 1.21
3 (lactato)	0.52 $\pm$ 0.23	0.42 $\pm$ 1.08
4 (lactato)	0.38 $\pm$ 0.27	0.42 $\pm$ 3.43
5 (lactato)	0.44 $\pm$ 0.38	0.47 $\pm$ 1.09
6 (lactato)	0.38 $\pm$ 0.39	0.40 $\pm$ 0.44
7 (glicerol)	0.76 $\pm$ 0.08	0.55 $\pm$ 0.84

Usando la estequiometria se pudo calcular cuanto sustrato se destinó para llevar a cabo el proceso de sulfato-reducción (Tabla 4.4). Como se puede observar en todos los consorcios más de 50% del sustrato fue consumido para realizar la actividad sulfato-reductora, esto podría explicarse porque se trata de consorcios y no están compuestos únicamente por BSR.

**Tabla 4.4** Porcentaje de sustrato utilizado para realizar sulfato-reducción de los consorcios obtenidos.

<b>Consorcio</b>	<b>Porcentaje de sustrato utilizado para sulfato-reducción [%].</b>
1 (lactato)	53.9 ± 2.17
2 (lactato)	77.8 ± 8.75
3 (lactato)	60.6 ± 4.93
4 (lactato)	59.1 ± 4.54
5 (lactato)	58.3 ± 0.625
6 (lactato)	54.1 ± 2.09
7 (glicerol)	**75.1 ± 3.74

\*\* valor teórico

El consorcio que consumió menos sustrato para realizar la actividad sulfato-reductora fue el Consorcio 1 (53.9 %) y el consorcio que mayor consumo de sustrato tuvo y que se utilizó para realizar sulfato-reducción fue el Consorcio 2 (77.8%). El valor teórico calculado para el Consorcio 7 que se alimentó con glicerol se obtuvo a partir de los valores estequiométricos debido a que no se tenía una lectura experimental inicial de cuanto glicerol se alimentó.

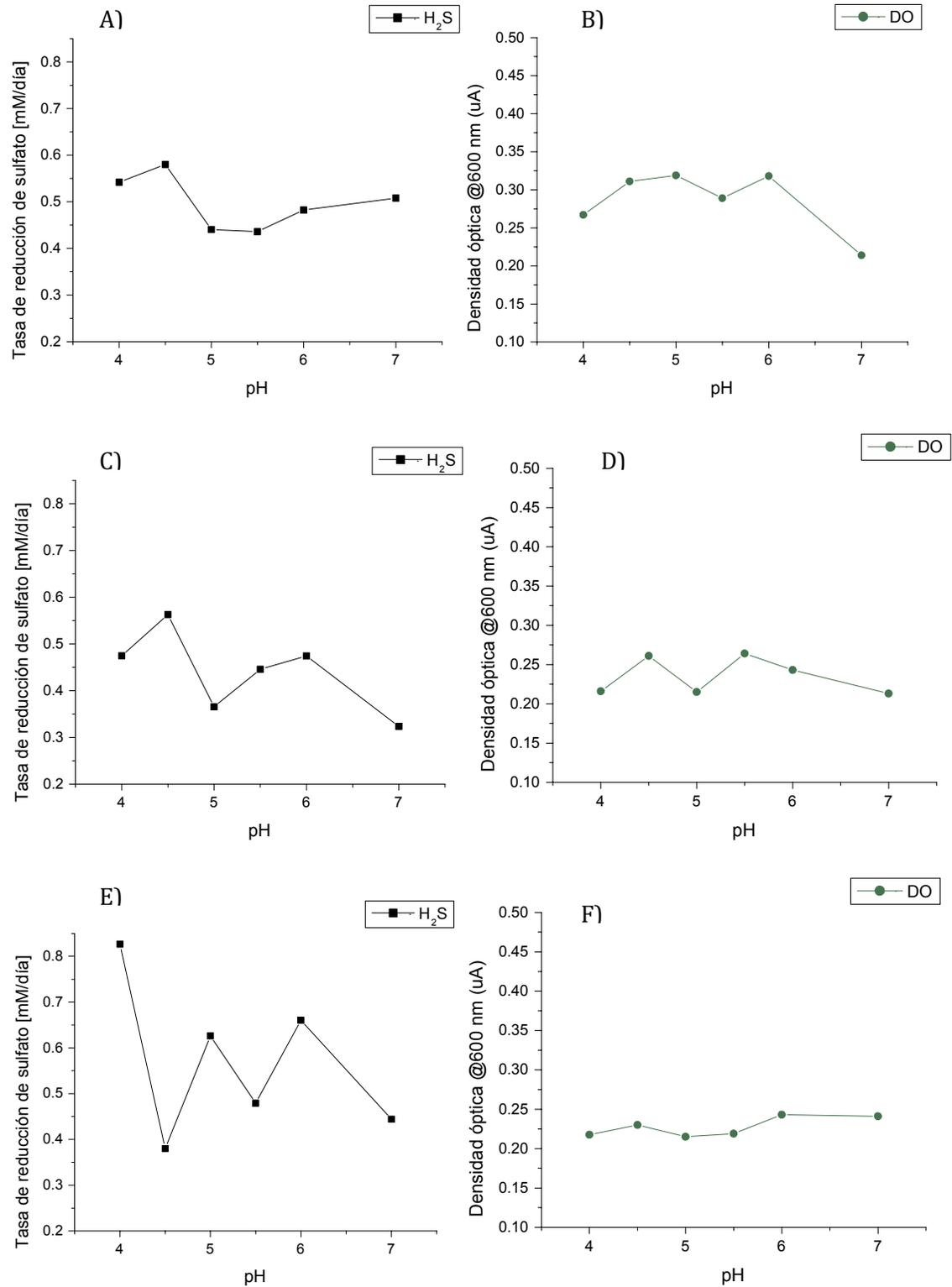
#### **4.7 Determinación del pH favorable para realizar actividad sulfato reductora**

Se hizo un intento para determinar el pH más favorable al cual ocurría la actividad sulfato-reductora. A partir de las cinéticas de sulfato-reducción que se obtuvieron a los distintos valores de pH se calcularon las tasas de reducción de sulfato de cada uno de los consorcios. Se obtuvo la pendiente de la producción

de sulfuro de cada consorcio, también se dio seguimiento al crecimiento celular mediante la densidad óptica. Después de obtener las velocidades de producción de sulfuro con respecto a los distintos pH se intentó encontrar un valor de pH favorable para la sulfato-reducción, sin embargo los resultados no fueron los esperados.

En la Figura 4.7 se muestra la velocidad de producción de sulfuro con respecto al pH de los Consorcios 1, 2 y 3, que fueron inoculados con 20% de suspensión, con lactato como sustrato y su pH inicial fue de 4, también las lecturas finales de densidad óptica (600 nm).

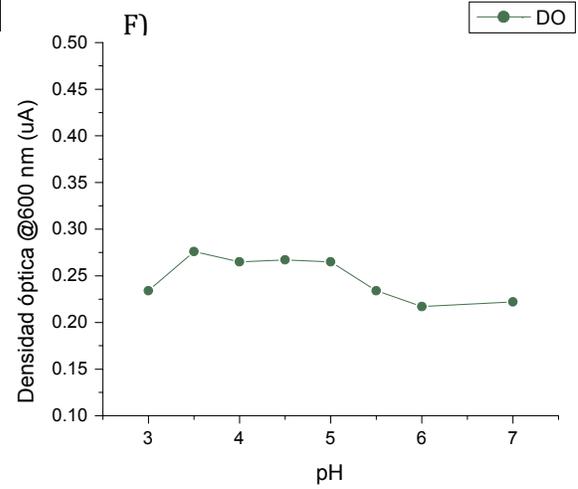
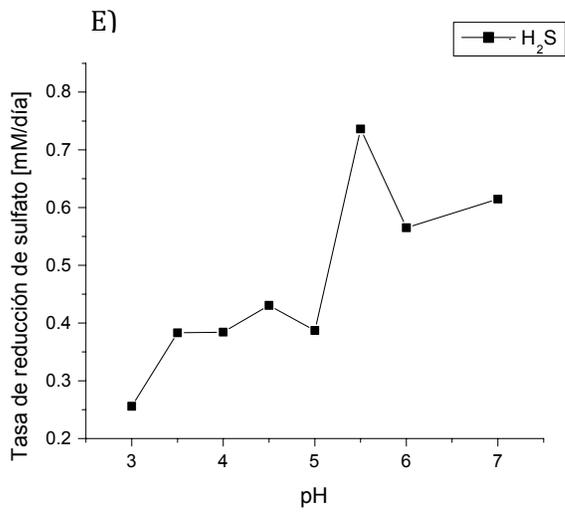
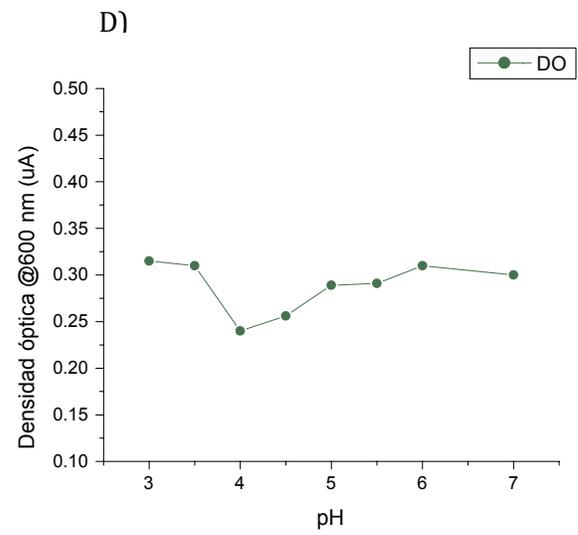
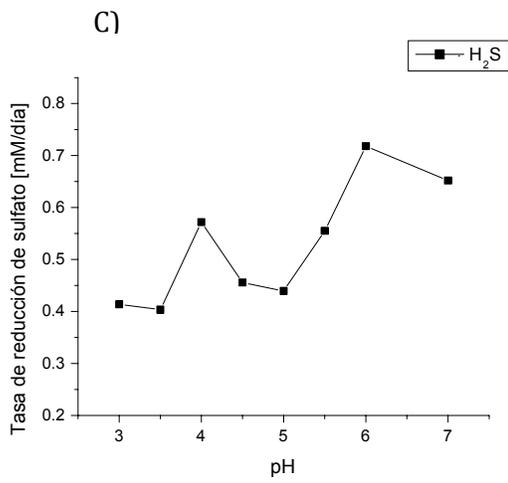
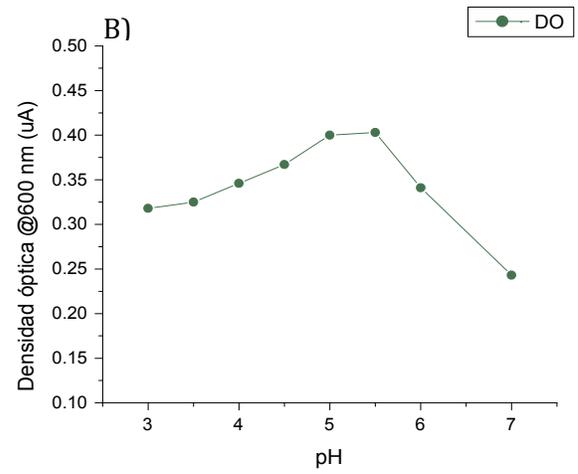
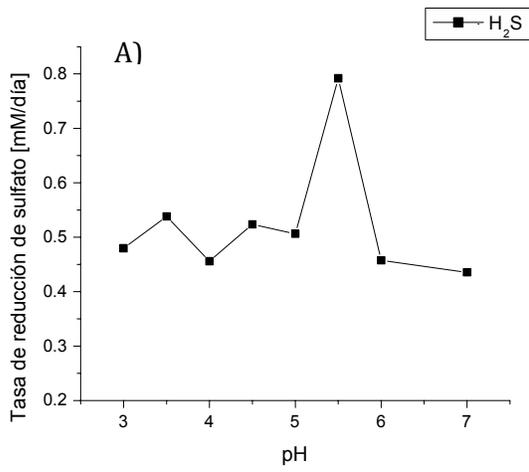
Se observa que los Consorcios 1 y 2 potencialmente coinciden en el pH favorable para realizar la sulfato-reducción que es alrededor de 4.5, para el Consorcio 3 el pH potencialmente favorable sería alrededor de 4. Considerando que la definición convencional de un microorganismo acidófilo es aquel con un pH óptimo de crecimiento de 3, mientras que se consideran acidófilos moderados aquellos microorganismos que crecen óptimamente entre un pH 3 y 6 (Sánchez-Andrea et al., 2014), se podría considerar que estos consorcios son moderadamente acidofílicos (Sánchez-Andrea et al., 2014).



**Figura 4.7.** Tasa de producción de sulfuro (cuadrado) y densidad óptica (círculo) con respecto al pH inicial de los ensayos. A) y B) Consorcio 1; C) y D) Consorcio 2; E) y F) Consorcio 3.

En la Figura 4.8 se muestra la velocidad de producción de sulfuro y densidad óptica con respecto al pH de los Consorcios 4, 5 y 6, que fueron inoculados con 20% de suspensión, utilizaron lactato como sustrato y su pH inicial fue de 3. El pH que potencialmente fue favorable para la producción de sulfuro para los Consorcios 4 y 5 fue de 5.5 y para el Consorcio 6 fue de 6. Por definición los Consorcios 4 y 5 serían moderadamente acidofílicos, mientras que el Consorcio 6 sería ácido tolerante. Lo anterior se podría explicar, ya que si recordamos el pKa del ácido láctico es de 3.08 que era más cercano al valor de pH inicial del cultivo y por lo tanto resultaría tóxico a este pH, lo que podría estar causando inhibición del proceso sulfato-reductor. La principal desventaja del láctico es su oxidación incompleta hasta acetato (50%) y como recordamos en todos los consorcios se acumula acetato lo que también podría causar toxicidad. Las concentraciones de ácidos orgánicos a una concentración menor de 1mM son letales para microorganismos acidofílicos (Koscorreck et al., 2004; Kimura et al., 2005).

En la Figura 4.9 se muestra al Consorcio 7 que fue inoculado con 10% de suspensión, este consorcio utilizó como sustrato glicerol a un pH inicial de 3, en esta figura se muestran las velocidades de producción de sulfuro y lecturas finales de densidad óptica (600 nm), con respecto al pH. No se pudo observar una tendencia clara en el pH que favorecía la velocidad producción de sulfuro, esto podría ser explicado por que el glicerol es una molécula compleja que se ha usado con éxito como sustrato de las BSR, sobre todo cuando éstas se cultivan a pH ácido (pH < 4.0) ya que no se ioniza, sus eficiencias de consumo son mayores de 90% y el acetato residual es menor a 10% (Koscorreck et al., 2004; Sánchez-Andrea et al., 2013). Sin embargo al no ser tóxico o no causar inhibición a pH ácido podría estar favoreciendo otros metabolismos microbianos y no únicamente la actividad sulfato-reductora.



**Figura 4.8.** Tasa de producción de sulfuro (cuadrado) y densidad óptica (círculo) con respecto al pH inicial de los ensayos. A) y B) Consorcio 4; C) y D) Consorcio 5; E) y F) Consorcio 6.

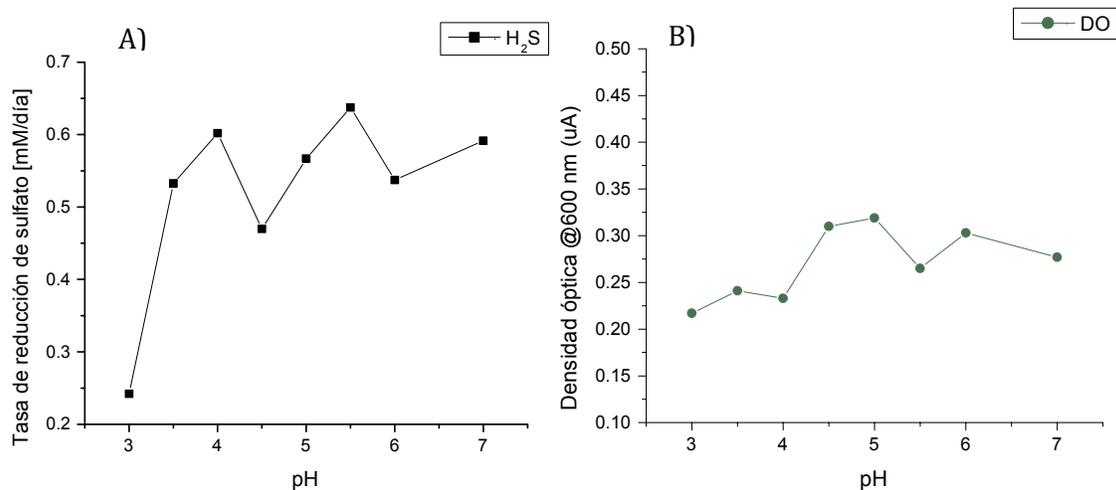
Todos los consorcios sulfato-reductores obtenidos en este trabajo crecieron a pH inicial ácido y tuvieron capacidad de consumir acetato, esto representa una ventaja ya que estos consorcios podrían usarse para tratar el DAM y otros efluentes ácidos.

Estos resultados son comparables a los obtenidos por Sánchez-Andrea y colaboradores (2015) donde se logró aislar *Desulfosporosinus acididurans*, una cepa la cual provenía de un enriquecimiento obtenido de un ambiente natural ácido (Río Tinto, España). Esta cepa consumía diferentes donadores de electrones como son: formiato, lactato, butirato, malato, piruvato, glicerol, metanol y etanol. El pH óptimo de esta cepa fue de 5.5 lo que lo hace un microorganismos moderadamente acidofílico, que es comparable a los consorcios que se obtuvieron en este trabajo. Similarmente en el año 2007, Rampinelli y colaboradores aislaron una cepa *Desulfovibrio fructosovorans* la cual utilizó etanol como donador de electrones y su pH óptimo fue de 4.5, y que la describe como una cepa acidofílica. Estos resultados coinciden en que se utilizó como donador de electrones un sustrato no ionizable como glicerol o etanol, lo cual presentó una ventaja para obtener el consorcio sulfato-reductor a pH ácido. En todos los perfiles obtenidos en la presente tesis, se observó que la velocidad de sulfato-reducción disminuyó entre valores de pH de 4.5 y 5, esto podría estar relacionado con la fuerte inhibición que causa el acetato que se produce y acumula ya que el valor del pKa del ácido acético como ya se mencionó es de 4.8 y a valores de pH iguales o menores que éste puede inhibir la respiración celular (Koscorreck et al., 2004).

El hecho de que no se hayan observado perfiles con un solo valor de pH al cual la velocidad de sulfato-reducción fuera mayor, se debe a la complejidad del sistema. Por un lado el exponer a los consorcios a pH ácido ejercerá un efecto

sobre la comunidad que se reflejará en la velocidad. Al mismo tiempo el sustrato, ya sea lactato o glicerol, tienen otro efecto ya que a partir del consumo de éstos se produce acetato que eventualmente puede tener un efecto negativo sobre la sulfato-reducción. De los perfiles de producción de acetato se observó en todas las transferencias y en todos los consorcios que el acetato se degradó una vez que el pH dentro de las botellas fue mayor a 5.5.

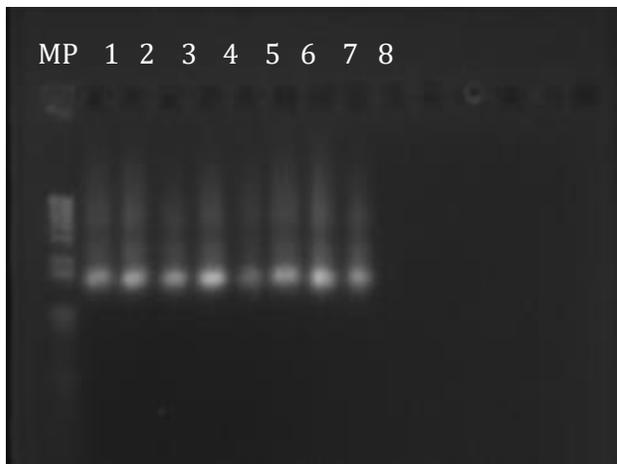
Se pudo observar que el crecimiento celular es posible a pH ácido en todos los consorcios, ya que los microorganismos crecieron aún con las limitaciones del pH y de la acumulación del ácido acético (Figuras 4.7, 4.8 y 4.9). Es por esto que podría decirse que los consorcios obtenidos en esta tesis, son activos a pH ácido y que son cultivables y reproducibles en su actividad, lo que indica su posible aplicación en remediar DAM.



**Figura 4.9.** Tasa de producción de sulfuro (cuadrado) y densidad óptica (círculo) con respecto al pH inicial de los ensayos. A) y B) Consorcio 7.

#### 4.8 Amplificación gen 16 rRNA por PCR

Para caracterizar con métodos moleculares a los consorcios, se amplificó el gen 16s rRNA con los oligos 27F y 1492R y se pudo obtener una banda de aproximadamente 1465 pb la cual se puede observar en la siguiente Figura 4.10



- MP Marcador de Peso
- 1.- Consorcio 1
  - 2.- Consorcio 2
  - 3.- Consorcio 3
  - 4.- Consorcio 4
  - 5.- Consorcio 5
  - 6.- Consorcio 6
  - 7.- Consorcio 7
  - 8.- Control positivo (búlgaros)

**Figura 4.10** Gel de calidad de los productos de PCR.

Después de clonar los productos de PCR, se realizaron las extracciones del DNA plasmídico y se corrieron varios geles (Figuras 4.11, 4.12 y 4.13), para poder observar las bandas correspondientes a la extracción y que realmente se pudo amplificar la región de interés.

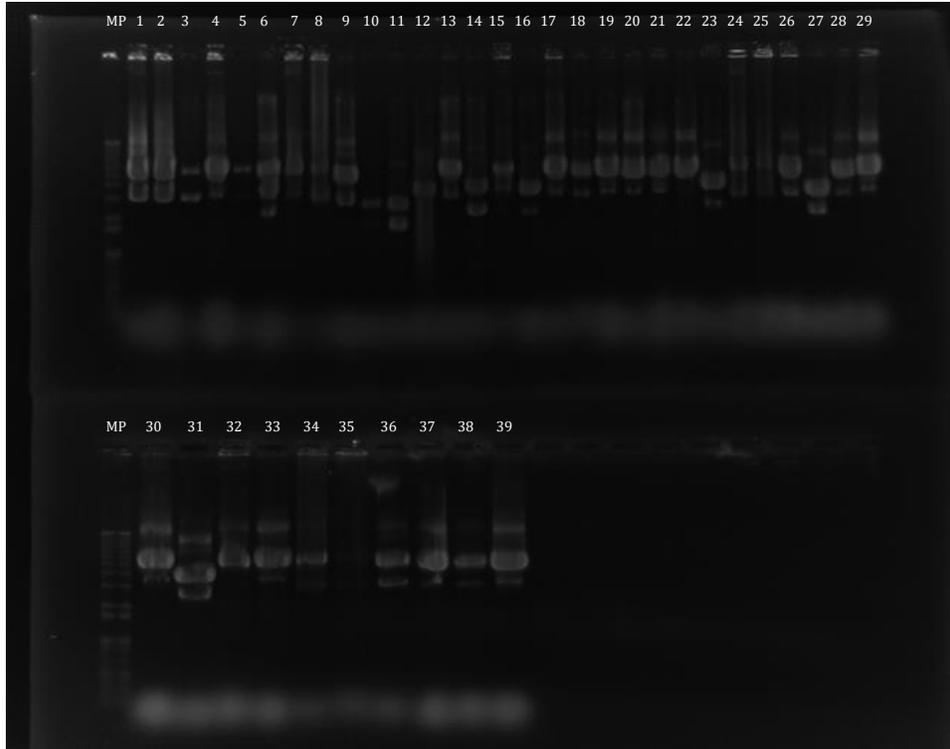
**Tabla 4.5** Número de clonas obtenido y su identificación para cada uno de los consorcios.

Consorcio	Numeración de clonas	Clonas
1	1-23	23
2	24-57	34
3	58-76	19
4	77-96	20
6	97-108	12
7	109-122	14

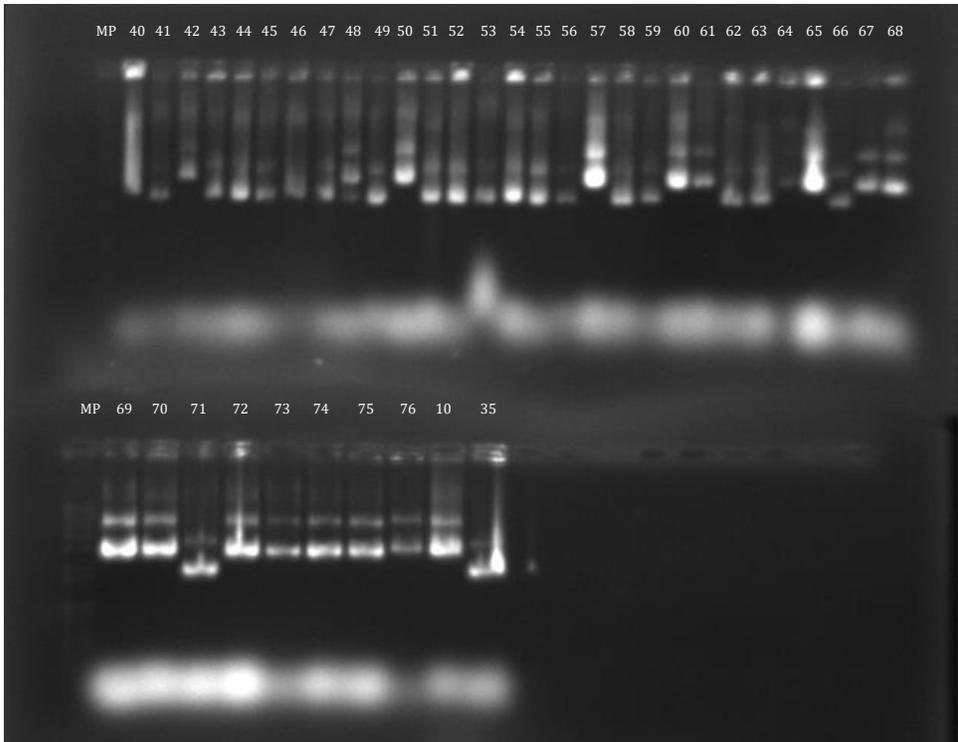
Se pudieron observar las bandas correspondientes de las 122 clonas obtenidas, en la Tabla 4.5 se presenta el número de clonas que se obtuvo para cada uno de los consorcios.

Las clonas que se obtuvieron solamente fueron una representación de los consorcios puesto que únicamente se obtuvieron clonas de 6 de los 7 consorcios

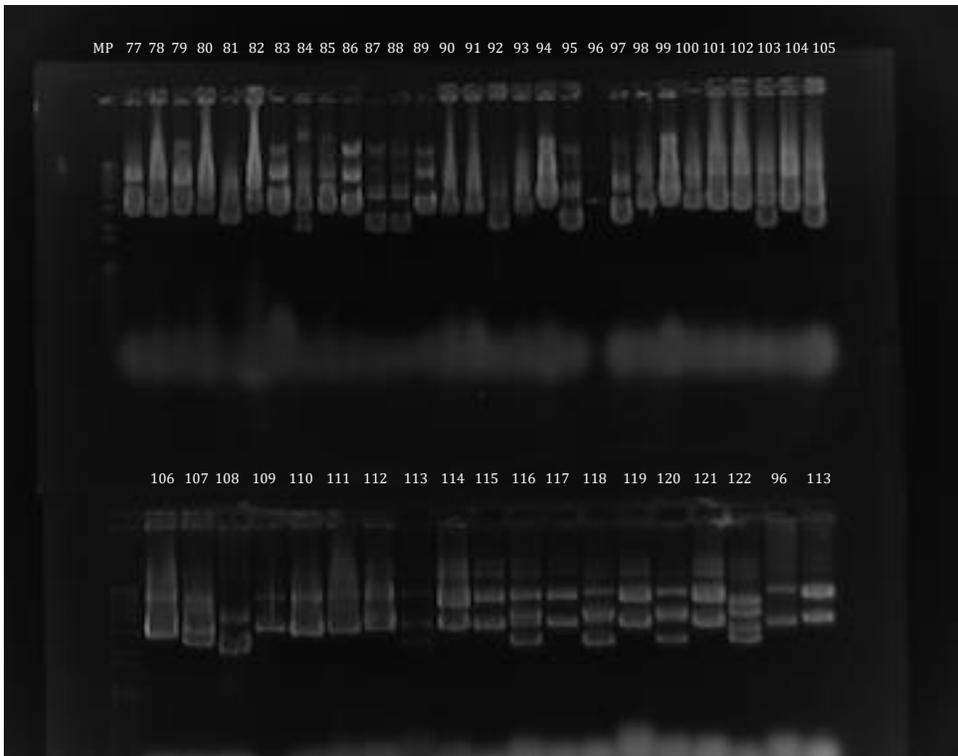
y un aproximado de 20 clonas por consorcio. Es por esto, que sería conveniente realizar una nueva clonación y que sea por triplicado para obtener un mayor número de clonas y así poder tener más certeza al caracterizar los consorcios.



**Figura 4.11** Bandas correspondientes a las clonas 1-39, obtenidas a partir del DNA plasmídico.



**Figura 4.12** Bandas correspondientes a las clonas 40-76, obtenidas a partir del DNA plasmídico.



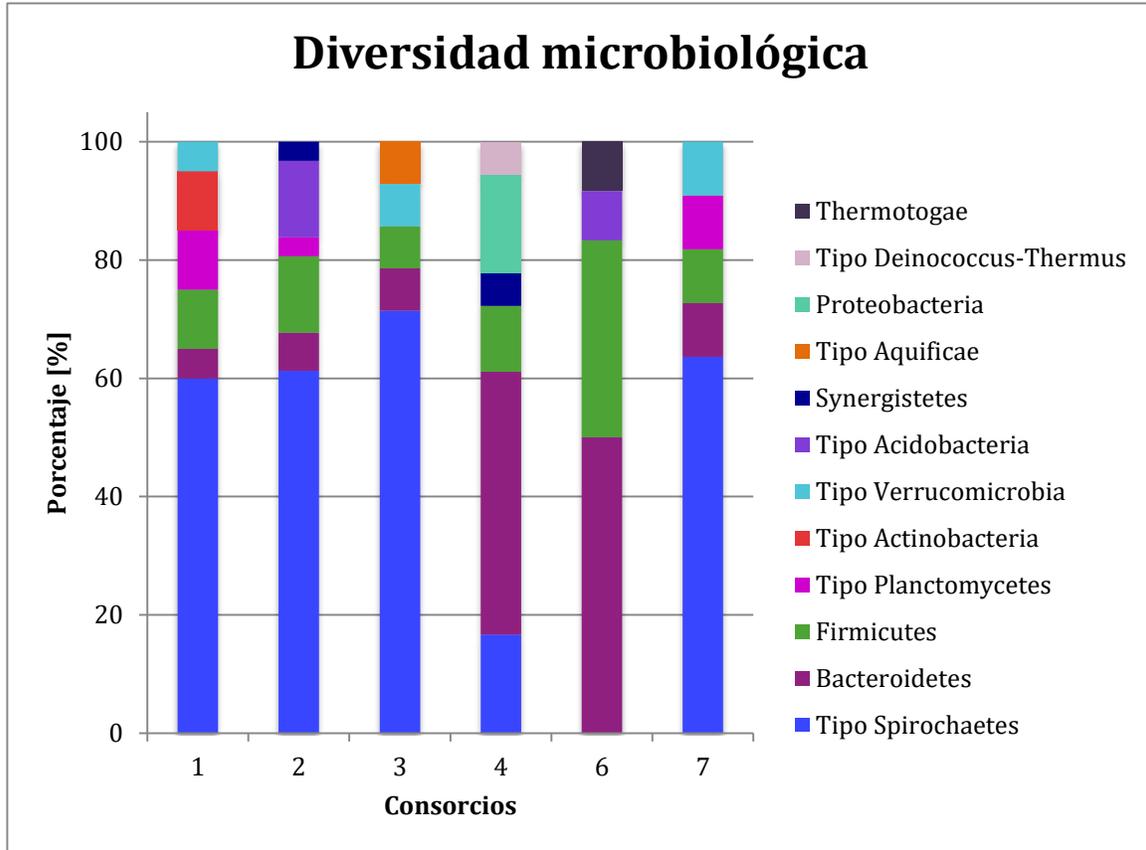
**Figura 4.13** Bandas correspondientes a las clonas 77-122, obtenidas a partir del DNA plasmídico.

#### 4.9 Análisis bioinformático de los consorcios a nivel Phylum

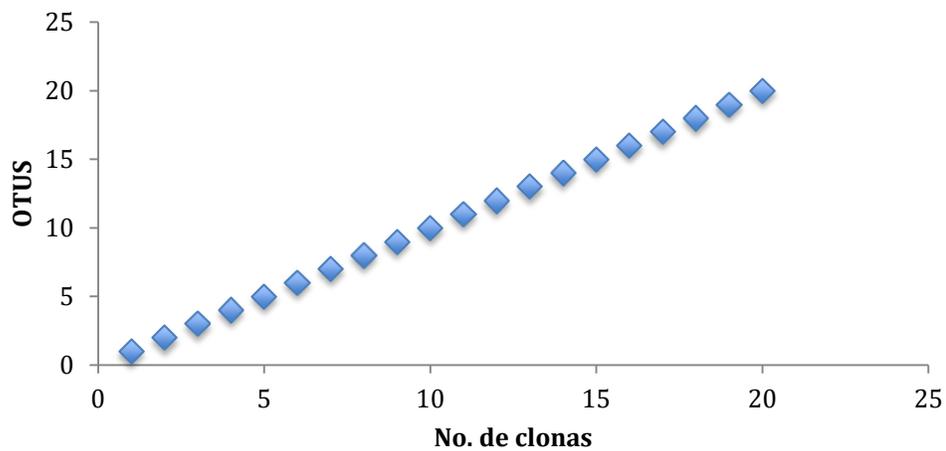
Después de realizar el análisis de las secuencias mediante el software Mothur tomando como molde de alineamiento la base de datos SILVA, se pudo obtener la composición de la comunidad bacteriana de cada consorcio lo cual se muestra en la Figura 4.14, en el Anexo 6 se muestran los porcentajes en forma de tabla para una mayor comprensión. Esta diversidad se obtuvo a nivel de Phylum considerando que los Phylo tipo fueron aquellos que se encontraban en un porcentaje de 70% o de menor similitud. Como antes se mencionó, únicamente se pudieron obtener clonas de 6 de los 7 consorcios de los cuales se obtuvieron 122 secuencias en total. Las 122 secuencias se agruparon en 12 grupos filogenéticos y los resultados indicaron que ninguno de los consorcios estuvo compuesto por más de 7 grupos filogenéticos. El porcentaje de secuencias de tipo *Spirochaetes* fue mayor en 4 de los 6 consorcios analizados ya que representaron más de 60% (consorcios 1, 2, 3, y 7). En contraste en dos de los consorcios las secuencias que refirieron al Phylum Bacteroidetes predominaron en los consorcios 4 y 6 ya que representaron más del 44% (44.5% y 50%) del total. En el consorcio 6 más de 33% de las secuencias fueron del Phylum Firmicutes, este Phylum se encontró presente en el resto de los consorcios con menos de 9% de presencia. Solamente en 3 consorcios se encontraron secuencias del Phylum tipo *Planctomycetes* con un porcentaje menor al 10%. Para el Phylum tipo *Actinobacteria* únicamente el consorcio 1 presentó este Phylum con un porcentaje de 10%. Para el Phylum tipo *Verrucomicrobia* 3 consorcios (1, 3 y 7) presentaron miembros de este Phylum en un porcentaje menor a 9%. El Phylum tipo *Acidobacteria* el consorcio 2 y 6 presentaron clonas de este tipo en un porcentaje cercano al 12%. Los consorcios 2 y 4 presentaron miembros del Phylum *Synergistetes* en un porcentaje no mayor a 5%. Varios Phylo únicamente fueron representados en un consorcio como se describe a continuación. Del Phylum tipo *Aquificae* únicamente el consorcio 3 lo presentó en un porcentaje de 7%. Así también para el Phylum tipo *Proteobacteria* el consorcio 4 fue el único consorcio que lo presentó con un porcentaje de 16%. Para el tipo *Deinococcus-Thermus* el

consorcio 4 también lo presentó en un porcentaje de 5%. Por último el Phylum *Thermotogae* estuvo presente en el consorcio 6 con un porcentaje de 8%. Al analizar los phylo obtenidos se encontró que por lo menos se encuentran 4 phylo en cada consorcio, el Consorcio 2 fue el que mas grupo de phylo representó teniendo 6.

Para cada uno de los consorcios se obtuvieron las curvas de rarefacción únicamente se muestra la curva para el Consorcio 1 (Figura 4.15), las curvas de los demás consorcios se pueden encontrar en el Anexo 9, en estas curvas se observa que el esfuerzo de muestreo no fue suficiente para poder determinar la composición de la comunidad de cada consorcio. Es por esto que sería pertinente realizar nuevamente los ensayos de clonación teniendo en cuenta que para lograr una representación mayor de cada uno de lo consorcios tendría que hacerse por triplicado. Esta estrategia de clonación no se realizó inicialmente porque se consideró que el esfuerzo realizado fue el suficiente. Sin embargo la información que se obtuvo aunque fue limitada proporcionó un panorama general de la composición de los consorcios.



**Figura 4.14** Composición de la comunidad bacteriana de los diferentes consorcios obtenida mediante PCR-clonación de 1465 pb del gen 16S rRNA.



**Figura 4.15** Curva de rarefacción de las clonas obtenidas para el Consorcio1.

Aunque como se puede observar en la Figura 4.14, en 5 consorcios se encontraron secuencias tipo Spirochaetes estas secuencias no alcanzaron un porcentaje de similitud mayor a 20%, por lo que se podría sugerir que dichas secuencias aún no han sido descritas o que podrían tratarse microorganismos no cultivables.

#### **4.10 Análisis bioinformático de los consorcios a nivel de género**

Posteriormente las secuencias se alinearon con el programa Mothur, a partir de una base de datos para 16S rRNA y se pudo obtener mayor información acerca de las secuencias. En ciertos casos se logró obtener hasta el género de la clona, como se puede apreciar en el Anexo 5.

Contrario a lo que se esperaba se recuperaron muy pocas secuencias similares a BSR mediante la clonación del gen 16S rRNA. Fue solo en el Consorcio 4 y en el Consorcio 6 en donde se lograron recuperar clonas con secuencias de BSR (Anexo 5). Dichas secuencias fueron similares (>95%) con *Desulfovibrio*, *Desulfobacterium* y *Desulfotomaculum*. La mayoría de las clonas que se obtuvieron fueron similares a Leptonema, incluso en el consorcio 7 que presentó la más alta velocidad de producción de sulfuro no fue posible recuperar ninguna secuencia que fuera similar a una BSR. Las secuencias completas de las clonas de las cuales se obtuvo el género se muestran en el Anexo 8 .

Para poder comparar los resultados obtenidos con otra base de datos, las 122 secuencias obtenidas se analizaron con la base de datos del NCBI. En el Anexo 7 se muestran los datos obtenidos para cada uno de los consorcios. En el Consorcio 1 se obtuvo que más de 56% de las secuencias estaban descritas como microorganismos no cultivables y las secuencias restantes no han sido descritas hasta ahora. En el Consorcio 2, 61% fue descrito como microorganismos no cultivables, 32% aún no ha sido descrito, 2.94% pertenecen al género de *Clostridium* y el 2.94% restante pertenece a *Desulfotomacolum*. En el Consorcio 3, 57% de las secuencias aún no se encuentran descritas, 26% se encontró como microorganismos no cultivables, 5% pertenece al género

*Desulfovibrio*, 5% pertenece al género *Clostridium*, 5% pertenece al género *Desulfotomacolum*. En el Consorcio 4, el 55% fue descrito como no cultivable, el 25% aún no se tiene descripción, el 5% se encontró su secuencia similar a *Desulfovibrio*, el 5% fue similar a *Clostridium*, el 5% su secuencia se encontró similar a *Desulfobacterium* y por último el 5% se encontró su secuencia similar a *Clostridium*. El Consorcio 6, 66% de las secuencias corresponden a microorganismos no cultivables, 16% corresponde al género *Clostridium*, 8% aún no ha sido descrito y por último el 8% corresponde al género *Desulfotomacolum*. Por último el consorcio 7, 42% aun no ha sido descrito, 42% pertenece a microorganismos no cultivables, 7% pertenece al género *Clostridium* y 7% restante corresponde al género *Desulfotomacolum*. Como se puede observar se obtuvieron muy pocas secuencias de BSR, es por esto que es pertinente realizar nuevos esfuerzos para poder obtener una mayor representación de los microorganismos que componen a los consorcios. Cuando se hace un análisis de las secuencias con respecto al porcentaje de similitud, resulta que la mayoría de los consorcios, aproximadamente un 40% de las secuencias, representan microorganismos no cultivables que en nuestro caso se esperaba ya que provienen de muestras ambientales complejas. Las secuencias de los microorganismos obtenidos se muestran en el Anexo 8.

Al analizar las secuencias obtenidas tanto por Silva y por NCBI se encontró que entre 45 y hasta 60% de las secuencias que se obtuvieron resultaron coincidir con secuencias recuperadas de microorganismos no cultivables, que además se obtuvieron de muestras de suelo.

Dentro del amplio grupo de BSR existen las que son formadoras de esporas y las que no lo son, esto depende de la cepa que se trate. *Desulfovibrio*, por ejemplo, tiene un pH óptimo en el intervalo mesofílico (6 a 8), este género tiene la característica de que puede generar o no esporas. Las células que no esporulan tienen un pigmento particular (citocromo c3 y desulfovirdina) que actúa como marcador ya que no se encuentra en microorganismos que esporulan. Se ha reportado que microorganismos aislados u obtenidos de

suelos, deben o se presume que esporulan y se ha demostrado que liberan este pigmento característico (Campell y Postagate, 1965).

Algunos autores han sugerido que los microorganismos que viven en sedimentos que tienen contacto con agua acidificada deben de ser ácido-tolerantes o acidófilicos. Un ejemplo de esto es *Desulfovibrio vulgaris* que fue aislado de sedimentos a un pH de 4, el pH óptimo de *Desulfovibrio vulgaris* es de 6.8 lo que lo hace un microorganismo neutrófilo (Rao, 2000). En el Anexo 5 se puede observar que en el Consorcio 4 se obtuvo una secuencia similar al género *Desulfovibrio* con una identidad de 99%, que coincide con que esta cepa se ha encontrado en lugares contaminados a pH menor al pH óptimo. (Hernández-Eugenio et al., 2000).

En la mayoría de los consorcios se puede observar la presencia de *Spirochetes* Figura 4.14. Respecto a este Phylum, en el año 2005, se reportó la coexistencia de BSR, oxidadoras de sulfuro con *Spirochetes*, que mantenían una asociación estable en donde las BSR y espiroquetas coexistían en un solo huésped parasitario (Blazejak et al., 2005).

Las BSR son capaces de crecer en una amplia gama de compuestos orgánicos que son utilizados como fuentes de energía metabólica, muchas especies pueden oxidar los sustratos por completo y presumiblemente también pueden asimilar compuestos intermediarios del metabolismo, como son precursores para los componentes orgánicos monoméricos y poliméricos que se generan durante el crecimiento. Las BSR del género *Desulfotomaculum* son un ejemplo de esto, ya que pueden degradar gran variedad de compuestos desde acetato, formiato, etanol hasta lactato (Jansen y Schink, 1995).

Se obtuvieron secuencias similares al género *Desulfotomaculum*, como es en el Consorcio 4 donde tuvo un porcentaje de similitud mayor al 85% (Anexo 5). El género *Desulfotomaculum* contiene BSR que forman endosporas resistentes a la desecación. Debido a su capacidad para formar esporas, miembros de este género pueden crecer en hábitats anóxicos y hábitats que presentan

deseccación. Los géneros *Desulfotomacoulum* y *Desulfosporosinus* se encuentran estrechamente relacionados ya que tienden a ser las BSR dominantes de ambientes subterráneos perturbados por las actividades humanas, como son las minas, así como los sitios donde el nivel freático está sujeto a fluctuaciones estacionales significativas. Lo anterior remite al sitio de donde se obtuvo el inóculo primario (sedimento) del cual se originaron los consorcios de este trabajo, dicho sedimento se obtuvo de una mina abandonada de azufre (Jansen y Schink, 1995; Hippe et al., 2003; Junier et al., 2010).

En varios de los consorcios que se obtuvieron en este trabajo, Consorcios 3, 4, 6 y 7 (Anexo 5), se recuperaron secuencias relacionadas con el género de *Clostridia* lo que coincide con estudios antes realizados. En el año 2000 se reportó actividad del género *Clostridium* que coexistía con BSR, el inóculo se obtuvo de una laguna contaminada en España (Robles et al., 2000).

Por último en todos los consorcios se pudo obtener el Phylum de *Bacteroidetes* que se ha reportado que se encuentran en comunidades sulfato-reductoras, como por ejemplo en el presente año se publicó un trabajo en el cual utilizaron un reactor sulfurogénico para la remoción de zinc, arsénico y altas concentraciones de sulfato; al caracterizar la comunidad se pudo obtener algunos representantes del Phylum *Bacteroidetes*, específicamente del grupo WCHB1-69, que también fue reportado en nuestras secuencias (Baldwin et al., 2015). En el año 2013 se publicó un trabajo acerca de la bioestimulación de agua subterránea para la biorremediación de contaminantes orgánicos (explosivos) se llevó a cabo la caracterización de la comunidad y se encontraron microorganismos del Phylum *Bacteroidetes* y al igual que en el trabajo antes mencionado y en el nuestro se encontró el mismo grupo WCHB1-69 (Livermore et al., 2013).

## 5. Conclusiones

Los enriquecimientos recuperados de un ambiente natural contaminado, se reactivaron con medio anaerobio con diferentes donadores de electrones, dichos enriquecimientos mostraron actividad sulfato-reductora. A partir de dichos enriquecimientos y después de transferir sucesivamente los cultivos se logró mantener la actividad sulfato-reductora inicial, en sólo 7 consorcios. Es por esto que se puede concluir que las condiciones de cultivo iniciales, es decir aquellas con las que se enriquecieron los sedimentos, fueron las adecuadas para obtener consorcios cultivables que presentaran actividad sulfato-reductora, además fue posible mantener la actividad mediante las transferencias sucesivas conservando las condiciones de pH inicial ácido (pH 4) y el tipo de sustrato (glicerol o lactato). Aunque los enriquecimientos fueron cultivados a las mismas condiciones iniciales y se obtuvieron del mismo sedimento por quintuplicado se observó que cada una de estas unidades experimentales resulto ser única, ya que conforme se fueron realizando las transferencias cada unidad tuvo un comportamiento diferente.

Debido a la naturaleza y la complejidad del sedimento utilizado como inóculo, se utilizaron diferentes donadores de electrones como glicerol, lactato o acetato. Sin embargo, no se logró que el acetato se utilizara como único donador de electrones ya que con este sustrato no se desarrolló la actividad sulfato-reductora deseada. No obstante al usar lactato o glicerol como donadores de electrones se pudieron obtener consorcios cultivables, que además de consumir estos sustratos, también consumían acetato.

Para obtener consorcios con actividad sulfato-reductora se utilizaron técnicas de microbiología tradicional (transferencias), a partir de los enriquecimientos previos de muestras naturales a pH ácido, las cuales permitieron reducir el tiempo en el que se consumía completamente entre 30 y 40% del sustrato, con respecto a la primer transferencia.

Mediante técnicas moleculares se logró tener una aproximación general de la composición de los 7 consorcios cultivables obtenidos, con lo cual se pudo observar la gran heterogeneidad de los consorcios, que aunque fueron obtenidos del mismo sedimento reflejan el efecto que tiene las condiciones *in-situ* sobre la comunidad.

## 6. Perspectivas

- Continuar con la caracterización molecular de todos los consorcios.
- Ser mas críticos y sistemáticos en la forma de clonar para poder así obtener una a mayor representación de los consorcios.
- Evaluar la factibilidad de utilizar los consorcios obtenidos como inóculos para un biorreactor con un efluente ácido.
- Comenzar los aislados microbiológicos para poder conocer mas acerca de estos consorcios y sus relaciones sintróficas.

## **Bibliografía**

Abbas F. M., Williamson C., Bhola, S. H., Spear J. M., Olson D. L., Mishra B., Kakpovbia A. E., (2013). Microbial Corrosion in Linepipe Steel Under the Influence of a Sulfate-Reducing Consortium Isolated from an Oil Field, ASM International; 1059-9495.

Arreola-Vargas A., Razo-Flores E. Celis L. B., Alatraste-Mondragon F., Buitron G., (2013). International Journal of Hydrogen Energy; 38, 13884-13894.

Blazejak A., Erseus C., Amann R., Dubilier N., (2005). Coexistence of Bacterial Sulfide Oxidizers, Sulfate Reducers, and Spirochetes in a Gutless Worm (Oligochaeta) from the Peru Margin, Applied and environmental microbiology, 1553–1561.

Bijmans F. M., Vries E., Yang C., Buisman C. N., Piet N., Dopson M., (2010). Sulfate reduction at pH 4.0 for treatment of process and wastewaters. Biotechnology Progress; 26, 4, 1029–1037.

Campbell Leon L., Postgate John R., (1965). Classification of the Spore-Forming Sulfate-Reducing Bacteria, Bacteriol Rev.; 29, 3, 359-363.

Castro-Hector F., Williams N. H., Ogram A., (2000). Phylogeny of sulfate-reducing bacteria, FEMS Microbiology Ecology; 31,1-9.

Celis L.B., Villa-Gómez, D., Alpuche-Solís, A., Ortega-Morales, B.O., Razo-Flores, E., (2009). Characterization of sulfat-reducing bacteria dominated Surface communities during start-up of a down-flow fluidized-bed reactor, Microbiol. Biotechnol; 36, 111-121.

Cheung K. H., Gu Ji-Dong., (2003). Reduction of chromate ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) by an enrichment consortium and an isolate of marine sulfate-reducing bacteria, *PERGAMON Chemosphere*; 52, 1523–1529.

Church, C., Wilkin, R., Alpers, C., O-Rye, R., McCleskey, B., (2007). Microbial sulfate reduction and metal attenuation in pH 4 acid mine water, *Geochem. Transac*; 8, 10.

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.

EPA 530-R-94-036 (1994). Technical document acid mine drainage prediction.

Fude L., Harris B., Urrutia M., Beveridge T., (1994). Reduction of Cr(VI) by a Consortium of Sulfate-Reducing Bacteria (SRB III), *Applied and Environmental Microbiology*; 4, 1525:1531.

Gabor E.M., de Vries E.J., Janssen D.B., (2003). Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods, *FEMS Microbiol Ecol*; 1,4, 153-163.

Gurtner C., Heyrmanb J., Pinar J., Lubitza W., (2000). Comparative analyses of the bacterial diversity on two dibiodeteriorated wall paintings by DGGE and 16S rDNA sequence analysis, *International Biodeterioration & Biodegradation*; 46, 229–239.

Green M. R., Sambrook J., (2009). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition)*; Cold Spring Laboratory Press.

Gross S., Robbins Eleanora I., (2010). Acidophilic and acid-tolerant fungi and yeasts, *Hydrobiologia*; 433, 91–109.

Hernandez-Eugenio G., Fardeau M.L., Patel Bharat K.C., Macarie H., Garcia J.L., Ollivier B., (2000). *Desulfovibrio mexicanus* sp. nov., a Sulfate-reducing

Bacterium Isolated from an Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactor Treating Cheese Wastewaters, *Anaerobe*; 6, 305-312.

Hansen Theo A., (1994). Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes, *Antonie van Leeuwenhoek*; 66, 165-185.

Hippe H., Vainshtein M., Gogotova G.I., Stackebrandt E., (2003). Reclassification of *Desulfobacterium macestii* as *Desulfomicrobium macestii* comb. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 53, 1127–1130.

Janda J. M., Abbott Sharon L., (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls, *Microbiol. J.*; 45, 9, 2761–2764.

Johnson D. B., Hallberg K. B. (2005). Acid mine drainage remediation options: a review. *Science of the Total Environment* 338, 3– 14.

Junier P., Junier T., Podell S., Sims David R., Detter John C. Lykidis A., Han Cliff S., Wigginton Nicholas S., Gaasterland T., Bernier-Latmani R., (2010). The genome of the Gram-positive metal and sulfate-reducing bacterium *Desulfotomaculum reducens* strain MI-1, *Environ Microbiol.*; 10, 2738-54.

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.

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, 57-65.

Kolmert S., Johnson B., (2001). Remediation of acidic waste waters using immobilised, acidophilic sulfate-reducing bacteria, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*; 76, 8, 836–843.

Koschorreck, M., Wendt-Potthoff, K., Geller, W., (2003). Microbial sulfate reduction at low pH in sediments of an acidic lake in Argentina, *Environ. Sci. Technol.*; 37, 1159–1162.

Koschorreck, M., Kunze, T., Luther, G., Bozau, E., Wendt-Potthoff, K., (2004). Accumulation and inhibitory effects of acetate in a sulphate reducing in situ reactor for the treatment of an acidic pit lake, *International Mine Water Association (IMWA)*, 101 – 109.

Livermore Joshua A., Jin Yang Oh, Arnseth Richard W., LePuil Michael, Timothy E. Mattes, (2015). Microbial Community Dynamics during Acetate Biostimulation of RDX-Contaminated Groundwater, *Environ. Sci. Technol*; 47, 7672–7678.

Lopez-Lozano Nguyen E., Heidelberg Karla B., Nelson William C., Garcia-Oliva Felipe, Eguiarte Luis E., Souza V., (2013). Microbial secondary succession in soil microcosms of a desert oasis in the Cuatro Ciénegas Basin, Mexico, *PeerJ*, 2-21.

Madigan M., Martinko J., Parker J., (1997). *Biología de los microorganismos*, Prentice Hall, New Jersey USA.; 10, 321-624.

Madsen E. L., (2005). Identifying microorganisms responsible for ecologically significant biogeochemical processes, *NATURE REVIEWS | MICROBIOLOGY*; 3, 439-446.

Montoya L., Celis L. B., Gallegos-Garcia M., Razo-Flores E., Alpuche-Solis A., (2012). Consortium diversity of a sulfate-reducing biofilm developed at acidic pH influent conditions in a down-flow fluidized bed reactor, *Eng. Life Sci.*; 13, 302–311.

Morris Brando E. L., Henneberger R., Huber H., Moissl-Eichinger C., (2013). Microbial syntrophy: interaction for the common good, *FEMS Microbiol Rev*; 37, 384–406.

Müller A. L., Kjeldsen Kasper U., Rattei T., Pester M., Loy A., (2014). Phylogenetic and environmental diversity of DsrAB-type dissimilatory (bi)sulfite reductases, *ISME Journal*; 9, 1152–1165.

Muyzer, G. y Stams, A.J.M., (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria, *Nat. Rev. Microbiol.*; 6, 441-454.

Nancucheo I., Johnson B., (2012). Removal of sulfate from extremely acidic mine waters using low pH sulfidogenic bioreactors, *Hydrometallurgy*; 150, 222–226.

Neculita C., Zagury G.J., (2007). Passive treatment of acid mine drainage in Bioreactors: short review, applications, and research needs, *OttawaGeo*; 23, 1439-1446.

Oude Elferink S., Maas R. N., Harmsen H. H. M., Stams A., (1995). *Desulforhabdus amnigenus* gen. nov. sp. nov., a sulfate reducer isolated from anaerobic granular sludge, *Arch Microbiol.*; 164, 119–124.

Papirio S., Villa-Gomez D.K., Esposito G., Pirozzi F., Lens L. N., (2013). Acid Mine Drainage Treatment in Fluidized-Bed Bioreactors by Sulfate-Reducing Bacteria: A Critical Review., *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*; 43, 2545–2580.

Perez-Jimenez J.R., Young L.Y., Kerkhof L.J., (2001). Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in anaerobic hydrocarbon-degrading consortia and pure cultures using the dissimilatory sulfate reductase (dsrAB) genes, *FEMS Microbiology Ecology*; 35, 145-150.

Qatibi A. I., Bories A. & Garcia J. L., (1991), Sulfate Reduction and Anaerobic Glycerol Degradation by a Mixed Microbial Culture, *CURRENT MICROBIOLOGY* Vol. 22 (1991), pp. 47-52.

Rabus, R. Hansen, T.A., Widdel F., (2006). Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing proaryotes. En: The Prokaryotes. A handbook on the biology bacteria: ecophysiology and biochemistry, Springer-Verlag New York., 659-768.

Rampinelli, L.R., Azevedo, R.D., Guerra-Sá, R., Teixeirac, M.C., Leão, V.A., (2007). Isolation and molecular characterization of sulfate reducing bacteria in a Brazilian acid mine drainage (Conference Paper), Advanced Materials Research; 20-21, 547-550.

Robles S., Rodríguez Jose M., Granados I., Guerrero M. C., (2000) Sulfite-reducing clostridia in the sediment of a high mountain lake (Laguna Grande, Gredos, Spain) as indicators of fecal pollution, INTERNATLMICROBIOL; 3, 187–191.

Sallam A., Steinbuchel A., (2009). *Clostridium sulfidigenes* sp. nov., a mesophilic, proteolytic, thiosulfate- and sulfur-reducing bacterium isolated from pond sediment, Int J Syst Evol Microbiol Jul; 59, 1661-5.

Sánchez-Andrea I., Stams A., Hedrich S., Nancucheo I. Y Johnson B., (2015), *Desulfosporosinus acididurans* sp. nov.: an acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acidic sediments, Extremophiles;19, 39–47.

Sánchez-Andrea I., Stams A., Amilis R., Sanz J. L., (2013). Enrichment and isolation of acidophilic sulfate-reducing bacteria from Tinto River sediments, Environmental Microbiology Reports; 5, 672–678.

Sánchez-Andrea I., Sanz J. L., Bijmans F. M., Stams J. M., (2014). Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage, Journal of Hazardous Materials; 269, 98–109.

Sekiguchi Y., (2006). Yet-to-be Cultured Microorganisms Relevant to Methane Fermentation Processes, Microbes and Environments; 21, 1-15.

Sousa D. Z., Pereira M. A., Smidt H., Stams J.M., Alves M., (2007). Molecular assessment of complex microbial communities degrading long chain fatty acids in methanogenic bioreactors, *FEMS Microbiol Ecol.*, 60, 252-65.

Sousa Joao A.B., Plugge Caroline M., Stams Alfons J.M., Bijmans Martijn F.M., (2015). Sulfate reduction in a hydrogen fed bioreactor operated at haloalkaline conditions, *Water Research*; 68, 67-76.

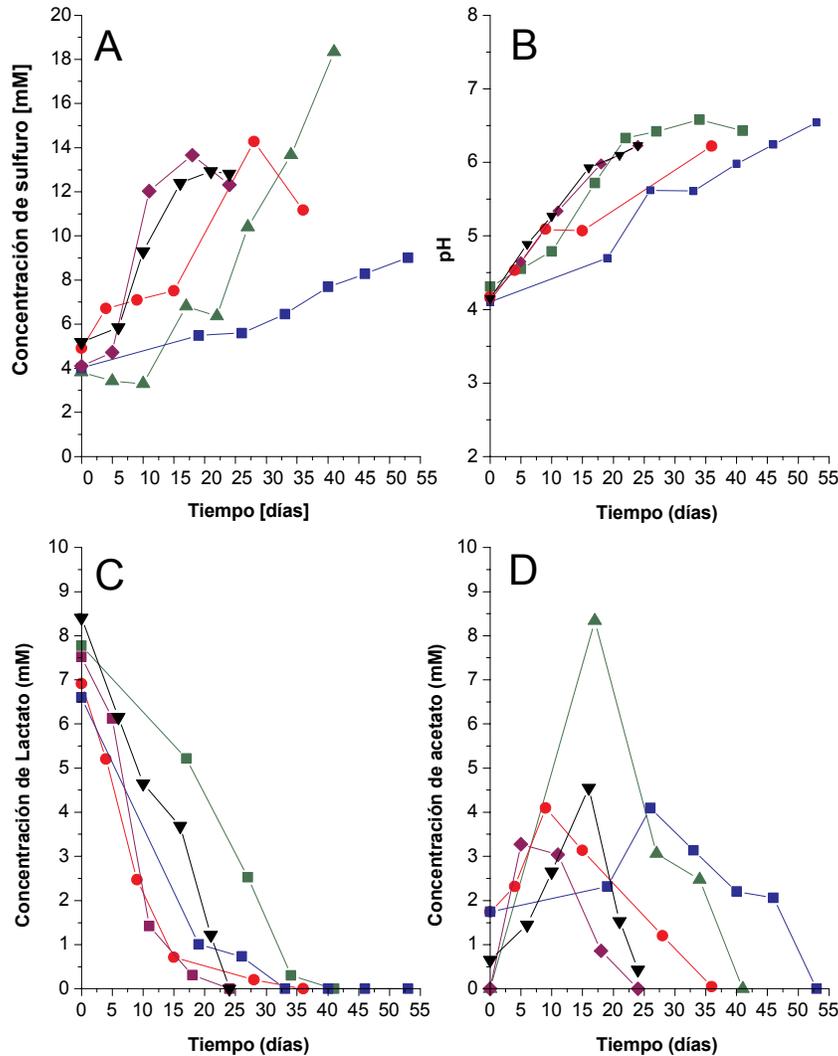
Thomas T., Gilbert J., Meyer F., (2012). Metagenomics - a guide from sampling to data analysis, Thomas et al. *Microbial Informatics and Experimentation*, 2-3

Vartoukian Sonia R., Palmer Richard M., Wade William G., (2010). Strategies for culture of 'unculturable' bacteria, *FEMS Microbiol Lett.*; 309, 1–7.

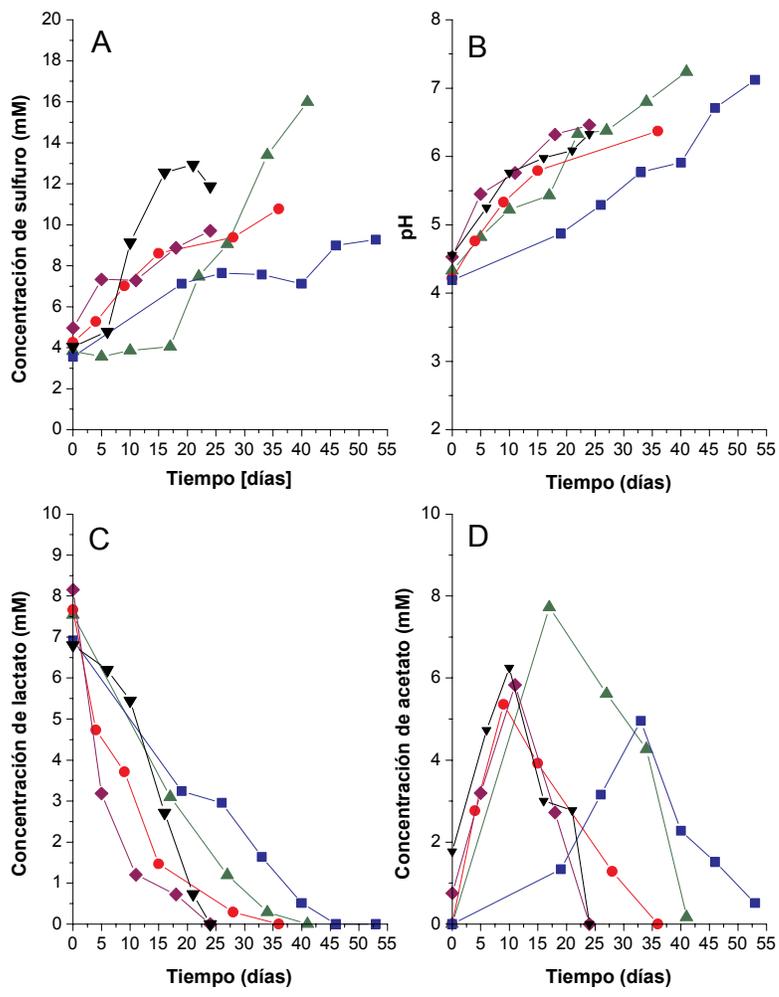
Worm P., Koehorst Jasper J., Visser M., Sedano-Núñez Vicente T., Schaap Peter J., Plugge Caroline M., Sousa Diana Z., Stams Alfons J.M., (2014). A genomic view on syntrophic versus non-syntrophic lifestyle in anaerobic fatty acid degrading communities, *Biochimica et Biophysica Acta*; 1837, 2004–2016.

## Anexos

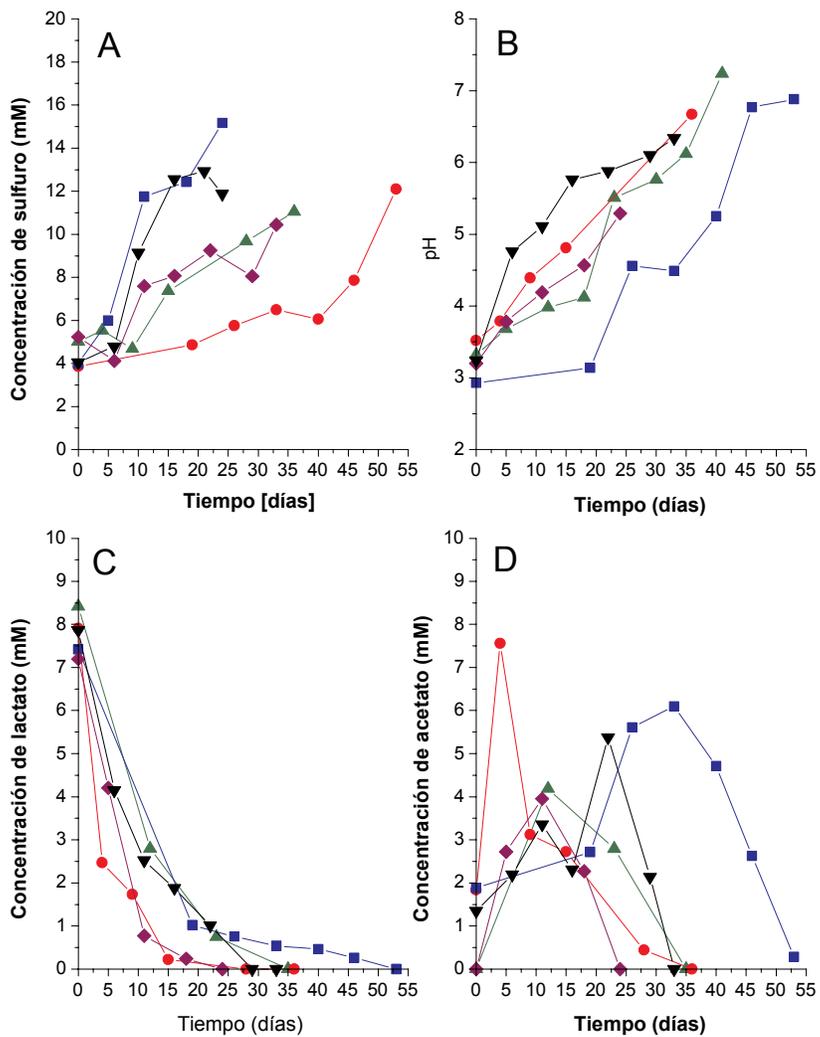
### Anexo 1. Perfiles de los consorcios obtenidos a lo largo de las 5 transferencias



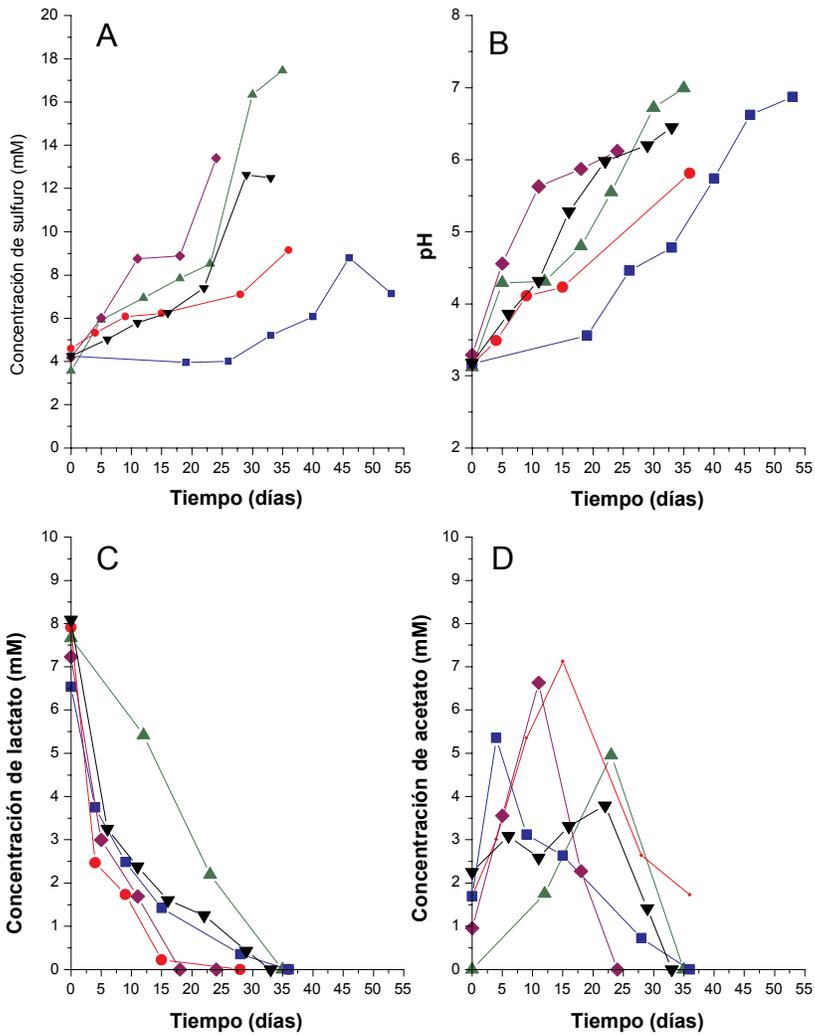
**Figura A1.1** Perfiles del consorcio 2. A: producción de sulfuro, B: aumento de pH, C: consumo de lactato y D: consumo de acetato. Cada serie representa un cultivo distinto. Triángulo verde: transferencia 1, círculo rojo: transferencia 2, cuadrado azul: transferencia 3, rombo morado: transferencia 4 y triángulo invertido negro: transferencia 5.



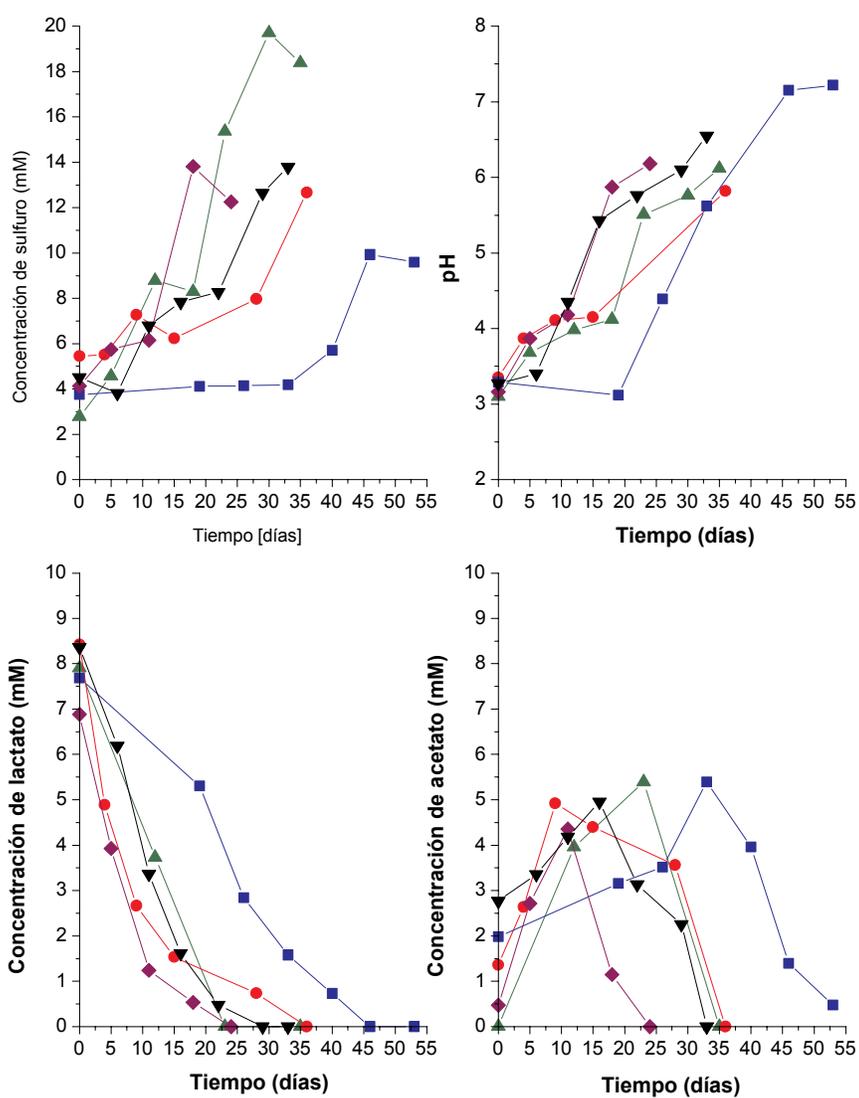
**Figura A1.2** Perfiles del consorcio 3. A: producción de sulfuro, B: aumento de pH, C: consumo de lactato y D: consumo de acetato. Cada serie representa un cultivo distinto. Triángulo verde: transferencia 1, círculo rojo: transferencia 2, cuadrado azul: transferencia 3, rombo morado: transferencia 4 y triángulo invertido negro: transferencia 5.



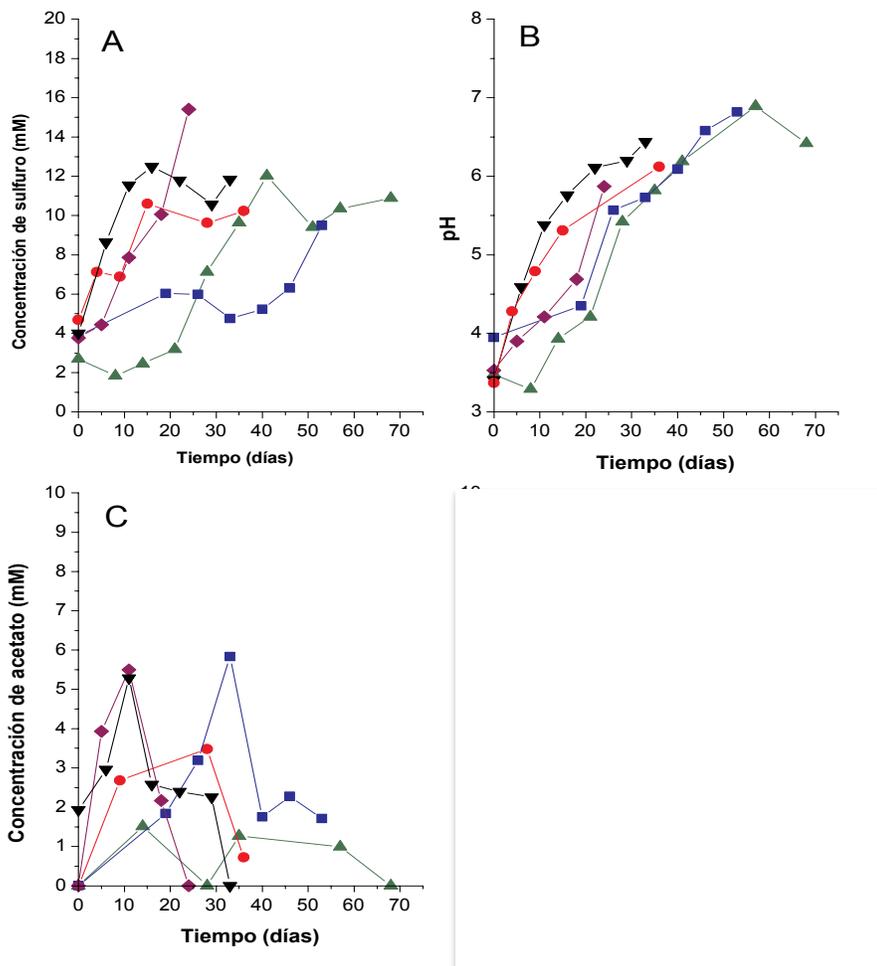
**Figura A1.3**Perfiles del consorcio 4. A: producción de sulfuro, B: aumento de pH, C: consumo de lactato y D: consumo de acetato. Cada serie representa un cultivo distinto. Triángulo verde: transferencia 1, círculo rojo: transferencia 2, cuadrado azul: transferencia 3, rombo morado: transferencia 4 y triángulo invertido negro: transferencia 5.



**Figura A1.4** Perfiles del consorcio 5. A: producción de sulfuro, B: aumento de pH, C: consumo de lactato y D: consumo de acetato. Cada serie representa un cultivo distinto. Triángulo verde: transferencia 1, círculo rojo: transferencia 2, cuadrado azul: transferencia 3, rombo morado: transferencia 4 y triángulo invertido negro: transferencia 5.

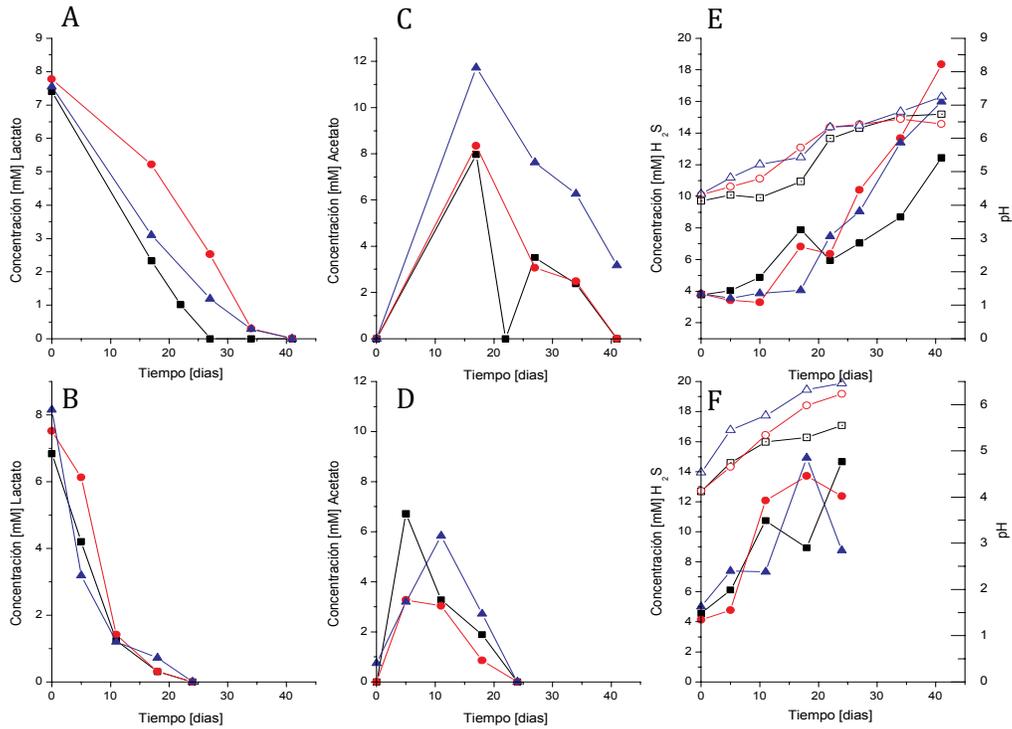


**Figura A1.5**Perfiles del consorcio 6. A: producción de sulfuro, B: aumento de pH, C: consumo de lactato y D: consumo de acetato. Cada serie representa un cultivo distinto. Triángulo verde: transferencia 1, círculo rojo: transferencia 2, cuadrado azul: transferencia 3, rombo morado: transferencia 4 y triángulo invertido negro: transferencia 5.

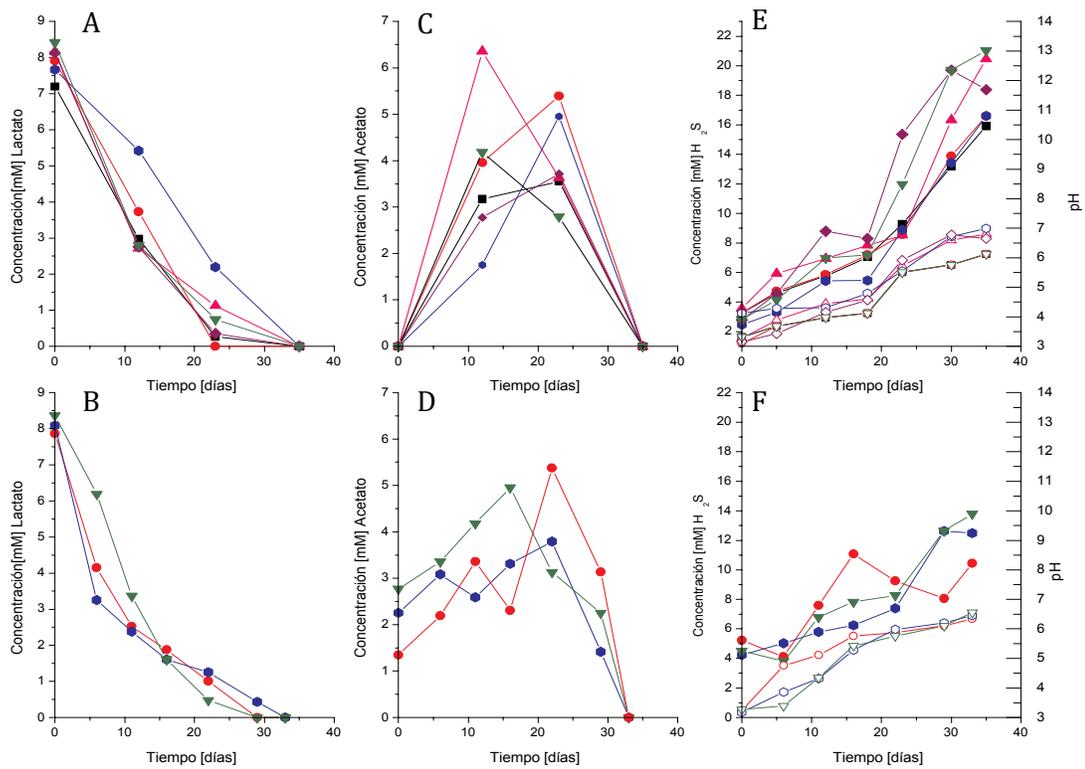


**Figura A1.6** Perfiles del consorcio 7. A: producción de sulfuro, B: aumento de pH, C: consumo de acetato. Cada serie representa un cultivo distinto. Triángulo verde: transferencia 1, círculo rojo: transferencia 2, cuadrado azul: transferencia 3, rombo morado: transferencia 4 y triángulo invertido negro: transferencia 5.

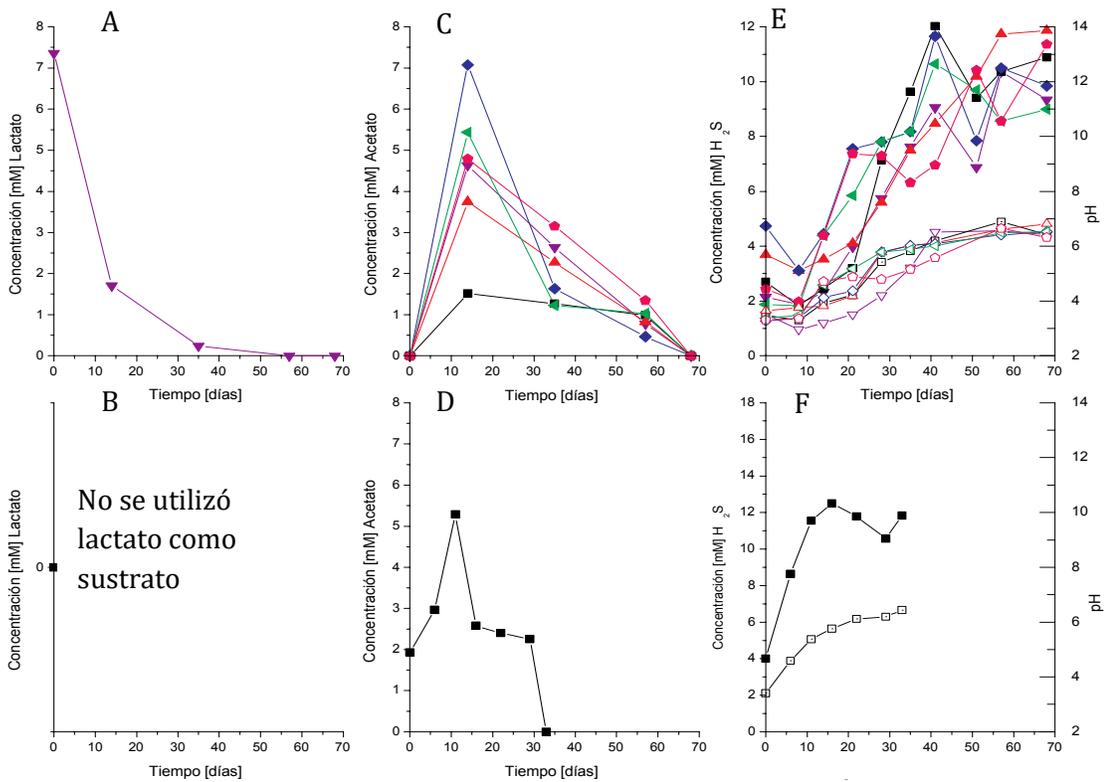
## Anexo 2. Perfiles de consumo de sustrato, producción de sulfuro e incremento de pH, transferencias 1 y 5



**Figura A2.1** Perfiles de consumo de lactato (A, B), consumo de acetato (C, D) y producción de sulfuro (E y F), correspondientes a las transferencias 1 (paneles superiores) y transferencia 5 (paneles inferiores). Cada serie representa un cultivo distinto. pH inicial 4, perfiles correspondientes a los consorcios 1, 2 y 3.

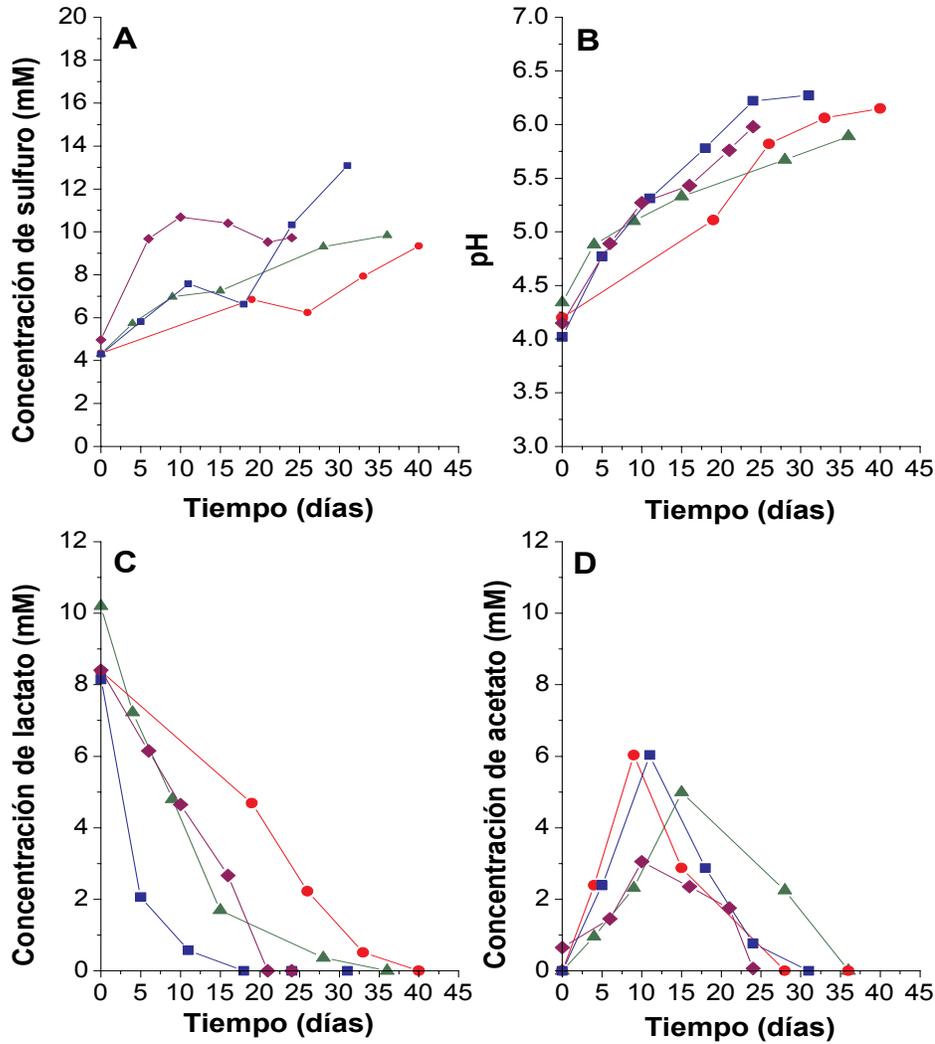


**Figura A2.2** Perfiles de consumo de lactato (A, B), consumo de acetato (C, D) y producción de sulfuro (E y F), correspondientes a las transferencias 1 (paneles superiores) y transferencia 5 (paneles inferiores). Cada serie representa un cultivo distinto. pH inicial 3, perfiles correspondientes a los consorcios 4, 5 y 6.

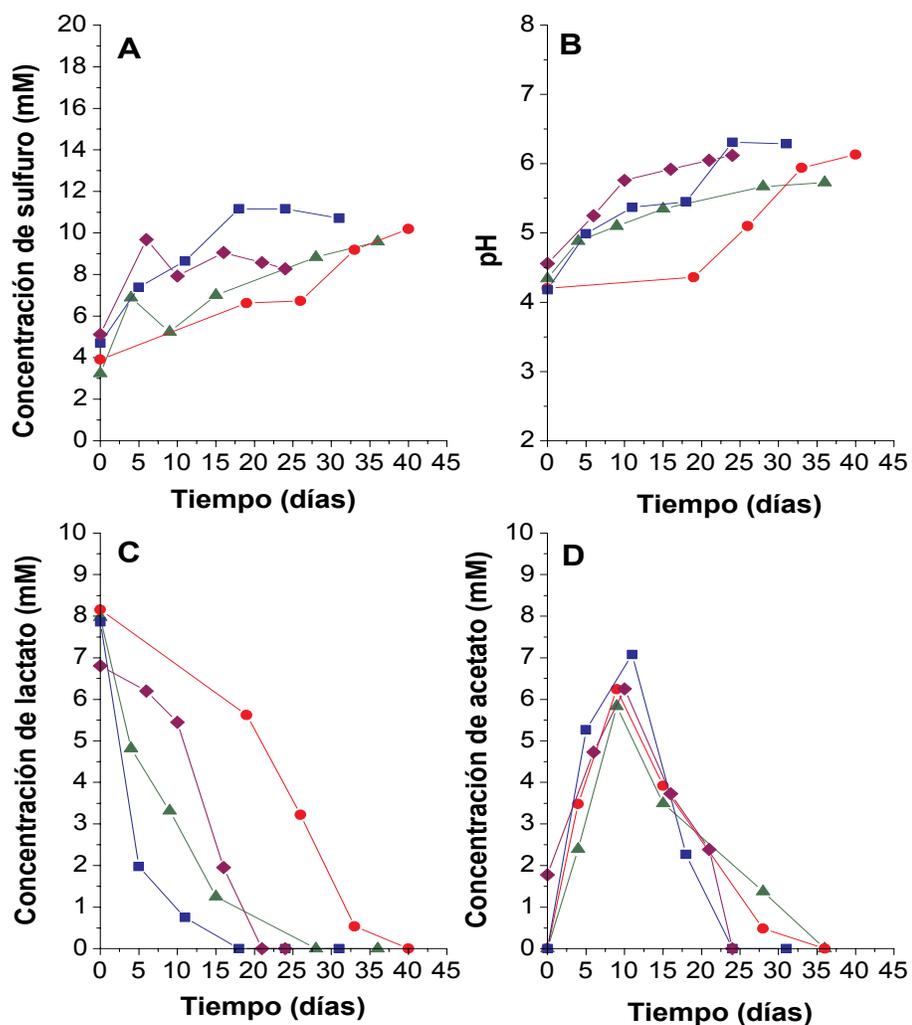


**Figura A2.3** Perfiles de consumo de lactato (A, B), consumo de acetato (C, D) y producción de sulfuro (E y F), correspondientes a las transferencia 1 (paneles superiores) y transferencia 5 (paneles inferiores). Cada serie representa un cultivo distinto. pH inicial 3, perfiles correspondientes al consorcio 7.

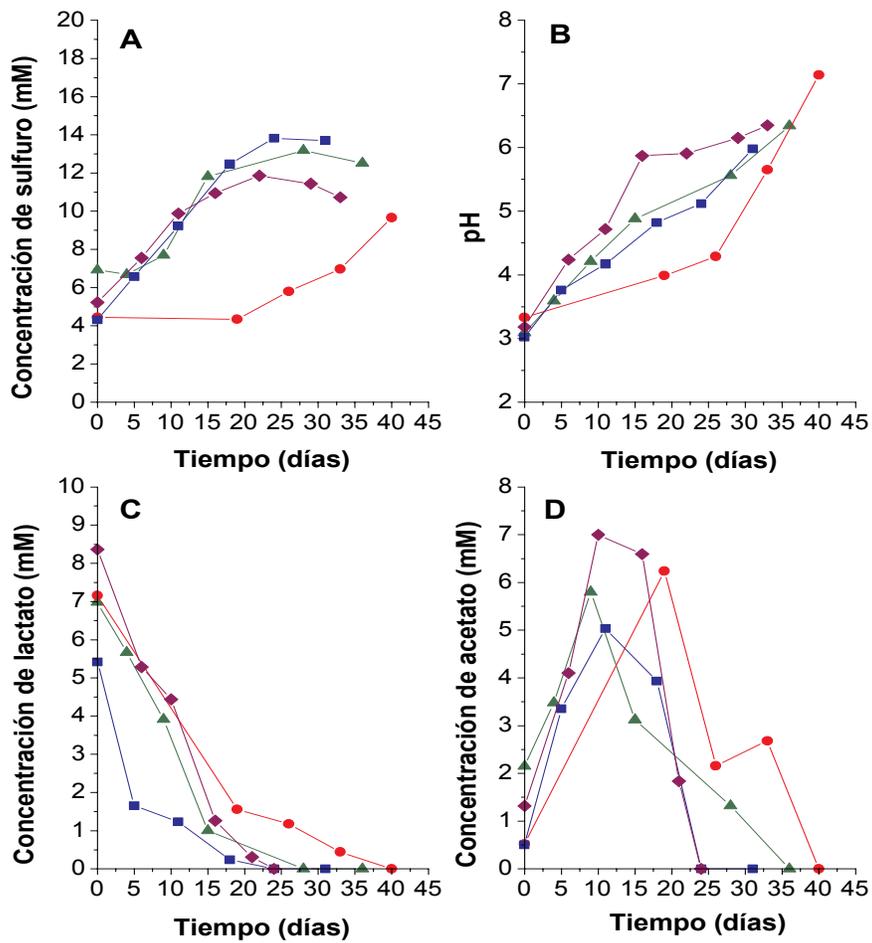
**Anexo 3. Perfiles de consumo de sustrato, producción de sulfuro e incremento de pH, de la reposición de medio**



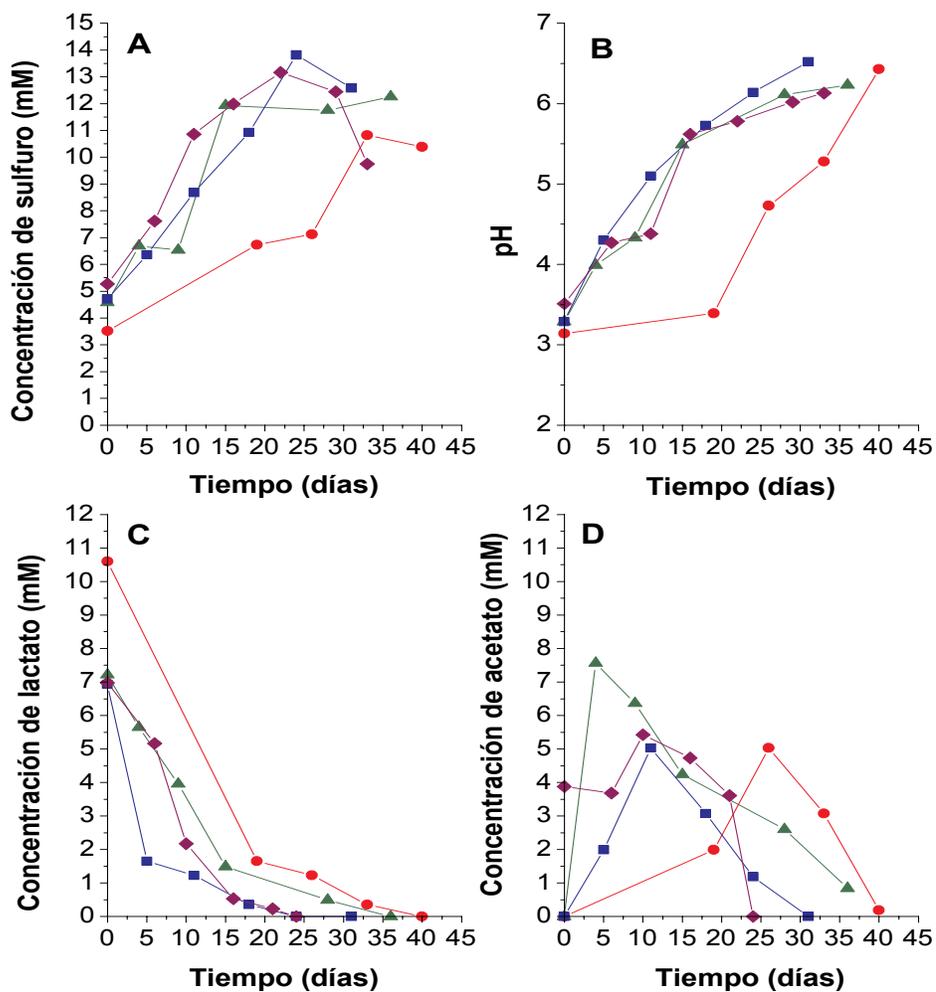
**Figura A3.1** Perfiles del consorcio 2, comprobación de la actividad sulfato-reductora. A: producción de sulfuro, B: aumento de pH, C: consumo de lactato y D: consumo de acetato. Cada serie representa un cultivo distinto. Triangulo verde: transferencia 1, círculo rojo: transferencia 2, cuadrado azul: transferencia 3 y rombo morado: transferencia 4.



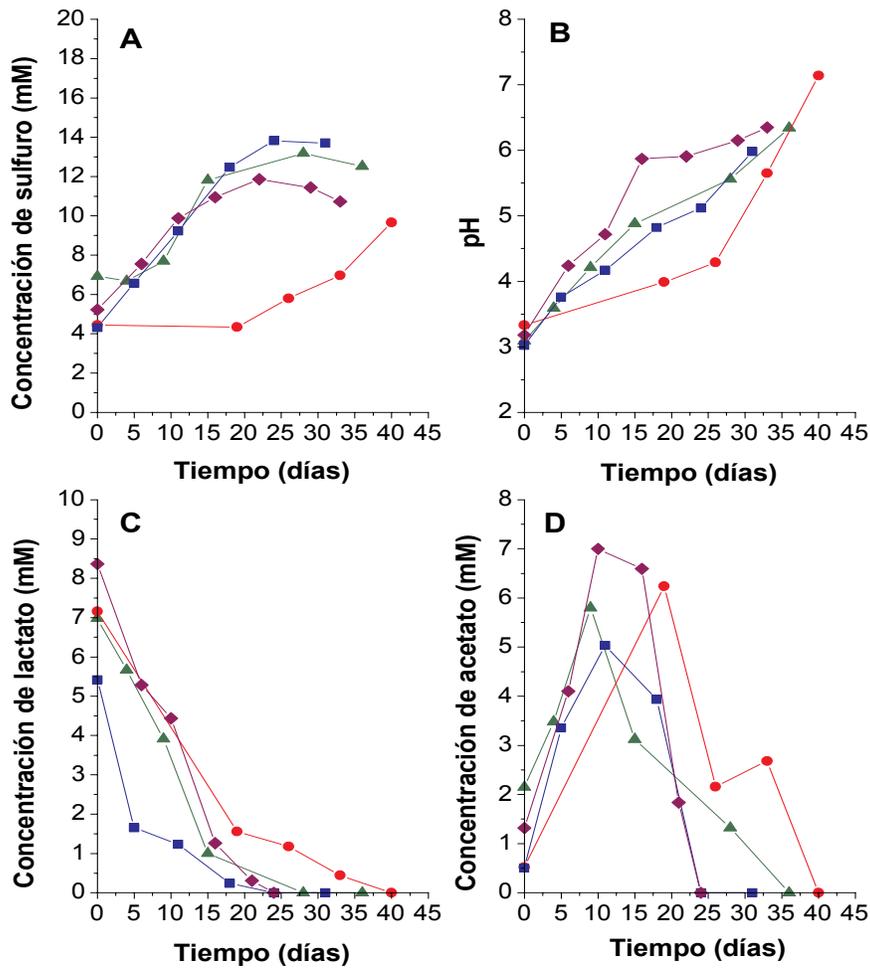
**Figura A3.2** Perfiles del consorcio 3, comprobación de la actividad sulfato-reductora. A: producción de sulfuro, B: aumento de pH, C: consumo de lactato y D: consumo de acetato. Cada serie representa un cultivo distinto. Triangulo verde: transferencia 1, círculo rojo: transferencia 2, cuadrado azul: transferencia 3 y rombo morado: transferencia 4.



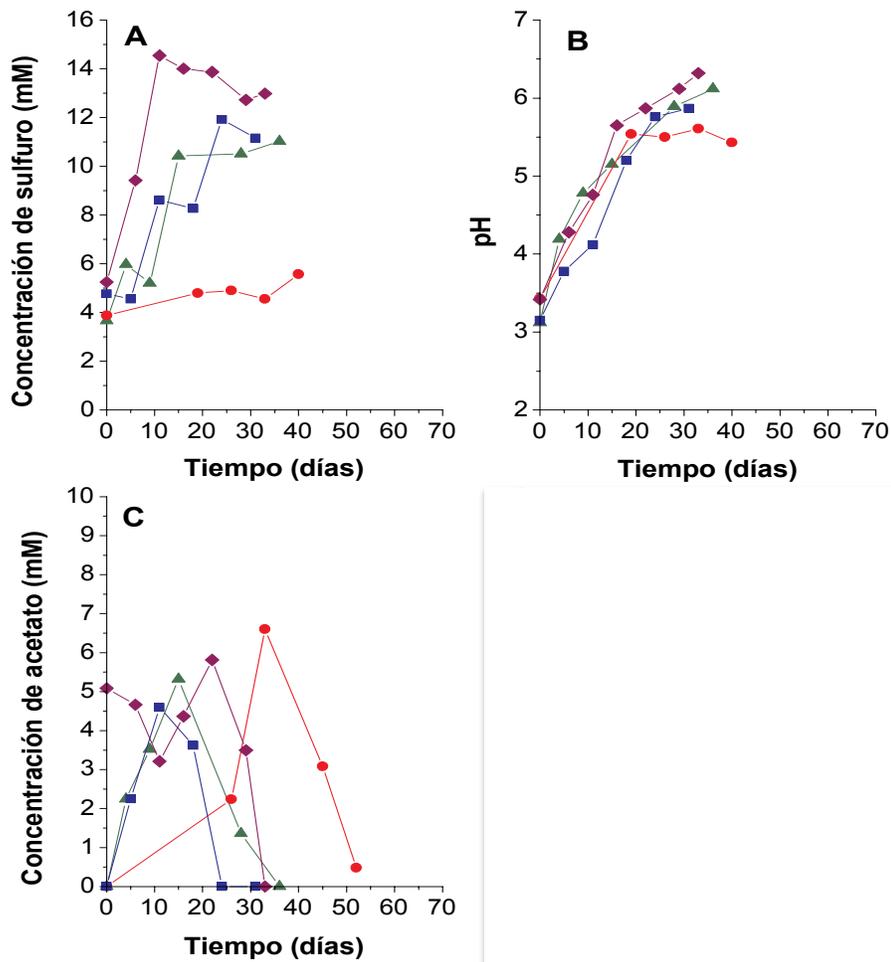
**Figura A3.3** Perfiles del consorcio 4, comprobación de la actividad sulfato-reductora. A: producción de sulfuro, B: aumento de pH, C: consumo de lactato y D: consumo de acetato. Cada serie representa un cultivo distinto. Triangulo verde: transferencia 1, círculo rojo: transferencia 2, cuadrado azul: transferencia 3 y rombo morado: transferencia 4.



**Figura A3.4** Perfiles del consorcio 5, comprobación de la actividad sulfato-reductora. A: producción de sulfuro, B: aumento de pH, C: consumo de lactato y D: consumo de acetato. Cada serie representa un cultivo distinto. Triangulo verde: transferencia 1, círculo rojo: transferencia 2, cuadrado azul: transferencia 3 y rombo morado: transferencia 4.

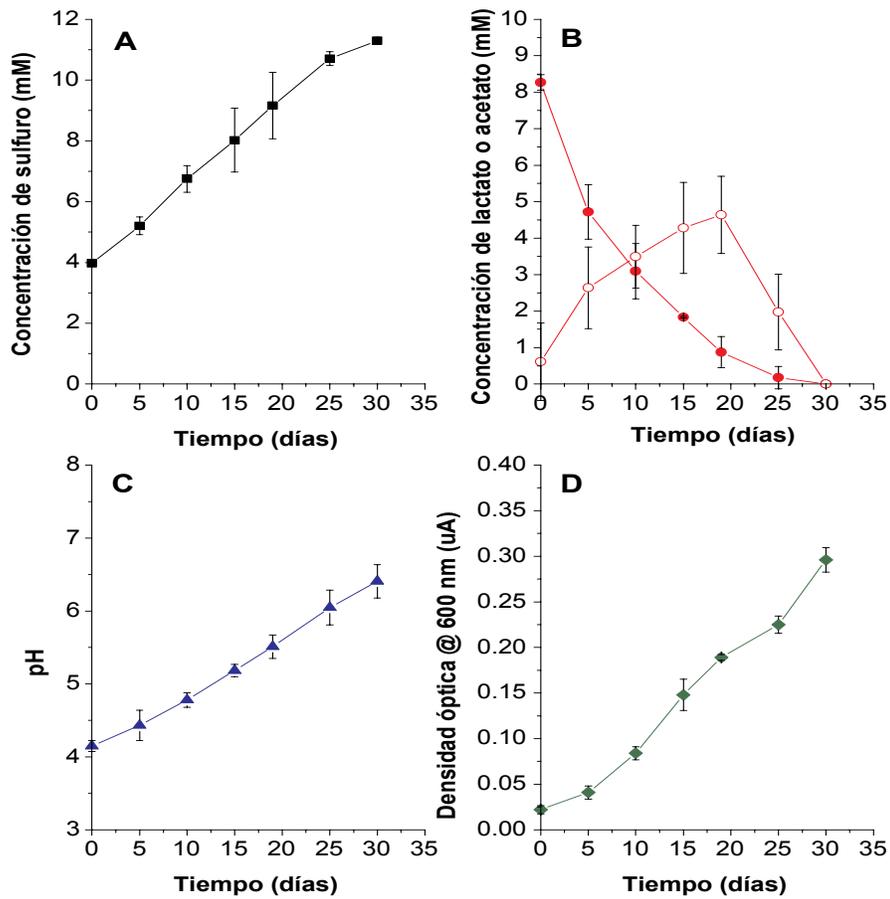


**Figura A3.5** Perfiles del consorcio 6, comprobación de la actividad sulfato-reductora. A: producción de sulfuro, B: aumento de pH, C: consumo de lactato y D: consumo de acetato. Cada serie representa un cultivo distinto. Triángulo verde: transferencia 1, círculo rojo: transferencia 2, cuadrado azul: transferencia 3 y rombo morado: transferencia 4.

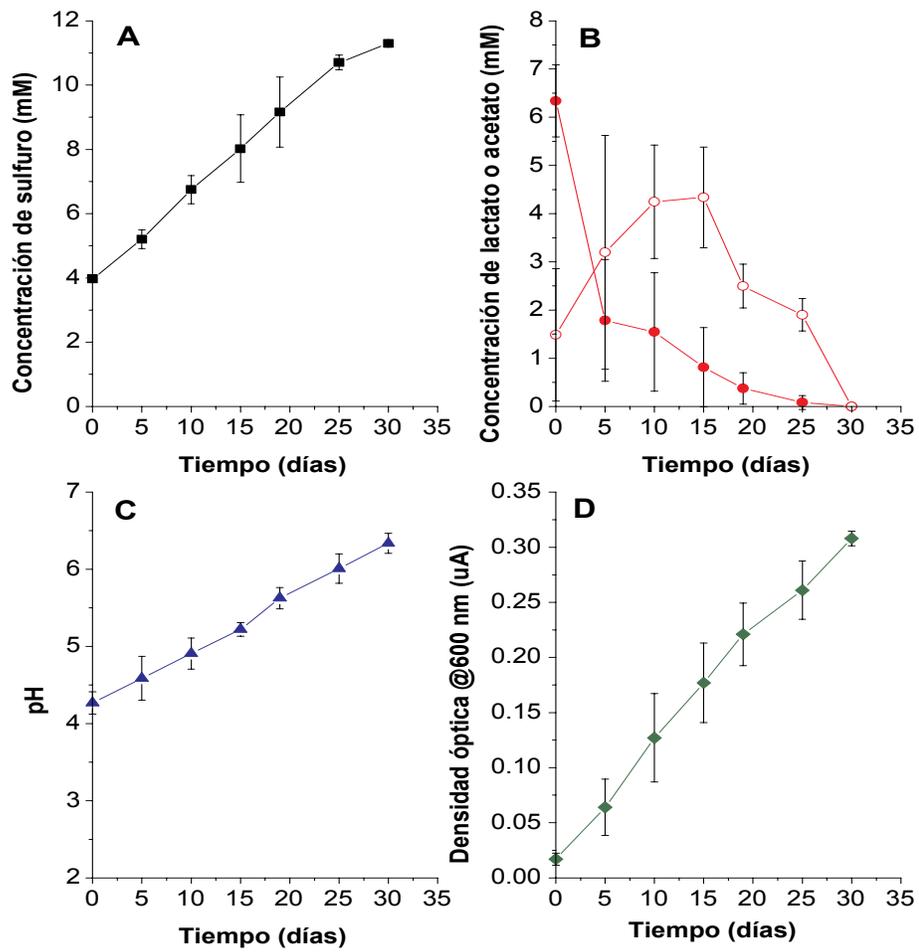


**Figura A3.6** Perfiles del consorcio 7, comprobación de la actividad sulfato-reductora. A: producción de sulfuro, B: aumento de pH y C: consumo de acetato. Cada serie representa un cultivo distinto. Triángulo verde: transferencia 1, círculo rojo: transferencia 2, cuadrado azul: transferencia 3 y rombo morado: transferencia 4.

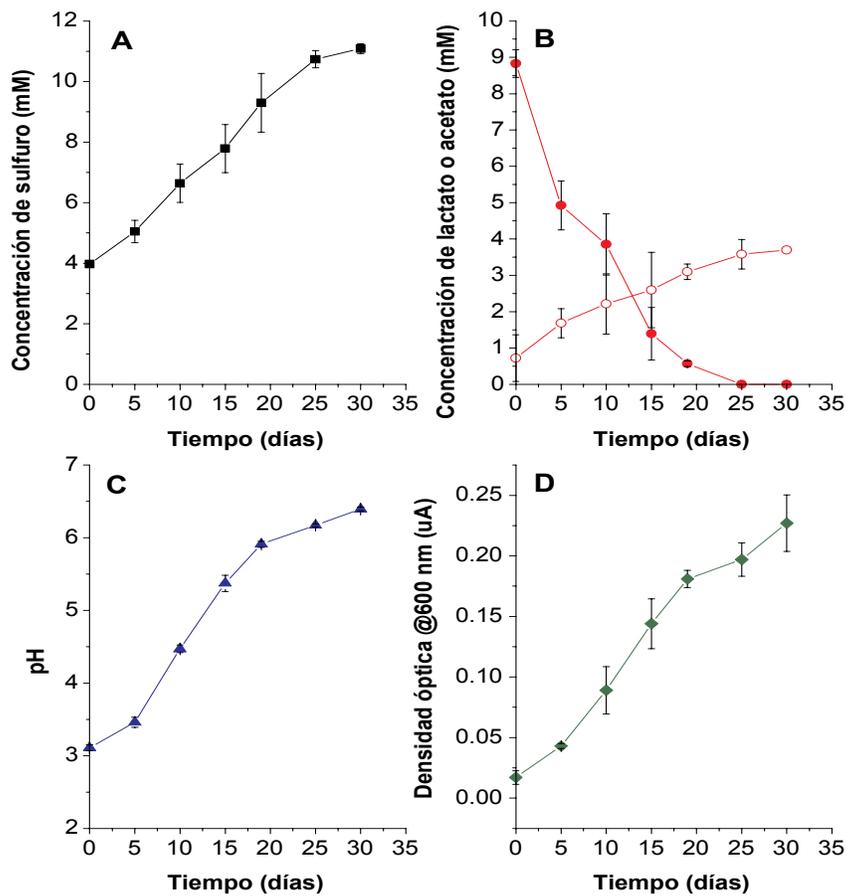
#### Anexo 4. Triplicados consorcios sulfato-reductores



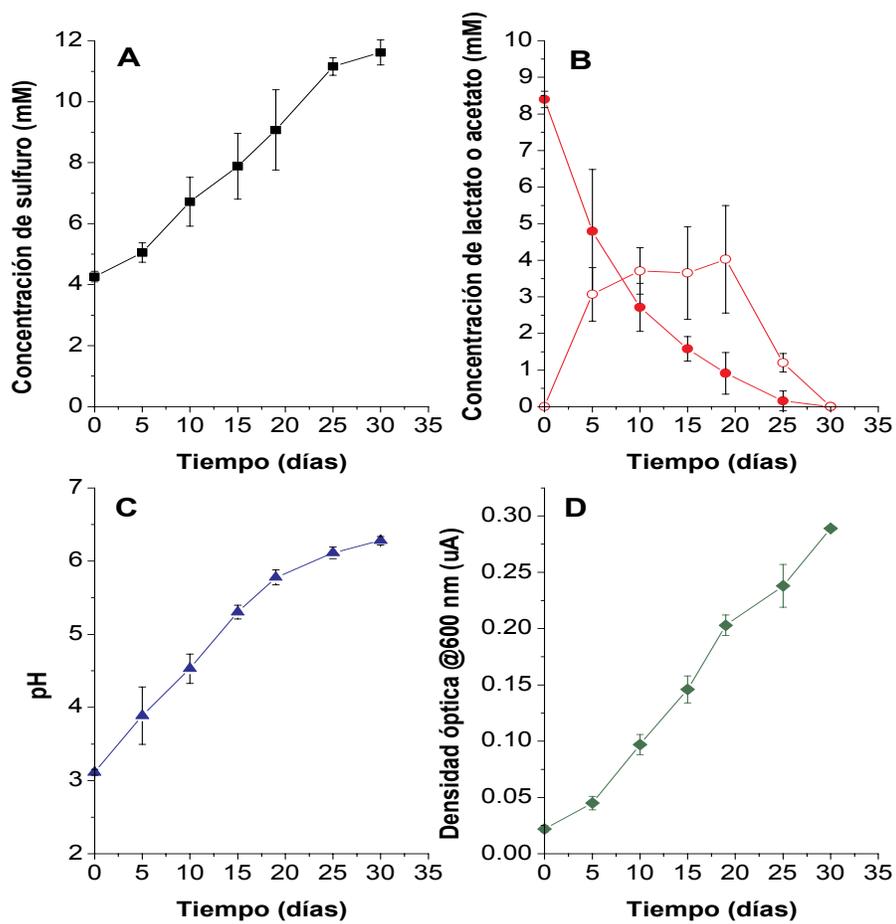
**Figura A4.1** Triplicado consorcio 2 A) producción de sulfuro (cuadro negro), B) consumo de sustrato lactato (cuadro rojo relleno) y acetato (cuadro rojo sin relleno), C) aumento de pH (triangulo azul) y D) densidad óptica (rombo verde).



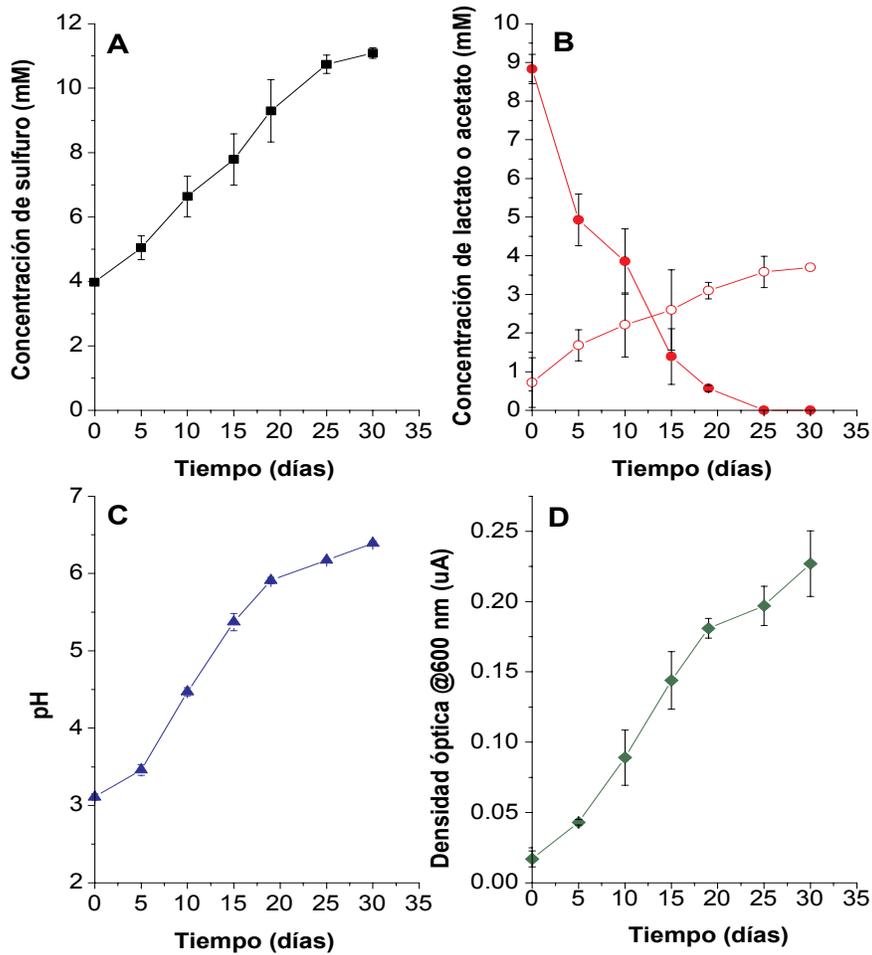
**Figura A4.2** Triplicado consorcio 3 A) producción de sulfuro (cuadro negro), B) consumo de sustrato lactato (cuadro rojo relleno) y acetato (cuadro rojo sin relleno), C) aumento de pH (triangulo azul) y D) densidad óptica (rombo verde).



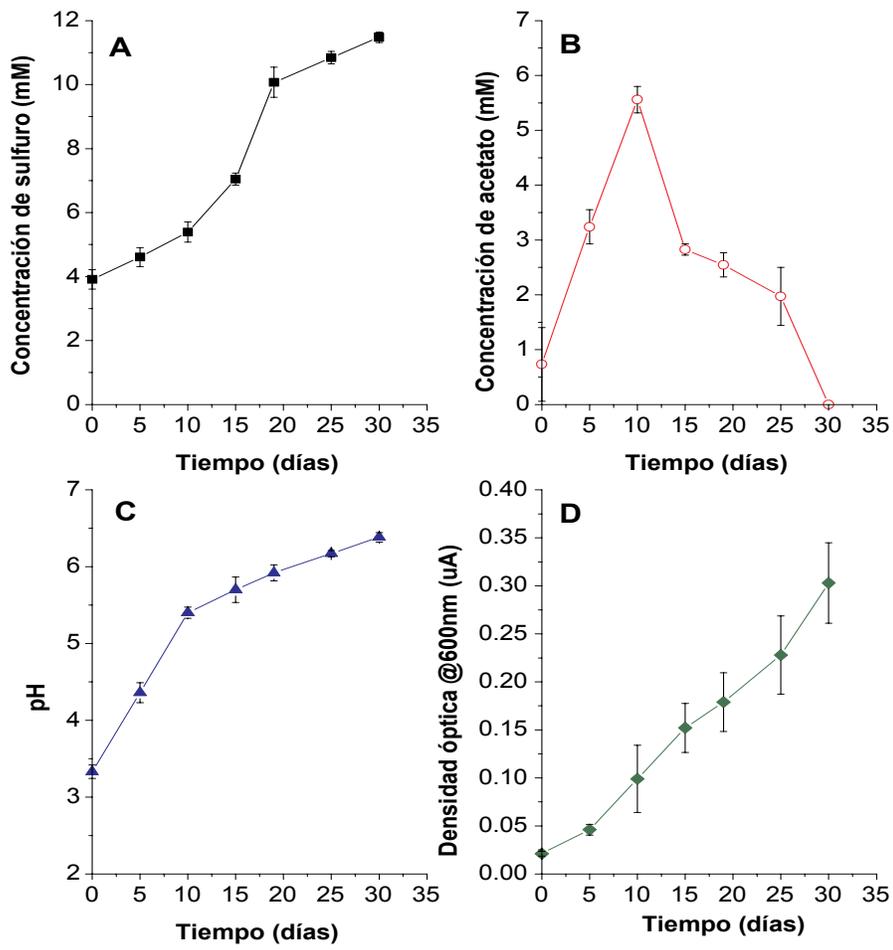
**Figura A4.3** Triplicado consorcio 4 A) producción de sulfuro (cuadro negro), B) consumo de sustrato lactato (cuadro rojo relleno) y acetato (cuadro rojo sin relleno), C) aumento de pH (triangulo azul) y D) densidad óptica (rombo verde).



**Figura A4.4** Triplicado consorcio 5 A) producción de sulfuro (cuadro negro), B) consumo de sustrato lactato (cuadro rojo relleno) y acetato (cuadro rojo sin relleno), C) aumento de pH (triangulo azul) y D) densidad óptica (rombo verde).



**Figura A4.5** Triplicado consorcio 6 A) producción de sulfuro (cuadro negro), B) consumo de sustrato lactato (cuadro rojo relleno) y acetato (cuadro rojo sin relleno), C) aumento de pH (triángulo azul) y D) densidad óptica (rombo verde).



**Figura A4.6** Triplicado consorcio 7 A) producción de sulfuro (cuadro negro), B) consumo de sustrato lactato (cuadro rojo relleno) y acetato (cuadro rojo sin relleno), C) aumento de pH (triángulo azul) y D) densidad óptica (rombo verde).

## Anexo 5 (Taxa clonas secuenciadas)

Consortio	Clona	Dominio	Phyla	Clase	Subclase	Orden	Familia	Genero	Especie
1	1	Bacteria(100)	Spirochaetes(11)	Spirochaetes(11)	Spirochaetales(8)	Leptospiraceae(6)	Leptonema(6)	unclassified	unclassified
1	2	Bacteria(100)	Spirochaetes(9)	Spirochaetes(9)	Spirochaetales(8)	Leptospiraceae(7)	Leptonema(7)	unclassified	unclassified
1	3	Bacteria(100)	Spirochaetes(7)	Spirochaetes(7)	Spirochaetales(5)	Leptospiraceae(3)	Leptonema(3)	unclassified	unclassified
1	4	Bacteria(100)	Spirochaetes(5)	Spirochaetes(5)	Spirochaetales(5)	Leptospiraceae(4)	Leptonema(4)	unclassified	unclassified
1	5	Bacteria(100)	Spirochaetes(13)	Spirochaetes(13)	Spirochaetales(9)	Leptospiraceae(8)	Leptonema(8)	unclassified	unclassified
1	6	Bacteria(100)	Spirochaetes(3)	Spirochaetes(3)	Spirochaetales(3)	Leptospiraceae(3)	Leptonema(3)	unclassified	unclassified
1	7	Bacteria(100)	Bacteroidetes(20)	Sphingobacteria(10)	Sphingobacteriales(10)	Sphingobacteriaceae(2)	Solitalea(2)	unclassified	unclassified
1	9	Bacteria(100)	Spirochaetes(5)	Spirochaetes(5)	Spirochaetales(4)	Leptospiraceae(3)	Leptonema(2)	unclassified	unclassified
1	10	Bacteria(100)	Spirochaetes(6)	Spirochaetes(6)	Spirochaetales(5)	Leptospiraceae(4)	Leptonema(4)	unclassified	unclassified
1	11	Bacteria(100)	Spirochaetes(8)	Spirochaetes(8)	Spirochaetales(6)	Leptospiraceae(5)	Leptonema(5)	unclassified	unclassified
1	14	Bacteria(100)	Firmicutes(16)	Mollicutes(5)	RF9(5)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
1	15	Bacteria(100)	Firmicutes(17)	Mollicutes(4)	RF9(4)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
1	16	Bacteria(100)	Planctomycetes(18)	vadinHA49(14)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified

1	17	Bacteria(100)	Spirochaetes(21)	Spirochaetes(21)	Spirochaetales(21)	Leptospiraceae(18)	Leptonema(15)	unclassified	unclassified
1	18	Bacteria(100)	Planctomycetes(12)	vadinHA49(6)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
1	19	Bacteria(100)	Actinobacteria(8)	Actinobacteria(8)	Actinobacteridae(5)	Actinomycetales(5)	Actinopolysporineae(4)	Actinopolysporaceae(4)	Actinopolysporina(4)
1	20	Bacteria(100)	Spirochaetes(8)	Spirochaetes(8)	SHA-41(8)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
1	21	Bacteria(100)	Actinobacteria(12)	Actinobacteria(12)	Actinobacteridae(12)	Actinomycetales(12)	Streptosporangineae(9)	Thermomonosporaceae(7)	Thermomonosporina(2)
1	22	Bacteria(100)	Verrucomicrobia(9)	Opitutae(5)	Puniceococcales(5)	Puniceococcaceae(5)	Cerasicoccus(5)	unclassified	unclassified
1	23	Bacteria(100)	Spirochaetes(7)	Spirochaetes(7)	Spirochaetales(7)	Leptospiraceae(6)	Leptonema(5)	unclassified	unclassified
2	24	Bacteria(100)	Spirochaetes(9)	Spirochaetes(9)	Spirochaetales(7)	Leptospiraceae(6)	Leptonema(6)	unclassified	unclassified
2	25	Bacteria(100)	Spirochaetes(10)	Spirochaetes(10)	Spirochaetales(6)	Leptospiraceae(6)	Leptonema(6)	unclassified	unclassified
2	26	Bacteria(100)	Spirochaetes(6)	Spirochaetes(6)	Spirochaetales(6)	Leptospiraceae(4)	Leptonema(4)	unclassified	unclassified
2	27	Bacteria(100)	Bacteroidetes(25)	Sphingobacteria(17)	Sphingobacteriales(17)	Flammeovirgaceae(11)	Thermonema(9)	unclassified	unclassified
2	28	Bacteria(100)	Spirochaetes(11)	Spirochaetes(11)	Spirochaetales(10)	Leptospiraceae(9)	Leptonema(9)	unclassified	unclassified
2	29	Bacteria(100)	Spirochaetes(10)	Spirochaetes(10)	Spirochaetales(10)	Leptospiraceae(10)	Leptonema(9)	unclassified	unclassified
2	30	Bacteria(100)	Spirochaetes(10)	Spirochaetes(10)	Spirochaetales(9)	Leptospiraceae(8)	Leptonema(8)	unclassified	unclassified
2	31	Bacteria(100)	Spirochaetes(16)	Spirochaetes(16)	Spirochaetales(15)	Leptospiraceae(14)	Leptonema(14)	unclassified	unclassified
2	32	Bacteria(100)	Firmicutes(24)	Mollicutes(10)	RF9(10)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified

2	33	Bacteria(100)	Spirochaetes(11)	Spirochaetes(11)	Spirochaetales(11)	Leptospiraceae(8)	Leptonema(8)	unclassified	unclassified
2	34	Bacteria(100)	Spirochaetes(5)	Spirochaetes(5)	Spirochaetales(4)	Leptospiraceae(4)	Leptonema(4)	unclassified	unclassified
2	35	Bacteria(100)	Planctomycetes(10)	vadinHA49(4)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
2	36	Bacteria(100)	Spirochaetes(7)	Spirochaetes(7)	Spirochaetales(7)	Leptospiraceae(4)	Leptonema(3)	unclassified	unclassified
2	38	Bacteria(100)	Firmicutes(23)	Erysipelotrichi(11)	Erysipelotrichales(11)	Erysipelotrichaceae(11)	Allobaculum(11)	unclassified	unclassified
2	39	Bacteria(100)	Acidobacteria(10)	Holophagae(10)	32-20(9)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
2	40	Bacteria(100)	Spirochaetes(11)	Spirochaetes(11)	Spirochaetales(8)	Leptospiraceae(6)	Leptonema(6)	unclassified	unclassified
2	41	Bacteria(100)	Spirochaetes(9)	Spirochaetes(9)	Spirochaetales(8)	Leptospiraceae(8)	Leptonema(7)	unclassified	unclassified
2	42	Bacteria(100)	Spirochaetes(9)	Spirochaetes(9)	Spirochaetales(5)	Leptospiraceae(5)	Leptonema(5)	unclassified	unclassified
2	43	Bacteria(100)	Acidobacteria(5)	Holophagae(5)	32-20(5)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
2	44	Bacteria(100)	Spirochaetes(6)	Spirochaetes(6)	Spirochaetales(6)	Leptospiraceae(6)	Leptonema(6)	unclassified	unclassified
2	45	Bacteria(100)	Acidobacteria(3)	Holophagae(3)	32-20(3)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
2	46	Bacteria(100)	Spirochaetes(3)	Spirochaetes(3)	Spirochaetales(2)	Leptospiraceae(2)	Leptonema(2)	unclassified	unclassified
2	48	Bacteria(100)	Spirochaetes(9)	Spirochaetes(9)	Spirochaetales(7)	Leptospiraceae(4)	Leptonema(4)	unclassified	unclassified
2	49	Bacteria(100)	Spirochaetes(9)	Spirochaetes(9)	Spirochaetales(8)	Leptospiraceae(7)	Leptonema(6)	unclassified	unclassified
2	50	Bacteria(100)	Firmicutes(22)	Mollicutes(9)	Anaeroplasmatales(8)	Anaeroplasmataceae(8)	Anaeroplasma(8)	unclassified	unclassified
2	51	Bacteria(100)	Acidobacteria(2)	Holophagae(2)	32-20(2)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified

2	53	Bacteria(100)	Spirochaetes(4)	Spirochaetes(4)	Spirochaetales(3)	Leptospiraceae(3)	Leptonema(3)	unclassified	unclassified
2	54	Bacteria(100)	Synergistetes(90)	Synergistia(90)	Synergistales(90)	Synergistaceae(90)	Thermanaerovibrio(55)	unclassified	unclassified
2	55	Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Sphingobacteria(100)	Sphingobacteriales(100)	WCHB1-69(100)	unclassified	unclassified	unclassified
2	56	Bacteria(100)	Spirochaetes(5)	Spirochaetes(5)	Spirochaetales(4)	Leptospiraceae(3)	Leptonema(3)	unclassified	unclassified
2	57	Bacteria(100)	Firmicutes(21)	Mollicutes(10)	RF9(10)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
3	59	Bacteria(100)	Verrucomicrobia(6)	Opitutae(4)	Puniceicoccales(4)	Puniceicoccaceae(4)	Cerasicoccus(4)	unclassified	unclassified
3	60	Bacteria(100)	Spirochaetes(5)	Spirochaetes(5)	Spirochaetales(5)	Leptospiraceae(4)	Leptonema(4)	unclassified	unclassified
3	61	Bacteria(100)	Spirochaetes(9)	Spirochaetes(9)	Spirochaetales(8)	Leptospiraceae(7)	Leptonema(7)	unclassified	unclassified
3	62	Bacteria(100)	Aquificae(1)	Aquificae(1)	Aquificales(1)	Desulfurobacteriaceae(1)	Thermovibrio(1)	unclassified	unclassified
3	63	Bacteria(100)	Spirochaetes(11)	Spirochaetes(11)	Spirochaetales(11)	Leptospiraceae(10)	Leptonema(7)	unclassified	unclassified
3	64	Bacteria(100)	Bacteroidetes(22)	Sphingobacteria(17)	Sphingobacteriales(17)	KD1-131(5)	unclassified	unclassified	unclassified
3	65	Bacteria(100)	Spirochaetes(5)	Spirochaetes(5)	Spirochaetales(5)	Leptospiraceae(5)	Leptonema(5)	unclassified	unclassified
3	66	Bacteria(100)	Spirochaetes(14)	Spirochaetes(14)	Spirochaetales(13)	Leptospiraceae(11)	Leptonema(11)	unclassified	unclassified
3	67	Bacteria(100)	Spirochaetes(6)	Spirochaetes(6)	Spirochaetales(5)	Leptospiraceae(3)	Leptonema(3)	unclassified	unclassified
3	71	Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Clostridiaceae(100)	Clostridium(100)	unclassified	unclassified
3	72	Bacteria(100)	Spirochaetes(8)	Spirochaetes(8)	Spirochaetales(8)	Leptospiraceae(8)	Leptonema(8)	unclassified	unclassified

3	74	Bacteria(100)	Spirochaetes(5)	Spirochaetes(5)	Spirochaetales(5)	Leptospiraceae(5)	Leptonema(4)	unclassified	unclassified
3	75	Bacteria(100)	Spirochaetes(5)	Spirochaetes(5)	Spirochaetales(5)	Leptospiraceae(5)	Leptonema(5)	unclassified	unclassified
3	76	Bacteria(100)	Spirochaetes(11)	Spirochaetes(11)	Spirochaetales(10)	Leptospiraceae(9)	Leptonema(9)	unclassified	unclassified
4	77	Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Sphingobacteria(100)	Sphingobacteriales(100)	WCHB1-69(100)	unclassified	unclassified	unclassified
4	78	Bacteria(100)	Spirochaetes(7)	Spirochaetes(7)	Spirochaetales(6)	Leptospiraceae(6)	Leptonema(6)	unclassified	unclassified
4	79	Bacteria(100)	Proteobacteria(38)	Alphaproteobacteria(16)	Rickettsiales(14)	Anaplasmataceae(14)	Candidatus_Neoehrlichia(9)	unclassified	unclassified
4	80	Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Sphingobacteria(100)	Sphingobacteriales(100)	WCHB1-69(100)	unclassified	unclassified	unclassified
4	81	Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Sphingobacteria(100)	Sphingobacteriales(100)	WCHB1-69(99)	unclassified	unclassified	unclassified
4	82	Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Sphingobacteria(100)	Sphingobacteriales(100)	WCHB1-69(100)	unclassified	unclassified	unclassified
4	83	Bacteria(100)	Spirochaetes(14)	Spirochaetes(14)	Spirochaetales(13)	Leptospiraceae(10)	Leptonema(10)	unclassified	unclassified
4	84	Bacteria(100)	Synergistetes(88)	Synergistia(88)	Synergistales(88)	Synergistaceae(88)	Thermanaerovibrio(58)	unclassified	unclassified
4	85	Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Sphingobacteria(100)	Sphingobacteriales(100)	WCHB1-69(99)	unclassified	unclassified	unclassified
4	86	Bacteria(100)	Deinococcus-Thermus(4)	Thermales(4)	Thermaceae(4)	Vulcanithermus(3)	unclassified	unclassified	unclassified
4	87	Bacteria(100)	Proteobacteria(100)	$\delta$ -proteobacteria(100)	Desulfovibrionales(100)	Desulfovibrionaceae(99)	Desulfovibrio(99)	unclassified	unclassified
4	89	Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Lachnospiraceae(100)	Incertae_Sedis(	unclassified	unclassified

							100)			
4	90	Bacteria(100)	Bacteroidetes(66)	Sphingobacteria(35)	Sphingobacteriales(35)	KD1-131(26)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
4	91	Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Clostridiaceae(100)	Clostridium(100)	unclassified	unclassified	unclassified
4	93	Bacteria(100)	Spirochaetes(8)	Spirochaetes(8)	Spirochaetales(8)	Leptospiraceae(7)	Leptonema(7)	unclassified	unclassified	unclassified
4	94	Bacteria(100)	Proteobacteria(100)	$\delta$ -proteobacteria(100)	Desulfobacteriales(93)	Desulfobacteraceae(93)	Desulfobacterium(85)	unclassified	unclassified	unclassified
4	95	Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Sphingobacteria(100)	Sphingobacteriales(100)	WCHB1-69(99)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
4	96	Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Sphingobacteria(100)	Sphingobacteriales(100)	WCHB1-69(100)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
6	97	Bacteria(100)	Firmicutes(13)	Mollicutes(2)	RF9(2)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
6	98	Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Lachnospiraceae(100)	Incertae_Sedis(100)	unclassified	unclassified	unclassified
6	99	Bacteria(100)	Thermotogae(100)	Thermotogae(100)	Thermotogales(100)	Thermotogaceae(100)	Kosmotoga(100)	unclassified	unclassified	unclassified
6	100	Bacteria(100)	Acidobacteria(19)	Holophagae(11)	SJA-36(10)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
6	101	Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Sphingobacteria(100)	Sphingobacteriales(100)	WCHB1-69(100)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
6	102	Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Sphingobacteria(100)	Sphingobacteriales(100)	WCHB1-69(99)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
6	103	Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Lachnospiraceae(100)	Incertae_Sedis(100)	unclassified	unclassified	unclassified
6	104	Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Sphingobacteria(100)	Sphingobacteriales(100)	WCHB1-69(100)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified

6	105	Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Sphingobacteria(100)	Sphingobacteriales(100)	WCHB1-69(100)	unclassified	unclassified	unclassified
6	106	Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Sphingobacteria(100)	Sphingobacteriales(100)	WCHB1-69(100)	unclassified	unclassified	unclassified
6	107	Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Peptococcaceae(100)	Desulfotomaculum(99)	unclassified	unclassified
6	108	Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Sphingobacteria(100)	Sphingobacteriales(100)	WCHB1-69(100)	unclassified	unclassified	unclassified
7	109	Bacteria(100)	Spirochaetes(6)	Spirochaetes(6)	Spirochaetales(6)	Leptospiraceae(5)	Leptonema(5)	unclassified	unclassified
7	110	Bacteria(100)	Spirochaetes(11)	Spirochaetes(11)	Spirochaetales(7)	Leptospiraceae(6)	Leptonema(6)	unclassified	unclassified
7	111	Bacteria(100)	Firmicutes(25)	Clostridia(14)	Clostridiales(11)	Veillonellaceae(9)	Schwartzia(1)	unclassified	unclassified
7	112	Bacteria(100)	Spirochaetes(7)	Spirochaetes(7)	Spirochaetales(7)	Leptospiraceae(7)	Leptonema(7)	unclassified	unclassified
7	113	Bacteria(100)	Spirochaetes(10)	Spirochaetes(10)	Spirochaetales(4)	Leptospiraceae(3)	Leptonema(3)	unclassified	unclassified
7	114	Bacteria(100)	Spirochaetes(12)	Spirochaetes(12)	Spirochaetales(11)	Leptospiraceae(11)	Leptonema(11)	unclassified	unclassified
7	115	Bacteria(100)	Bacteroidetes(21)	Flavobacteria(13)	Flavobacteriales(13)	Flavobacteriaceae(12)	Yeosuana(2)	unclassified	unclassified
7	117	Bacteria(100)	Verrucomicrobia(18)	Opitutae(12)	Puniceococcales(12)	Puniceococcaceae(12)	Cerasicoccus(11)	unclassified	unclassified
7	120	Bacteria(100)	Spirochaetes(8)	Spirochaetes(8)	Spirochaetales(7)	Leptospiraceae(6)	Leptonema(6)	unclassified	unclassified
7	121	Bacteria(100)	Planctomycetes(10)	vadinHA49(9)	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
7	122	Bacteria(100)	Spirochaetes(11)	Spirochaetes(11)	Spirochaetales(9)	Leptospiraceae(9)	Leptonema(8)	unclassified	unclassified

( ) porcentaje de similitud La secuencia 37 se elimino ya que no se pudo clasificar

**Anexo 6.- Porcentaje de secuencia obtenidas por cada consorcio de cada Phylum**

Phylum	Consortio					
	1	2	3	4	6	7
Tipo Spirochaetes	60.0	61.3	71.4	16.7	0.0	63.6
Bacteroidetes	5.0	6.5	7.1	44.4	50.0	9.1
Firmicutes	10.0	12.9	7.1	11.1	33.3	9.1
Tipo Planctomycetes	10.0	3.2	0.0	0.0	0.0	9.1
Tipo Actinobacteria	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Tipo Verrucomicrobia	5.0	0.0	7.1	0.0	0.0	9.1
Tipo Acidobacteria	0.0	12.9	0.0	0.0	8.3	0.0
Synergistetes	0.0	3.2	0.0	5.6	0.0	0.0
Tipo Aquificae	0.0	0.0	7.1	0.0	0.0	0.0
Proteobacteria	0.0	0.0	0.0	16.7	0.0	0.0
Tipo Deinococcus- Thermus	0.0	0.0	0.0	5.6	0.0	0.0
Thermotogae	0.0	0.0	0.0	0.0	8.3	0.0
	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

**Anexo 7.- Porcentajes de similitud obtenidos con base de datos NCBI**

**Consortio 1**

Numero de clona	Microorganismo tipo	Porcentaje de identidad [%]
1	no cultivable	99
2	no cultivable	99
3	--	
4	no cultivable	98
5	--	
6	--	
7	no cultivable	97
8	--	
9	no cultivable	100
10	no cultivable	99
11	no cultivable	99
12	--	
13	--	
14	--	
15	no cultivable	100
16	--	
17	no cultivable	93

18	--	
19	no cultivable	83
20	no cultivable	99
21	no cultivable	97
22	--	
23	no cultivable	97

## Consortio 2

Numero de clona	Microorganismo tipo	Porcentaje de identidad [%]
24	no cultivable	99
25	no cultivable	100
26	no cultivable	99
27	--	
28	no cultivable	98
29	--	
30	no cultivable	100
31	no cultivable	97
32	--	
33	--	
34	no cultivable	98
35	no cultivable	99
36	--	
37	--	
38	no cultivable	86
39	no cultivable	94
40	--	
41	no cultivable	100
42	no cultivable	90
43	no cultivable	95
44	no cultivable	94
45	no cultivable	91
46	no cultivable	98
47	Clostridium propionicum	99
48	--	
49	no cultivable	100
50	no cultivable	89
51	--	
52	--	
53	Desulfotomacolum gibsoniae	98
54	no cultivable	100
55	no cultivable	100
56	no cultivable	98
57	---	

**Consortio 3**

<b>Numero de clona</b>	<b>Microorganismo tipo</b>	<b>Porcentaje de identidad [%]</b>
58	--	
59	no cultivable	97
60	Clostridium propionicum	99
61	--	
62	--	
63	no cultivable	98
64	--	
65	Desulfotomacolum gibsoniae	100
66	--	
67	no cultivable	100
68	--	
69	--	
70	--	
71	no cultivable	100
72	--	
73	--	
74	no cultivable	97
75	Desulfovibrio marrakechensis	98
76	--	

**Consortio 4**

<b>Numero de clona</b>	<b>Microorganismo tipo</b>	<b>Porcentaje de identidad [%]</b>
77	no cultivable	96
78	no cultivable	100
79	--	
80	no cultivable	98
81	no cultivable	99
82	no cultivable	100
83	no cultivable	100
84	no cultivable	96
85	no cultivable	99
86	--	
87	Desulfovibrio marrakechensis	100
88	--	
89	Clostridium propionicum	100
90	--	
91	Clostridium beijerinckii	100
92	--	
93	no cultivable	97

94	Desulfobacterium indolicum	100
95	no cultivable	90
96	no cultivable	94

### Consortio 6

Numero de clona	Microorganismo tipo	Porcentaje de identidad [%]
97	--	
98	Clostridium propionicum	100
99	no cultivable	94
100	no cultivable	40
101	no cultivable	100
102	no cultivable	96
103	Clostridium propionicum	100
104	no cultivable	86
105	no cultivable	89
106	no cultivable	98
107	Desulfotomacolum gibsoniae	97
108	no cultivable	98

### Consortio 7

Numero de clona	Microorganismo tipo	Porcentaje de identidad [%]
109	no cultivable	100
110	--	
111	Desulfotomacolum gibsoniae	99
112	no cultivable	100
113	no cultivable	100
114	--	
115	no cultivable	67
116	--	
117	no cultivable	98
118	--	
119	Clostridium propionicum	93
120	--	
121	no cultivable	98
122	--	

## Anexo 8 Secuencias completas de aquellas que pudieron ser identificadas

### NCBI

#### *Clostridium sp.*

GCATCCTGCCCTGTA CTGTGGAATAATCACTGGAAACGGTGACTAATACCGCATGT  
CATTGCGAGAGGGGCATCCTCTTGCAAGAAAAGGATTTATTCGGTACAGGATGGGCC  
CGCATCTGATTAGCTAGTTGGTGAGATAACAGCCCACCAAGGCAACGATCAGTAGC  
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTAC  
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGC  
CGCGTGAAGGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTTCTATCAACAGGGACGAAAAAA  
ATGACGGTACCTGAATAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  
TACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTACTGGGTGTAAAGGGAGAGTAGGCGG  
CATGGTAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGAGGCTTAACCTCGGGATTGCATTTAAACT  
ATCAAGCTAGAGTACAGGAGAG

#### *Desulfotomaculum sp.*

AGTAACGCGTGGATAACCTGCCCCCTTAGCCTGGGATAACGCCGGGAAACTGGTG  
CTAATACCGGATACGTTTCATCTGGCTGCATAGCCGGATGAAGAAAGGTGCAAACCG  
CTACTGGATGGGTCCGCGTCCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAG  
GCAGCGATGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCCGGCCACACTGGA ACTGAGACA  
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTCCGCAATGGGCGCAA  
GCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCCGATTGTAAA ACTCTG  
TCCAAAGGGAAGAAACAATGACGGTACCTTTGGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGT  
GCCAGCAGCCGCGGTAAAACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGT  
AAAGGGCGTGTAGGCGGCTCTACAAGTCAGTCGTGAAACCTACCGGCTTAACCGG  
TAGCTGGCGATTGAAAC

#### *Desulfovibrio sp.*

TCTACCCAAACGTTTCGGGCTAACGGGGGGAAACTACCGCTAATACCGGATACGCT  
CCAATTTTCGGTTGGAGGAAAGGCGGCCTCTGCTTGCAAGCTGTCGCATTTGGATGA  
GTCCGCGTCCATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCTACGATGGG  
TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGA ACTGAAACACGGTCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGC  
GACGCCGTGTGAGGGAAGAAGGCTTTCCGGTTCGTAAACCTCTGTCCGGAAAGGAAG  
AGCCCCCAAGTCCGAATAGGGCTTGGGGCTGACGGTACTTCAAAGGAAGCACC  
GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA  
ATCACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGCTTTTTAAGTCGGACGTGAAAGCCCT  
CGGCTCAACCGGGGAATTGCGTTGCAAACTGGGAGGCTTGAGTCCTGG

#### *Desulfobacterium sp.*

TTGGATTTGGGATAACATTTGCGAAAGGGGTGCTAATACCAGATAATATCCTGATGAT  
TTTGGTTATTAGGATCAAAGATAGCCTCTACATGTAAGCTATTGTGCAAGGATGAGC  
CCGCGTACCATTAGCTAGTTGGCAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATGGTTA  
GCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAAACACGGTCCAGACTCCT  
ACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATTTTGGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAAC  
GCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTGGGTCGTAAAGCTCTGTCAAGAGGGAAGAAG  
GTAGATGGTGGTAATACTGCTGTTTATTGACGGTACCTCTGAAGGAAGCACCGGCT  
AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGGTGAAGCGTTATTCGGATTTA  
TTGGGCGTAAAGAGCGC

## SILVA

### *Desulfovibrio sp.*

TCTACCCAAACGTTCCGGGCTAACGGGGGGAAACTACCGCTAATACCGGATACGCT  
CCAATTTCCGGTTGGAGGAAAGGCGGCCTCTGCTTGCAAGCTGTCCGATTTGGATGA  
GTCCGCGTCCCATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCTACGATGGG  
TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAAACACGGTCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGC  
GACGCCGTGTGAGGGAAGAAGGCTTTCCGGTTCGTAAACCTCTGTCCGGGAAGGAAG  
AGCCCCCAAGTCCGAATAGGGCTTGGGGCTGACGGTACTTCCAAAGGAAGCACC  
GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGA  
ATCACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGGCGCTTTTAAAGTCGGACGTGAAAGCCCT  
CGGCTCAACCGGGGAATTGCGTTCGAAACTGGGAGGCTTGAGTCCTGG

### *Desullobacterium sp.*

TTGGATTTGGGATAACATTTGCGAAAGGGGTGCTAATACCAGATAATATCCTGATGAT  
TTTGGTTATTAGGATCAAAGATAGCCTCTACATGTAAGCTATTGTGCAAGGATGAGC  
CCGCGTACCATTAGCTAGTTGGCAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATGGTTA  
GCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAAACACGGTCCAGACTCCT  
ACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATTTTGGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAAC  
GCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTGGGTCGTAAAGCTCTGTCAAGAGGGAAGAAG  
GTAGATGGTGGTAATACTGCTGTTTATTGACGGTACCTCTGAAGGAAGCACCGGCT  
AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGGTGAAGCGTTATTCGGATTTA  
TTGGGCGTAAAGAGCGC

### *Clostridium sp.*

CCCCCGAAAGGGAGATTAATACCGCATAACATTATTTTCTCGCATGAGAAGATAAT  
CAAAGGAGCAATCCGCTTTGAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGG  
TAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTGCGCCACA  
TTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC  
GCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGA  
TTGTAAAGCTCTGTCTTTGGGACGATAATGACGGTACCCAAGGAGGAAGCCACG  
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAT  
TACTGGGCGTAAAGAGTATGTAGGCGGATATTTAAGTCAGATGTGAAATTCGCGG  
GCTTAACCTGGGCGCTGCATTTGAAACTGGGTATCTAGAGTGCGGGAGAGGAAAG  
TGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAG

### *Desulfo bacteriaceae sp.*

AGTAACGCGTGGATAACCTGCCCCCTTAGCCTGGGATAACGCCGGGAAACTGGTG  
CTAATACCGGATACGTTTCTGCTGCGTGCATAGCCGGATGAAGAAAGGTGCAACCG  
CTACTGGATGGGTCCGCGTCCCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAG

GCAGCGATGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGCGACCGGCCACACTGGAAGTGGAGACA  
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTCCGCAATGGGCGCAA  
GCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCCGATTGTAAAACCTCTG  
TCCAAAGGGAAGAAACAAATGACGGTACCTTTGGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGT  
GCCAGCAGCCGCGGTAAAACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAAGGGCGT  
AAAGGGCGTGTAGGCGGCTCTACAAGTCAGTCGTGAAACCTACCGGCTTAACCGG  
TAGCTGGCGATTGAAAC

### Anexo 9 Curvas de rarefacción

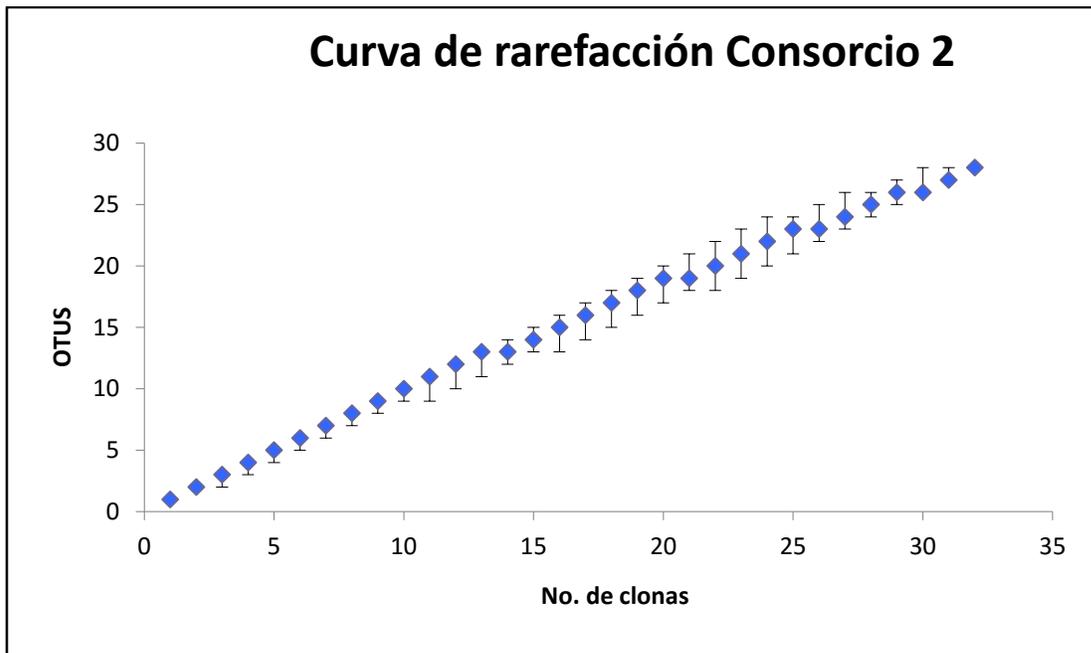
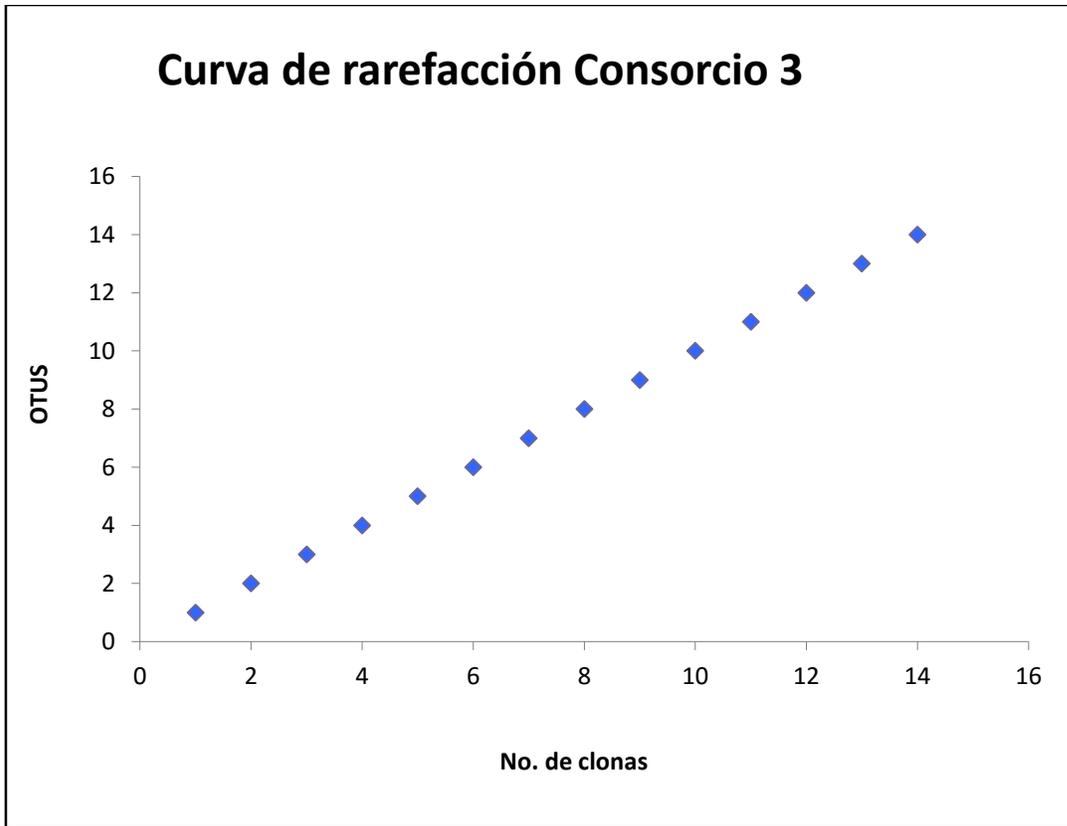
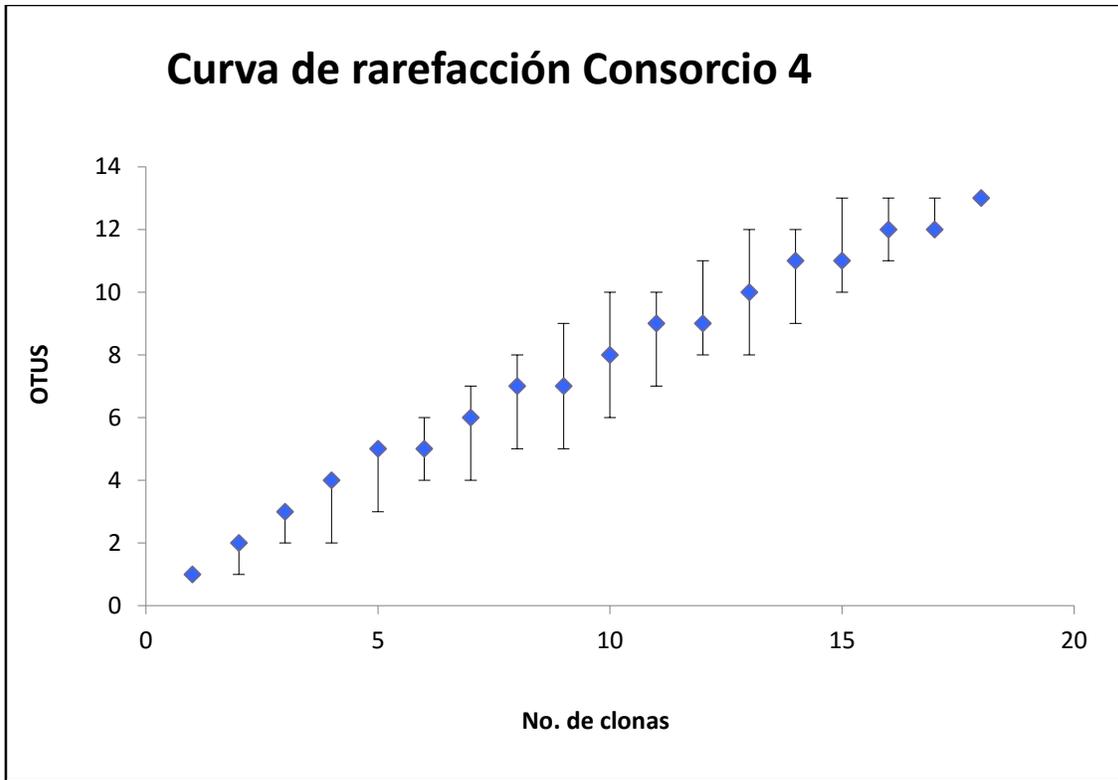


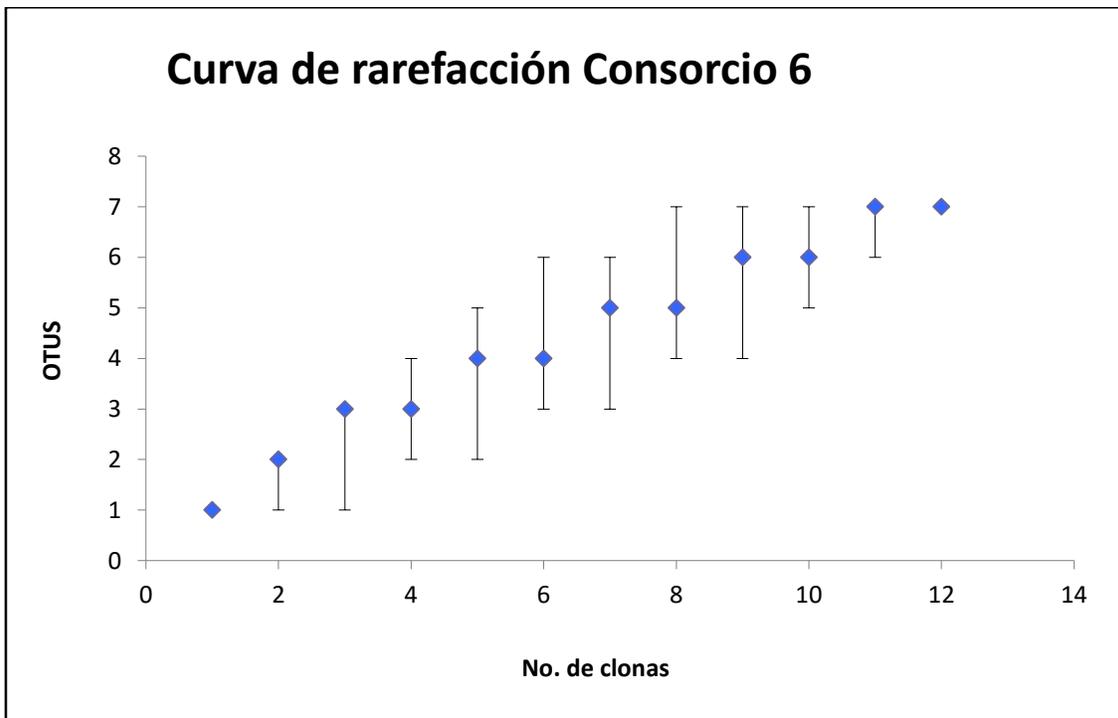
Figura A9.1 Curva de rarefacción Consorcio 2 Programa Mothur, base de datos SILVA)



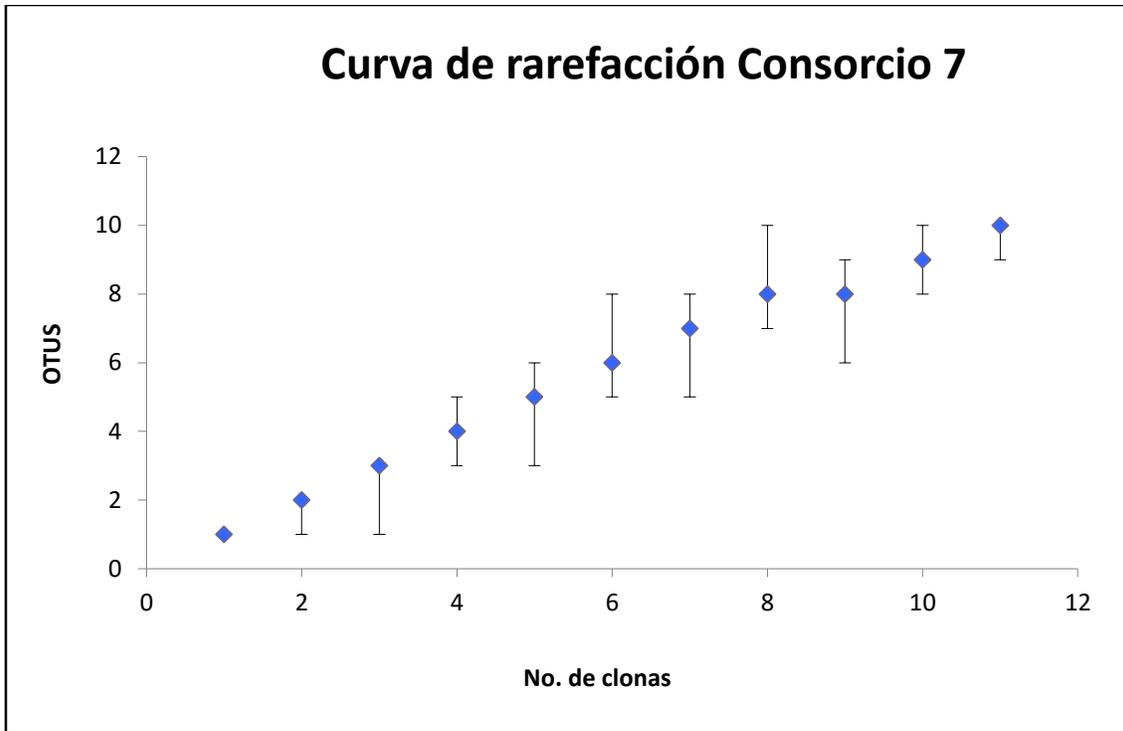
**Figura A9.2** Curva de rarefacción Consorcio 3 Programa Mothur, base de datos SILVA)



**Figura A9.3** Curva de rarefacción Consorcio 4 Programa Mothur, base de datos SILVA)



**Figura A9.4** Curva de rarefacción Consorcio 6 Programa Mothur, base de datos SILVA)



**Figura A9.5** Curva de rarefacción Consorcio 7 Programa Mothur, base de datos SILVA)