



Universidad Nacional de la Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Química

Bioprecipitación de metales pesados por bacterias reductoras de sulfato aisladas de muestras ambientales

Pamela Alejandra Kikot

Tesis Doctoral

2012



*“Bioprecipitación de metales pesados por bacterias reductoras
de sulfato aisladas de muestras ambientales”*

El presente trabajo de tesis, para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigaciones y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata, con el financiamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Tesista: Lic. Pamela Alejandra Kikot

Director: Dr. Carlos Fernando Mignone

Co-director: Dra. Marisa Viera

2012

Parte de los resultados obtenidos con el presente trabajo de tesis han sido publicados o aceptados para su publicación en revistas científicas:

Kikot P., Viera M., Mignone C., Donati E., 2010. Study of the effect of pH and dissolved heavy metals on the growth of sulfate-reducing bacteria by a fractional factorial design. Hydrometallurgy 104 (3-4), 494-500.

Kikot P., Viera M., Mignone C., Donati E., 2009. Isolation of mesophilic sulfate-reducing bacteria from a microbial community: Comparative study of the effect of pH and dissolved heavy metals on the reduction of sulfate. Advanced Materials Research 71-73, 549-552.

A Mónica y Alejandro

A Gisele y Gabriel

A Nicolás

A Catalina

Índice de contenidos

CAPÍTULO 1:

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATO (BRS)	3
1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS BRS	4
1.3. METABOLISMO DE COMPUESTOS ORGÁNICOS	5
1.4. CONTEXTO ECOLÓGICO	9
1.5. INTERACCIÓN CON BACTERIAS METANOGÉNICAS Y ACETOGÉNICAS	10
1.6. EFECTO DE LOS FACTORES AMBIENTALES SOBRE EL CRECIMIENTO DE LAS BRS.....	12
1.6.1. Efecto del pH	12
1.6.2. Efecto de la temperatura.....	14
1.6.3. Efecto del sulfuro.....	15
1.6.4. Efecto de los metales pesados.....	18
1.6.5. Efecto del oxígeno.....	20
1.6.6. Efecto del sulfato.....	21
1.7. BIORREMEDIACIÓN	23
1.8. BIORREACTORES SULFIDOGÉNICOS.....	24
1.9. ESTUDIO MOLECULAR DE LA ECOLOGÍA MICROBIANA	31
1.9.1. Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE)	33
1.9.2. Hibridación fluorescente in situ (FISH)	35
1.9.3. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	37
1.10. OBJETIVO DE LA TESIS	39
CARACTERIZACIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS PARA SU UTILIZACIÓN EN BIORREACTORES SULFIDOGÉNICOS	41
2.1. OBJETIVO.....	43
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	43
2.2.1. Fuente del inóculo y aislamiento	43
2.2.2. Determinación de $\mu_{m\acute{a}xima}$ y r_{SO_4}	44
2.2.3. Consumo de diferentes fuentes de carbono.....	46
2.2.4. Efecto del pH y los metales pesados	47
2.2.4.1. Diseño factorial fraccionado 2_{IV}^{7-3}	47
2.2.4.2. Análisis estadístico del diseño factorial fraccionado	49
2.2.4.3. Cinética de crecimiento a diferentes valores de pH inicial	50
2.2.5. Métodos analíticos.....	51
2.2.5.1. Determinación de sulfato.....	51
2.2.5.2. Determinación de metales pesados en solución.....	51
2.2.5.3. Determinación de ácido láctico y acético	52
2.2.5.4. Determinación de densidad óptica.....	52
2.2.6. Morfología bacteriana.....	52
2.2.6.1. Fijación de las células.....	52
2.2.6.2. Tinción de DAPI	52
2.2.7. Conteo directo de células.....	53
2.2.8. Análisis de las comunidades microbianas por DGGE.....	53
2.2.8.1. Extracción de ADN	53
2.2.8.2. Amplificación por PCR	53
2.2.8.3. DGGE.....	54

2.2.8.4. Análisis estadístico de patrones de DGGE	54
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
2.3.1. Comunidades microbianas reductoras de sulfato	55
2.3.2. Aislamiento de cepas de BRS y caracterización	58
2.3.3. Utilización de fuentes de carbono.....	59
2.3.4. Precipitación de metales pesados	61
2.3.5. Efecto de los metales pesados y el pH sobre la reducción total de sulfato.....	63
2.3.6. Efecto de los metales pesados y el pH sobre la cinética de crecimiento.....	66
2.3.7. Efecto del pH y los metales sobre la composición del consorcio bacteriano	69
2.4. CONCLUSIONES.....	73
EVALUACIÓN DE SOPORTES PARA LA INMOVILIZACIÓN DE BRS.....	77
3.1. OBJETIVO.....	79
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	79
3.2.1. Inóculo y medios de cultivo.....	79
3.2.2. Propiedades físicas de los materiales de soporte	79
3.2.3. Ensayo de inmovilización / actividad.....	80
3.2.4. Métodos analíticos.....	81
3.2.5. Determinación de proteínas.....	81
3.2.6. Extracción de ADN - PCR - DGGE	81
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	82
3.3.1. Ensayo de actividad	82
3.3.2. Adhesión Celular	84
3.3.3. Análisis del patrón de bandas de DGGE	86
3.4. CONCLUSIONES.....	89
REACTOR DE LECHO EMPAQUETADO DE FLUJO ASCENDENTE.....	91
4.1. OBJETIVO.....	93
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	93
4.2.1. Inóculo y medios de cultivo.....	93
4.2.2. Cultivo en lote con células en suspensión.....	93
4.2.3. Reactores de lecho fijo de flujo ascendente (RLEFA).....	94
4.2.3.1 Soportes utilizados	94
4.2.3.2. RLEFA	94
4.2.3.3. Determinación del módulo de dispersión axial.....	94
4.2.3.4. Operación del reactor	96
4.2.4. Métodos analíticos.....	98
4.2.5. Microscopia electrónica de barrido.....	98
4.2.6. Determinación de proteínas.....	98
4.2.7. Extracción de ADN - PCR - DGGE	99
4.2.8. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	99
4.2.8.1. Estándar de ADN.....	99
4.2.8.2. PCR Cuantitativa	100
4.2.8.3. Cálculos y análisis estadístico	102
4.2.9. FISH (Hibridación in situ con sondas fluorescentes)	102
4.2.9.1. Fijación de las células.....	102
4.2.9.2. Hibridación.....	102
4.2.9.3. Tinción con DAPI y observación microscópica	103
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	103
4.3.1. Cultivo en lote de células en suspensión.....	103
4.3.2. Módulo de dispersión axial del RLEFA.....	106
4.3.3. Comportamiento del RLEFA.....	107
4.3.4. Biopelícula inmovilizada.....	115
4.3.5. Estructura de las comunidades bacterianas de las biopelículas (DGGE).....	118
4.3.6. Composición de los consorcios bacterianos (qPCR - FISH).....	120
4.4. CONCLUSIÓN	128
REACTOR DE LECHO FLUIDIZADO DE FLUJO DESCENDENTE	129
5.1. OBJETIVO.....	131
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	131

5.2.1. Inóculo y medios de cultivo.....	131
5.2.2. Propiedades físicas de los materiales de inmovilización.....	131
5.2.3. Reactor de flujo descendente (RFD).....	131
5.2.3.1. Determinación del $t_R^{\text{mínimo}}$	132
5.2.3.2. Determinación de la velocidad volumétrica de precipitación de cobre.....	132
5.2.3.3. Determinación de proteínas.....	133
5.2.3.4. FISH.....	133
5.2.3.5. Microscopía electrónica de barrido.....	133
5.2.4. Reactor de lecho fluidizado de flujo descendente (RLFFD).....	133
5.2.5. Métodos analíticos.....	135
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	135
5.3.1. RFD.....	135
5.3.2. RLFFD.....	142
5.4. CONCLUSIONES.....	143
CONCLUSIONES GENERALES.....	145
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147
DISEÑOS FACTORIALES FRACCIONADOS DE DOS NIVELES.....	165

Capítulo 1

Introducción General

1.1. Bacterias reductoras de sulfato (BRS)

El azufre, uno de los elementos más abundantes en la Tierra, puede ser transformado química y biológicamente. El sulfato es tomado como nutriente, reducido a sulfuro e incorporado luego en aminoácidos azufrados y enzimas, en un proceso que se conoce como reducción asimilatoria de sulfato. La reducción asimilatoria de sulfato no libera sulfuro al ambiente, a excepción de la putrefacción de los organismos muertos (Rabus *et al.*, 2006). Las reacciones de oxidación y la reducción para la generación de energía metabólica son también importantes, como la reducción no asimilatoria de sulfato realizado por las bacterias reductoras de sulfato (BRS), microorganismos anaerobios que utilizan este compuesto como aceptor final de electrones, lo que resulta en la producción de sulfuro (Figura 1.1). Dado que miembros de los dominios de las Bacterias y las Arqueas puede llevar a cabo este proceso, algunos investigadores usan el término procariontas reductoras de sulfato o microorganismos reductores de sulfato. Sin embargo, se utiliza usualmente el término BRS para referirse a ambos dominios (Muyzer y Stams, 2008).

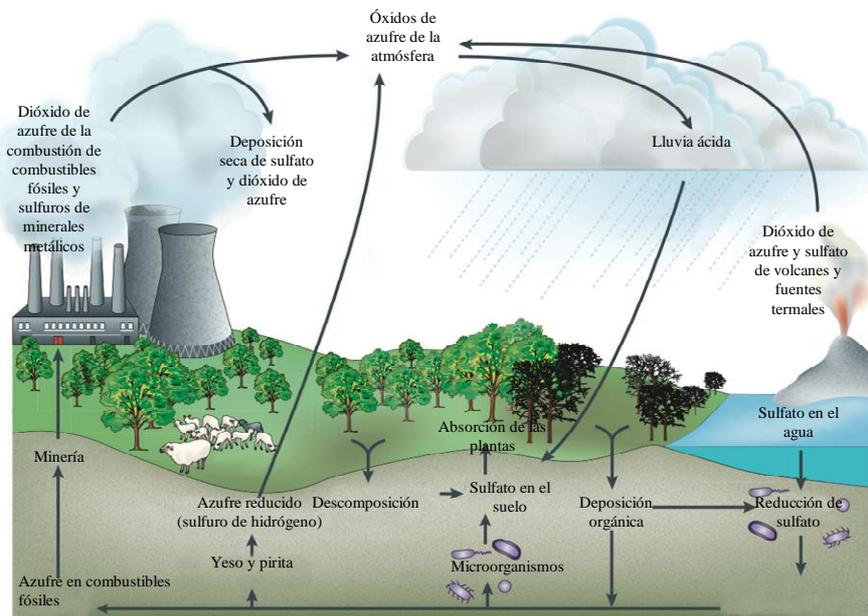


Figura 1.1. Ciclo del azufre (Muyzer y Stams, 2008). Los mayores depósitos de azufre son los sulfuros de hierro (pirita: FeS_2) y el yeso (CaSO_4) en sedimentos y rocas y el sulfato disuelto en el agua marina. El azufre es tomado como sulfato por los microorganismos y las plantas, y subsecuentemente por los animales, en un proceso de reducción asimilatoria. Las BRS son responsables de la reducción no asimilatoria del sulfato, que libera sulfuro al medio. La descomposición de la materia orgánica en anaerobiosis genera sulfuro de hidrógeno. La combustión de compuestos fósiles y las emisiones volcánicas desechan dióxido de azufre en la atmósfera, que interacciona con el agua formando ácido sulfúrico y resultando en la lluvia ácida.

El principal interés sobre las BRS se centra en su utilización en la remediación de efluentes con altos contenidos de sulfato y en el uso del sulfuro biológicamente producido para precipitar metales pesados en solución mediante la formación de sulfuros metálicos insolubles. Uno de los efluentes de interés es el drenaje ácido de mina (DAM). Los DAM son biolixiviados producidos en sitios mineros donde los sulfuros metálicos del suelo son expuestos al aire y el agua. Los DAM poseen pH ácido (entre 3 y 6), altas concentraciones de sulfato y de metales. La aplicación de biorremediación mediante BRS no sólo elimina los metales pesados y el sulfato del DAM, sino que además la actividad metabólica de estos microorganismos alcaliniza el pH ácido.

1.2. Clasificación de las BRS

Hasta mediados de la década de 1980, la clasificación se había realizado mediante la observación de la nutrición microbiana, la morfología y de algunos marcadores bioquímicos como la proteína desulfovirdina (una enzima sulfito reductasa participante de la reducción no asimilatoria de sulfato), ácidos grasos específicos o menaquinonas (Rabus *et al.*, 2006). Los recientes avances en el análisis de la secuencia ARNr 16S ha permitido una clasificación más exhaustiva y sistemática de las BRS. Basado en el análisis comparativo de secuencias del gen ARNr 16S, las BRS conocidas se pueden agrupar en siete linajes filogenéticos, cinco en Bactariae y dos en Archaea (Figura 1.2). La mayoría de los microorganismos reductores de sulfato corresponden a los 23 géneros pertenecientes al grupo de las Deltaproteobacterias, seguido por las BRS Gram-positivas dentro de las Clostridias (*Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus* y *Desulfosporomusa*). Existen tres linajes que contienen BRS termófilas, Nitrospirae (*Thermodesulfovibrio*), Thermodesulfobacteria (*Thermodesulfobacterium*) y Thermodesulfobiaceae (*Thermodesulfobium*). Dentro de las Arqueas, existen BRS del género *Archaeoglobus* dentro del grupo Euryarchaeota, y el género *Thermocodium* y *Calditerrivirga* en Crenarchaeota.

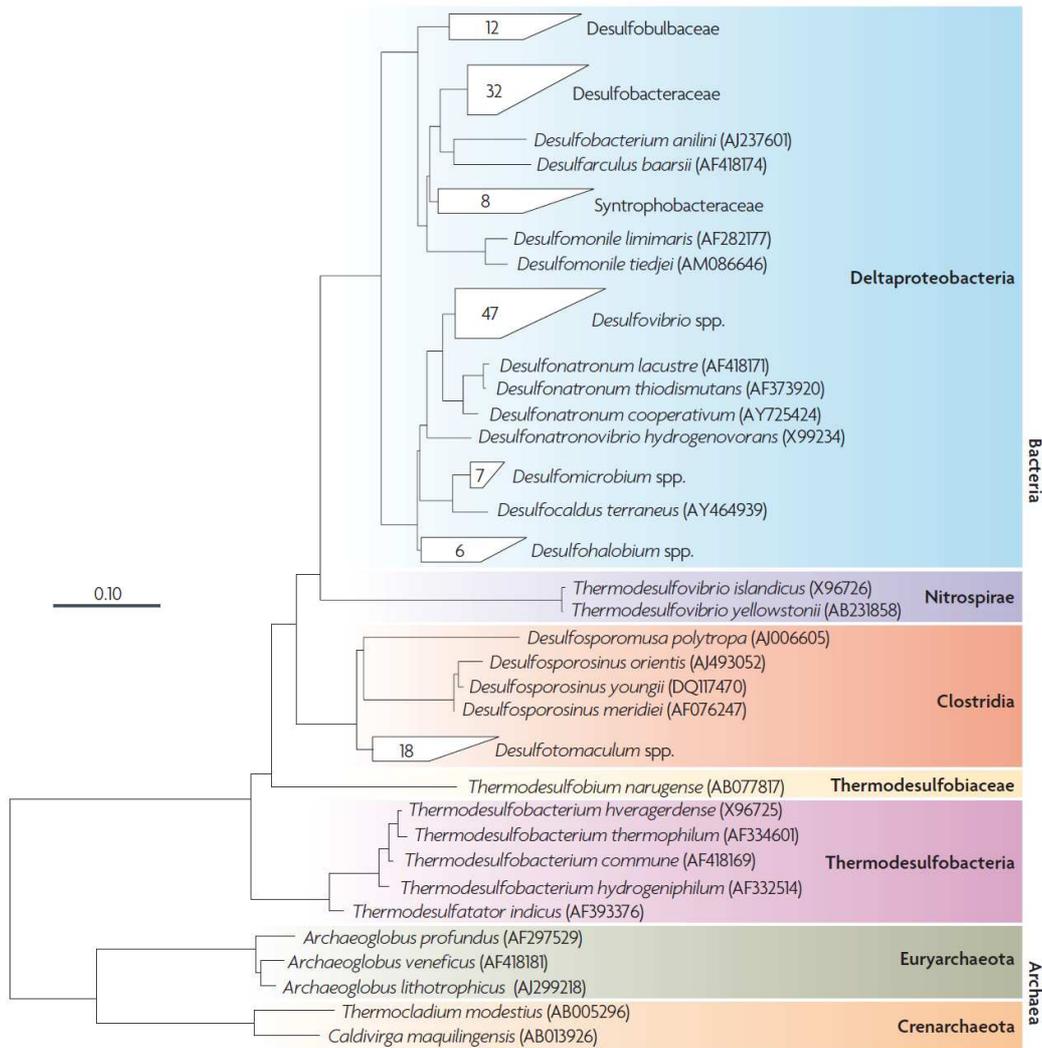


Figura 1.2. Árbol filogenético basado en la secuencia parcial del gen ARNr 16S de especies descritas de BRS (Muyzer y Stams, 2008). Siete linajes filogenéticos de organismos reductores de sulfato, dos en el dominio Archaea y cinco en Bactereae. El número dentro de las ramas colapsadas indica la cantidad de especies dentro de un grupo. La barra de escala indica un 10% de diferencia en las secuencias.

1.3. Metabolismo de compuestos orgánicos

En la reducción no asimilatoria de sulfato los sustratos orgánicos se oxidan y el sulfato se reduce produciendo HS^- y HCO_3^- que aumenta el pH de la solución. En estos casos, el donante de electrones y la fuente de carbono son el mismo compuesto. En casos minoritarios, se utiliza el hidrógeno como donante de electrones y el CO_2 como fuente de carbono. Debido a que gran parte del sustrato orgánico consumido por las

BRS es oxidado para la conservación energética y sólo una pequeña fracción es asimilada en la biomasa, estos organismos poseen bajos rendimientos celulares. La estequiometría anabólica, catabólica y del metabolismo global para la oxidación incompleta de lactato se enumeran en la Tabla 1.1. Se ha demostrado que los rendimientos catabólicos de crecimiento (de generación de acetato y reducción de sulfato) para *Desulfovibrio desulfuricans* son independientes de las condiciones de cultivo (Okabe *et al.*, 1992, 1995; Okabe y Characklis, 1992); mientras que los rendimientos anabólicos de crecimiento (de producción de biomasa) y la velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máxima}}$) son funciones de las necesidades energéticas de mantenimiento debido a las condiciones inhibitorias (Rabus *et al.*, 2006).

Tabla 1.1. Estequiometría metabólica de oxidación de lactato de *Desulfovibrio desulfuricans* (Okabe y Characklis, 1992).

Reacción	Estequiometría
Catabolismo	$\text{CH}_3\text{CHOHCOOH} + 0,5 \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{CO}_2 + 0,5 \text{H}_2\text{S} + \text{H}_2\text{O}$
Anabolismo	$\text{CH}_3\text{CHOHCOOH} + 0,6 \text{NH}_3 \rightarrow 3 \text{CH}_{1,4}\text{N}_{0,2}\text{O}_{0,4} + 1,8 \text{H}_2\text{O}$
Metabolismo global	$\text{CH}_3\text{CHOHCOOH} + 0,47 \text{H}_2\text{SO}_4 + 0,036 \text{NH}_3 \rightarrow 0,18 \text{CH}_{1,4}\text{N}_{0,2}\text{O}_{0,4} + 0,47 \text{H}_2\text{S} + 0,94 \text{CO}_2 + 0,94 \text{CH}_3\text{COOH} + 1,05 \text{H}_2\text{O}$

Diferentes mecanismos metabólicos se han usado para explicar la conservación energética de la reducción de sulfato acoplada a la utilización de sustratos orgánicos, como la oxidación del lactato acoplada a la reducción de sulfato por el mecanismo del hidrógeno (Figura 1.3) o el mecanismo del ácido fórmico.

Algunas BRS pueden crecer utilizando sulfito o tiosulfato como aceptores de electrones alternativos al sulfato, los cuales son reducidos a sulfuro. Sólo algunas especies utilizan azufre elemental o nitrato como aceptor de electrones, los cuales son reducidos a sulfuro o amonio, respectivamente (Moura *et al.*, 1997). Por otro lado las BRS utilizan una gran variedad de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, incluyendo ácidos mono- y di-carboxílicos alifáticos, alcoholes, compuestos aromáticos polares e incluso hidrocarburos (Rabus *et al.*, 2006). Sin embargo, el lactato es la fuente de carbono utilizada por la mayoría de las especies de BRS (Postgate, 1984). La desventaja de la utilización de lactato es que la mayoría de las especies lo oxidan parcialmente a acetato y CO_2 , requiriendo una gran cantidad de sustrato para reducir el sulfato y generando efluentes de alta demanda química de oxígeno (DQO).

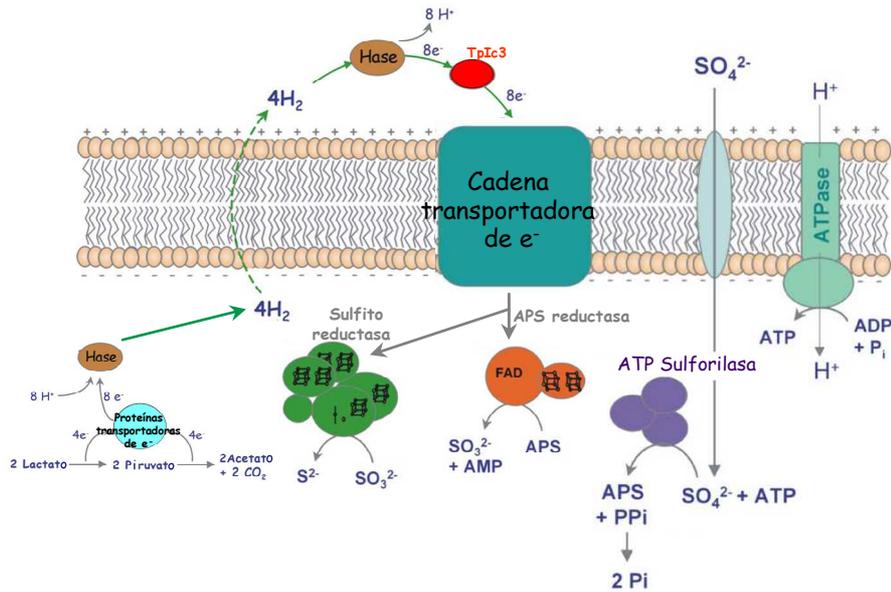


Figura 1.3. Representación esquemática de la reducción de sulfato acoplada a la utilización de lactato en *Desulfovibrio* por el mecanismo del ciclo del hidrógeno (Matias *et al.*, 2005). El mecanismo del ciclo del hidrógeno, propuesto para explicar la conservación energética en *Desulfovibrio* creciendo con lactato y sulfato (Odom y Peck, 1981), describe que el poder reductor generado por la oxidación del lactato es transferido a una hidrogenasa citoplasmática para generar H_2 , el cual difunde al periplasma, donde es reoxidado. El aceptor de electrones para las hidrogenasas periplásmicas es el citocromo TpI-c3, el cuál transfiere electrones a citocromos de complejos redox asociados a membrana. Los electrones generados que son transportados a través de la membrana se utilizan en la reducción citoplasmática del sulfato, dejando protones en el periplasma para activar la ATPsintasa. El sulfato reacciona con ATP para formar adenosina fosfosulfato (APS), catalizado por la ATPsulforilasa. El APS es reducido a sulfito por la APSreductasa (afr), el cual es consecuentemente reducido por la sulfito reductasa disimilatoria (srd) a sulfuro.

Las BRS se pueden clasificar en dos grupos en función de su capacidad funcional para oxidar los compuestos orgánicos completamente a CO_2 (incluido el acetato) o incompletamente a acetato y CO_2 (Widdel, 1988). La oxidación incompleta de los sustratos orgánicos se debe a la falta de un mecanismo para la oxidación terminal del acetil-CoA. Las especies que pertenecen a las BRS de oxidación incompleta incluyen *Desulfomonas pigra*, *Thermodesulfobacterium commune* y la mayoría de las especies de los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfomonas* y *Desulfobulbus* (Colleran *et al.*, 1995). Algunas especies de los géneros *Desulfobacter*, *Desulfosarcina*, *Desulfococcus*, *Desulfobacterium*, *Desulfoorculus*, *Desulfomonile* y *Desulfonema* pertenecen al grupo de los oxidantes completos. Este grupo también incluyen algunas BRS como *Desulfotomaculum acetoxidans*, *Desulfotomaculum sapomandens* y *Desulfovibrio baarsii* (Postgate, 1984; Colleran *et al.*, 1995). Los oxidantes incompletos suelen tener velocidades de crecimiento mayores a los oxidantes completos (Postgate, 1984). En la Tabla 1.2 se listan algunos de los aceptores de

electrones alternativos, las fuentes de carbono y energía y el tipo de oxidación (completa o incompleta) de la fuente de carbono para diferentes géneros de BRS.

Tabla 1.2. Propiedades fisiológicas y morfológicas de las BRS (Rabus *et al.*, 2006).

Género	Morfología ^P	Temp. óptima (°C)	Desulfoviridina ^A	Aceptores de electrones (además del sulfato)	Oxidación de dadores electrónicos orgánicos ^B	Dadores de electrones ^C										Otros utilizados por algunas especies
						H ₂	Acetato	Propionato	Ácidos grasos mayores	Etanol	Lactato	Succinato, fumarato y/o malato	Fructosa y/o glucosa	Ácidos orgánicos sustituidos con grupos fenilo		
Bacteria																
<i>Desulfovibrio</i>	v	30-38	+	SO ₃ ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻ ; Fumarato	i	+	-	-	-	+	+	±	±	-	Metanol; glicerol; glicina; alanina; colina; furfural	
<i>Desulfomicrobium</i>	o / b	28-37	-	SO ₃ ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻	i	+	-	-	-	±	+	+	-	-	-	
<i>Desulfobulbus</i>	o	28-39	-	SO ₃ ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻ ; NO ₃ ⁻	i	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	
<i>Desulfobacter</i>	o / v	28-32	-	SO ₃ ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻	cac	±	+	-	-	±	-	-	-	-	-	
<i>Desulfobacterium</i>	o	20-35	-	S ₂ O ₃ ²⁻	co	±	(+)	(±)	±	±	±	±	-	±	Metanol; glutamato; glutarato; fenol; anilina; indol; nicotinato	
<i>Desulfococcus</i>	e	28-36	+	SO ₃ ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻	co	-	(+)	+	+	+	+	-	-	+	Acetona	
<i>Desulfosarcina</i>	o (forma agregados)	33	-	SO ₃ ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻	co	+	(+)	+	+	+	+	±	-	+	-	
<i>Desulfomonile</i>	b	37	+	S ₂ O ₃ ²⁻ ; 3-Cloro benzoato	c	+	- ^F	na	na	-	-	-	-	+	3- o 4-anisato	
<i>Desulfonema</i>	Filamento multicelular	30-32	±	SO ₃ ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻	c	±	(+)	+	+	-	±	+	-	±	-	
<i>Desulfobotulus</i>	v	34	-	SO ₃ ²⁻	i	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
<i>Desulfoarculus</i>	v	35-39	-	SO ₃ ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻	co	-	(+)	(+)	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Desulfotomaculum</i>	b rectos o curvados, esporulante	30-38 50-65 ^G	-	S ₂ O ₃ ²⁻ ; Fumarato	i/co	±	±	±	±	+	±	±	±	±	Metanol; alanina	
<i>Desulfosporosinus</i>	b rectos o curvados, esporulante	30-37	-	S ₂ O ₃ ²⁻	i	+	-	-	na	+	+	na	-	+	3,4,5-trimetoxibenzoato	
<i>Thermodesulfovibrio</i>	v	65	-	SO ₃ ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻	i	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
<i>Thermodesulfobacterium</i>	b	65-70	-	S ₂ O ₃ ²⁻	i	+	-	-	-	-	+	-	na	na	-	
<i>Thermodesulforhabdus</i>	b	60	-	SO ₃ ²⁻	c	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	
<i>Desulfacinum</i>	o	60	-	SO ₃ ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻	na	+	+	+	+	+	+	+	-	-	Hexanol	
<i>Desulforhopalus</i>	o	18-19	-	SO ₃ ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻	i	+	-	+	na	+	+	-	-	-	-	
<i>Desulforhabdus</i>	b	37	-	SO ₃ ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻	c	+	+	+	na	+	+	-	-	-	-	
<i>Desulfonatronovibrio</i>	v	37	-	SO ₃ ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻	na	+	-	-	na	-	-	-	-	na	-	
<i>Desulfonatronum</i>	v	37-40	-	SO ₃ ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻	i	+	-	-	na	+	-	-	-	na	-	
<i>Desulfohalobium</i>	b	37-40	-	SO ₃ ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻ ; S ⁰	i	+	-	-	na	+	+	-	-	na	-	
<i>Desulfofustis</i>	b	28	-	SO ₃ ²⁻ ; S ⁰	i	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Glicolato, betaína, colina, trietanolamina, indol	
<i>Desulfocella</i>	v	34	-	-	i	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1-alanina; 2-metilbutirato	
<i>Desulfocapsa</i>	b	20-30	-	-	i	-	-	-	na	+	-	-	-	-	-	
<i>Desulfobacca</i>	o	37	-	SO ₃ ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻	c	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Desulfuromusa</i>	b	30	na	S ⁰ ; NO ₃ ⁻ ; Fumarato; DMSO; Fe(III)-citrato	c	na	+	+	±	-	+	+	-	na	-	
<i>Desulfospira</i>	b curvo	26-30	-	SO ₃ ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻ ; S ⁰	c	+	-	-	+	-	+	+	-	±	Betaína, prolina	
<i>Desulfobacula</i>	b	28	na	na	c	-	+	-	-	+	-	+	na	+	Tolueno; p-cresol, benzaldehído; benzoato; fenilacetato; p-hidroxibenzaldehído; p-hidroxibenzoato	
<i>Desulfofrigus</i>	b	10	-	SO ₃ ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻ ; Fe(III)-citrato	c	±	+	-	+	+	+	+	-	-	-	
<i>Desulfofaba</i>	b	7	-	SO ₃ ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻	i	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	
<i>Desulfotalea</i>	b	10	-	SO ₃ ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻ ; Fe(III)-citrato	i	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	
Arquea																
<i>Archaeoglobus</i>	e	82-83	-	-	co	+	-	na	na	na	+	na	+	na	Péptidos, almidón	

^A +: presente, ± presente o ausente, -: ausente; ^B c: oxidación completa a CO₂ mediante una vía desconocida, cac: completa por el ciclo del ácido cítrico, co: completa por la vía de monóxido de carbono deshidrogenasa C₁, i: oxidación incompleta a acetato como producto final; ^C +: utilizado, (+): escasamente utilizado, ±: utilizado o no utilizado, -: no utilizado, na: no analizado o no reportado; ^D v: vibrio, e: esférica, b: bacilo, o: ovalada; ^E Utilizado por algunas cepas sin nombre, pero no por las especies validadas publicadas; ^F Utilizado quizá con tiosulfato como aceptor electrónico; ^G Especies termofílicas.

1.4. Contexto ecológico

Las BRS son organismos sumamente versátiles, no sólo por la variedad de aceptores y dadores de electrones que son capaces de utilizar, sino también por el amplio rango de condiciones ambientales en las que son capaces de vivir. Por ejemplo, han sido detectadas en hábitats con valores de pH extremos, como los DAM con valores de pH de hasta 2 (Sen, 2001; Kolmert y Johnson, 2001) y en lagos alcalinos de pH superior a 10 (Geets *et al.*, 2006).

Las BRS son ubicuas y pueden ser encontradas en varios ambientes naturales e ingenieriles donde se disponga de sulfato. Especies oxidantes incompletas tales como *Desulfovibrio* se encuentran frecuentemente en ambientes de agua dulce (Sass *et al.*, 1998a), mientras que los ambientes marinos contienen grandes cantidades de especies mineralizantes de acetato. Debido a su alto contenido de sulfatos, las regiones anaeróbicas de los sedimentos marinos (Mussman *et al.*, 2005; Llobet-Brossa *et al.*, 2002) y estuarios (Kondo *et al.*, 2004, 2008; Leloup *et al.*, 2004, 2005; Jouliau *et al.*, 2001) son sitios primarios para el crecimiento de BRS. La fuente de carbono de estas bacterias puede derivar de la actividad de microorganismos heterótrofos o de una fuente directa, especialmente en los hábitats contaminados por una fuente de nutrientes, como las aguas residuales y plantas de digestión anaerobia (Gibson, 1990; Oude Elferink *et al.*, 1994; Dar *et al.*, 2005, 2007a; Hernández-Eugenio *et al.*, 2000; Nanninga y Gottschal, 1987; Kjeldsen *et al.*, 2009).

Las BRS representan un grave problema para la industria debido a su participación en la corrosión influida por microorganismos (CIM) (Videla y Herrera, 2005), hallándose en yacimientos de petróleo (Leu *et al.*, 1998; Nilsen *et al.*, 1996a, 1996b; Beeder *et al.*, 1994; Rosner *et al.*, 1991), yacimientos de gas (Hamilton, 1998), tuberías de petróleo corroídas (Neria-González *et al.*, 2006), filtraciones de hidrocarburos (Knittel *et al.*, 2003; Kniemeyer *et al.*, 2007), estructuras marinas de acero corroídas (Feio *et al.*, 1998) y acuíferos contaminados con derivados del petróleo (Kleikemper *et al.*, 2002).

También se han encontrado BRS en suelos de arrozales (Stubner y Meuser, 2000; Stubner, 2002, 2004; Liu *et al.*, 2009), fuentes hidrotermales (Jeanthon *et al.*, 2002; Dhillon *et al.*, 2003), rizósfera de plantas (Hines *et al.*, 1999), minas subterráneas

(Nakagawa *et al.*, 2002), volcanes de lodo (Stadnitskaia *et al.*, 2005), tapetes microbianos hipersalinos (Rissati *et al.*, 1994; Minz *et al.*, 1999), piscinas de lodo solfatárico (Goorissen *et al.*, 2003), desechos de industria química (Ben-Dov *et al.*, 2007) e incluso en el contenido intestinal de algunos mamíferos y de los seres humanos (Willis *et al.*, 1997).

1.5. Interacción con bacterias metanogénicas y acetogénicas

En ambientes aerobios, los microorganismos heterótrofos son capaces de llevar a cabo una completa oxidación del carbono orgánico a CO₂. En los ecosistemas anaerobios, sin embargo, la oxidación es mucho más compleja y requiere la interacción de diferentes grupos de microorganismos. Cada grupo microbiano realiza una oxidación parcial del carbono orgánico y sus productos metabólicos son a su vez asimilados por el siguiente miembro de la cadena alimentaria hasta la oxidación completa (Figura 1.4). El proceso implica la hidrólisis de compuestos de gran peso molecular, tales como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos, a productos de menor peso molecular tales como ácidos orgánicos y alcoholes por organismos fermentativos. Éstos luego pueden ser degradados a ácidos grasos volátiles (acetato, propionato y butirato) y gases (H₂ y CO₂). Es en estas etapas donde actúan las BRS si el ambiente cuenta con un suministro abundante de sulfato. Si compuestos de bajo peso molecular como el acetato y el hidrógeno se acumulan, los primeros procesos de oxidación se inhiben. Hasta el descubrimiento de las BRS que consumen acetato, se pensó que la oxidación del acetato era producido por una sintropía ente los organismos metanógenos y las BRS. De hecho, en ecosistemas carentes de sulfato como los sedimentos de agua dulce, los metanógenos son los principales responsables de la utilización del hidrógeno y el acetato. Sin embargo, en presencia de sulfato la metanogénesis es inhibida, ya que las BRS tienen una mayor afinidad por dichos sustratos, manteniendo la concentración de éstos en niveles bajos a los cuales los organismos metanógenos no pueden competir. En hábitats ricos en sulfato pueden producirse bajas velocidades de metanogénesis si la cantidad de donantes de electrones disponibles alcanza un nivel lo suficientemente alto como para la utilización no competitiva por los metanógenos y las BRS (Gibson, 1990).

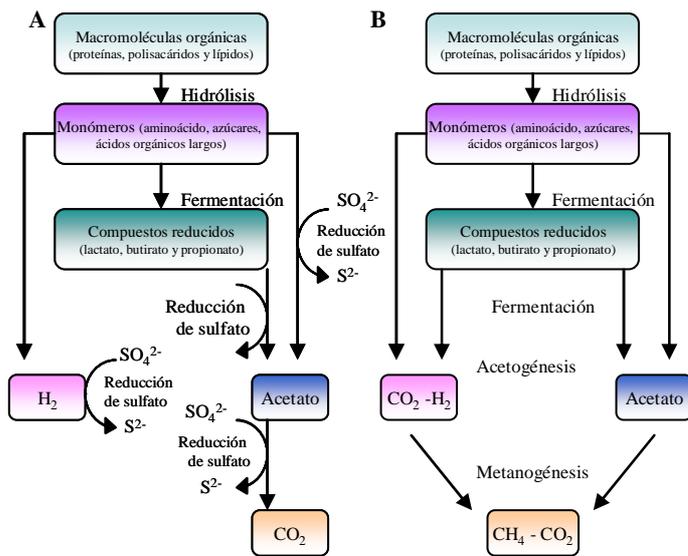


Figura 1.4. Degradación de materia orgánica en ambientes anaerobios en presencia y ausencia de sulfato (Muyzer y Stams, 2008). Las macromoléculas son degradadas por bacterias hidrolíticas y los monómeros son fermentados por bacterias fermentativas. En presencia de sulfato (A) las BRS consumen los productos fermentativos. En ausencia de sulfato (B) el hidrógeno y el acetato (generado por bacterias fermentativas o indirectamente por acetogénicas) son consumidos por metanógenos.

En contraste con las BRS, los metanógenos utilizan un número limitado de sustratos. Hasta el momento no se han descrito metanógenos capaces de utilizar ácidos orgánicos como lactato, propionato y butirato, sustratos comunes para las BRS. En ambientes con baja concentración de sulfato, estos compuestos son degradados conjuntamente por comunidades microbianas de bacterias acetogénicas y arqueas metanogénicas. Las BRS capaces de degradar propionato y butirato crecen mucho más rápido que las comunidades metanogénicas, lo que da una ventaja competitiva. Debido a la mayor afinidad por el sustrato, las BRS que utilizan hidrógeno dejan fuera de competencia a los microorganismos metanógenos y acetógenos. Sin embargo, muchas BRS requieren acetato como fuente de carbono y, por tanto, cuando el acetato no se proporciona, coexisten con acetógenos. Las BRS que utilizan acetato también superan a los metanógenos acetoclásticos. Sin embargo, esta competencia no está tan clara como para el hidrógeno (Muyzer y Stams, 2008).

Desde un punto de vista ecológico, es interesante entender cómo las BRS interactúan con las comunidades metanogénicas cuando el sulfato disponible es insuficiente para la oxidación completa de compuestos orgánicos. En estas condiciones, las BRS competirán entre sí por el sulfato disponibles. Laanbroek *et al.* (1984) encontraron que el género *Desulfovibrio* tiene la mayor afinidad por el sulfato seguido por *Desulfobulbus* y *Desulfobacter*; y sugirieron que bajo limitación de sulfato, las BRS utilizan hidrógeno, etanol y lactato como sustratos, pero no propionato y acetato.

1.6. Efecto de los factores ambientales sobre el crecimiento de las BRS

Varios parámetros ambientales de los procesos de remediación en los que se utilizan a las BRS, como el pH, temperatura, el sulfuro y las concentraciones de metales, afectan el crecimiento y la actividad de estos organismos. Los efectos de algunas de estas variables se discuten en las secciones siguientes.

1.6.1. Efecto del pH

El rango de pH óptimo para el desarrollo de las BRS es alrededor de pH 7, siendo inhibido a valores de pH por debajo de 6,5 y por encima de 8,5 (Widdel, 1988). El rango de pH y el pH óptimo de crecimiento para varias BRS se encuentran en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3. pH y rango de temperatura de crecimiento de algunas especie de BRS.

Género / Especie	pH		Temp. (°C)		Referencia
	Rango	Óptimo	Rango	Óptimo	
<i>Desulfobacter</i>	6,2 - 8,5	7,3	28 - 32	-	Widdel, 1988
<i>Desulfobulbus</i>	6,0 - 8,6	7,2	28 - 39	-	
<i>Desulfococcus</i>	-	-	30 - 36	-	
<i>Desulfomonas</i>	6,5 - 8,5	7,2	-	30	
<i>Desulfosarcina</i>	6,9 - 8,0	7,4	33 - 38	-	
<i>Desulfovibrio</i>	-	7,5	25 - 35	-	
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	-	7,0	25 - 43	43	Okabe y Characklis, 1992
<i>Thermodesulforhabdus norvegicus</i>	6,1 - 7,7	6,9	44 - 74	60	Beeder <i>et al.</i> , 1995
<i>Desulfotomaculum solfataricum</i> ^A	6,4 - 7,9	7,3	48 - 65	60	Goorissen <i>et al.</i> , 2003
<i>Desulfotomaculum thermobenzoicum susp. thermosyntrophicum</i> ^A	6,0 - 8,0	7,0 - 7,5	45 - 62	55	Plugge <i>et al.</i> , 2002
<i>Desulfotomaculum thermocisternum</i> ^A	6,2 - 8,9	6,7	41 - 75	62	Nilsen <i>et al.</i> , 1996a
<i>Desulfotomaculum thermosapovorans</i> ^A	-	7,2 - 7,5	35 - 60	50	Fardeau <i>et al.</i> , 1995
<i>Desulfosarcinimum infernum</i>	-	7,1 - 7,5	-	64	Rees <i>et al.</i> , 1995

^A Esporulante.

No obstante, se ha encontrado actividad reductora de sulfato en ecosistemas naturales y en sistemas ingenieriles con pH por fuera de este rango (Tang *et al.*, 2009). Sin embargo, los aislados obtenidos de dichos sitios resultaron incapaces de crecer a pH ácido, por lo que se cree que la constitución de micronichos y de biopelículas de consorcios microbianos genera, en los sitios nativos, un entorno afable para el desarrollo de las BRS. La formación de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) y de capas de precipitados de sulfuro metálico sobre las BRS es propicia para mantener el pH del entorno celular en condiciones óptimas (Fortin *et al.*, 1996; White y Gadd,

2000). Además, los productos metabólicos de las BRS H_2S y ácidos orgánicos, como el ácido acético producido por las oxidantes incompletas (Reis *et al.*, 1990), son potencialmente tóxicos a pH ácido debido a que se encuentran sin disociar y de este modo son capaces de penetrar la membrana plasmática y actuar como desacoplantes (Koschorreck, 2008). La información disponible en la literatura indica que las BRS en general no son acidófilas sino ácido tolerantes. El interés por las BRS tolerantes a pH ácido radica en la aplicación de las mismas en la remediación de los DAM.

Kolmert y Johnson (2001) informaron de un cultivo mixto de BRS acidófilas capaz de crecer a un pH de 3,0, respaldando la idea de que los cultivos mixtos de BRS son más tolerantes a condiciones extremas que los cultivos puros. También se redujo sulfato a pH menor que 3 en sedimentos ácidos del lago neuquino Caviahue (Koschorreck *et al.*, 2003). Elliott *et al.* (1998) observaron reducción de sulfato en biorreactores con valores de pH entre 4,5 y 3,0, y otros autores reportaron reducción de sulfato en reactores a pH 3 con inóculos de BRS enriquecidos de sitios mineros (Jong y Parry, 2006) y de estiércol de caballo (Tsukamoto *et al.*, 2004). Sin embargo, el pH del efluente de estos reactores fue siempre superior a 5,5 y no constaba que pH poseía el interior de los reactores.

Algunas BRS fueron aisladas de un estanque con un pH de 3,4 (Tuttle *et al.*, 1969) y de una mina abandonada con condiciones ligeramente oxidantes y ácidas (Fortin *et al.*, 1996). Cuando se intentó cultivar estas BRS en el laboratorio, no hubo un crecimiento significativo por debajo de pH 5,5 en ambos casos. Basándose en los resultados se concluyó que las BRS aisladas de condiciones oxidantes generaron un entorno favorable mediante la reducción del sulfato a sulfuro, lo que proporcionó una alcalinización adecuada para su actividad. Gyure *et al.* (1990) informaron enriquecimientos microbianos que pudieron ser mantenidos a un pH de 3,8, mientras que los cultivos puros no fueron capaces de crecer en un rango de pH entre 3 y 5; sugiriendo que las BRS presentes en ambientes ácidos encontraban microambientes de un pH más alto en sedimentos y partículas en suspensión. Koschorreck *et al.* (2003) atribuye la falta de éxito en el aislamiento de BRS acidófilas de lagos ácidos de minería a la falta de sustratos orgánicos y la competencia con las bacterias reductoras de hierro por los dadores de electrones.

No obstante, Johnson *et al.* (1993) informaron que una especie perteneciente a los géneros *Desulfotomaculum* pudo crecer a pH de 2,9. Küsel *et al.* (2001) reportaron la presencia de BRS en un sedimento ligeramente ácido afectados por la minería del carbón con un pH *in situ* de 5,2; de donde aislaron una BRS esporulante con un pH óptimo de 5,2 y capaz de crecer en el rango 4,9-6,1. Kimura *et al.* (2006) demostraron la reducción de sulfato a pH 3,8-4,2 con metanol como sustrato con un cultivo mixto de una BRS esporulante aislada de un sedimento ácido y una bacteria no reductora de sulfato acidófila; existiendo interacciones sintrópicas entre ambas que suponían una transferencia de hidrógeno. Además, el metanol no plantea problemas de toxicidad en los valores de pH bajos, a diferencia de la mayoría de los ácidos orgánicos. También Hard *et al.* (1997) fueron capaces de aislar una BRS de las aguas residuales de una mina de cobre capaz de crecer a pH 4,0 y observaron que *Desulfovibrio salexigens* podría crecer en metanol a pH 4,5.

1.6.2. Efecto de la temperatura

Las BRS se pueden clasificar en mesófilas (< 40 °C), termófilas moderadas (40-60 °C) y termófilas extremas (> 60 °C) en función de su temperatura óptima de crecimiento. Algunas termófilas, tales como las especies de *Desulfotomaculum* forman endosporas para sobrevivir en ambientes extremos a 60 °C (Widdel, 1992). Stetter *et al.* (1993) aislaron un número de cepas termófilas *Archeoglobus* con una temperatura óptima de crecimiento de alrededor de 80 °C. La temperatura óptima de crecimiento para varios géneros de BRS se lista en la Tabla 1.2 y 1.3.

Okabe y Characklis (1992) estudiaron la relación entre la temperatura, la cinética y la estequiometría microbiana de *Desulfovibrio desulfuricans* creciendo con lactato como fuente de carbono y energía. Encontraron que la $\mu_{\text{máxima}}$ se mantenía constante entre 25 °C y 43 °C pero decaía fuertemente por fuera de ese rango. El rendimiento celular mostró un comportamiento similar pero en el rango 25 - 43 °C, no siendo atribuible su disminución por fuera de este a un aumento del mantenimiento ya que fue en todos los casos despreciable. Sin embargo, la estequiometría de reducción de sulfato no dependió de la temperatura. Moosa *et al.* (2005) arribaron a conclusiones similares estudiando el crecimiento con acetato como fuente de carbono y energía de un

cultivo mixto formado por productores de ácido, productores de metano y reductores de sulfato. Se informó que el efecto de la temperatura sobre la $\mu_{\text{máxima}}$ era insignificante dentro del rango de temperatura óptimo 20 °C a 35 °C, con un coeficiente de mantenimiento (m_s) despreciable; mientras que la tasa de reducción de sulfato se incrementó con el aumento de la temperatura. Experimentos de otros autores confirman que la reducción de sulfato aumenta cuando la temperatura de reacción se incrementa de 20 a 32 °C en cultivos mesófilos de BRS (Van Houten *et al.*, 1997; Weijma *et al.*, 1999).

Por otra parte, Rabus *et al.* (2002) estudiaron el efecto de la temperatura sobre la expresión de proteínas de *Desulfobacterium autotrophicum*, una BRS marina capaz de crecer entre 0 °C y 31 °C. Observaron que a bajas temperaturas, la BRS respondió reduciendo la actividad metabólica en lugar de sintetizar *de novo* proteínas especialmente adaptadas.

1.6.3. Efecto del sulfuro

Predeciblemente, las BRS tienen una mayor tolerancia hacia el sulfuro que la mayoría de las bacterias. El sulfuro puede estar presente como H_2S , HS^- y S^{2-} en solución y en fase gaseosa como H_2S . La relación entre las concentraciones de sulfuro de hidrógeno en la fase líquida y la gaseosa se basa en la ley Henry (Ecuación [1.1]).

$$[\text{H}_2\text{S}]_{(l)} = \alpha [\text{H}_2\text{S}]_{(g)} \quad [1.1]$$

Donde, $[\text{H}_2\text{S}]_{(l)}$ es la concentración de H_2S en fase líquida y $[\text{H}_2\text{S}]_{(g)}$ en fase gaseosa y α , el valor del coeficiente de distribución, a 30°C es igual a 1,99 (Hulshoff Pol *et al.*, 1998). El estado del sulfuro sólo depende del pH del medio y de la temperatura. A pH bajo el sulfuro de hidrógeno producido está presente en forma no disociada, y a medida que aumenta el pH se disocia en HS^- y S^{2-} (Figura 1.5) (Lens *et al.*, 1998). El proceso de

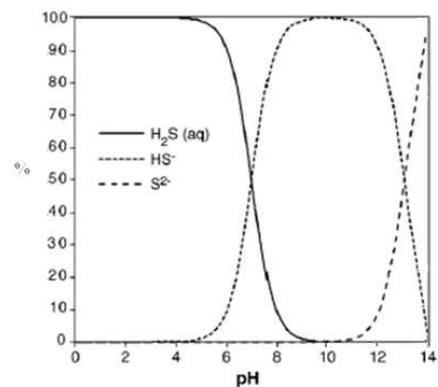
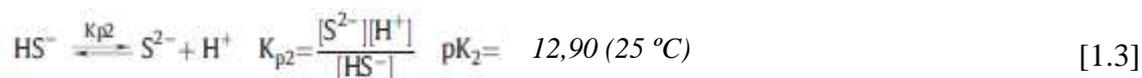
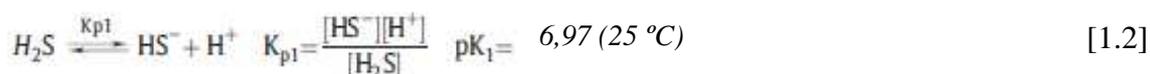


Figura 1.5. Formas del sulfuro a diferentes valores de pH.

disociación viene dado por las Ecuaciones [1.2] y [1.3] (Kaksonen *et al.*, 2007).



La información disponible sobre la toxicidad de sulfuro y su mecanismo es controvertida. Por un lado, se ha informado que el sulfuro es absorbido por la célula y destruye las proteínas, con lo que la célula se inactiva (Postgate, 1984). En ese caso, las bacterias no deberían ser capaces de reanudar su actividad una vez que los sulfuros se retiran. Por el contrario, se informó que la inhibición de sulfuro es reversible (Reis *et al.*, 1992). Otra teoría afirma que la precipitación de los elementos traza es la causa de la disminución de la actividad (Bharathi *et al.*, 1990). Okabe *et al.* (1992) afirman que la inhibición por sulfuro ocurre probablemente cuando este se combina con el hierro de los citocromos y otros compuestos celulares que contienen hierro, deteniendo la actividad de la cadena transportadora de electrones. En un trabajo posterior, los mismos autores señalan que la precipitación de hierro y otros micronutrientes puede limitar el crecimiento, pero que las BRS son capaces de reponerse del contacto con grandes concentraciones de sulfuro (Okabe *et al.*, 1995).

Además de la incertidumbre con respecto a los mecanismos inhibitorios del sulfuro, existen informes contradictorios con respecto a los efectos de las diversas formas de sulfuro. Algunos estudios se han basado el efecto de inhibición del sulfuro total (Hilton y Oleszkiewicz, 1988; Cord-Ruwisch *et al.*, 1988) y otros en el del H₂S no disociado (McCartney y Oleszkiewicz, 1991, 1993). Speece (1983) afirmó que sólo el H₂S no disociado es capaz de traspasar la membrana celular. Más tarde se demostró que las bacterias tienen dos umbrales de inhibición, uno para el H₂S no disociado y el otro para el sulfuro total, que dependen del pH del medio. O'Flaherty *et al.* (1998) demostraron que varias cepas de BRS eran menos sensibles al sulfuro total cuando el pH se incrementaba de 6,8 a 8,0 y más sensibles al sulfuro no disociado. Con un pH inferior a 7,2 el H₂S no disociado era dominante y llegaba al límite del umbral inhibitorio, y a un pH superior a 7,2 el sulfuro total era responsable del efecto inhibitorio.

El modelo de inhibición no competitiva ha sido utilizado en diferentes trabajos para describir los efectos del sulfuro disuelto total (SDT) y el H₂S no disociado (Maillacheruvu y Parkin, 1996; Kaksonen *et al.*, 2004a; Okabe *et al.*, 1995), donde se reduce la $\mu_{\text{máxima}}$ por la presencia de sulfuro pero la constante de saturación media del sustrato (K_{Lac}) no se ve afectada. La Ecuación [1.4] describe este tipo de inhibición:

$$\mu = \frac{\mu_{\text{máxima}} SK_i}{(K_{Lac} + S)(K_i + i)} \quad [1.4]$$

Donde S es la concentración de sustrato (lactato), K_i es el coeficiente de inhibición e i es la concentración de sulfuro total (Okabe *et al.*, 1995). La presencia de sulfuro aumenta el m_s y en consecuencia disminuye el rendimiento de biomasa (Okabe *et al.*, 1995). Sin embargo, Cooney *et al.* (1996) cultivaron en lote la cepa *Desulfovibrio desulfuricans* con y sin burbujeo de nitrógeno (lo cuál barría el H₂S presente) y observaron que el rendimiento celular fue menor en presencia de H₂S debido probablemente al aumento de la energía destinada a mantenimiento, pero que la $\mu_{\text{máxima}}$ no presentaba variación. Los K_i de las biopelículas son mayores que los de las células libres (Kaksonen *et al.*, 2004a), debido a que los EPS que unen a las biopelículas protegen las células contra los efectos tóxicos (Teitzel y Parsek, 2003) y el aumento de la concentración de sulfuro estimula la producción de EPS (Okabe *et al.*, 1992). En la Tabla 1.4 se dan valores de K_i reportados en diferentes trabajos.

Tabla 1.4. Constantes de inhibición (K_i) para la toxicidad del sulfuro disuelto total (SDT) y el H₂S sobre la utilización de sustrato (35 °C).

Microorganismo	Sustrato	pH	K_i (mg/L)		Referencia
			SDT	H ₂ S	
Cultivo mixto de BRS	Acetato	-	35	8	Maillacheruvu y Parkin, 1996
	Propionato	-	681	194	
	H ₂ /CO ₂	-	422	140	
Cultivo mixto de BRS	Etanol	6,9-7,3	248	84	Kaksonen <i>et al.</i> , 2004a
	Acetato	6,9-7,3	356	124	
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Lactato	7,0	251	-	Okabe <i>et al.</i> , 1995

Algunos géneros y especies de BRS son más vulnerables al sulfuro que otros. Algunas concentraciones inhibitorias reportadas por la bibliografía se encuentran en la Tabla 1.5. Icgen y Harrison (2006a) estudiaron el cambio en la estructura de un cultivo mixto de BRS mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en un biorreactor continuo alimentado con hasta 1,5 g/L de sulfuro; siendo tóxico para *Desulfonema*, *Desulfobulbus spp.* y *Desulfobacteriaceae*, a pesar de que no lo era para *Desulfobacter*,

Desulfotomaculum, *Desulfobacterium spp.* y *Desulfovibrionaceae*. Por otro lado, sólo con 1,5 g/L de sulfuro se observó toxicidad para *Desulfococcus*.

Tabla 1.5. Concentraciones inhibitorias del sulfuro para diferentes cepas de BRS.

Inóculo	Sustrato	Temp (°C)	pH	SDT (mg/L)	H ₂ S (mg/L)	Inhibición	Referencia
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	lactato	35	7,0	500	-	CI50 ^A	Okabe <i>et al.</i> , 1992
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	lactato	35	7,0	250	-	CI50 ^B	Okabe <i>et al.</i> , 1995
<i>Desulfovibrio spp.</i>	lactato	37	6,2-6,6	-	547	100% ^C	Reis <i>et al.</i> , 1992
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Lactato	35	7,2-7,6	82	-	CI50 ^D	McCartney y Oleszkiewicz, 1991
<i>Desulfotomaculum magnum</i>	Acetato	37	6,8	443	239	CI50 ^C	O'Flaherty <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfovibrio acetoxidans</i>	Acetato			487	263		
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	H ₂ / CO ₂			554	299		
<i>Desulfovibrio sapovorans</i>	Butirato			513	277		
<i>Desulfovibrio postgatei</i>	Acetato			583	315		
<i>Desulfovibrio multivorans</i>	Etanol			498	269		
<i>Desulfovibrio propionicus</i>	Propionato			223	121		
Cultivo mixto BRS	Acetato			374	202		
	H ₂ / CO ₂			505	273		
	Propionato			328	177		
	Butirato			593	320		
	Etanol			561	303		
UASB	Etanol	35	7,1-8,0	1700-9951	570- 610	100% ^D	Kalyuzhnyi <i>et al.</i> , 1997
UASB	Acetato	30	7,0	521	217	CI50 ^C	Visser <i>et al.</i> , 1996
		35	7,2-7,4	615	161		
Lodo suspendido	H ₂	35	7	380	-	CI50 ^D	Yamaguchi <i>et al.</i> , 1999
	Acetato			270	-		
Cultivo mixto BRS	Lactato	35	7,1-7,3	-	300	CI50 ^D	McCartney y Oleszkiewicz, 1993
			8,0	-	185		
Lodo granular	Acetato	30	7,2-7,4	171	615	CI50 ^D	Visser, 1995
			8,1-8,3	57	1125		
Biopelícula	Acetato	35	7,5-8,5	50	-	100%	Stucki <i>et al.</i> , 1993
Biopelícula	Acetato - etanol	35	7	1300	-	CI50 ^D	Isa <i>et al.</i> , 1986a
Biopelícula	H ₂ /CO ₂	30	7	450	-	SI	van Houten <i>et al.</i> , 1994
Biopelícula	H ₂ /CO ₂	55	7	250	-	100%	van Houten <i>et al.</i> , 1997
Lodo de un digestor	Azúcar - etanol	20-25	>7,5	-	500-1500	SI	Greben <i>et al.</i> , 2005
Lodo granular	Acetato - propionato	35	7,5	-	750	CI50 ^D	Celis-García <i>et al.</i> , 2004
Biopelícula				-	860		
Lodo flocular	Acetato - etanol - butirato	35	8	70	1000	100% ^A	O'Flaherty y Colleran, 1999

SI: sin inhibición; 100%: inhibición total; CI50: concentración inhibitoria 50%; ^A: inhibición de la oxidación de la fuente de carbono; ^B: inhibición del rendimiento celular; ^C: inhibición del crecimiento celular; ^D: inhibición de la reducción sulfato; UASB: Reactor de lodo de flujo ascendente.

1.6.4. Efecto de los metales pesados

Mientras que bajas concentraciones de metales pesados pueden promover la actividad de las BRS, las altas concentraciones son inhibitorias e incluso letales

(Neculita *et al.*, 2007). Además, los metales en solución pueden causar efectos tóxicos sinérgicos como en el caso del níquel y el zinc (Poulson *et al.*, 1997) y el cobre y el zinc (Utgikar *et al.*, 2004). Contrariamente a la creencia común de que sólo los iones metálicos solubles pueden ser tóxicos o inhibidores, Utgikar *et al.* (2002) demostraron que los compuestos insolubles de metal también podían afectar la actividad de las BRS, bloqueando el acceso al sustrato y los nutrientes esenciales ya que los precipitados forman una capa sobre las bacterias.

En base a los resultados reportados por diversos autores (Tabla 1.6) se puede arribar a la conclusión que las comunidades de microorganismos suelen ser más resistentes a los metales pesados que los aislados bacterianos, sobre todo si fueron obtenidas de sitios contaminados con dichas sustancias; y que las biopelículas formadas de cultivos mixtos de BRS son más efectivas que los cultivos puros, ya que contienen grandes cantidades de SPE que mejoran la precipitación de metales pesados (White y Gadd, 1998, 2000). Además, la tolerancia a cada metal depende de la especie (Sani *et al.*, 2001a, 2001b; Poulson *et al.*, 1997)

Tabla 1.6. Concentraciones inhibitorias de metales pesados.

Microorganismo	Concentración de metal (mg/L)											Inhibición	Referencia
	Cr(III)	Cu(II)	Mn(II)	Ni(II)	Zn(II)	Co(II)	Fe(II)	Cr(VI)	Cd(II)	Pb(II)	Hg(II)		
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	15	4	10	8,5	20	-	-	-	-	-	-	100% ^A	Cabrera <i>et al.</i> , 2006
<i>Desulfovibrio spp</i>	15	4	10	8,5	20	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-	100% ^{A,B}	Radhika <i>et al.</i> , 2006
Aislado BRS	-	-	20	-	-	20	-	-	-	-	-	^C	Medírcio <i>et al.</i> , 2007
Cultivo mixto de BRS	-	10,5	-	-	16,5	-	-	-	-	-	-	CI50 ^B	Utgikar <i>et al.</i> , 2001
	-	12	-	-	20	-	-	-	-	-	-	100% ^B	
Consorcios de BRS	-	100	-	-	-	-	30	-	-	-	-	SI	García <i>et al.</i> , 2001
Consorcio de BRS	-	80	-	-	150	-	400	-	-	-	-	SI	Martins <i>et al.</i> , 2009
Consorcio de BRS	-	150	-	150	150	-	-	150	-	-	-	SI	Kieu <i>et al.</i> , 2011
Consorcio de BRS	-	80	-	-	200	-	750	-	-	-	-	SI	Alexandrino <i>et al.</i> , 2011
Consorcio de BRS	-	-	-	-	150	-	-	-	-	-	-	100% ^A	Azabou <i>et al.</i> , 2007
Cultivo mixto de BRS	60	2	-	10	13	-	-	-	4	125	74	100% ^B	Utgikar <i>et al.</i> , 2003

SI: sin inhibición; 100%: inhibición total; CI50: concentración inhibitoria 50%; ^A: inhibición del crecimiento celular;

^B: inhibición de la reducción sulfato; ^C: disminución de la $\mu_{\text{máxima}}$ mayor en el caso del Co(II).

En la remediación de metales pesados se utilizan altas concentraciones de dichas sustancias, y para evitar el efecto inhibitor existen dos alternativas principales. Por un lado, se intenta buscar BRS tolerantes o resistentes a metales pesados procedentes de zonas con altas concentraciones de los mismos, como pueden ser zonas mineras o sitios contaminados. Alternativamente, se pueden emplear biorreactores con diseños que minimicen el contacto de los metales con los microorganismos. Algunos de estos

diseños son los reactores con recirculación (Glombitza, 2001), los reactores de lecho fluidizado y los reactores de membrana extractiva (Chuichulcherm *et al.*, 2001).

1.6.5. Efecto del oxígeno

Tradicionalmente se cree que los BRS son microorganismos heterótrofos anaeróbicos, incapaces de tolerar el oxígeno y, por lo tanto, restringidos a zonas anóxicas. Sin embargo, a partir de los estudios de Cypionka *et al.* (1985) se ha demostrado que las BRS son capaces de sobrevivir a cortos períodos de exposición al oxígeno conservando la capacidad de reducción de sulfato y que la tolerancia al oxígeno depende de la especie. Trabajos posteriores dieron ejemplos de la capacidad de algunas BRS para reducir oxígeno y nitrato en condiciones aeróbicas (Dilling y Cypionka, 1990). El proceso de respiración es sólo microaerófilo y se reduce o detiene a una concentración de oxígeno mayor a 1 - 2 % (Krekeler *et al.*, 1997; van Niel *et al.*, 1998; Abdollahi y Wimpenny, 1990; Marschall *et al.*, 1993). Además, las diferentes cepas de BRS tienen diferentes tolerancias de oxígeno (Marschall *et al.*, 1993). Krekeler y Cypionka (1995) encontraron que si una pequeña cantidad de oxígeno está presente conjuntamente con otros aceptores de electrones, el oxígeno se consume primero, seguido por el nitrato y finalmente por compuestos del azufre; demostrando que las BRS utilizan el aceptor electrónico en base al rendimiento energético. Por otra parte, el oxígeno induce cambios morfológicos tales como los que se han observado para *Desulfovibrio*, que desarrollan células anormalmente alargadas (Sass *et al.*, 1998a).

La toxicidad del oxígeno puede estar relacionada con la sensibilidad de varias proteínas aisladas de BRS. Hidrogenasas (enzimas clave de su metabolismo energético) (Cammack *et al.*, 1994) y diferentes enzimas que intervienen en la oxidación de sustratos (Stams y Hansen, 1982; Hensgens *et al.*, 1993; Zellner y Jargon, 1997) aisladas de *Desulfovibrio* se inactivan rápidamente por el oxígeno. Fournier *et al.* (2006) han informado que la exposición al oxígeno durante una hora de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough induce cambios en el contenido de proteínas, algunas de las cuales participan en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos y en la división celular. Esto puede estar relacionado con los cambios morfológicos (Sass *et al.*, 1998a) y la

ausencia de la división celular (Marschall *et al.*, 1993) que han sido reportados en presencia de oxígeno (Dolla *et al.*, 2006).

Debido a los efectos tóxicos del oxígeno, las BRS han desarrollado estrategias de adaptación que pueden distinguirse en dos grupos: las de comportamiento y las moleculares (Cypionka, 2000). Las primeras estrategias incluyen aerotaxis (Marschall *et al.*, 1993) y la formación de agregados que permiten crear microambientes anóxicos (Sigalevich *et al.*, 2000a). Mecanismos similares se han propuesto para la capacidad de BRS de crecer aeróbicamente cuando son co-cultivadas con anaerobios facultativos que podrían eliminar el oxígeno, creando un micronicho en el que las BRS podrían crecer (van den Ende *et al.*, 1997; Sigalevich *et al.*, 2000b). El segundo mecanismo permite eliminar las especies reactivas del oxígeno y protegerse contra sus efectos nocivos mediante mecanismos moleculares que implican enzimas (Tabla 1.7). Fournier *et al.* (2006) identificaron varias proteínas de funciones desconocidas expresadas diferencialmente en condiciones oxidativas, que podrían constituir nuevos sistemas antioxidantes.

Tabla 1.7. Proteínas envueltas en la reducción de oxígeno y la detoxificación de especies reactivas del oxígeno en el género *Desulfovibrio* (Dolla *et al.*, 2006).

	Proteína	Locación
<i>Reducción del oxígeno</i>		
Citoplasmática	Rubredoxina-oxígeno oxidoreductasa	Citoplasma, soluble
	Citocromo c oxidasa	Unida a la cara citoplasmática de la membrana
	Citocromo bd oxígeno reductasa	Periplasma, soluble
Periplasmática	[Fe] hidrogenasa	
<i>Detoxificación de especies reactivas del oxígeno</i>		
Superóxido	Superóxido dismutasa	Periplasma
	Superóxido reductasa	Citoplasma
H ₂ O ₂	Catalasa	Citoplasma
NADH peroxidasas	Rubreritrina 1	Citoplasma
	Rubreritrina 2	
	Nigeritrina	
Peroxidasas tiol-específicas	Tiol peroxidasa	Citoplasma
	BCP	

1.6.6. Efecto del sulfato

La interacción entre las BRS y los microorganismos metanógenos depende considerablemente de la relación de la DQO con el sulfato. De la competencia de estos microorganismos depende en muchos casos el éxito de un proceso de tratamiento anaeróbico. Estequiométricamente, 96 g de sulfato pueden ser reducidos a sulfuro oxidando 6 g de DQO, relación DQO:sulfato de 0,67 (Hien Hoa *et al.*, 2007). Bajo estas

condiciones de exceso de sulfato los organismos metanógenos se ven suprimidos (Choi y Rim, 1991; Omil *et al.*, 1998; Annachhatre y Suktrakoolvait, 2001a); pero compiten con las BRS a relaciones DQO:sulfato entre 0,57 y 0,90 (Choi y Rim, 1991) y a medida que la relación alcanza a 2 los metanógenos predominan (Mizuno *et al.*, 1994). Por otro lado, hay que observar que en sistemas reductores de sulfato de oxidación incompleta donde se acumula acetato, la relación DQO:sulfato necesita ser mayor a la estequiométrica (Sahinkaya *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2008; Sahinkaya y Gungor, 2010).

Sin embargo, ha sido demostrado que una alta concentración de sulfato afecta la actividad de las BRS (White y Gadd, 1996; Dries *et al.*, 1998). Moosa *et al.*, 2002 demostraron en un cultivo continuo con células libres que la concentración de sulfato influencia la cinética microbiana. Para una determinada concentración inicial de sulfato, el aumento en el caudal de alimentación produjo un aumento lineal de la velocidad volumétrica de reducción de sulfato (r_{SO_4}). El aumento de la concentración inicial de sulfato ($[SO_4^{2-}]_i$) de 1,0 a 10,0 g/L aumentó la r_{SO_4} de 0,007 a 0,170 g/L.h. Además, no tuvo efecto sobre la $\mu_{m\acute{a}xima}$, el coeficiente de decaimiento (K_d) y los rendimientos de producción de biomasa (Y_{X/SO_4}); mientras que la constante de saturación (K_S) creció linealmente en función de la concentración inicial de sulfato. Los autores estimaron que la Ecuación [1.5], derivada de la ecuación de Monod modificada por el modelo de Contois (Chen y Hashimoto, 1980) y la de Pirt (1975), describía la cinética de reducción en función de la concentración de sulfato.

$$r_{SO_4} = \left\{ \frac{\mu_{m\acute{a}xima} \cdot [SO_4^{2-}]}{K'_S \cdot [SO_4^{2-}]_i \cdot [X] + [SO_4^{2-}]} - K_d \right\} \cdot \{[X] / Y_{X/SO_4}\} \quad [1.5]$$

Donde, $[SO_4^{2-}]$ es la concentración de sulfato remanente, $[X]$ es la concentración de biomasa y K'_S es la pendiente que relaciona el K_S y la $[SO_4^{2-}]_i$. Sin embargo, otra investigación realizada en un sistema de cultivo continuo con células inmovilizadas encontró que a una determinada $[SO_4^{2-}]_i$, el aumento de la velocidad volumétrica de alimentación causaba un aumento de la r_{SO_4} hasta un máximo, mientras que el incremento en la $[SO_4^{2-}]_i$ de 1 a 5 g/L generó menores r_{SO_4} (Baskaran y Nemati, 2006).

El trabajo publicado por Içgen y Harrison (2006b) revela que la sensibilidad a la concentración de sulfato no es igual para todas las especies, determinando que una alta

concentración de sulfato era tóxica para *Desulfobacterium* y *Desulfobulbus*, y que *Desulfococcus* resultó ser más resistente a concentraciones de hasta 15 g/L de sulfato.

1.7. Biorremediación

Los procesos metalúrgicos y la minería son la principal causa de contaminación por metales pesados de las fuentes de agua, ríos y lagos. La eliminación de estos agentes contaminantes de aguas subterráneas y aguas residuales mediante la precipitación como sulfuros es una de las aplicaciones más útiles de la reducción biológica de sulfato, debido a la solubilidad extremadamente baja de los sulfuros metálicos y la alta solubilidad de los sulfatos metálicos (Hulshoff Pol *et al.*, 1998). El volumen del residuo así generado es bajo en comparación con el producido por la precipitación como hidróxido, usual en el tratamiento químico de metales pesados (Eccles, 1999). Además, los sulfuros metálicos son mucho más estables que los hidróxidos (Machemer *et al.*, 1993) (Tabla 1.8).

Tabla 1.8. Solubilidad de los sulfuros metálicos y de los hidróxidos metálicos (K_{ps} , 25°C) (Sheoran *et al.*, 2010)

Metal - Me(II)	Solubilidad MeS	Solubilidad Me(OH) ₂
Mn(II)	$5,6 \cdot 10^{-16}$	$2,0 \cdot 10^{-13}$
Fe(II)	$1,0 \cdot 10^{-19}$	$1,8 \cdot 10^{-15}$
Ni(II)	$3,0 \cdot 10^{-21}$	$1,6 \cdot 10^{-16}$
Cd(II)	$1,4 \cdot 10^{-23}$	$2,0 \cdot 10^{-14}$
Zn(II)	$4,5 \cdot 10^{-24}$	$4,5 \cdot 10^{-17}$
Pb(II)	$1,0 \cdot 10^{-29}$	$4,2 \cdot 10^{-15}$
Cu(II)	$4,0 \cdot 10^{-38}$	$1,6 \cdot 10^{-19}$

Por otro lado, el tratamiento químico convencional incluye reactivos de altos costos y genera una remoción ineficiente (Kaksonen *et al.*, 2007). La reducción biológica del sulfato es de especial interés en la eliminación de metales pesados del DAM (Glombitza, 2001; Gibert *et al.*, 2003; Jonson y Hallberg, 2002), que logra también eliminar el sulfato y alcalinizar el efluente. El DAM generalmente contiene concentraciones relativamente bajas de carbono orgánico disuelto (menos de 10 mg/L) (Kolmert y Johnson, 2001), por lo cuál la disponibilidad de carbono de una fuente externa limita la actividad microbiana (Gibert *et al.*, 2004; Zagury *et al.*, 2006). El desafío es la selección de un sustrato orgánico adecuado para que el proceso sea eficiente y económicamente viable (Hulshoff Pol *et al.*, 2001; Neculita *et al.*, 2007).

En los casos en que el sulfuro queda en el efluente después de la precipitación del sulfuro metálico, este puede ser oxidado a azufre para su recuperación (Annachhatre y Suktrakoolvait, 2001a). Por lo tanto, los metales y el azufre se pueden precipitar, recuperar y reutilizar. Un ejemplo de este tipo de procesos es el sistema THIOPAQ, un diseño desarrollado para eliminar el sulfato de zinc contenido en las aguas de desecho en una fundición (Nyrstar, Países Bajos) que utiliza un reactor tipo *gas-lift* de 500 m³ (Figura 1.6). La comunidad microbiana presente en este reactor se compone principalmente de BRS heterótrofas de los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium*, y microorganismos metanógenos y homoacetogénicos. Las BRS presentes dependen de la formación de acetato por estos últimos (Muyzer y Stams, 2008).

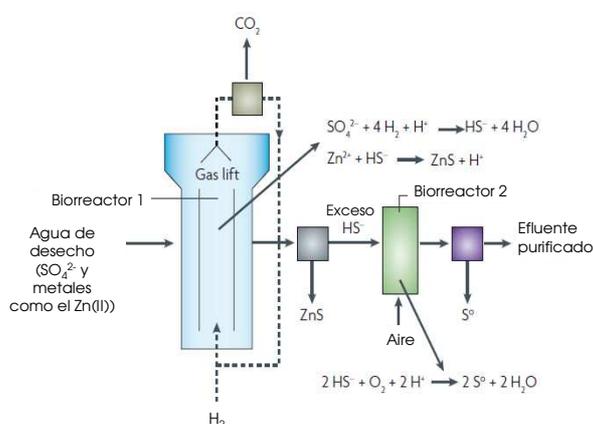


Figura 1.6. Representación esquemática del proceso THIOPAQ para remover sulfato y zinc de aguas residuales (Muyzer y Stams, 2008). El sulfato es reducido a sulfuro por las BRS en el primer biorreactor utilizando hidrógeno como donante de electrones. Luego, el sulfuro precipita los metales pesados, y el exceso de sulfuro es convertido a azufre elemental por bacterias oxidantes de sulfuro en el segundo biorreactor. El metal y el azufre precipitados pueden ser reutilizados.

La reducción de sulfato mediante BRS termófilas es aplicable para el tratamiento de aguas residuales calientes que contienen sulfato, como las vertidas por papeleras, por procesos de fabricación de rayón y de desulfurización de gases de combustión (Lopes *et al.*, 2007); eliminando la necesidad de refrigeración (Sipma *et al.*, 1999). Además, la tasa de reducción del tratamiento termofílico es mucho mayor que el de un tratamiento mesofílico, permitiendo mayores tasas de carga (Rintala y Lettinga, 1992; Visser *et al.*, 1992).

1.8. Biorreactores sulfidogénicos

La aplicación de la reducción biológica de sulfato mediante BRS *in situ* se ha centrado en sistemas pasivos, como los humedales artificiales y, más recientemente, las barreras reactivas permeables (BRP). Una BRP consiste en la instalación en el acuífero de un material reactivo (sustratos orgánicos que sustentan la actividad de las BRS, grava que brinda permeabilidad y piedra caliza para incrementar el pH) capaz de inducir los procesos físicoquímicos y biológicos necesarios para remediar el agua subterránea contaminada que fluye a través de él (Figura 1.7.A) (Cruz Viggi *et al.*, 2010). Una vez establecida la BRP, teóricamente, no requiere de mantenimiento (Gibert *et al.*, 2002). La Tabla 1.9 resume algunos trabajos con BRP.

Figura 1.7. Representación esquemática de sistemas pasivos de remediación *in situ*. A. Barrera reactiva permeable; B. Humedal artificial.

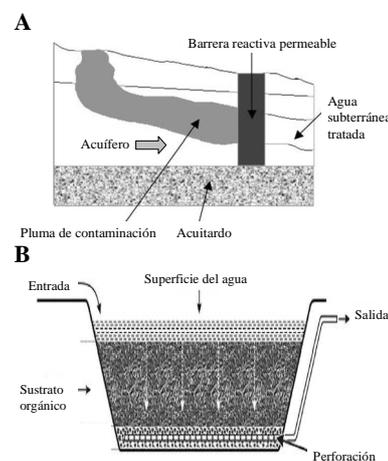


Tabla 1.9. Experimentos con BRP a escala laboratorio y a gran escala (Gibert *et al.*, 2002).

Origen de la materia orgánica	Sistema	Sulfato (g/L)	t_R (h)	Fuente orgánica adicional	r_{SO_4} (g/L.h)	Referencia
Cultivo BRS, estiércol de vaca, suero de leche	Lote	1	-	Ninguna	0,00012-0,00018	Christensen <i>et al.</i> , 1996
Sedimento arroyo, aguas residuales, lodos, mantillo de hojas, madera, astillas, estiércol de oveja, aserrín, celulosa, arena, piedra caliza	Lote	1,2-4,6	-	Ninguna	0,0002-0,0045	Waybrant <i>et al.</i> , 1998
Compost, estiércol, yeso, piedra caliza	Columna	2	12	Lactato (3,5 g/L)	0,0012-0,0041	Hammack y Edenborn, 1992
Cultivo BRS	Columna	1,92	50,4	Glicerol-lactato-etanol	0,0104-0,0125	Kolmert y Johnson, 2001
Compost de setas	Continuo	1	120-408	Ninguna	0,00088-0,00133	Dvorak <i>et al.</i> , 1992
Compostaje municipales, hojas, virutas de madera, piedra caliza, arena de sílice	BRP full-scale	2-4	2160	Ninguna	0,00063 (1 ^{er} año)-0,00042 (3 ^{er} año)	Benner <i>et al.</i> , 2002

Otros sistemas pasivos son los humedales artificiales anaeróbicos que tratan eficazmente efluentes que contienen metales pesados disueltos a través de una combinación de procesos físicoquímicos y biológicos (Sheoran *et al.*, 2010) (Figura 1.7.B). Constan de una cuenca poco profunda llena de sustrato, donde el agua se introduce en la parte superior o inferior, fluye a través del sustrato y se descarga en el otro extremo a través de una tubería instalada en la parte inferior o superior, que controla la profundidad del agua.

El uso de BRS a través de tratamientos *ex situ* mediante sistemas activos en biorreactores (Figura 1.8) se ha centrado en maximizar la producción de sulfuro para

optimizar la eliminación de metales pesados y de sulfato (Hao *et al.*, 1996; Hulshoff Pol *et al.*, 1998).

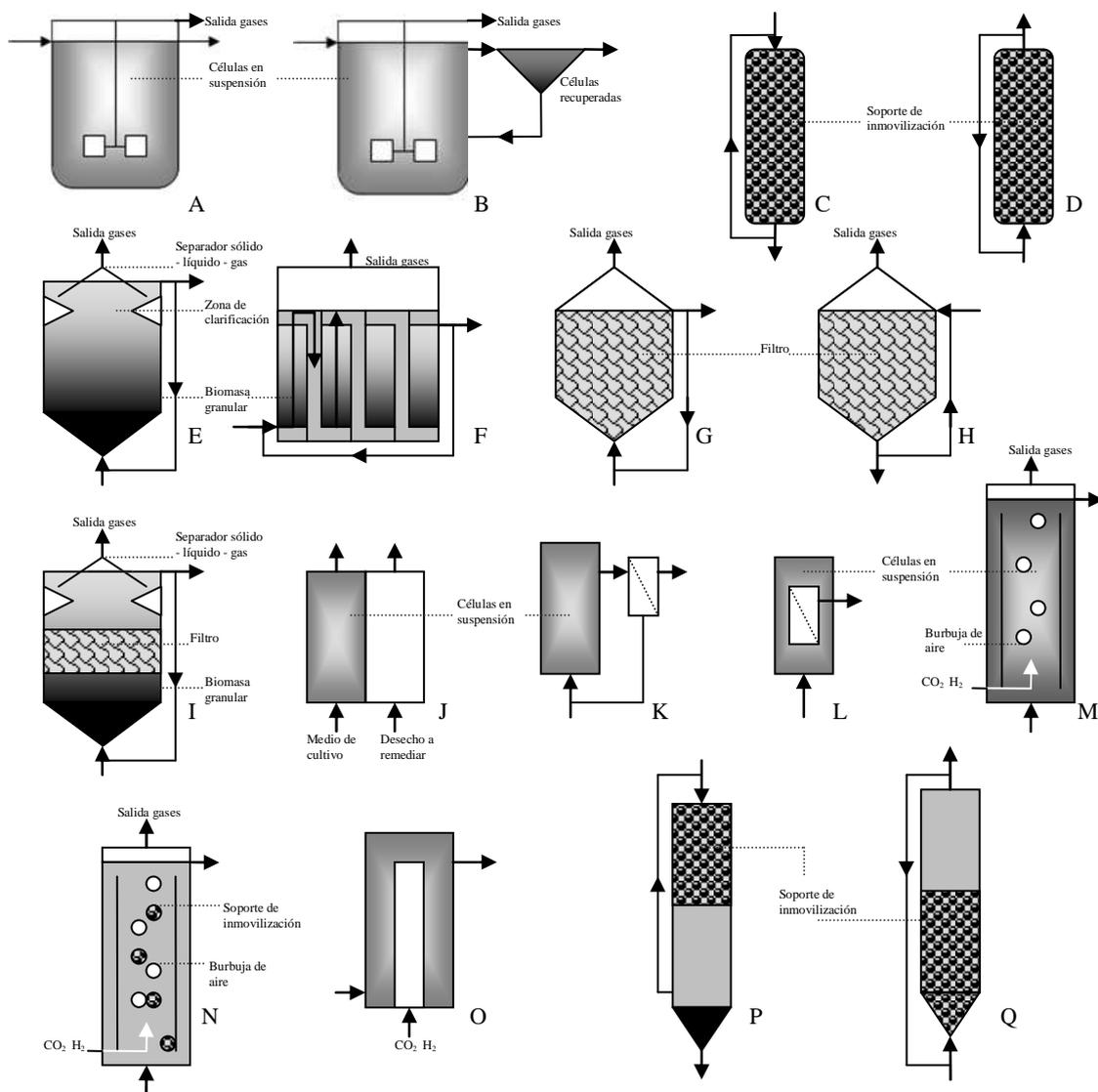


Figura 1.8. Algunos biorreactores sulfidogénicos. A. Reactor continuo tipo tanque agitado (RCTA); B. Reactor tipo tanque agitado con recuperación de células; C. Reactor de lecho empacado de flujo descendente (RLEFD); D. Reactor de lecho empacado de flujo ascendente (RLEFA); E. Reactor de lodo de flujo ascendente (UASB); F. Reactor de lodo con deflectores (RD); G. Filtro anaeróbico de flujo ascendente (FAFA); H. Filtro anaeróbico de flujo descendente (FAFD); I. Reactor híbrido de lodo y filtro anaeróbico (RH); J. Reactor de membrana extractiva (RME); K. Reactor de membrana localizada en serie (RMS); L. Reactor de membrana inmersa en el compartimento biológico (RMI); M. Reactor tipo *gas-lift* con células libres (GLL); N. Reactor tipo *gas-lift* con células inmobilizadas (GLI); O. Reactor de membrana de fibra hueca (RMFH); P. Reactor de lecho fluidizado de flujo descendente (RLFFD); Q. Reactor de lecho fluidizado de flujo ascendente (RLFFA).

La reducción biológica de sulfato se puede lograr con células suspendidas o células inmobilizadas. La aplicación de células libres en biorreactores de cultivo continuo, tales como los reactores tipo tanque agitado (Moosa *et al.*, 2002 y 2005;

Herrera *et al.*, 1997) (Figura 1.8.A) o *gas-lift* (van Houten *et al.*, 1994, 1995a, 1995b) (Figura 1.8.M) implica tiempos de residencia hidráulicos (t_R) altos para evitar el lavado del reactor por arrastre de las células, o bien la aplicación de un sistema de recuperación y reincorporación de la biomasa lavada del biorreactor (por sedimentación, floculación, centrifugación o separación magnética) (Figura 1.8.B). En un biorreactor de células inmovilizadas, el tiempo de residencia de la biomasa se desacopla del t_R , por lo que es posible operar el reactor a flujos altos. La formación de biopelículas en los biorreactores de células inmovilizadas ofrece además resistencia a condiciones extremas tales como pH bajo, altas concentraciones de oxígeno (Kolmert *et al.*, 1997) o altas concentraciones inhibidores, tales como los metales pesados y el sulfuro (Colleran *et al.*, 1995; Lyew y Sheppard, 1997), generando velocidades de reacción óptimas en comparación con las bacterias en suspensión (Glombitza, 2001), proporcionando un aumento de la estabilidad del proceso (Alvarez *et al.*, 2006) y mejorando el crecimiento microbiano (Chen *et al.*, 1994; Costerton y Wilson, 2004).

Los biorreactores de flujo vertical se han utilizado en numerosos estudios (Dvorak *et al.*, 1992; Cheong *et al.*, 1998; Elliott *et al.*, 1998; Drury, 1999; Tsukamoto y Miller, 1999; Chang *et al.*, 2000; Willow y Cohen, 2003; Tsukamoto *et al.*, 2004; Johnson y Hallberg, 2005b; Jong y Parry, 2003). En los biorreactores de lecho empacado (RLE) las células son inmovilizadas sobre un soporte. En los RLE de flujo descendente (Figura 1.8.C) el afluente se alimenta a través de la parte superior, mientras que en el modo de flujo ascendente (Figura 1.8.D) se alimenta a través de la parte inferior del reactor. Los biorreactores con flujo vertical pueden generar canales preferenciales por donde percola el líquido afluente. Los biorreactores de flujo ascendente tienden a evitar la compactación y la formación de canales (Neculita *et al.*, 2007).

Los biorreactores de lodos granulares de flujo ascendente (*up-flow anaerobic sludge bed reactors* – UASB) (Figura 1.8.E) han sido aplicados para la reducción de sulfato (Colleran *et al.*, 1994; Sánchez *et al.*, 1997), pero el desarrollo de gránulos apropiados requiere varios meses y resulta más adecuado para aplicaciones metanogénicas (Omil *et al.*, 1997). Debido a la granulación de la biomasa, no se requiere un soporte de inmovilización, lo que reduce los costos iniciales en comparación con otros sistemas de células inmovilizadas. Una variante del UASB es el reactor de

lodo granular de lecho expandido (EGSB), donde la velocidad del flujo que atraviesa el lecho es suficiente para expandirlo y fluidizarlo. Los sistemas de reactores de lodo con deflectores (RD) son una variante de UASB con deflectores internos que fuerzan al líquido a fluir de modo sinuoso permitiendo aumentar el tiempo de contacto con la biomasa (Figura 1.8.F).

En los reactores de filtros anaeróbicos (Figura 1.8.G y 1.8.H) la biomasa es retenida en los intersticios del material de empaque del reactor sin adherirse al mismo y también como una biopelícula inmovilizada sobre el soporte. Existe una configuración híbrida entre los biorreactores de filtro anaeróbico y los de lodos granulares (Figura 1.8.I). El material soporte incluye materiales inorgánicos (polipropileno, perlas de vidrio y minerales alcalinos) (Kaksonen y Puhakka, 2007).

Los problemas asociados con el tratamiento anaerobio de aguas residuales mediante BRS están vinculados principalmente a los efectos tóxicos del H_2S y los metales pesados. Una disposición útil para evitar este tipo de inconvenientes son los biorreactores de membrana extractiva (Figura 1.8.J) (Chuichulcherm *et al.*, 2001), donde es posible separar los inhibidores del seno del reactor contenedor de las células libres. En este tipo de reactores, el residuo conteniendo los metales es pasado a través de la superficie de una membrana selectivamente permeable, mientras que el cultivo microbiano es mantenido del otro lado de la misma. El H_2S permea del compartimento biológico al de los desechos y precipita los metales. Además, la membrana es impermeable a compuestos cargados, impidiendo el contacto con los metales, pH extremos y altas salinidades. Otro tipo de reactores de membrana son los de separación de biomasa, que están conformados por un reactor de células libres y una unidad de filtración, lo que permite mayor retención de la biomasa en comparación con otros reactores de células libres. Existen diferentes configuraciones de acuerdo a la localización de la unidad de filtración, como los localizados en serie con el biorreactor (Figura 1.8.K) o inmersa en el biorreactor (Figura 1.8.L) (Mack *et al.*, 2004).

Los reactores tipo *gas-lift* se aplican en sistemas que utilizan hidrógeno y dióxido de carbono para la reducción de sulfato (Figura 1.8.M y 1.8.N). La mezcla gaseosa se hace pasar por el líquido del reactor, se disuelve y difunde a las células, que pueden encontrarse libres o inmovilizadas sobre un soporte, lo que resulta en la formación de sulfuros. Dado que el hidrógeno es bastante insoluble en agua, los gases

que no han reaccionado al salir del reactor se represurizan y reciclan. El $H_2S_{(g)}$ formado y eliminado del líquido debe ser separado de la corriente de gas de reciclaje para evitar su acumulación. Las principales desventajas del sistema son la baja solubilidad acuosa del hidrógeno, su pobre transferencia de masa, los problemas de seguridad derivados de su uso, y el empleo de células libres sujetas a un posible lavado por arrastre. El uso de un sistema de reactor de membrana de fibra hueca (Figura 1.8.O) supera los problemas de la utilización de reactores *gas-lift*. Las principales ventajas del sistema de reactor de membrana son el gran área expuesta a la fase líquida que presenta la membrana microporosa que resulta en flujos de masa altos, que el H_2S se forma fuera de la membrana y por lo tanto no se mezcla con el gas a presión en el interior de las fibras huecas, que no se requiere de un compresor de gas de reciclaje y que la membrana proporciona una superficie adecuada para la inmovilización de BRS. Debido a las limitaciones de transferencia de masa, los reactores *gas-lift* deben tener un volumen significativamente mayor que los reactores de membrana y los costos de operación son mayores debido principalmente a la recompresión y el reciclaje del gas (Tabak y Govind, 2003).

Los sistemas de lecho fluidizado (RLF) (Figura 1.8.P y 1.8.Q) impiden el taponamiento y la formación de canales en el lecho debido a la fluidización del soporte de inmovilización mediante la corriente del líquido (Cattony *et al.*, 2005; Kaksonen *et al.*, 2006a; Silva *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2006). El reactor anaeróbico de lecho fluidizado de flujo descendente (RLFFD) es un sistema realmente útil en la eliminación de sulfato y metales pesados y la alcalinización de efluentes ácidos (Celis *et al.*, 2009). En otros sistemas de cultivo, el reactor sulfidogénico suele estar acoplado a una unidad de precipitación donde toma contacto el sulfuro con el metal, realizando la remediación del efluente en dos pasos al menos. El RLFFD utiliza pequeñas partículas que operan de soporte para la inmovilización celular, con una densidad específica más baja que la del líquido circundante, por lo que las partículas flotan en el reactor y son fluidizadas hacia abajo por acción del caudal descendente de alimentación y la recirculación del efluente (García-Calderón *et al.*, 1998). En estos sistemas de cultivo, el proceso se produce en un solo paso, ya que es posible precipitar los metales en el mismo reactor en el que se desarrollan los microorganismos. El sulfuro metálico producido es arrastrado por el flujo hacia la base del reactor, donde precipita y permite ser separado de las partículas de soporte con la biopelícula en su superficie; impidiendo la oclusión del lecho (Jong y

Parry, 2003) o la formación de canales (Kaksonen *et al.*, 2006a), la inhibición causada por la presencia de sulfuro de metal (Utgikar *et al.*, 2002) y permitiendo su recuperación. Además, la recirculación permite la neutralización del pH ácido y la precipitación de metales inmediatamente el agua residual ingresa al reactor, además de la dilución de sustancia inhibitorias del líquido ingresante (Sahinkaya y Gungor, 2010).

La comparación de la r_{SO_4} no es fácil, debido a que existen varios factores de influencia. La variabilidad de las concentraciones iniciales de sulfato influyen el crecimiento y la cinética de reducción de sulfato de las BRS (Moosa *et al.*, 2002). Por otro lado, algunos estudios ofrecen los porcentajes de eliminación de sulfato sin la presentación de las concentraciones iniciales y finales (Cheong *et al.*, 1998; Elliott *et al.*, 1998; Johnson y Hallberg, 2005b). Además, la fuente de carbono y el rendimiento de la reacción influyen el porcentaje de reducción de sulfato. En la Tabla 1.10 se resumen resultados obtenidos con diferentes configuraciones de biorreactores sulfidogénicos. Las productividades volumétricas más altas se han alcanzado en reactores de células inmovilizadas, en especial los sistemas de lecho fijo (Stucki *et al.*, 1993; Selvaraj *et al.*, 1997; Baskaran y Nemati, 2006), con t_R mucho mayores que en los experimentos en lote.

Tabla 1.10. Velocidad volumétrica de reducción de sulfato (r_{SO_4} , g/L.h) obtenida para diferentes biorreactores sulfidogénicos reportados. Los valores de r_{SO_4} son los máximos obtenidos en cada publicación.

Reactor	Sustrato	Temp. (°C)	r_{SO_4} (g/L.h)	Referencia
UASB	-	28	0,004	Hien Hoa <i>et al.</i> , 2007
RLE	Lactato	-	0,004	Jong y Parry, 2006
RLE	Desechos de una planta recicladora de papel	25	0,005	Chang <i>et al.</i> , 2000
RLE	Lactato, desechos orgánicos	-	0,005	Waybrant <i>et al.</i> , 2002
RLF	Etanol	25	0,008	Celis <i>et al.</i> , 2009
FA	Lixiviado	19-25	0,008	Henry y Prasad, 2000
RCTA	Efluente de una curtiembre	-	0,012	Boshoff <i>et al.</i> , 2004
RLE	Acetato	35	0,013	Lin y Lee, 2001
RLF	Lactato	25	0,015	Chen <i>et al.</i> , 1993
Reactor en zanja	Efluente de una curtiembre	-	0,016	Boshoff <i>et al.</i> , 2004
UASB	Metanol	30	0,016	Weijma <i>et al.</i> , 2003
RLE	Lactato	Amb	0,017	Hammack <i>et al.</i> , 1994
RLE	Lactato	25	0,02	Jong y Parry, 2003
RCTA	H ₂	30	0,02	Lens <i>et al.</i> , 2003a
RLE	Etanol, lactato, glicerol	-	0,021	Kolmert y Johnson, 2001
UASB	Efluente de una curtiembre	-	0,024	Boshoff <i>et al.</i> , 2004
RM	CO ₂ , H ₂	25	0,025	Tabak y Govind, 2003
RLE	Etanol, tolueno	30	0,028	Cattony <i>et al.</i> , 2005
RLE	Extracto de carne, almidón, sacarosa, soja, detergente	30	0,03	Silva <i>et al.</i> , 2006
RLE	Lactato	-	0,031	Elliott <i>et al.</i> , 1998
RCTA	Melaza	27	0,035	Maree y Hill, 1987
RM	CO ₂ , H ₂	30	0,036	Fedorovich <i>et al.</i> , 2000
RLE	Glucosa, metanol, acetato	26	0,044	Cadavid <i>et al.</i> , 1999
RLE	CO, H ₂	35	0,05	du Preez y Maree, 1995
RLF	Melaza, agua de mina	-	0,057	Maree <i>et al.</i> , 1991
RLE	Metanol	23-26	0,067	Tsukamoto y Miller, 1999
UASB burbujeado N ₂	Almidón, sacarosa, lactato, propionato y acetato	55	0,069	Lens <i>et al.</i> , 2003b

Tabla 1.10. Velocidad volumétrica de reducción de sulfato (r_{SO_4} , g/L.h) obtenida para diferentes biorreactores sulfidogénicos reportados. Los valores de r_{SO_4} son los máximos obtenidos en cada publicación.

Reactor	Sustrato	Temp. (°C)	r_{SO_4} (g/L.h)	Referencia
RCTA	Acetato	35	0,076	Moosa <i>et al.</i> , 2005
Digestor anaeróbico	Glucosa, acetato	35	0,08	Polpresert y Haas, 1995
UASB	Lactato	35	0,096	Kaksonen <i>et al.</i> , 2003b
RLE	CO	35	0,1	du Preez y Maree, 1995
FA	Glucosa	-	0,101	Kuo y Shu, 2004
RLF	Lactato	35	0,108	Sahinkaya y Gungor, 2010
RLE	Metanol	Amb	0,13	Glombitza, 2001
RLE	Suero de queso	35	0,144	Deswaef <i>et al.</i> , 1996
RLF	Lactato	35	0,144	Sahinkaya y Gungor, 2010
UASB	Almidón, sacarosa, lactato, propionato y acetato	55	0,166	Lens <i>et al.</i> , 2003b
RCTA	Acetato	35	0,172	Moosa <i>et al.</i> , 2002
RLF	Lactato	35	0,179	Kaksonen <i>et al.</i> , 2004a
UASB	Melaza	30	0,18	Annachhatre y Suktrakoolvait, 200a, 2001b
RLE	CO ₂ , H ₂ , acetato	30	0,2	Foucher <i>et al.</i> , 2001
RCTA con recirculación	Agua residual	30	0,2	Selvaraj <i>et al.</i> , 1997
RLE	Suero de queso	35	0,256	Hiligsmann <i>et al.</i> , 1996
RLF	Etanol	Amb.	0,264	Nagpal <i>et al.</i> , 2000
RLE	Melaza	31	0,271	Maree y Strydom, 1985
RM	Acetato, etanol	33	0,276	Vallero <i>et al.</i> , 2005
EGSB	Acetato	33	0,368	Dries <i>et al.</i> , 1998
UASB	Etanol	30	0,375	Dar <i>et al.</i> , 2007b
UASB	Acetato, propionato, butirato	30	0,376	Omil <i>et al.</i> , 1996
GLI	CO ₂ , CO, H ₂	35	0,416	van Houten <i>et al.</i> , 1996
GLI	CO ₂ , H ₂	55	0,464	van Houten <i>et al.</i> , 1997
EGBS	Etanol	33	0,524	de Smul <i>et al.</i> , 1999
UASB	Acetato	32	0,584	Muthumbi <i>et al.</i> , 2001
RD	Ácidos grasos volátiles	30	0,625	Vallero <i>et al.</i> , 2003
EGBS	Metanol	65	0,625	Weijma <i>et al.</i> , 2000
RLE	Aguas residuales de producción de peróxido orgánico, etanol	-	0,783	Silva <i>et al.</i> , 2002
EGSB	Etanol	33	0,875	de Smul y Verstraete, 1999
UASB	Sacarosa	55	0,95	Lopes <i>et al.</i> , 2007
RD	Sacarosa, peptona	35	0,98	Barber y Stuckey, 2000
GLI	CO ₂ , H ₂	30	1,08	van Houten <i>et al.</i> , 1995a, 1995b
EGSB	Acetato	33	1,19	de Smul y Verstraete, 1999
GLI	CO ₂ , H ₂	30	1,25	van Houten <i>et al.</i> , 1994
RLE	Melaza	35	1,3	Gasiorek, 1994
RLE	Lactato	22	1,7	Baskaran y Nemati, 2006
RLE	Agua residual	30	1,8	Selvaraj <i>et al.</i> , 1997
RLE	Acetato	35	2,7	Stucki <i>et al.</i> , 1993

RCTA: Reactor continuo tipo tanque agitado; FA: Filtro anaeróbico; UASB: Reactor de lodo suspendido de flujo ascendente; EGSB: Reactor de lodo granular expandido; RD: Reactor de lodo con deflectores; RLE: Reactor de lecho empaquetado; RLF: Reactor de lecho fluidizado; GLL: Reactor tipo gas-lift con células libres; GLI: Reactor tipo *gas-lift* con células inmovilizadas; RMFH: Reactor de membrana de fibra hueca; RM: Reactor de membrana de separación de biomasa; Amb: Temperatura ambiente.

1.9. Estudio molecular de la ecología microbiana

Las técnicas microbiológicas convencionales, basadas en el aislamiento de cultivos puros, técnicas morfológicas, bioquímicas, metabólicas y los análisis genéticos,

han proporcionado vasta información sobre la biodiversidad de las comunidades microbianas en sistemas naturales e ingenieriles. Sin embargo, dado que los medios de cultivo tienden a favorecer el crecimiento de ciertos grupos de microorganismos (mientras que otros que son importantes en la muestra original no proliferan) y que se ignoran las condiciones de cultivo bajo las cuales la mayoría se desarrollan (Muyzer, 1999), los métodos convencionales representan sólo una parte minoritaria de la diversidad real existente. De este modo, sólo entre un 0,001 y un 1 % de los microorganismos viables son realmente cultivables (Torsvik *et al.*, 2003).

Una solución adecuada a este problema es utilizar métodos de biología molecular. Algunas de estas técnicas están basadas en el ARN ribosomal de la subunidad pequeña (ARNr 16S) o de sus genes correspondientes, considerándola como un “reloj molecular” o “cronómetro evolutivo”. Esta molécula fue elegida debido a su universalidad y abundancia en todos los seres vivos (10^3 - 10^5 ribosomas/célula) y el hecho de que es una molécula altamente conservada durante la evolución aunque tiene algunas regiones muy variables. Organismos dentro de un dominio a menudo comparten la misma secuencia de ADN en la región más conservada, mientras que las especies del mismo género pueden presentar diferencias en las regiones variables (Woese *et al.*, 1987). Estas características permiten la comparación de los organismos dentro del mismo dominio, así como la diferenciación de las cepas de la misma especie. Por otra parte, la secuencia del gen es lo suficientemente larga como para ser obtenida mediante secuenciación y generar datos estadísticos robustos.

En el caso específico de las BRS, ha sido de gran utilidad la utilización de genes funcionales comunes para los diferentes grupos de BRS; por ejemplo, los genes codificantes de las enzimas correspondientes a las rutas metabólicas de reducción de sulfato. El gen *dsr* que codifica la enzima sulfito reductasa, una enzima clave de la reducción del sulfito a sulfuro y necesaria para todas las BRS, es el marcador funcional mejor estudiado (Geets *et al.*, 2006).

Durante décadas, un reactor biológico se ha considerado una “caja negra”. Recientemente, las técnicas moleculares de ecología microbiana se han empleado principalmente al estudio de los flóculos (lodos activados) y biopelículas aplicados al tratamiento de aguas residuales. Un creciente número de métodos microscópicos y moleculares han facilitado el análisis de la organización espacial y las características

filogenéticas las comunidades de las biopelículas (Rajbir *et al.*, 2006). A continuación se describen algunas de las técnicas moleculares de ecología microbiana de mayor utilidad empleados en este trabajo.

1.9.1. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE)

Las electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante químico (DGGE) y térmico (TGGE), son técnicas a partir de las cuales los fragmentos de ADN de igual longitud pero con secuencia distinta se pueden resolver electroforéticamente (Fischer y Lerman, 1979). Estas técnicas permiten la separación de una mezcla heterogénea de genes amplificados por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en un gel de poliacrilamida con un gradiente químico de formamida y urea en concentraciones crecientes (en el caso de la DGGE) o un gradiente térmico de temperaturas crecientes (TGGE) en el sentido de la migración electroforética (Muyzer *et al.*, 1993). Se pueden estudiar moléculas de ADN de hasta 700 pb de longitud, con la característica de llevar acoplada una cola artificial rica en GC en uno de los extremos (añadida a uno de los dos cebadores en posición 5'), para evitar la desnaturalización completa del ADN (Muyzer *et al.*, 1993). Las bandas individuales representan aquellos ADN que han frenado su migración por el gel al desnaturalizarse por completo (excepto la cola de GC) (Figura 1.9).

Muyzer *et al.* (1993) demostró que mediante esta técnica se puede acceder a la identificación de componentes que representan el 1 % de la población. Más aun, en estudios posteriores realizando PCR anidada (*nested PCR*) se logró detectar por DGGE especies que representaban el 0,01 % de la población, amplificando con un primer par de cebadores la secuencia blanco y reamplificando sucesivamente con cebadores que hibridaban en regiones internas a las amplificadas por los primeros (Phillips *et al.*, 2000). Se utilizó este tipo de amplificación del ADN para caracterizar biopelículas desarrolladas sobre superficies que presentaban corrosión inducida microbiológicamente (CIM) (Neria-González *et al.*, 2006), muestras de lixiviados de rellenos sanitarios (Daly *et al.*, 2000), muestras de biorreactores industriales (Dar *et al.*, 2005) y de una mina (Kaksonen *et al.*, 2006b).

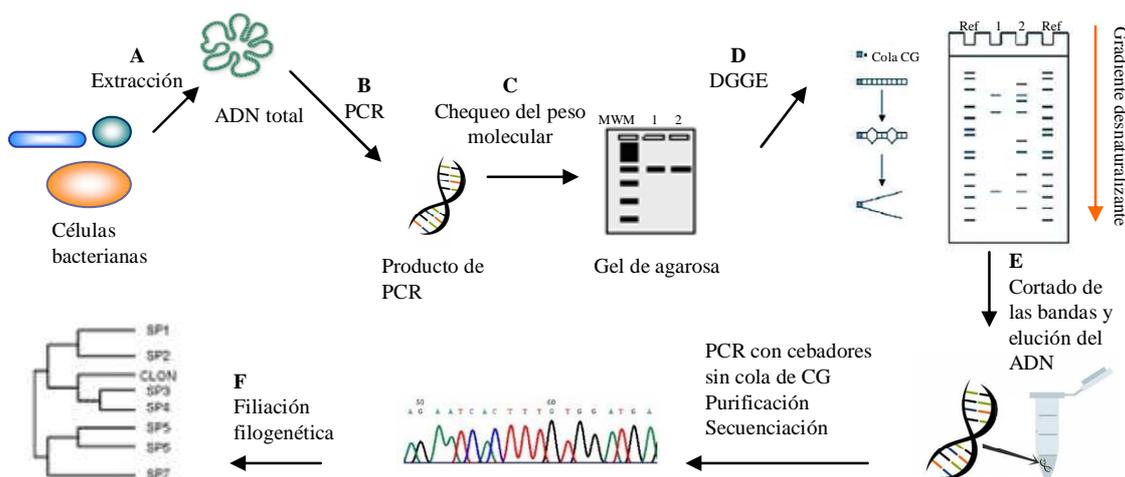


Figura 1.9. Representación esquemática de la DGGE. A. Se extrae el ADN de la muestra original; B. El gen ARNr 16S es parcialmente amplificado por PCR, por lo general con cebadores universales (o con cebadores específicos para determinados grupos de microorganismos), para dar una mezcla de fragmentos de ADN de la misma longitud (C. chequeo del peso molecular en un gel de agarosa), donde cada una de las moléculas de ADN de diferente secuencia representa un microorganismo diferente; D. La mezcla de ADN se separa por electroforesis en un gel de acrilamida de gradiente desnaturalizante de urea y formamida. Las moléculas de ADN migran hacia el polo positivo y al llegar al sitio del gel con su correspondiente fuerza desnaturalizante (dependiente de la secuencia de ADN) se detienen; E. Las bandas pueden ser cortadas del gel, el ADN extraído y secuenciado; F. La comparación de las secuencias del gen ADNr 16S con una base de datos permite determinar la filiación filogenética de los microorganismos presentes en la muestra.

La mayor parte de los trabajos utilizan el gen ARNr 16S como blanco para la PCR-DGGE. Existen numerosos cebadores diseñados para amplificar dicha secuencia selectivamente para los diferentes grupos de BRS (Daly *et al.*, 2000; Dar *et al.*, 2005; Stubner y Meuser, 2000), así como cebadores generales para Eubacterias y Arqueas. Algunos de estos cebadores se enumeran en la Tabla 1.11. Sin embargo, también existen trabajos que utilizan genes funcionales como el *dsr* (Geets *et al.*, 2006; Kjeldsen *et al.*, 2009).

Tabla 1.11. Algunos cebadores utilizados para la amplificación específica del gen ARNr 16S para diferentes grupos de BRS (Daly *et al.*, 2000). R (G o A); Y (C o T); K (G o T); M (A o C); S (G o C); W (A o T).

Cebador	Secuencia 5'-3'	Posición ADNr 16S	Grupo blanco	Temp. hibridación (°C)	Tamaño amplicón (pb)
DFM140	TAG MCY GGG ATA ACR SYK G	140-158	<i>Desulfotomaculum</i>	58	700
DFM842	ATA CCC SCW WCW CCT AGC AC	842-823			
DBB121	CGC GTA GAT AAC CTG TCY TCA TG	121-142	<i>Desulfobulbus</i>	66	1120
DBB1237	GTA GKA CGT GTG TAG CCC TGG TC	1237-1215			
DBM169	CTA ATR CCG GAT RAA GTC AG	169-183	<i>Desulfobacterium</i>	64	840
DBM1006	ATT CTC ARG ATG TCA AGT CTG	1006-986			
DSB127	GAT AAT CTG CCT TCA AGC CTG G	127-148	<i>Desulfobacter</i>	60	1150
DSB1273	CYY YYY GCR RAG TCG STG CCC T	1273-1252			
DCC305	GAT CAG CCA CAC TGG RAC TGA CA	305-327	<i>Desulfosarcina</i>	65	860
DCC1165	GGG GCA GTA TCT TYA GAG TYC	1165-1144			
DSV230	GRG YCY GCG TYY CAT TAG C	230-248	<i>Desulfovibrio</i>	61	610
DSV838	SYC CGR CAY CTA GYR TYC ATC	838-818			

Para conocer la composición y diversidad de los microorganismos pertenecientes a la comunidad microbiana, se pueden recortar las bandas separadas, reamplificarlas y secuenciarlas (Llobet-Brossa *et al.*, 2002; Kaksonen *et al.*, 2006a). También se puede revelar el gel con sondas específicas que hibriden con el ADN de determinados microorganismos para identificar bandas de interés (Daly *et al.*, 2000; Muyzer *et al.*, 1993), o realizar un estudio estadístico de la estructura de la comunidad según la posición e intensidad de las bandas (Fromin *et al.*, 2002). La DGGE es el método de elección cuando la información que se necesita no es tan profunda desde el punto de vista filogenético como la proporcionada por una biblioteca de clones, pero precisa como para determinar los miembros dominantes de una comunidad microbiana. Un simple análisis de patrones de bandas puede ser suficiente para determinados fines como observar los cambios espaciales y temporales de un consorcio (Dar *et al.*, 2008), detectar la presencia de determinado organismo (Teske *et al.*, 1996) o observar el efecto de una variable sobre la composición de un consorcio (Alexandrino *et al.*, 2011). Sin embargo, en general esta técnica se combina con otros métodos. Por ejemplo, la secuencia de las bandas predominantes de la DGGE permite el diseño de sondas aplicables a FISH, lo que permite cuantificar los microorganismos y observar su disposición espacial. La combinación de la DGGE con la realización de una biblioteca de genes analiza exhaustivamente una comunidad microbiana.

La DGGE y la TGGE tienen limitaciones como la optimización incorrecta del gradiente. Incluso en gradientes optimizados, pueden aparecer bandas únicas que representen a varios organismos diferentes. Asimismo, existen microorganismos que generan más de una banda en el DGGE, debido a que poseen diferentes copias del gen ADNr 16S (Head *et al.*, 1998). Además, los procariontes poseen distintas cantidades de copias del mismo por célula, lo que impide un análisis cuantitativo de los patrones de banda. Por ejemplo *Bacillus subtilis* posee 10 operones de genes ARNr mientras que *Desulfovibrio vulgaris* posee 5. Otra desventaja es que la extracción y amplificación del ADN genómico puede ser difícil.

1.9.2. Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Las sondas fluorescentes son secuencias cortas de ADN (16-20 nucleótidos) marcadas con un fluoróforo. Estas secuencias reconocen secuencias del gen ARNr 16S en las células e hibridan con ellas *in situ*. La hibridación *in situ* con oligonucleótidos

marcados fluorescentemente se ha utilizado con éxito para analizar muchas comunidades microbianas en diferentes ambientes (Amann *et al.*, 1995). Metodológicamente, la técnica implica la fijación de las muestras en un portaobjetos, lo que incrementa la permeabilidad y mantiene la integridad morfológica. Las células hibridadas con las sondas fluorescentes se visualizan en un microscopio de epifluorescencia o un microscopio confocal, pudiéndose comparar cuantitativamente la población total analizada con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) con la población específica que hibrida con la sonda utilizada (Hicks *et al.*, 1992) (Figura 1.10).

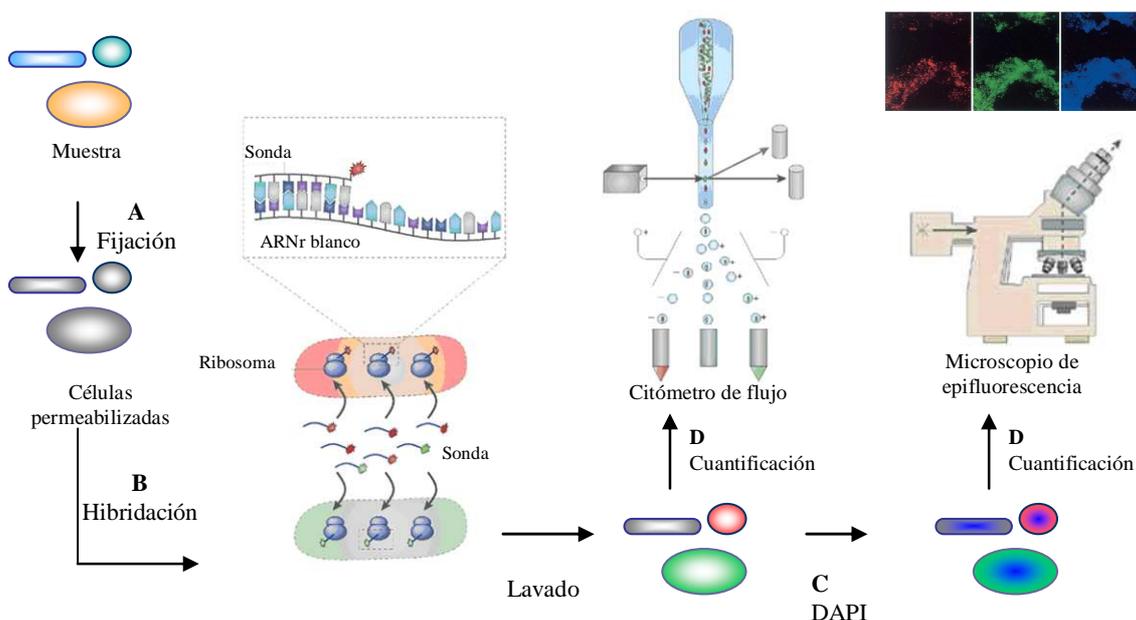


Figura 1.10. Representación esquemática de FISH. A. La muestra es tomada e inmediatamente fijada con formaldehído para preservar la integridad celular (en especial los ribosomas); B. Se hibridan las muestras con las sondas específicas (marcadas con un fluoróforo en su extremo 5', un fluoróforo diferente para cada sonda) que se pegan al ARNr 16S; C. Tinción con el marcador universal DAPI (que se adhiere de forma inespecífica al ADN); D. observación en un microscopio de epifluorescencia o un microscopio confocal (para flóculos, biopelícula, etc.); E. Cuantificación de las células hibridadas de forma manual (microscopio de epifluorescencia y confocal), con analizador de imágenes digital (ambos microscopios) o con un citómetro de flujo. La relación de células que hibridan con una sonda específica a las células totales cuantificadas por DAPI o con una sonda general, da el porcentaje de dicho grupo en la muestra (Sanz y Köchling, 2007).

Mediante esta técnica los microorganismos pueden ser identificados, localizados y cuantificados en casi todos los ecosistemas. La especificidad de la sonda permite la detección / identificación en cualquier nivel taxonómico con una resolución adecuada para diferenciar entre las especies individuales. El principal inconveniente de esta técnica radica en la falta de disponibilidad de sondas dirigidas al taxón deseado. Aunque es posible, en teoría, el diseño sondas para cada aplicación gracias a las bases de datos

de secuencia del ARNr. Entre las limitaciones más importantes de esta técnica encontramos la necesidad de optimizar las condiciones de hibridación (variando la temperatura o concentraciones de formamida en la solución de hibridación) para evitar la aparición de falsos positivos, la dificultad de asegurar la permeabilidad celular, la necesidad de normalizar la señal de fluorescencia emitida para cuantificar correctamente los resultados y de un conocimiento *a priori* del ecosistema en estudio y los microorganismos con más probabilidades de ser detectados. Además, el diseño de una sonda específica y restrictiva sin ambigüedades para un cierto grupo de microorganismos no siempre es posible, la cuantificación puede ser tedioso y subjetiva (recuento manual) o complejas (análisis de imágenes) y el análisis estructural de los agregados (lodo granular y biopelícula) requiere un microscopio confocal y un programa de análisis de imagen (es necesario personal entrenado).

1.9.3. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Las técnicas analíticas dirigidas al gen ARNr 16S o genes funcionales fueron ampliamente utilizadas para la cuantificación de microorganismos mediante métodos de hibridación. Sin embargo, sus límites de detección (del orden de 10^5 copias de ADN / ARN) los hacen poco sensibles. De este modo, sólo pueden ser utilizados para muestras de concentración microbiana relativamente alta. Los métodos basados en la PCR, por el contrario, son capaces de detectar ADN / ARN en bajas concentraciones.

Una nueva técnica conocida como PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) se ha impuesto para la detección y cuantificación de microorganismos en concentraciones bajas. Éste método controla la cantidad de productos de PCR en tiempo real. En base al aumento exponencial de la concentración del producto de PCR durante los sucesivos ciclos de amplificación, puede ser estimada la concentración inicial de la ADN/ARN blanco (Figura 1.11). El sistema de detección puede ser general, como la detección mediante SYBR Green (un agente intercalante que fluoresce al unirse a ácidos nucleicos de doble hebra), o específico, mediante sondas de secuencia definida (que fluorescen al hibridar con la secuencia blanco incluidas en el amplicón) o cebadores marcados. El gen ARNr 16S y los genes funcionales son las secuencias diana más comúnmente usadas para la cuantificación de ADN microbiano mediante qPCR.

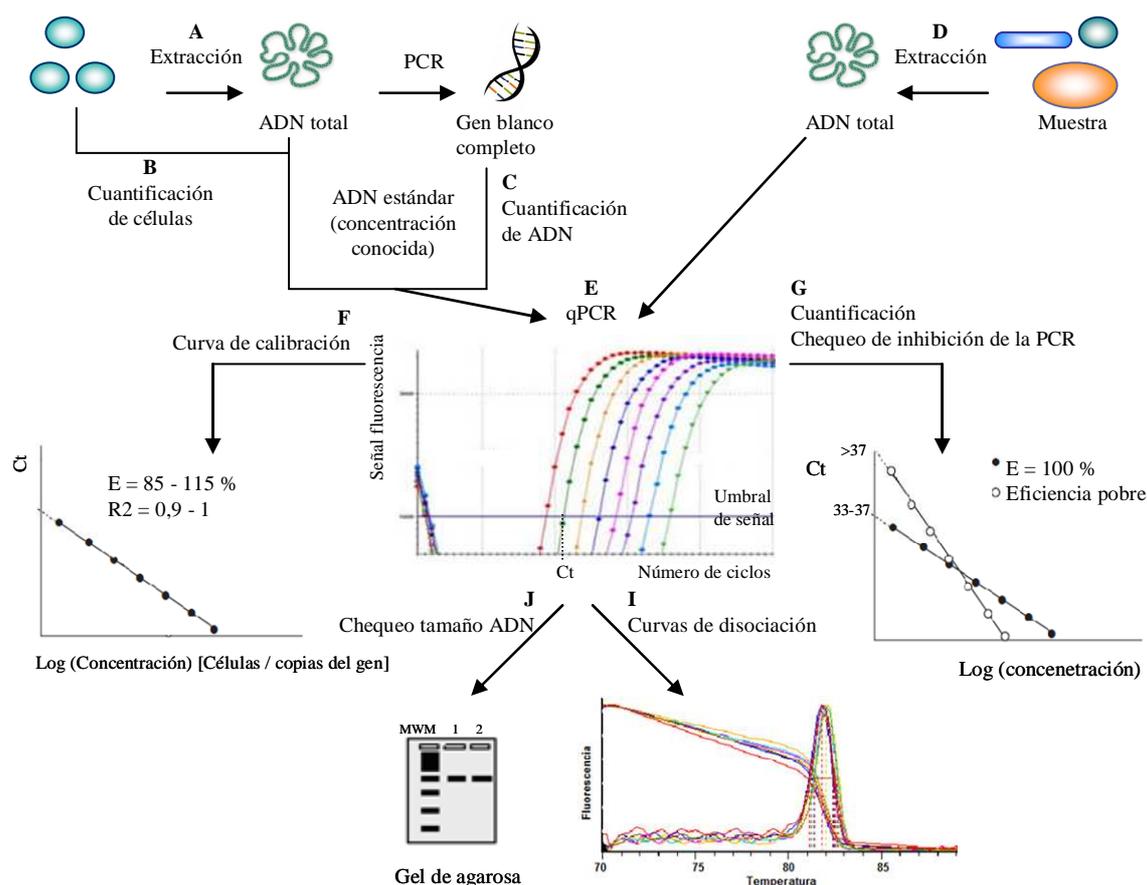


Figura 1.11. Representación esquemática de la qPCR. A. Se extrae el ADN de la cepa de referencia; B. El estándar para la qPCR se construye en base a la cantidad de células (cuantificado por técnicas microbiológicas clásicas) o (C) en base al número de copias del gen blanco (ej. ARNr 16S) amplificándolo por completo por PCR convencional y cuantificando la cantidad de ADN (por métodos espectrofotométricos); D. Se extrae el ADN de las muestras; E. Se realizan diluciones seriadas del estándar y las muestras y se amplifican mediante qPCR, detectando la cantidad de ciclos necesarios para superar un determinado umbral de señal fluorescente (C_t) para cada dilución; F. Se construye la curva de calibración graficando el C_t en función del logaritmo de la concentración del estándar (copias del gen o células) que debe tener una pendiente óptima de 3,32 (100 % de eficiencia de amplificación); G. Se interpola el valor del C_t para conocer la concentración de las muestras en todas las diluciones empleadas y se construye una curva del logaritmo de la concentración en función del C_t para corroborar que no existe inhibición de la PCR (100 % de eficiencia de amplificación); I. En caso de usar SYBR Green como sistema de detección, debe realizarse una curva de disociación al final de la qPCR, cuya primera derivada muestre un solo máximo similar para las muestras y los estándares; y/o realizarse una electroforesis en gel del de agarosa para determinar que el tamaño del amplicón es el deseado (J).

Las BRS son un grupo de microorganismos polifiléticos y debido a la amplia base de datos filogenéticos del gen ADNr 16S, varios pares de cebadores y sondas están disponibles para diferentes niveles de clasificación. Según Stubner (2002), el análisis de qPCR para las BRS Gram-positivas *Desulfotomaculum* posee un límite de detección de 100 copias de ADN, lo que equivale a 10^6 copias ADN /g de suelo; mientras que los límites de detección de BRS Gram-negativas fueron entre 10^5 y 10^3 copias ADN / g suelo (Stubner, 2004).

Otro enfoque para la detección de BRS es el uso de genes funcionales que codifican enzimas de la vía de reducción de sulfato, como *srd* o *afr* (Tang *et al.*, 2004). Esta aplicación fue usada por diversos autores para cuantificar BRS en muestras naturales (Schmidtova y Baldwin, 2011; Liu *et al.*, 2009; Kondo *et al.*, 2008), en plantas de tratamiento anaeróbico (Kjeldsen *et al.*, 2009; Ben-Dov *et al.*, 2007) y en DAM (Kock y Schippers, 2008).

1.10. Objetivo de la tesis

Desarrollar sistemas de remediación biológica de metales pesados utilizando BRS obtenidas de muestras ambientales.

Capítulo 2

Caracterización de consorcios microbianos para su utilización en biorreactores sulfidogénicos

Para la aplicación de la bioprecipitación de metales pesados mediada por BRS es necesario maximizar la producción de sulfuro para optimizar la eliminación de metales pesados y de sulfato. En este sentido, se debe seleccionar una cepa de BRS o un consorcio de BRS con una alta velocidad de reducción de sulfato. Por otro lado, los efluentes a remediar suelen tener bajas concentraciones de carbono disuelto (requiriendo la adición de una fuente de carbono externa), altas concentraciones de metales pesados y valores de pH ácidos. Por ello, es fundamental conocer las fuentes de carbono consumidas por la BRS a aplicar y su tolerancia a dichas condiciones adversas.

En este capítulo se estudió la reducción de sulfato de diferentes consorcios bacterianos enriquecidos a partir de muestras ambientales y de cepas de BRS aisladas a partir de los mismos. Una de dichas comunidades denominada *R*, proveniente del efluente de una curtiembre, redujo mayor cantidad de sulfato total y a una velocidad mayor. Debido a estas ventajas, se estudió el efecto de la fuente de carbono, la presencia de metales pesados (zinc, cromo, cobalto, níquel, cobre y cadmio) y el pH inicial del medio de cultivo sobre el crecimiento del consorcio *R* y de la cepa *Rc* aislada del mismo y sobre la estructura de la comunidad microbiana *R* aplicando DGGE (electroforesis en de gradiente desnaturizante). Además, se analizó la precipitación de los metales pesados estudiados.

Tanto *R* como *Rc* fueron capaces de utilizar lactato y etanol como fuente de carbono. Por otro lado, mientras que el pH ácido perjudicó el desarrollo de *R* y *Rc*, la presencia individual de los metales pesados no mostró un efecto significativo, a excepción del Cu(II) que afectó al aislado *Rc*. A diferencia del pH ácido que disminuyó la riqueza microbiana del consorcio *R*, la presencia de metales pesados ejerció efectos muy leves sobre su composición. Además, la precipitación de los metales fue casi total para *R* y *Rc*, siendo el Cr(III) el único metal que permaneció soluble.

2.1. Objetivo

- Obtener comunidades y cepas puras de BRS a partir de muestras ambientales.
- Seleccionar un inóculo en base a su capacidad de reducción de sulfato, las fuentes de carbono que consume, su resistencia a la presencia de metales pesados (Cr(III), Cu(II), Co(II), Cd(II), Ni(II) y Zn(II)) y su tolerancia al pH ácido para su utilización en biorreactores sulfidogénicos.
- Estudiar la bioprecipitación de metales pesados en solución.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Fuente del inóculo y aislamiento

Se enriquecieron diferentes comunidades reductoras de sulfato denominadas *R*, *D*, *8* y *9*. Fueron utilizados sedimentos tomados del efluente de una curtiembre en la zona del Río Luján (Buenos Aires, Argentina) para el enriquecimiento de la comunidad microbiana *R*. *D* provino de cañerías de transporte de crudo sometidas a corrosión inducida microbiológicamente (CIM). *8* y *9* se obtuvieron de diferentes zonas del volcán Copahue (Neuquén, Argentina). Todas las muestras fueron otorgadas por el Dr. Edgardo Donati. Para el enriquecimiento y mantenimiento de los microorganismos se utilizó el medio líquido Postgate B (Postgate, 1984) (Tabla 2.1). La incubación se realizó a 30 °C a pH neutro en botellas de suero de 120 mL llenas completamente (sin cámara de aire) cerradas herméticamente con tapones de goma y selladas con virolas metálicas.

Después de varios cultivos de enriquecimiento de los consorcios *R*, *8* y *9*, cepas de BRS fueron aisladas y nombradas con el subíndice *c* (*Rc*, *8c* y *9c*, respectivamente). El aislamiento en medio sólido por estrías se llevó a cabo en medio Postgate C (Postgate, 1984) (Tabla 2.2 y 2.3) con agregado de agar al 2 %. Las placas se colocaron en jarras de anaerobiosis con generadores de anaerobiosis (OXOID AnaeroGen AN35)

y fueron incubadas a 30 °C. Se utilizó un indicador del mantenimiento de las condiciones anaeróbicas (OXOID Anaerobic Indicator BR55). Las colonias negras (debido a la presencia de FeS) se transfirieron a medio Postgate B líquido.

Tabla 2.1. Medio de cultivo líquido Postgate B (Postgate, 1984).

Sustancia	Cantidad (por litro)
NH ₄ Cl	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
CaSO ₄	1,0 g
Lactato de sodio	3,5 g
Extracto de levadura	1,0 g
Ácido ascórbico	0,1 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Ácido tioglicólico	0,1 mL
pH	7,0 – 7,5

Tabla 2.2. Medio de cultivo líquido Postgate C (Postgate, 1984).

Sustancia	Cantidad (por litro)
KH ₂ PO ₄	0,5 g
NH ₄ Cl	1,0 g
Na ₂ SO ₄	4,5 g
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,06 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,06 g
Lactato de Sodio	6,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
FeSO ₄	0,004 g
Citrato de sodio .7H ₂ O	0,3 g
Solución de anaerobiosis ^A	5,0 mL
pH	7,5 ± 0,2

^ATabla 2.3. Esterilizado por separado, mediante filtración.

Tabla 2.3. Solución de anaerobiosis.

Sustancia	Concentración (por litro)
Ácido ascórbico	20,0 g
Ácido tioglicólico	20,0 mL
pH	7,0

2.2.2. Determinación de $\mu_{m\acute{a}xima}$ y r_{SO_4}

Con el fin de seleccionar para los ensayos posteriores los microorganismos más efectivos en la reducción de sulfato, se realizaron cultivos por duplicado de los consorcio obtenidos (R, D, 8 y 9), de las BRS aisladas (Rc, 8c y 9c) y de *Desulfovibrio sp* ATCC49975 (usada como cepa de referencia) en medio Postgate G (Okabe y Characklis, 1992) (Tabla 2.4) a 30 °C en botellas de suero de 120 mL sin cámara de aire y cerradas herméticamente.

Tabla 2.4. Medio de cultivo sintético Postgate G (Okabe y Characklis, 1992).

Sustancia	Cantidad (por litro)
NaCl	1,20 g
KCl	0,30 g
NH ₄ Cl	0,30 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,40 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,15 g
KH ₂ PO ₄	0,31 g
Lactato de sodio	5,6 g
Na ₂ SO ₄	4,20 g
Solución de anaerobiosis ^{A, B}	5,0 mL
Solución de vitaminas ^{A, B}	1,0 mL
Solución de microelementos ^B	1,0 mL
Solución de selenito ^B	1,0 mL

^A Esterilizado por separado, mediante filtración; ^B Tablas 2.3, 2.5, 2.6 y 2.7.

Tabla 2.5. Solución de vitaminas (Okabe y Characklis, 1992).

Sustancia	Cantidad (por litro)
Biotina	0,01 g
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	0,05 g
Vitamina B ₁₂	0,05 g
Tiamina	0,10 g

Tabla 2.6. Solución de microelementos (Okabe y Characklis, 1992).

Sustancia	Cantidad (por litro)
HCl (25 %)	6,5 mL
FeCl ₂ ·4H ₂ O	1,50 g
H ₃ BO ₃	0,06 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,10 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,12 g
ZnCl ₂	0,07 g
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,025 g
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,015 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,025 g

Tabla 2.7. Solución de selenito (Postgate, 1984; Okabe y Characklis, 1992).

Sustancia	Cantidad (por litro)
NaOH	0,50 g
Na ₂ SeO ₃	0,003 g

Se contaron en forma directa la cantidad de células y la concentración de ácido láctico al final del ensayo. Se determinó la concentración de sulfato en el tiempo para cada inóculo y se calcularon las velocidades volumétricas de reducción de sulfato (r_{SO_4}) mediante la Ecuación [2.1].

$$r_{SO_4} = ([SO_4^{2-}]_f - [SO_4^{2-}]_i) / \Delta t \quad [2.1]$$

Donde, $[SO_4^{2-}]_f$ y $[SO_4^{2-}]_i$ son las concentraciones inicial y final de sulfato, y Δt es el tiempo de cultivo en el cuál se produjo la reducción de sulfato.

Se determinó adicionalmente la velocidad específica de crecimiento máxima ($\mu_{m\acute{a}xima}$) de los aislados mediante la estimación de la biomasa por la medición de la densidad óptica (DO) a 600 nm aplicando el modelo de crecimiento de Monod, que relaciona el valor de la velocidad específica de crecimiento (μ) y la concentración de sustrato limitante (S), entendiéndose por éste al componente del medio de cultivo que esté en menor proporción respecto de las necesidades del microorganismo:

$$\mu = \mu_{m\acute{a}xima} \cdot \frac{S}{K_S + S} \quad [2.2]$$

Donde, K_S es la constante de saturación (da una idea de la afinidad del microorganismo por el sustrato). En el caso del medio de cultivo aquí utilizado, S fue el lactato. Normalmente K_S tiene valores pequeños (10^{-2} a 10^{-3} g/L) y despreciables con respecto a concentraciones relativamente pequeñas de S, por lo que μ se iguala a $\mu_{m\acute{a}xima}$ en la fase exponencial del crecimiento. De modo que la μ varía durante el cultivo, siendo un valor constante y máximo en la fase exponencial ($\mu_{m\acute{a}xima}$) y nulo en la estacionaria. Además, dado que:

$$r_X = \mu \cdot X \quad [2.3]$$

En fase exponencial, la Ecuación [2.3] se reduce a:

$$r_X = dX/dt = \mu_{m\acute{a}xima} \cdot X \quad [2.4]$$

Donde r_X es la velocidad de crecimiento microbiano, X es la concentración de biomasa y t es tiempo. Integrando la Ecuación [2.4] a $t = 0$ y $X = X_0$ (concentración inicial de microorganismos):

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{m\acute{a}xima} \cdot t \quad [2.5]$$

De la pendiente de la gráfica de $\ln X$ en función de t en la fase exponencial se puede calcular $\mu_{m\acute{a}xima}$ mediante la Ecuación [2.5].

2.2.3. Consumo de diferentes fuentes de carbono

Se ensayaron diferentes sustratos como fuente de carbono de la comunidad microbiana *R* y del aislado *Rc*. Para ello, se utilizó medio de cultivo Postgate G (Tabla 2.4) sustituyendo el lactato de sodio por cantidades equivalentes en Cmol de las siguientes sustancias: glucosa (4,0 g/L); piruvato (sal sódica, 4,9 g/L); metanol (99,9 % (v/v), 5,4 mL/L); acetato (sal sódica, 5,5 g/L); ácido fórmico (36,5 % (v/v), 5,3 mL/L); isopropanol (99,5 % (v/v), 3,4 mL/L); etanol (96 % (v/v), 3,7 mL/L); y ácido benzoico (2,3 g/L). Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado en botellas de suero de 120 mL cerradas herméticamente con tapones de goma y llenas completamente con medio de cultivo sintético de pH 7,0 con la fuente de carbono correspondiente. Los cultivos se incubaron a 30 °C durante 25 días. Luego, se determinó la concentración de sulfato para detectar actividad reductora de sulfato.

2.2.4. Efecto del pH y los metales pesados

2.2.4.1. Diseño factorial fraccionado 2_{IV}^{7-3}

Los diseños factoriales completos son inaplicables cuando deben ser estudiadas un gran número de variables. Aunque sólo se utilicen dos niveles de las variables el número de experimentos es 2^k (donde k es el número total de variables). Todos los diseños de los llamados “diseños de dos niveles” permiten analizar el efecto de un número relativamente grande de factores en un número relativamente pequeño de experimentos. Para reducir el número de experimentos se puede utilizar un diseño factorial fraccionado 2_{IV}^{n-p} a dos niveles, en el que n variables pueden ser estudiados en sólo al menos $2n$ experimentos. El diseño aplicado aquí es el diseño factorial fraccionado 2_{IV}^{7-3} , que a diferencia de otros diseños de dos niveles (ej., Plackett-Burman) permite una interpretación estadística más amplia de los efectos debido a que la interacción de dos factores no se confunden con los efectos principales, y al menos se puede estimar siete efectos independientes, compuesto cada uno por tres interacciones de dos factores cada una (Vander Heyden *et al.*, 2001) (Apéndice).

Se utilizaron siete factores en dos niveles: pH (7,0 y 5,0), Cu(II) (4,8 y 0 ppm), Zn(II) (6,1 y 0 ppm), Cr(III) (3,7 y 0 ppm), Co(II) (5,0 y 0 ppm), Cd(II) (5,5 y 0 ppm) y Ni(II) (5,7 y 0 ppm). La Tabla 2.8 muestra la matriz experimental aplicada, donde cada

fila representa un experimento y cada columna representa una variable independiente. Los signos + y - representan los niveles alto y bajo, respectivamente. Los siete tríos de interacciones de dos factores fueron nombrados con las letras A a la G (Tabla 2.9).

Tabla 2.8. Matriz experimental para el diseño factorial fraccionado 2_{IV}^{7-3} para 7 factores.

Experimento	Variable						
	pH	Cu(II)	Zn(II)	Cr(III)	Co(II)	Cd(II)	Ni(II)
1	-	-	-	-	+	+	+
2	-	-	+	+	-	-	+
3	+	-	-	+	+	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+
5	+	-	+	-	-	+	-
6	-	+	-	+	-	+	-
7	-	+	+	-	+	-	-
8	+	+	-	-	-	-	+
9	+	+	+	+	-	-	-
10	+	+	-	-	+	+	-
11	-	+	+	-	-	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-
13	-	+	-	+	+	-	+
14	+	-	+	-	+	-	+
15	+	-	-	+	-	+	+
16	-	-	+	+	+	+	-

Tabla 2.9. Efectos de la interacción de dos factores que pueden ser estimados.

Efecto compuesto por la confusión de tres interacciones de dos variables	Interacción de dos variables			
A	Cu(II) – Ni(II)	Zn(II) – Cd(II)	Cr(II) – Co(II)	
B	pH – Ni(II)	Zn(II) – Co(II)	Cr(II) – Cd(II)	
C	pH – Cd(II)	Cu(II) – Co(II)	Cr(II) – Ni(II)	
D	pH – Co(II)	Cu(II) – Cd(II)	Zn(II) – Ni(II)	
E	pH – Cr(II)	Cu(II) – Zn(II)	Cd(II) – Ni(II)	
F	pH – Zn(II)	Cu(II) – Cr(II)	Zn(II) – Co(II)	
G	pH – Cu(II)	Zn(II) – Cr(II)	Co(II) – Cd(II)	

Para calcular el error estándar de los efectos, se hicieron tres repeticiones en los niveles nominales de las variables (donde cada metal se encontraba a una concentración equivalente a la mitad del nivel alto y a pH 7,0). Adicionalmente, se realizaron controles abióticos para cada uno de los ensayos del diseño factorial fraccionado (donde el inóculo fue suprimido) y tres cultivos de cada inóculo sin contenido de metales (a pH neutro).

Todos los ensayos se llevaron a cabo en botellas de suero de 120 mL cerradas herméticamente con tapones de goma y llenas casi completamente con medio de cultivo sintético (Tabla 2.4) (Figura 2.1)



Figura 2.1. Fotografía de los ensayos del diseño factorial fraccionado.

cuyo pH se ajustó a los valores definidos por el diseño factorial fraccionado (pH 5 o 7) con solución de NaOH o HCl. Bajo condiciones anaeróbicas (burbujeo de N₂ estéril), se

añadió a las botellas 10 mL de inóculo y se complementó con soluciones estériles de los metales correspondientes. Los cultivos se incubaron a 30 °C hasta que no se detectó consumo de sulfato.

Se determinaron las concentraciones de sulfato, de metales pesados, de ácido láctico y de ácido acético al inicio y al final de la experiencia. El consumo total de sulfato y lactato y la generación total de acético fueron utilizados como respuesta para observar el efecto de las variables mediante el análisis estadístico que se detalla a en la Sección 2.2.4.2. Durante el transcurso de los cultivos se tomaron muestras diariamente de las repeticiones a niveles nominales de las variables, de los tres cultivos sin contenido de metales y del experimento 4 del diseño factorial fraccionado (conteniendo todas las variables en su nivel alto) y se determinaron las concentraciones de sulfato y de ácido láctico de cada una con el objetivo de obtener las cinéticas de metabolización de estos compuestos en presencia simultánea de diferentes niveles de concentración de los metales ensayados.

2.2.4.2. Análisis estadístico del diseño factorial fraccionado

En este tipo de diseños estadísticos, el efecto de cada variable x puede estimarse como E_x :

$$E_x = \frac{(\sum y_{x^+} - \sum y_{x^-}) \cdot 2}{N} \quad [2.6]$$

Donde, $\sum y_{x^+}$ y $\sum y_{x^-}$ son la suma de las respuestas cuando el factor x se encuentra al nivel alto o bajo, respectivamente, y N es el número de experimentos del diseño. Los gráficos de probabilidad normal se usaron para identificar los factores con efecto significativo. Se considera que los efectos de los factores que caen en una línea recta alrededor del cero en dichos gráficos no son efectos significativos, mientras que los que se desviaban si lo son. Para eliminar la subjetividad del método gráfico, se aplicó una interpretación estadística (Chen, 2003). Para ello, se calculó un límite numérico (margen de error, ME) y se consideró que los factores significativos son aquellos que se encuentran en el intervalo $(-ME, +ME)$. Se calculó un efecto crítico, $E_{\text{crítico}}$, de la siguiente manera:

$$E_{\text{crítico}} = t_{\text{tab}} \cdot (SE)_e \quad [2.7]$$

Donde, t_{tab} es el valor tabulado del estadístico t y $(SE)_e$ es el error estándar del efecto. El número de grados de libertad y el nivel α de significancia determinaron el t_{tab} .

El error $(SE)_e$ fue estimado por dos métodos: mediante el algoritmo de Dong y a partir de réplicas del experimento a niveles nominales. Según el algoritmo de Dong, un error inicial estimado, s_0 , basado en todos los efectos es usado para calcular la estimación final del error estándar, s_1 , (Ecuaciones [2.8] y [2.9]). Este último determina el ME (Ecuación [2.10]).

$$s_0 = 1,5 \cdot \text{mediana } |E_i| \quad [2.8]$$

$$s_1 = \sqrt{(m^{-1} \sum E_i^2)} \quad [2.9]$$

Donde E_i es el efecto del factor i, E_i es un efecto cuyo valor absoluto es menor o igual a $2,5 \times s_0$, y m es el número de dichos efectos.

$$ME = t_{(1-(\alpha/2), gl)} \cdot s_1 \quad [2.10]$$

Donde, gl corresponde a los grados de libertad, en este caso: $gl = m$ y $\alpha = 0,05$. Los efectos $|E_x|$ que son mayores o iguales a ME se consideran significativos (Vander Heyden *et al.*, 2001).

Para estimar el error mediante las réplicas de los experimentos a niveles nominales, se realizaron tres réplicas. Luego, el error estándar se calcula utilizando la Ecuación 2.10:

$$(SE)_e = \sqrt{(4 \cdot s^2 / N)} \quad [2.10]$$

La varianza s^2 se determina de las réplicas a niveles nominales. El $t_{\text{crítico}}$ es un valor-t tabulado con R grados de libertad (donde $R = N - 1$ y N es el número de réplicas) con el cuál se estima s^2 .

2.2.4.3 Cinética de crecimiento a diferentes valores de pH inicial

Luego de observar mediante el diseño factorial fraccionado que la variable con efecto más significativo fue el pH, se realizaron cultivos a pH 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 y 7,0 del consorcio bacteriano R para determinar como afectaba la cinética de crecimiento y de

reducción de sulfato. Los experimentos se llevaron a cabo por quintuplicado en botellas de suero de 120 mL cerradas herméticamente con tapones de goma y llenas completamente con medio Postgate G (Tabla 2.4) del pH correspondiente. Los cultivos se incubaron a 30 °C durante 25 días y se tomaron muestras diariamente para la determinación de la concentración de sulfato, el pH y la DO a 600 nm. Con dichos datos se determinaron la $\mu_{\text{máxima}}$ y la r_{SO_4} para cada valor de pH inicial, como se detalla en la Sección 2.2.2.

2.2.5. Métodos analíticos

2.2.5.1. Determinación de sulfato

La concentración de sulfato se determinó por el método turbidimétrico utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 640 (Fullerton) a 450 nm (Greenberg *et al.*, 1985). Cuando se adiciona bario a una solución conteniendo sulfato, el sulfato de bario precipita según la Ecuación [2.11]:



Antes de la determinación del sulfato remanente en el medio de cultivo, los elementos suspendidos (bacterias y sólidos inorgánicos) fueron separados de la muestra por centrifugación, ya que la presencia de éstos interfiere en la medida de la turbidez. A 500 μL de muestra, estándar o blanco (agua) se le agregan 12,5 mL de agua y 500 μL de solución reguladora (7,5 mL de glicerina, 4,5 mL $\text{HCl}_{(c)}$, 11,25 g NaCl, 15 mL etanol y 45 mL de agua destilada). Se agregó cloruro de bario en polvo en exceso, se mezcló en un vortex vigorosamente, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia. La curva de calibración se realizó utilizando una solución de sulfato de sodio.

2.2.5.2. Determinación de metales pesados en solución

La concentración de metales pesados en solución se midió usando un espectrofotómetro de absorción atómica Shimadzu AA-6650 (Shimadzu Corporation). Previamente, las muestras fueron filtradas con una membrana de tamaño de poro de

0,22 μm para remover biomasa y sólidos en suspensión.

2.2.5.3. Determinación de ácido láctico y acético

Para determinar la concentración de lactato y acetato se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (*high performance liquid chromatography* -HPLC-). El cromatógrafo (Waters 1525) estaba equipado con detector de arreglo de fotodiodos (Waters 2996) y se midió la absorbancia a 210 nm. Se utilizó una columna PRP-X300 (Hamilton). La temperatura de trabajo fue 30°C y la fase móvil ácido sulfúrico 0,001 N (2,0 mL/min). La curva de calibración se realizó con soluciones de ácido láctico y ácido acético a diferentes concentraciones.

2.2.5.4. Determinación de densidad óptica

Para estimar la biomasa se determinó la DO a 600 nm mediante un espectrofotómetro Beckman DU 640 (Fullerton), utilizando agua como blanco.

2.2.6. Morfología bacteriana

2.2.6.1. Fijación de las células

Las células en suspensión fueron fijadas con tres volúmenes de paraformaldehído (PFA) 12 % (p/v) en PBS (NaCl 8,7 g/L; KH_2PO_4 0,4 g/L; K_2HPO_4 1,23 g/L) e incubadas 2 horas a 4 °C. Luego, se centrifugó en frío a 5000 g por 15 minutos. El precipitado fue lavado con PBS dos veces, resuspendido en una mezcla de PBS y etanol (1:1) y almacenado a -20 °C. 10 μL de muestra se colocó en portaobjetos de pocillos múltiples y se deshidrató con incubaciones sucesivas de 3 minutos en etanol 70 % y 98 %. Luego, se secó a temperatura ambiente.

2.2.6.2. Tinción de DAPI

La morfología bacteriana se investigó usando un microscopio de epifluorescencia (Leica 2500) por el método de tinción de DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol). DAPI se usó a una concentración final de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS. Luego de incubar 3 minutos se lavaron los portaobjetos con etanol 80 % y luego con agua. Se

secaron a temperatura ambiente y se cubrieron los pocillos con solución antidecolorante y cubreobjetos.

2.2.7. *Conteo directo de células*

Para contar de modo directo la cantidad de células se utilizó una cámara de Petroff-Hausser y un microscopio óptico con contraste de fase (NIKON Labophot).

2.2.8. *Análisis de las comunidades microbianas por DGGE*

2.2.8.1. Extracción de ADN

El ADN total del consorcio bacteriano de cada experimento del diseño factorial fraccionado, de los triplicados a nivel nominal y de los ensayos a diferentes valores de pH (Sección 2.2.4.3) se extrajo hirviendo los cultivos 10 minutos. Luego de centrifugar, el sobrenadante se conservó a -20 °C y fue posteriormente utilizado como molde de amplificación de la PCR.

2.2.8.2. Amplificación por PCR

Para el análisis de DGGE la amplificación mediante PCR de la secuencia parcial del gen codificante de ARNr 16S se realizó con el par de cebadores para Eubacterias 341f-GC (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3', con cola de GC UNIDA AL EXTREMO 5') y 907r (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3') (Teske *et al.*, 1996). La mezcla de reacción contenía: 0,5 µM de cada cebador; dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 0,25 µM de cada uno; y 8 mU de GoTaq DNA polymerase (Promega) en Green GoTaq Buffer (5X). La PCR se llevó a cabo en termociclador Mastercycler (Eppendorf) con el siguiente programa: desnaturalización inicial de 4 min a 94 °C; 10 ciclos de desnaturalización (30 seg a 92 °C), pegado de cebadores (45 seg a 62 °C) y polimerización (1 min a 72 °C); 25 ciclos con una temperatura de pegado de cebadores de 57 °C y una extensión final a 72 °C por 10 min.

Se observó la presencia de un amplicón único del peso molecular adecuado

mediante electroforesis en gel de agarosa 1,2 % (p/v) en solución reguladora TAE (193,6 g/L Tris base, 45,7 mL/L ácido acético y EDTA 14,9 g/L; pH 7,4) con una tinción en bromuro de etidio (0,5 mg/mL) y un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

2.2.8.3. DGGE

La DGGE se realizó en un equipo CBS Scientific DGGE-2401 (Figura 2.2). Los geles de acrilamida (6,0 % (p/v)) se prepararon y corrieron en la solución reguladora TAE. El gradiente lineal desnaturalizante conteniendo entre 30 y 70 % de desnaturalizante (100 % es definido como 7 M de urea y 40 % (v/v) de formamida) se formó utilizando un sistema de vasos comunicantes y una bomba peristáltica regulable. Luego de armados, los geles de DGGE polimerizaron durante una hora antes de ser sembrados. La electroforesis se realizó por 16 horas a un voltaje constante de 100 V a una temperatura de 60 °C. Luego de la electroforesis, los geles se tiñeron con una solución de Syber Gold (Invitrogen) y se fotografiaron en un transiluminador UV transillumination Universal Hood II (BIO-RAD).



Figura 2.2. Fotografía del equipo de DGGE. A. Cuba de electroforesis; B. Gel; C. Regulador de temperatura; D. Resistencia; E. Termómetro

2.2.8.4. Análisis estadístico de patrones de DGGE

Los diferentes geles se alinearon con las muestras correspondientes a las repeticiones a valores nominales como referencia. La posición de las bandas y su intensidad fueron analizadas con el programa informático GelCompare II. La similitud entre las muestras se comparó por un análisis de agrupamiento del patrón de bandas digitalizado. La similitud de los patrones de banda se analizó mediante el coeficiente de correlación de Dice y graficado en un dendograma. El coeficiente de correlación de Dice es expresado como:

$$S_D = \frac{100 \cdot 2n_{AB}}{(n_A + n_B)} \quad [2.12]$$

Donde n_{AB} es el número de bandas en común entre las dos muestras, n_A es el número de bandas en la muestra A, y n_B es el número de bandas en la muestra B. Un valor de cero indica que las muestras son completamente diferentes y 100 que son idénticas. El algoritmo usado para obtener el dendograma fue el UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic averages*) (Fromin *et al.*, 2002).

2.3. Resultados y discusión

2.3.1. Comunidades microbianas reductoras de sulfato

Se lograron enriquecer cuatro comunidades microbianas nombradas *R*, *D*, 8 y 9 capaces de reducir de forma no asimilativa el sulfato a sulfuro.



Figura 2.3. Sitios de origen de las comunidades de BRS. A. Río Luján, Buenos Aires (*R*); B. Cañerías de acero corroídas por BRS (<http://www.bushman.cc>) (*D*); C. Salto del Río Agrio, Neuquén (8); D. Cascada del Gigante, Neuquén (9).

El consorcio *R* provino de los sedimentos del efluente de una curtiembre en el cauce del Río Luján (Figura 2.3.A) que presentaban las características típicas de presencia de BRS (olor a sulfuro de hidrógeno y ennegrecimiento). En este tipo de ecosistema ya se ha demostrado la viabilidad de BRS (Boshoff *et al.*, 2004).

La comunidad *D* se obtuvo de los sitios corroídos de cañerías de transporte de crudo que presentaban corrosión inducida microbiológicamente (CIM) (Figura 2.3.B). La importancia de las BRS en la corrosión de cañerías de transporte de petróleo fue demostrado por Neria-González *et al.* (2006) y Videla y Herrera (2005).

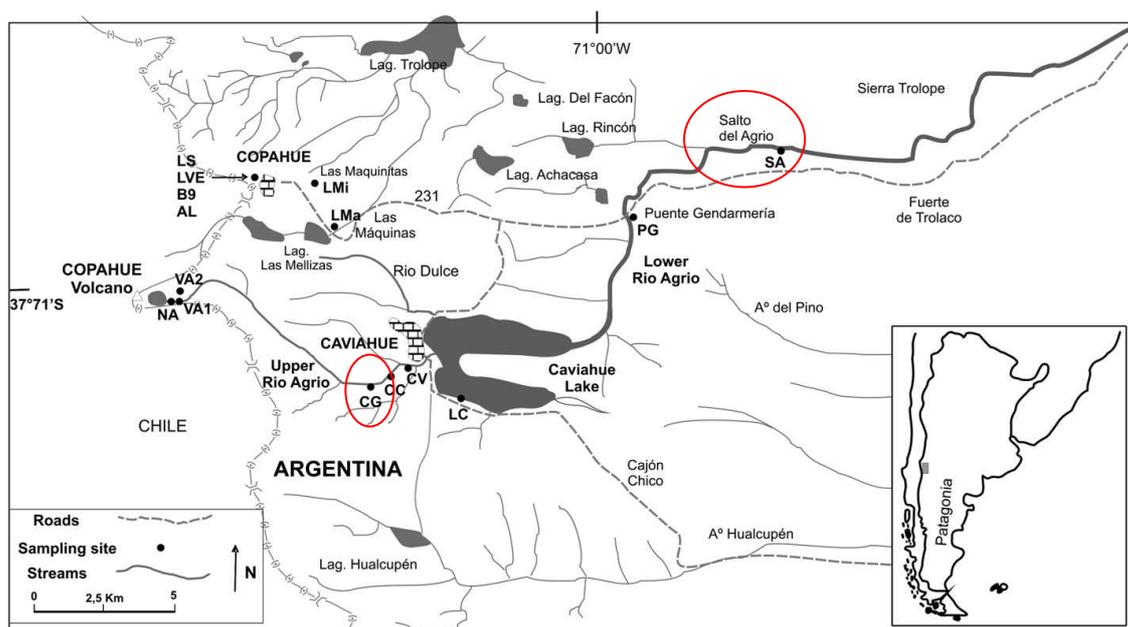


Figura 2.4. Sistema geotermal Copahue-Caviahue (Chiacchiarini *et al.*, 2010). Círculos rojos: Cascada del Gigante (CG) (de donde se obtuvo el consorcio 9); Salto del Agrio (SA) (de donde se obtuvo el consorcio 8).

Los consorcios 8 y 9 fueron obtenidos del sistema geotermal Copahue–Caviahue situado en el noroeste de la Provincia de Neuquén, Argentina (Figura 2.4). Caviahue es una villa de montaña al pie del Volcán Copahue en las costas del Lago Caviahue. El Volcán Copahue (37°51'S, 71°10,2'O), 2977 m snm, posee un lago ácido en su cráter (Laguna del Volcán, pH 0,2–1,1). En el flanco este de la montaña, debajo del lago, existe una fuente de aguas termales ácidas (el Vertedero, NA) que junto con otra fuente de agua termal (pH 0,3-2,3) alimentan el Río Agrio Alto (pH 0,5-2,5). Después de varias caídas de agua entre las que se encuentra la Cascada del Gigante (CG) de donde se aisló el consorcio 9 (Figura 2.3.D), el Río Agrio descarga en el glaciar del Lago Caviahue (LC, pH 2,1 a 3,7). Luego, el río continúa con una gran caída de agua (Salto del Agrio, SA, de donde se obtuvo el consorcio 8, Figura 2.3.C), y fluye hacia el este

(Chiacchiarini *et al.*, 2010). Numerosos estudios han caracterizado los microorganismos acidófilos de esta zona (Chiacchiarini *et al.*, 2010; Wendt-Potthoff y Koschorreck, 2002; Koschorreck *et al.*, 2008). Koschorreck *et al.* (2003) determinó la presencia de BRS en el Lago Caviahue desarrolladas a pH 3,0. Wendt-Potthoff y Koschorreck (2002) cuantificaron por número más probable (NMP) las BRS en el Río Agrío en las afluencias al Lago Caviahue ($37^{\circ}52'10''S$ - $71^{\circ}06'34''O$) y en la zona baja del río ($37^{\circ}52'42''S$ - $71^{\circ}03'19''O$), reportando cantidades del orden de 10 y 10^4 células/mL respectivamente.

Los cultivos de las comunidades obtenidas y de la cepa de referencia *Desulfovibrio sp.* arrojaron las curvas de reducción de sulfato de la Figura 2.5. Las r_{SO_4} promedio aproximadas fueron 0,010; 0,013; 0,012; 0,012 y 0,008 g/L.h para *Desulfovibrio sp.*, R, 8, 9 y D, respectivamente. Todos los cultivos agotaron el ácido láctico, sustrato limitante del cultivo. De este ensayo se concluyó que el consorcio R redujo más sulfato (sulfato reducido 2,04 g/L) y en menos tiempo que el resto de los consorcios, incluso que *Desulfovibrio sp.*. Los consorcios 8 y 9 (1,70 g/L, para ambos consorcios) presentaron curvas similares a los de *Desulfovibrio sp.* (1,64 g/L), mientras que D resulto ampliamente inferior (1,20 g/L).

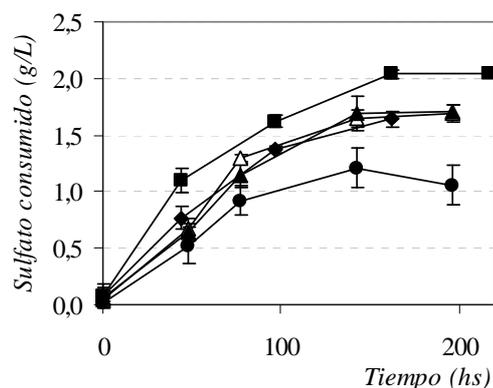


Figura 2.5. Consumo de sulfato en función del tiempo para las comunidades bacterianas. R (cuadrados), D (círculos), 8 (triángulos vacíos) y 9 (triángulos llenos) y de la cepa de referencia *Desulfovibrio sp.* (rombos).

Estos resultados son comparables a los obtenidos en diferentes reportes para BRS creciendo en medios de cultivo con sulfato y lactato. Cooney *et al.* (1996) realizaron un cultivo en lote de *Desulfovibrio desulfuricans* en medio Postgate C (en condiciones de temperatura y pH óptimas) que redujo alrededor de 2,75 g/L en 50 horas (0,03 g/L.h). La mayor cantidad de sulfato total reducido con respecto a este ensayo puede deberse a que el medio Postgate C contiene alrededor de 7 % más de lactato que el medio de cultivo usado en este ensayo (Postgate G). Sin embargo, Cabrera *et al.* (2006) cultivaron *Desulfovibrio vulgaris* y *Desulfovibrio sp.* en el mismo medio de cultivo, reduciendo 1 g/L en 7 días (0,006 g/L.h) y 1 g/L en 10 días (0,004 g/L.h),

respectivamente. Estos resultados fueron inferiores a los encontrados durante este trabajo incluso para la misma cepa de colección *Desulfovibrio sp.*.

Se obtuvieron recuentos celulares muy cercanos para todas las muestras ($1,8 \cdot 10^8$, $3,5 \cdot 10^8$, $1,8 \cdot 10^8$, $1,5 \cdot 10^8$ y $2,9 \cdot 10^8$ células/mL para *Desulfovibrio sp.*, R, 8, 9 y D, respectivamente) lo que demostró que las variaciones de la actividad reductora de sulfato no fue consecuencia de la cantidad de biomasa presente. Se decidió en base a la capacidad de reducción de sulfato aislar cepas BRS de R, 8 y 9.

2.3.2. Aislamiento de cepas de BRS y caracterización

Los cultivos en medio Postgate G de las tres cepas aisladas se los consorcios R, 8 y 9 (nombradas Rc, 8c y 9c, respectivamente) agotaron por completo la fuente de carbono (sustrato limitante) y consumieron cantidades similares de sulfato, aunque a diferentes r_{SO_4} (0,006; 0,004 y 0,004 g/L.h para Rc, 8c y 9c, respectivamente) (Figura 2.6). En los tres casos, la r_{SO_4} y la cantidad total de sulfato reducido fueron inferiores o iguales a los obtenidos en sus respectivos consorcios de origen. La $\mu_{m\acute{a}xima}$ obtenida para Rc, 8c y 9c fueron 0,008; 0,005 y 0,005 h⁻¹, respectivamente (Figura 2.7). Estos valores fueron del orden de los obtenidos por algunos autores para aislados del género *Desulfovibrio* (Tabla 2.10). Aunque varios trabajos reportan una $\mu_{m\acute{a}xima}$ mayor, estas velocidades de crecimiento son pequeñas en comparación con otro tipo de microorganismos.

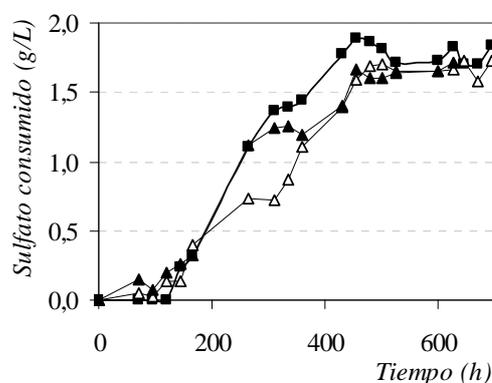


Figura 2.6. Consumo de sulfato en función del tiempo para los aislados Rc (cuadrados), 8c (triángulos vacíos) y 9c (triángulos llenos).

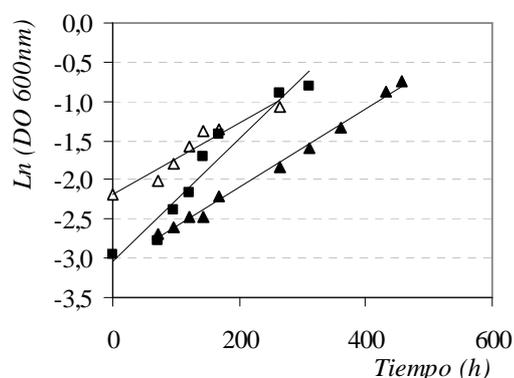


Figura 2.7. Determinación de $\mu_{m\acute{a}xima}$ para los aislados Rc (cuadrados), 8c (triángulos vacíos) y 9c (triángulos llenos).

Tabla 2.10. Velocidades específicas de crecimiento máxima reportadas para BRS consumidoras de lactato.

Organismo	$\mu_{\text{máxima}}$ (h ⁻¹)	Medio de cultivo	Temp. (°C)	pH	Referencia
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ^C	0,395	Postgate G	25	7,0	Okabe y Characklis, 1992
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ^B	0,074	Postgate B	30	7,0	Petrova <i>et al.</i> , 2006
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ^B	0,050	Postgate B	30	7,0	Petrova <i>et al.</i> , 2002
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ^B	0,052	Postgate C	37	7,8	Cooney <i>et al.</i> , 1996.
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ^{B,*}	0,056				
<i>Desulfotomaculum acetoxidans</i> ^B	0,058	Sintético	29	7,1-7,3	Widdel y Pfennig, 1981
<i>Desulfovibrio africanus</i> ^B	0,060	Complejo	30	7,2	Traore <i>et al.</i> , 1982
<i>Desulfovibrio gigas</i> ^B	0,092				
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ^B	0,104				
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	0,222	Complejo	30	7,2	Traore <i>et al.</i> , 1981
<i>Hiidenborough</i> ^B					
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> ^B	0,011	Sintético	30	7,1	Ingvorsen y Jorgensen, 1984
<i>Desulfovibrio sapovorans</i> ^B	0,007				
<i>Desulfovibrio salexigens</i> ^B	0,021				
Cultivo mixto ^C	0,002	Complejo	30	7,0	Visser, 1995

^C Sistema de cultivo continuo; ^B Sistema de cultivo en lote; ^{*} Burbujeado con N₂.

Por otro lado, a los aislados se les practicó una tinción de Gram, se observó su morfología (Figura 2.8) y movilidad. La tinción de Gram fue negativa para los tres aislados, como es común para las BRS mesófilas. En la Tabla 2.11 se resumen las características de los consorcios microbianos y de los aislados obtenidos.

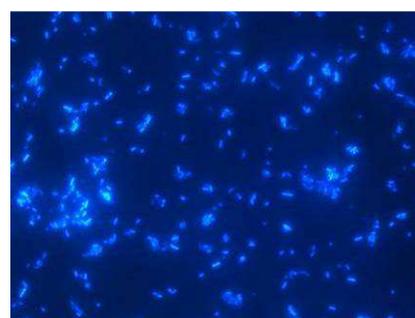


Figura 2.8. Morfología bacteriana del aislado Rc observada por el método de tinción con DAPI.

Comparando los valores obtenidos de $\mu_{\text{máxima}}$, r_{SO_4} y cantidad total de sulfato reducido de los distintos aislados, Rc resultó ser la cepa más eficiente. Además, los valores de r_{SO_4} y la cantidad total de sulfato reducido de R fueron mayores en comparación con el resto de los consorcios. En virtud de lo anterior, los ensayos posteriores se realizaron con la comunidad R y la cepa Rc.

Tabla 2.11. Comunidades microbianas y BRS obtenidas.

Consorcio	r_{SO_4} (g/L.h)	SO ₄ ²⁻ consumido (g/L)	Aislado	Morfología Celular	Gram	r_{SO_4} (g/L.h)	SO ₄ ²⁻ consumido (g/L)	$\mu_{\text{máxima}}$ (h ⁻¹)
R	0,012	2,0	Rc	Bacilos no móviles, en pares.	(-)	0,006	1,9	0,008
D	0,008	1,2	-	-	-	-	-	-
8	0,011	1,7	8c	Vibrios móviles	(-)	0,004	1,7	0,005
9	0,011	1,7	9c	Espirilos móviles.	(-)	0,004	1,7	0,005

- no realizado.

2.3.3. Utilización de fuentes de carbono

Se observó que tanto la cepa Rc como el consorcio microbiano de origen R,

fueron capaces de utilizar sólo etanol y lactato como fuentes de carbono para la reducción de sulfato. En presencia de glucosa, piruvato, metanol, acetato, ácido fórmico, isopropanol, etanol y ácido benzoico no se verificó opalescencia del medio del cultivo (indicativo del crecimiento celular) ni reducción de sulfato. Como se registra en la Tabla 1.2 algunos de los géneros de BRS Gram negativas capaces de utilizar estos dos sustratos son *Desulfovibrio* y *Desulfobulbus*.

Los productos del metabolismo del ácido láctico fueron investigados mediante HPLC. Se observó que *Rc* y *R* oxidaban incompletamente el lactato a ácido acético y que cada uno generaba un producto adicional pero diferente entre si. En el caso de *R*, el producto adicional poseía un tiempo de retención en los cromatogramas de HPLC de 1,2 relativo al del ácido láctico (de aproximadamente 1,6 minutos) y 0,77 en relación al tiempo de retención del ácido acético (2,5 minutos) (Figura 2.9.A). El espectro de absorción ultravioleta del compuesto incógnita poseía un máximo a 200 nm y otro a 260 nm, en contraste con el acético y el láctico que poseen sólo un máximo a 200 nm (Figura 2.9.B). Para *Rc*, se observó un producto metabólico diferente a un tiempo de retención 0,52 relativo al láctico y 0,33 relativo al acético, cuyo espectro ultravioleta poseía un solo máximo a 200 nm (Figura 2.9.C y D).

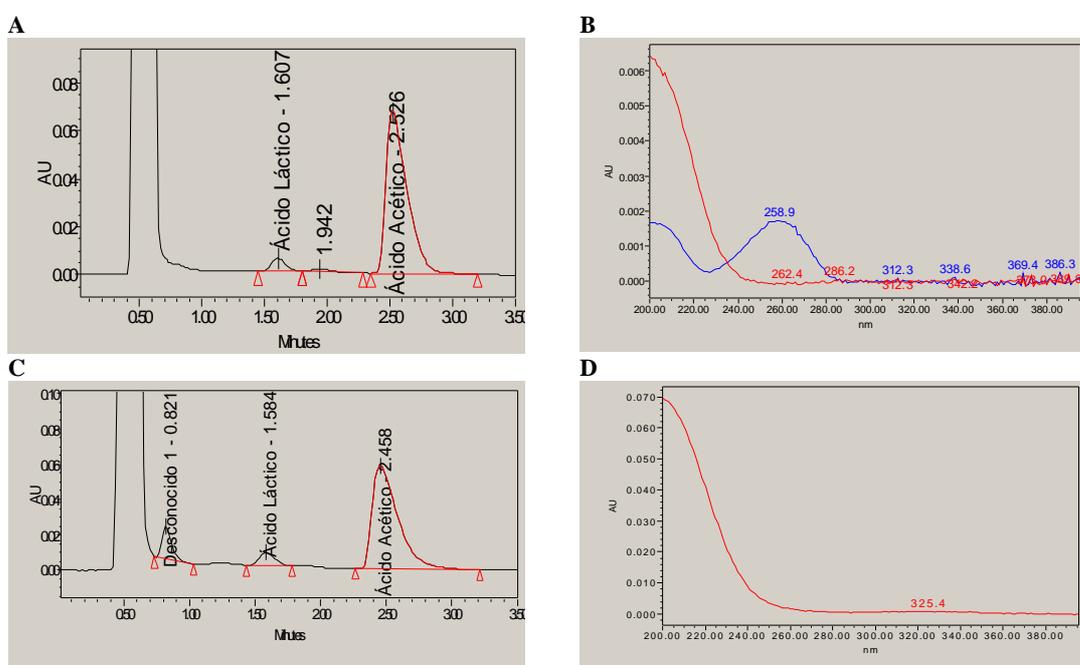


Figura 2.9. Productos metabólicos de la oxidación incompleta de ácido láctico para *R* y *Rc*. A. Cromatograma de HPLC del cultivo de *R* con ácido láctico como sustrato; B. Espectro ultravioleta de los productos de oxidación del láctico de *R*: ácido acético (rojo) y el producto metabólico incógnita (azul); C. Cromatograma de HPLC del cultivo de *Rc* con ácido láctico como sustrato; D. Espectro ultravioleta del producto incógnita de oxidación del láctico de *Rc*.

En la literatura se han reportado diferentes productos orgánicos de la oxidación incompleta del ácido láctico para las BRS (adicionales al acético) como el butanol (generado para regular el flujo de electrones en la reducción de sulfato (Traore *et al.*, 1982)), etanol (Traore *et al.*, 1981) y formiato (Matias *et al.*, 2005).

2.3.4. Precipitación de metales pesados

Para evaluar la eficacia de la precipitación de metales por la cepa *Rc* y el consorcio *R*, la concentración de metales pesados se midió al principio y al final del experimento en las tres réplicas a nivel nominal (donde todos los metales estaban presentes). En estos experimentos las concentraciones iniciales de los metales fueron: Cu(II) 2,4 ppm; Zn(II) 3 ppm; Cr(III) 1,9 ppm; Co(II) 2,5 ppm; Cd(II) 2,8 ppm y Ni(II) 2,9 ppm. La Figura 2.10.A muestra la concentración relativa de metal en las réplicas de los cultivos de la comunidad bacteriana *R*, la cepa *Rc* y el control abiótico. Como puede verse, la eficacia de precipitación de metales pesados fue alta para *R* y *Rc* y baja para el control abiótico, indicando que la producción biológica de sulfuro promovió la precipitación de los metales presentes. El cadmio y el zinc fueron completamente removidos de la solución; y el cobre, el cobalto y el níquel permanecieron en baja concentración (al menos 92, 80 y 86 % de precipitación, respectivamente). Sin embargo, la eliminación del cromo fue baja tanto para *R* como para *Rc*, que lograron inmovilizar 56 y 35 % del metal, respectivamente. Además, al determinar el porcentaje de precipitación de cromo en todos los ensayos del diseño factorial fraccionado que presentaron una reducción efectiva de sulfato (corridas 3, 4, 9 y 15) del aislado y de la comunidad, se observó que la precipitación de cromo en todos los cultivos estaba en el rango 50 - 80 %, y para los ensayos abióticos entre 60 - 20 %; evidenciando que en todos los casos el cromo no fue precipitado efectivamente como los otros cationes. Este resultado contrasta con el hecho de que el sulfuro de cromo tiene un K_{ps} varios órdenes de magnitud menor que los sulfuros del resto de los metales ensayados y comparable al del CuS (Ni(II), 3.10^{-19} > Co(II), 4.10^{-21} > Zn(II), 2.10^{-25} > Cd(II), 8.10^{-27} > Cu(II), 6.10^{-37} ~ Cr(III), 6.10^{-37}). Sin embargo, este resultado coincide con el reportado por Cabrera *et al.* (2006), quienes encontraron que la efectividad de la precipitación de cromo por *Desulfovibrio vulgaris* fue la más baja entre la de varios iones ensayados, observando un aumento en el porcentaje de metal precipitado con el aumento de la concentración

inicial de metal, precipitando alrededor de 7, 10, 20, 23 y 25 % con 1, 4,5, 9, 12 y 15 ppm de cromo, respectivamente. En dicho estudio, la precipitación de zinc y níquel fue alta, al igual que en este ensayo (Tabla 2.12), sin embargo la del cobre fue muy inferior.

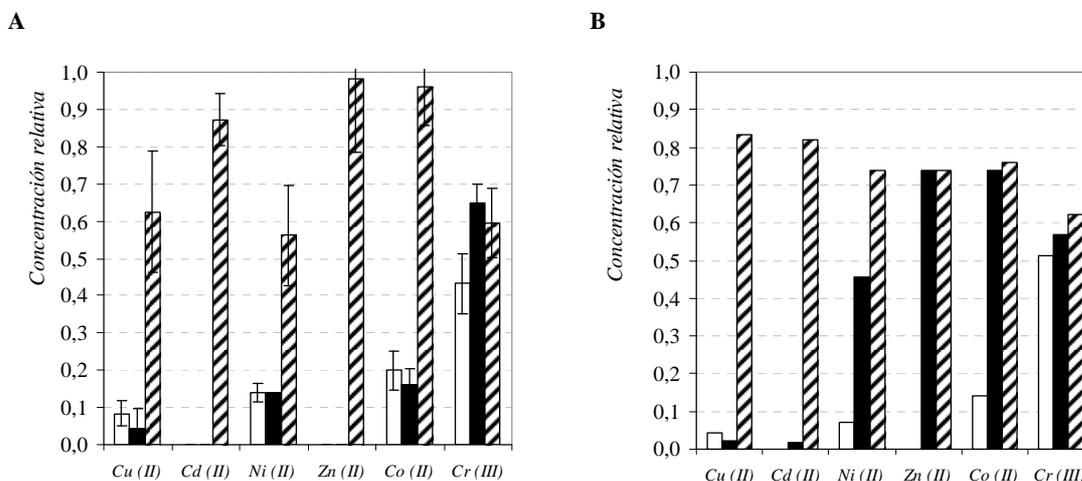


Figura 2.10. Concentración relativa de metales pesados (final a inicial) en los cultivos de la comunidad microbiana R (barras blancas), la cepa Rc (barras de color negro) y el control abiótico (barras ralladas). A. Concentraciones iniciales a niveles nominales (Cu (II) 2,4 ppm; Zn (II) 3 ppm; Cr (III) 1,9 ppm; Co (II) 2,5 ppm; Cd (II) 2,8 ppm y Ni (II) 2,9 ppm); B. Concentraciones iniciales a niveles altos (Cu (II) 4,8 ppm; Zn (II) 6,1 ppm; Cr (III) 3,7 ppm; Co (II) 5,0 ppm; Cd (II) 5,5 ppm y Ni (II) 5,7 ppm).

Al determinar la precipitación de todos los cationes en el ensayo número 4 del diseño factorial fraccionado (de pH 7,0 y concentración inicial de metales en nivel alto: Cu(II) 4,8 ppm; Zn(II) 6,1 ppm; Cr(III) 3,7 ppm; Co(II) 5,0 ppm; Cd(II) 5,5 ppm y Ni(II) 5,7 ppm) para R, Rc y el control abiótico (Figura 2.10.B), se observa que los niveles de precipitación fueron similares a los obtenidos para las réplicas a valores nominales en el caso de R; mientras que para Rc la eficiencia de precipitación fue menor, siendo sólo el cobre y el cadmio precipitados eficazmente si se sustrae la precipitación abiótica. El orden relativo de precipitación (Cd > Cu > > Ni > Cr > Zn = Co) es, a excepción del cromo, comparable al orden del K_{ps} de sus sulfuros.

Varios autores (Tabla 2.12) han realizado experiencias de precipitación, la mayoría de las cuales se han realizado con soluciones individuales de los cationes metálicos. Se puede cotejar que la precipitación de zinc, cobre, cadmio y níquel suele ser alta en todos los estudios, independientemente de la concentración inicial y de la precipitación simultánea con otros metales. Sin embargo, existe poca literatura sobre la precipitación de Cr(III) y Co(II).

Tabla 2.12. Precipitación de metales pesados reportados.

Cu(II)		Zn(II)		Cr(III)		Co(II)		Cd(II)		Ni(II)		Cultivo celular	Simultáneo	Referencia
Inicial (ppm)	% remoción													
2,4	92	3	100	1,9	57	2,5	80	2,8	100	2,9	86	L	S	Este estudio (<i>R</i>)
2,4	96	3	100	1,9	35	2,5	84	2,8	100	2,9	86	L	S	Este estudio (<i>Rc</i>)
4	45	5	100	4,5	10	-	-	-	-	8,5	96	L	N	Cabrera <i>et al.</i> , 2006
-	-	-	-	-	-	-	-	20	85	-	-	L	N	Medírcio <i>et al.</i> , 2007
-	-	150	100	-	-	-	-	-	-	-	-	L	N	Azabou <i>et al.</i> , 2007
-	-	210	70	-	-	-	-	-	-	-	-	L	N	Radhika <i>et al.</i> , 2006
50	98	50	98	-	-	-	-	50	98	-	-	I	S	Jong y Parry, 2003
80	100	150	100	-	-	-	-	-	-	-	-	L	N	Martins <i>et al.</i> , 2009
150	100	150	100	-	-	-	-	-	-	150	100	L	S	Kieu <i>et al.</i> , 2011
200	97	80	96	-	-	-	-	-	-	-	-	L	S	Alexandrino <i>et al.</i> , 2011

L: células libres; I: células inmovilizadas; S: cultivo con los metales en forma simultánea; N: cultivo con cada metal por separado.

2.3.5. Efecto de los metales pesados y el pH sobre la reducción total de sulfato

Para analizar la influencia de los siete factores independientes y los siete factores compuestos por tres interacciones de dos factores sobre la cantidad total de sulfato reducido por la comunidad *R* y la cepa *Rc*, se realizaron los gráficos de probabilidad normal. En la Figura 2.11.A se muestra la gráfica de probabilidad normal correspondiente a la cepa *Rc*. El algoritmo de Dong se usó para calcular el margen de error (ME) ($\alpha = 0,05$). De esta figura, es claro que el pH, la presencia de cobre en 4,8 ppm y la interacción G (pH -Cu(II), Zn(II) - Cr(II), Co(II) - Cd(II)) tienen un efecto significativo en la reducción de sulfato. Mientras que la presencia de 4,8 ppm de cobre y el factor G ejercen una influencia negativa leve sobre la reducción de sulfato, el aumento del pH ejerce una influencia positiva importante; es decir, que el pH ácido tiene un marcado efecto inhibitorio sobre la reducción de sulfato en el aislado *Rc*. El mismo análisis aplicado a *R* revela que el pH fue el único factor con efecto significativo, mientras que la presencia de metales o su interacción no tuvieron efecto alguno sobre la reducción de sulfato. Esto podría estar asociado a la presencia de organismos menos sensibles a la presencia de cobre y al efecto sinérgico representado por la interacción G.

El análisis de gráfico de probabilidad normal aplicado al consumo total de ácido láctico y la generación de ácido acético, mostrado para *Rc* en las Figuras 2.11.B y 2.11.C, arroja un resultado concordante. El pH neutro ejerce un efecto positivo en las

respuestas para *R* y *Rc*. Sin embargo, para *Rc* la presencia de cobre y la interacción bifactorial G se encuentra dentro de los límites del ME ($\alpha = 0,05$), pero muy cerca de ellos.

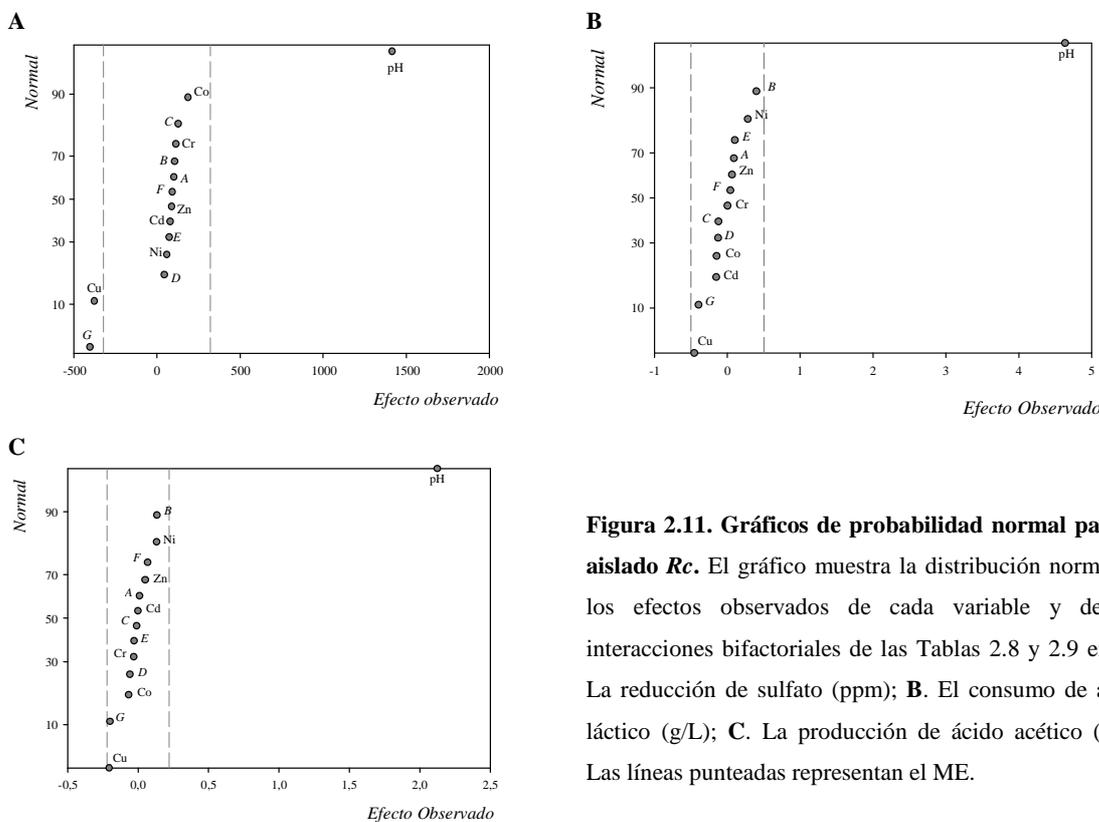


Figura 2.11. Gráficos de probabilidad normal para el aislado *Rc*. El gráfico muestra la distribución normal de los efectos observados de cada variable y de las interacciones bifactoriales de las Tablas 2.8 y 2.9 en: **A.** La reducción de sulfato (ppm); **B.** El consumo de ácido láctico (g/L); **C.** La producción de ácido acético (g/L). Las líneas punteadas representan el ME.

De acuerdo a este resultado, la variable que resultó tener un pronunciado efecto sobre la reducción de sulfato fue el pH; afectando paralelamente el consumo de lactato y la producción de acético, mostrando que no afectó la estequiometría de la reducción de sulfato. Consiguientemente, el pH 5,0 posee un efecto ampliamente inhibitorio sobre la reducción de sulfato tanto sobre el aislado *Rc* como sobre su consorcio de origen *R*. Se ha informado en numerosos estudios que las BRS son muy sensibles a condiciones ácidas suaves y son inhibidas por el pH inferior a 5 (Johnson *et al.*, 2009; García *et al.*, 2001).

El hecho de que los metales estudiados no tuvieran efecto significativo sobre la reducción de sulfato de las BRS, quizá radica en que las concentraciones estudiadas fueron relativamente bajas (Cu(II) 4,8 ppm; Zn(II) 6,1 ppm; Cr(III) 3,7 ppm; Co(II) 5,0 ppm; Cd(II) 5,5 ppm y Ni(II) 5,7 ppm). Sin embargo es de destacar que no se observó inhibición con 5,5 ppm de cadmio, que puede inhibir completamente la actividad de las BRS a concentraciones tan bajas como 4 ppm (Utgikar *et al.*, 2003; Hao *et al.*, 1994).

En la Tabla 2.13 se comparan las concentraciones inhibitorias de metales reportadas en la literatura. No fueron encontrados trabajos donde se describiese la inhibición causada por el cobalto.

Tabla 2.13. Concentraciones inhibitorias de metales para las BRS.

Inhibición (%)	Concentración de metal (ppm)					Referencia
	Cd (II)	Cr (III)	Cu (II)	Ni (II)	Zn (II)	
100 ^A	6	23	6	13	25	Morton <i>et al.</i> , 1991
50 ^C	40	-	-	-	-	Loka Bharathi <i>et al.</i> , 1990
100 ^A	>4	60	4	10	40	Hao <i>et al.</i> , 1994
50 ^C	-	-	100	-	-	Song <i>et al.</i> , 1991
100 ^C	112	-	64	59	65	Ueki <i>et al.</i> , 1991
100 ^C	-	-	-	10	13	Poulson <i>et al.</i> , 1997
100 ^C	-	-	-	>100	-	Fortin <i>et al.</i> , 1994
100 ^C	-	-	32	-	-	Pershad y Jia, 1998
100 ^C	-	15	9	17	>20	Cabrera <i>et al.</i> , 2006
100 ^C	-	-	-	-	12	Radhika <i>et al.</i> , 2006
50 ^A	-	-	11	-	17	Utgikar <i>et al.</i> , 2001
100 ^A	-	-	12	-	20	
100 ^C	-	-	-	-	150	Azabou <i>et al.</i> , 2007
100 ^A	4	60	2	10	13	Utgikar <i>et al.</i> , 2003

^A Inhibición de la actividad; ^C Inhibición del crecimiento.

En todos los trabajos se observó que el cobre es el metal que presenta menor concentración inhibitoria, apoyando el resultado obtenido en este estudio que marca el efecto inhibitorio del cobre a 4,8 ppm en los cultivos del aislado *Rc*, siendo éste el único metal de los estudiados con efecto inhibitorio. El orden relativo de concentración inhibitoria de metales reportado por Cabrera *et al.* (2006) fue Cu > Ni > Mn > Cr > Zn. Según otros autores es Cu > Cd > Ni > Zn > Cr (Morton *et al.*, 1991; Hao *et al.*, 1994; Utgikar *et al.*, 2003). Por su parte, el consorcio *R* demostró ser totalmente resistente a los metales ensayados y a la sinergia ejercida por la presencia simultánea de al menos dos de cualquiera de ellos, reforzando la hipótesis que afirma que las comunidades de microorganismos originarias de sitios expuestos a metales pesados suelen ser más resistentes a los mismos que los aislados bacterianos (Azabou *et al.*, 2007; Cabrera *et al.*, 2006).

Por otra parte, el efecto significativo observado en el aislado *Rc* ejercido por la interacción G, puede deberse a la interacción del pH con el Cu(II), del Zn(II) con el Cr(II), o bien de Co(II) con el Cd(II). Debido al diseño estadístico utilizado, es imposible distinguir a cuál de estas tres interacciones bifactoriales se debió la disminución del crecimiento del aislado *Rc*. En la literatura se ha reportado la consecuencia sinérgica de la presencia simultánea de dos metales, como en el caso del níquel y el zinc (Poulson *et al.*, 1997) o el cobre y el zinc (Utgikar *et al.*, 2004), pero nada hay publicado sobre la interacción del zinc y el cromo o del cobalto y el cadmio.

Para elucidar cual de ambos ejerce un efecto negativo sobre el crecimiento de *Rc*, se requeriría de la aplicación de un diseño factorial completo sobre estas variables.

2.3.6. Efecto de los metales pesados y el pH sobre la cinética de crecimiento

Observando las cinéticas de reducción de sulfato de las réplicas realizadas a valores nominales de las variables y de los ensayos sin contenido de metales para *R* y *Rc* (Figura 2.12), se determinó que la comunidad microbiana redujo el sulfato más velozmente que el aislado pero que la cantidad total de sulfato reducido por cada uno no varió. Para ambos inóculos, la presencia simultánea de metales pesados en las concentraciones nominales no ejerció un efecto visible sobre la tasa de reducción de sulfato ni sobre el tiempo de latencia. La reducción de 2 g/L de sulfato se alcanzó tras alrededor de 6 días de cultivo para el consorcio *R* sin presentar fase de latencia (r_{SO_4} 0,017 g/L.h); mientras que la cepa *Rc* necesitó 15 días, con alrededor de 5 días de latencia (0,006 g/L.h). La r_{SO_4} de *R* fue incluso mayor que la encontrada para cepas de colección en presencia de niveles similares de metal. Cabrera *et al.* (2006) observaron que la presencia individual de diferentes metales en solución en concentraciones similares a las de este trabajo generaba la disminución de la r_{SO_4} , de la cantidad total de sulfato reducido y un aumento de la fase de latencia para *Desulfovibrio vulgaris* y *Desulfovibrio sp.*, reduciendo, por ejemplo, sólo alrededor de 0,5 g/L en siete días (0,003 g/L.h) y 1 g/L en diez días (0,004 g/L.h), respectivamente, en presencia de 4,5 ppm de Cu(II).

Al comparar la curva de consumo de sulfato para el aislado *Rc* en presencia de valores nominales y niveles altos de cada metal ensayado, se observó que el aumento de la concentración de los cationes en un 100 % generó una disminución de la cantidad total de sulfato reducido (Figura 2.12) pero la r_{SO_4} se mantuvo en valores similares. Al determinar la concentración de ácido láctico en función del tiempo en estos ensayos, se constató que sólo en presencia de los metales en niveles altos el ácido láctico no había sido agotado (Figura 2.13). Esto muestra que en este ensayo, los metales no ejercieron un efecto sobre la cinética del organismo.

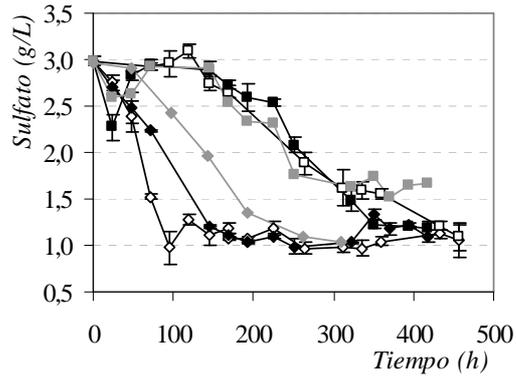


Figura 2.12. Concentración de sulfato en función del tiempo para la comunidad bacteriana *R* y el aislado *Rc* en ausencia de metales (blanco), en presencia de metales a niveles nominales (negro) y en niveles altos (gris). Consorcio *R*: rombos; Aislado *Rc*: cuadrados. Las barras de error representan la desviación estándar entre las réplicas de cada ensayo.

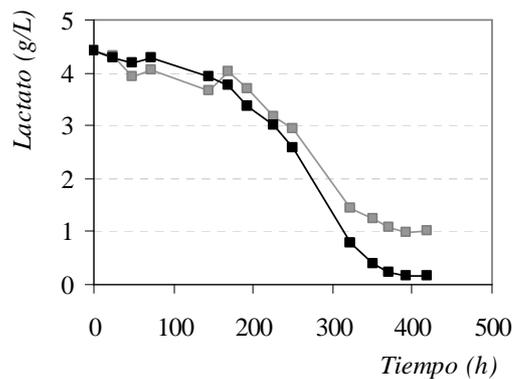


Figura 2.13. Concentración de lactato en función del tiempo para *Rc* en presencia de metales a niveles nominales (negro) y a niveles altos (gris).

En el caso del consorcio *R*, la cinética de reducción observada en presencia simultánea de los metales en nivel alto no presentó variaciones con respecto a la obtenida en valores nominales, pero requirió de una fase de latencia (Figura 2.12). Por consiguiente, se consideró que el consorcio *R* era más apto que el aislado *Rc* para la aplicación tecnológica de reducción de sulfato, en virtud de su mayor tasa de reducción y la resistencia a todos los metales pesados ensayados.

Distintos autores informaron que la presencia de metales pesados genera una disminución de la r_{SO_4} y de la cantidad total de sulfato reducido. Medírcio *et al.* (2007) encontraron que la presencia individual de 20 ppm de cadmio en un cultivo de un aislado de BRS disminuyó la cantidad de sulfato total reducido (alrededor de 0,75 g/L en 8 días, 0,004 g/L.h) con respecto a un cultivo con

igual cantidad de manganeso. Azabou *et al.* (2007) hallaron que el aumento de la concentración de zinc disminuía la r_{SO_4} , registrando una baja de 0,5 g/L de sulfato total reducido en presencia de 10 ppm de zinc con respecto al control en el mismo período de tiempo. Martins *et al.* (2009) encontraron que cultivando un consorcio en presencia de hierro, cobre y zinc (400 ppm, 80 ppm y 150 ppm, respectivamente) se reducía la misma cantidad total de sulfato que en el control, pero que la r_{SO_4} era mucho menor, necesitando 110 días contra 30 días del control para llevar a cabo la reducción.

Luego de determinar mediante el diseño factorial fraccionado que el pH fue el factor con mayor influencia, se procedió a ampliar la información ofrecida por ese

diseño estadístico para el consorcio *R*, determinando el efecto del pH en la cinética del crecimiento y de la reducción de sulfato. Como se expone en la Figura 2.14.A, las cinéticas de reducción de sulfato a pH 7,0 y 6,5 fueron muy similares (r_{SO_4} 0,021 y 0,019 g/L.h, respectivamente). A pH 6,0 se observó un aumento en el período de latencia (72 horas), pero la r_{SO_4} fue semejante a la obtenida en los casos anteriores (0,025 g/L.h). Sin embargo, a pH 5,5 se observó no sólo una dilación del período de latencia (11 días), sino que además la r_{SO_4} fue menor (0,009 g/L.h). A pH 5,0 no se detectó reducción de sulfato. Las $\mu_{m\acute{a}xima}$ estimadas fueron similares (0,03 h⁻¹) para los ensayos a pH 7,0 y 6,5. Sin embargo, a pH 6,0 este parámetro disminuyó a 0,02 h⁻¹. A pH 5,5 la dispersión aumentó considerablemente, creciendo sólo 3 de las 5 réplicas con un tiempo de latencia considerablemente mayor (300 h aproximadamente). A pH 5,0 la comunidad no fue capaz de crecer ni de reducir sulfato (Figura 2.14.A y 2.14.B). Por otra parte, el final pH de los cultivos fue similar en todos los casos excepto para los ensayos a pH inicial 5,0 (Figura 2.14.C).

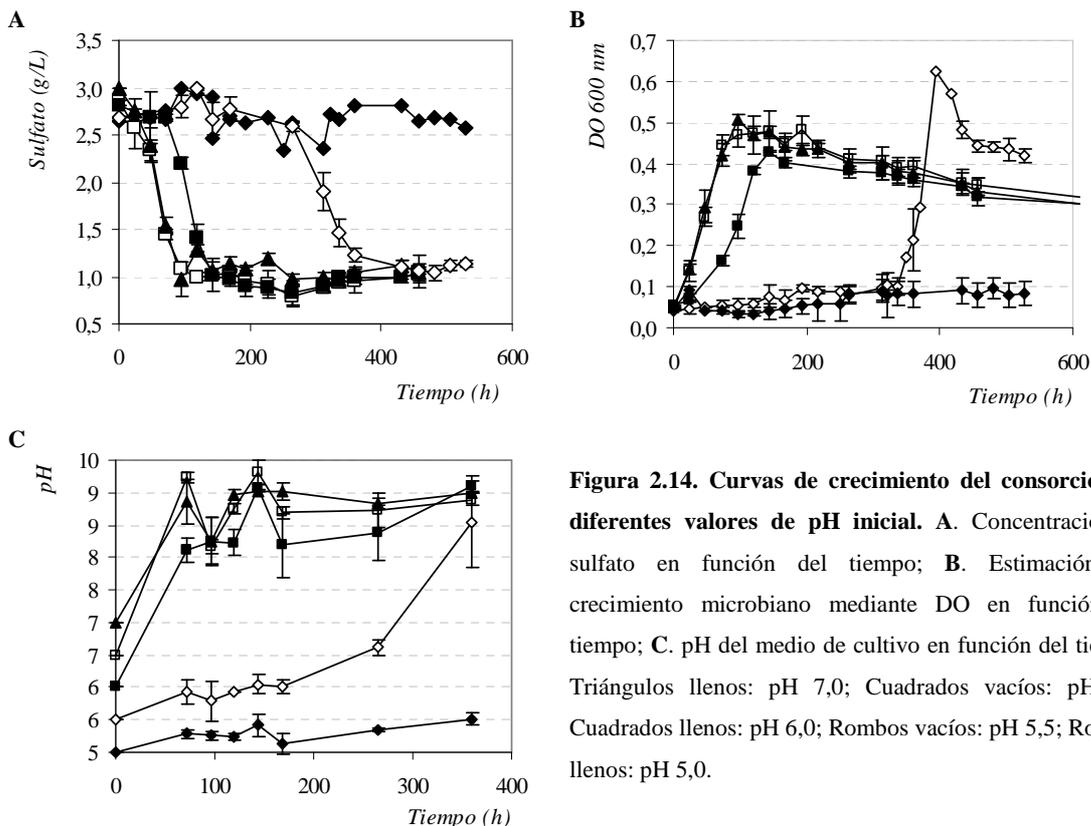


Figura 2.14. Curvas de crecimiento del consorcio *R* a diferentes valores de pH inicial. A. Concentración de sulfato en función del tiempo; **B.** Estimación del crecimiento microbiano mediante DO en función del tiempo; **C.** pH del medio de cultivo en función del tiempo. Triángulos llenos: pH 7,0; Cuadrados vacíos: pH 6,5; Cuadrados llenos: pH 6,0; Rombos vacíos: pH 5,5; Rombos llenos: pH 5,0.

Los resultados encontrados aquí se corresponden con los hallados por diversos autores que muestran que por debajo de pH 6,5 las BRS presentan algún grado de inhibición (Widdel, 1988) y que valores de pH inferiores a 5,0 suelen detener por

completo el desarrollo celular (Fortin *et al.*, 1996; Tuttle *et al.*, 1969).

2.3.7. Efecto del pH y los metales sobre la composición del consorcio bacteriano

El efecto que cada una de las variables estudiadas en este capítulo ejerce sobre la estructura de la comunidad bacteriana *R* se analizó mediante PCR-DGGE. Previamente al este ensayo, se practicaron corridas electroforéticas en geles de agarosa y se comprobó que se amplificara un único fragmento de ADN del tamaño esperado (600 pb aproximadamente) (Figura 2.15).

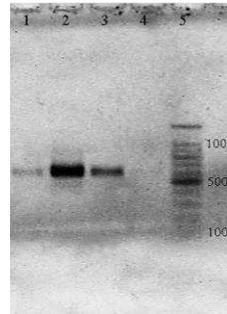


Figura 2.15. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones para DGGE. Calle 1 a 3: amplicones; Calle 4: control negativo; Calle 5: marcador de peso molecular.

Las Figuras 2.16.A y 2.16.B ilustran el patrón de bandas de DGGE para los experimentos 1 a 8 y de 9 a 16 del diseño factorial fraccionado (Tabla 2.8), respectivamente. La Figura 2.16.C muestra el gel de DGGE para los ensayos practicados a diferentes valores de pH inicial.

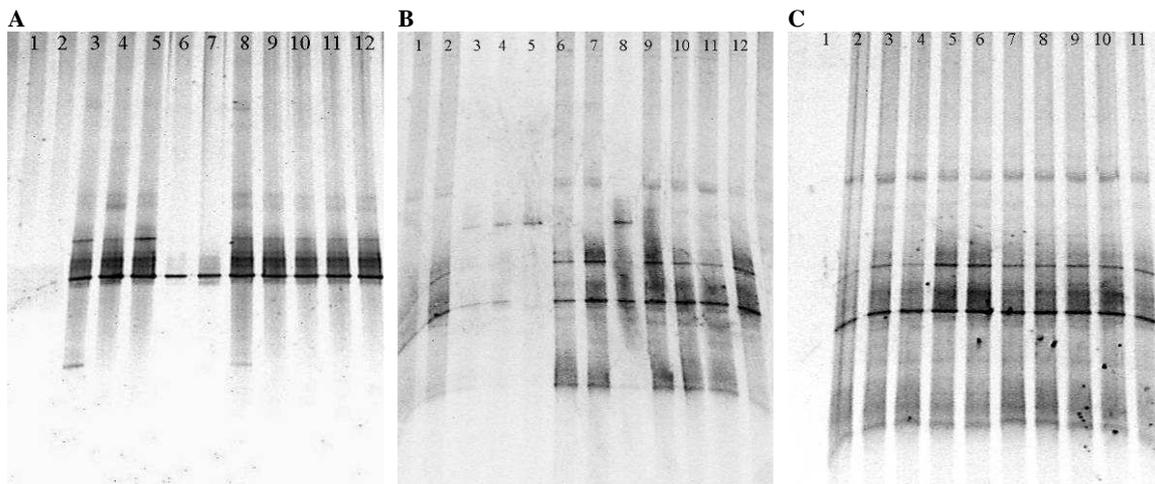


Figura 2.16. Gel de DGGE obtenido para la comunidad microbiana *R*. **A.** Calles 1 a 8: ensayos 1 a 8 del diseño factorial fraccionado; Calles 9 a 12: replicas a valores nominales; Calles 1, 2, 6 y 7 a pH 5,0; Calles 3 a 5 y 8 a 12 a pH 7,0. **B.** Calles 1 a 8: ensayos 9 a 16 del diseño factorial fraccionado; Calles 9 a 12: replicas a valores nominales; Calles 1, 2, 6, 7 y 9 a 12 a pH 7,0; Calles 3 a 5 y 8 a pH 5,0. **C.** Ensayos diferentes valores de pH; Calle 1: pH 5,0; Calle 2 a 4: pH 5,5; Calle 5 y 6: pH 6,0; Calle 7 y 8: pH 6,5; Calle 9 y 10: pH 7,0; Calle 11: replica a valores nominales del diseño factorial fraccionado (referencia).

El hecho que las repeticiones a niveles nominales generaran un patrón de bandas idéntico es una clara muestra de la reproducibilidad de la prueba. Estos resultados confirman que el método de “huellas dactilares” de DGGE es una herramienta muy fiable para la caracterización de la estructura de las comunidades bacterianas y para evaluar el impacto de las condiciones ambientales sobre la misma.

Se observaron al menos 18 bandas distintas identificables de diferentes intensidades en todas las muestras y en todos los geles. Las posiciones de las bandas en los perfiles de DGGE corresponden a identidades microbianas individuales y las intensidades de la banda representan sus cantidades relativas. El número de bandas en un gel de DGGE se puede utilizar como indicativo de la riqueza de la comunidad. Una reducción en el número de bandas con respecto a los ensayos a pH neutro se observó en todos los experimentos de pH 5,0 (1 a 4 bandas), lo que indica que la comunidad bacteriana era muy sensible a la disminución del pH. Todas las bandas que se presentaron en los experimentos a pH 5,0 se pudieron encontrar en los ensayos a pH 7,0. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en el patrón de bandas de los experimentos realizados a pH 7,0 lo que sugiere que los miembros más abundantes de las comunidades bacterianas fueron similares. El efecto del pH puede analizarse con mas detalle en la Figura 2.16.C, donde se presentan los perfiles de DGGE obtenidos en los experimentos efectuados a pH 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 y 7,0. Como puede verse, el patrón de bandas fue muy similar para todos los casos excepto para los cultivos efectuados a pH 5,0. Esto indicaría que todos los miembros de la comunidad *R* fueron capaces de tolerar valores de pH de hasta de 5,5. A pH 5,0 sólo se observó una banda, produciéndose una drástica disminución de la riqueza del consorcio.

Las posiciones de las bandas identificables en cada perfil de DGGE fueron digitalizadas y las semejanzas entre los patrones se expresó mediante el coeficiente de similitud de Dice, basado en la presencia / ausencia de cada banda. En la Figura 2.17, que muestra el análisis de agrupamiento realizado sobre los perfiles digitales, se observó que el patrón de bandas de DGGE de las réplicas a valores nominales realizadas en el gel 2.16.A (muestras R1.1 a 1.4 de la Figura 2.17) presentaron 100 % de similitud y en el gel 2.16.B (R2.1 a 2.4 de la Figura 2.17) obtuvieron un coeficiente de Dice de 87 %; lo que quiere decir que estos ensayos independientes analizados en un mismo gel de DGGE generaron un perfil de bandas igual o similar. En base a este resultado, se

consideró que las muestras sembradas en un mismo gel de DGGE que poseían más del 87 % de similitud eran muy similares o iguales. Por otro lado, las réplicas a niveles nominales usadas en los diferentes geles (como referencia para su alineación) fueron concentradas en diferentes grupos del dendograma. El coeficiente de similitud entre los grupos que contenían a los patrones de bandas conseguidos en el gel 2.16.A (R1.1 a 1.4 de la Figura 2.17) y los obtenidos en el 2.16.C (R3) fue de 90 %; y para estos con los del gel 2.16.B (R2.1 a 2.4 de la Figura 2.17) fue de 80 %. Por lo que se consideró que las muestras sembradas en diferentes geles que poseían al menos 80 % de similitud eran muy similares o iguales.

Se determinó que los ensayos realizados a diferentes valores de pH inicial de entre 5,5 y 7,0 en ausencia de metales pesados generaron patrones de bandas similares (84 a 100 %). Además, los ensayos realizados a pH inicial entre 5,5 y 7,0 con o sin metales se agruparon separadamente de los ensayos de pH 5,0 con o sin metales (58 %).

Los patrones generados en el gel 2.16.A por las réplicas a niveles nominales (R1.1 a 1.4 de la Figura 2.17) y la muestra 4 con niveles altos de todos los metales ensayados (ensayo 4 del diseño factorial fraccionado) fueron exactamente iguales (100 %), revelando que un aumento del 100 % en la concentración de los metales no afectó la composición del consorcio *R*. Adicionalmente, las diferentes combinaciones de metales produjeron en la mayoría de los ensayos a pH 7,0 poco efecto diferencial sobre la composición del consorcio bacteriano (como en el caso del ensayo 3 y el 8 con 95 % de similitud; el 5 y el 4 con 94 %; el 9 y el 10 con 92 %). Por otro lado, los perfiles generados en ausencia de metales pesados a pH inicial entre 5,5 y 7,0 (gel 2.16.C) fueron muy similares a los producidos por las muestras con diferentes combinaciones de metales a pH 7,0 en el gel 2.16.A (Dice de 100 % a 84 %); pero variables con respecto a las del gel 2.16.B (desde 80 % hasta 65 %).

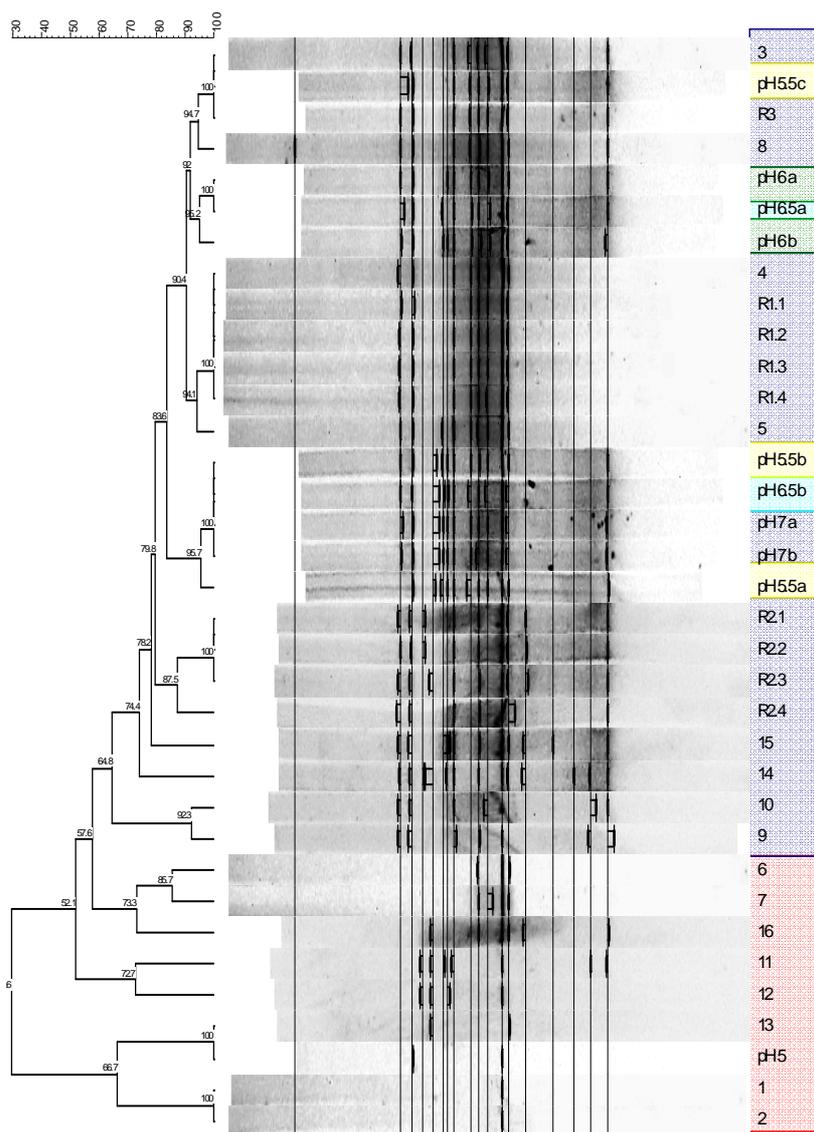


Figura 2.17. Análisis de dendrograma de los patrones de banda del DGGE de la comunidad microbiana R. 1 a 16: experimentos 1 a 16 del diseño factorial fraccionado. R: réplicas a valores nominales (R1.1 a 1.4, corresponden al gel de la Figura 2.20.A; R2.1 a 2.4, corresponden al gel de la Figura 2.20.B; R3: corresponde al gel de la Figura 2.20.C); pH 5; 5,5; 6; 6,5 y 7: cultivos a diferentes valores de pH inicial (a, b y c, corresponde a diferentes réplicas de cada ensayo). Azul: pH inicial 7,0; Celeste: pH inicial 6,5; Verde: pH inicial 6,0; Amarillo: pH inicial 5,5; Rojo: pH inicial 5,0. Optimización: 1 %; Tolerancia: 1 %.

Existen numerosos trabajos que aplican la técnica de PCR-DGGE y al análisis de agrupamiento para examinar el efecto de diferentes variables sobre la estructura de consorcios microbianos (Llobet-Brossa *et al.*, 2002; Roedera *et al.*, 2010). Otros tantos estudios realizaron los análisis mediante DGGE y clonación (Sahinkaya *et al.*, 2007; Kaksonen *et al.*, 2006a). Sin embargo, sólo algunos autores aplicaron estos métodos al estudio del efecto de los metales pesados y el pH sobre las comunidades bacterianas.

Alexandrino *et al.* (2011) realizaron un análisis de DGGE para determinar el

efecto de la presencia de 0,75 g/L de hierro, 0,20 g/L de zinc y 0,080 g/L de cobre sobre la composición de una comunidad bacteriana obtenida de una fumarola con alto contenido metálico. Observaron que, a pesar de que no se registraron efectos inhibitorios en la reducción de sulfato ni una disminución de la carga bacteriana por la presencia de los metales, la diversidad bacteriana decreció drásticamente. Este resultado contrasta con el aquí obtenido, dado que el consorcio *R* fue resistente a los metales ensayados. Sin embargo, cabe remarcar que los autores utilizaron concentraciones mayores a las usadas aquí.

Church *et al.* (2007) utilizaron DGGE y clonación para estudiar el efecto del pH ácido sobre la composición de una comunidad microbiana de BRS obtenida de una mina abandonada de California, realizando cultivos a pH neutro y a pH 4,0. Los autores encontraron cambios en la intensidad y en la presencia de las bandas en los patrones de DGGE; sin embargo, no se observó una disminución tan importante del número de bandas a pH ácido como resultó aquí, a pesar de que la cinética de reducción de sulfato del consorcio allí estudiado se vio afectada por el pH.

2.4. Conclusiones

Se obtuvieron cuatro consorcios de BRS de sitios naturales y de sitios contaminados con metales pesados a partir de los cuales se aislaron cepas de BRS. En virtud de sus cinéticas de crecimiento más competente, se seleccionaron al consorcio *R* y el aislado *Rc* (proveniente de aquél) para su caracterización.

Se determinó que *R* y *Rc* utilizaron lactato y etanol como sustratos orgánicos dadores de electrones. La oxidación incompleta del ácido láctico por *R* y *Rc* generó como productos orgánicos ácido acético y otro compuesto incógnita. El segundo fue diferente entre *R* y *Rc*.

Se caracterizó la precipitación simultánea de Cu(II), Zn(II), Cr(III), Co(II), Cd(II) y Ni(II) a niveles de concentración nominal por *R* y *Rc*. Los porcentajes precipitación de cada metal por *R* y *Rc* fueron similares (entre 100 y 80 % para los

diferentes metales) siendo el Cr(III) el único metal que permaneció soluble luego de la precipitación biológica (57 y 35%, para *R* y *Rc* respectivamente). A los niveles de concentración altos, *R* logró una precipitación similar a la antedicha, mientras que *Rc* resultó deficiente.

El desarrollo celular del consorcio *R* no presentó restricción ante la presencia individual de los metales ensayados en sus mayores concentraciones, ni por la interacción sinérgica de dos de los mismos; pero la presencia simultánea de todos generó un aumento en el período de latencia.

De todos los metales ensayados en sus mayores concentraciones, sólo la presencia individual de Cu(II) ejerció inhibición sobre el desarrollo del aislado *Rc*. Además, se vio perturbado por la sinergia derivada de la presencia simultánea de zinc y cromo, cobalto y cadmio o bien cobre y el pH; y de la presencia simultánea de todos los metales, lo que disminuyó la cantidad de sulfato total reducido pero no afectó la cinética. Sin embargo, la presencia simultánea de los metales en niveles de concentración nominal no modificó el comportamiento de *Rc*.

El pH 5,0 resultó altamente inhibitorio para *R* y *Rc*. Los pH ácidos entre 5,5 y 7,0 generaron sobre *R* un aumento de la fase de latencia y una disminución de la tasa volumétrica de reducción de sulfato.

La alta reproducibilidad en los perfiles de DGGE de réplicas experimentales confirma que esta técnica es una herramienta fiable para la caracterización de la estructura de la comunidad bacteriana y evaluar el impacto de las condiciones ambientales.

La composición del consorcio microbiano *R* se vio afectada significativamente por el pH 5,0, pero no por los valores de pH entre 5,5 y 7,0. La presencia de metales pesados afectó de forma variable la estructura de la comunidad, aunque la mayoría de las muestras conteniendo diferentes combinaciones, concentraciones e incluso ausencia de metales resultaron muy similares.

Se decidió utilizar al consorcio *R* en aplicaciones tecnológicas de reducción biológica de sulfato estudiadas en los posteriores capítulos con lactato como fuente de carbono en base a su resistencia a metales

pesados, alta tasa de reducción de sulfato, efectividad en la precipitación de metales pesados y tolerancia a valores de pH inicial entre 5,5 y 7,0.

Capítulo 3

Evaluación de soportes para la inmovilización de BRS

La aplicación tecnológica de la bioprecipitación de metales pesados mediante la actividad de BRS implica el uso de sistemas continuos con células en suspensión, lo que requiere de altos tiempos de residencia (t_R) para evitar el lavado del reactor por arrastre, debido a la baja velocidad de crecimiento de las BRS. Para salvar esta desventaja, se suelen aplicar sistemas con células inmovilizadas, donde la biomasa queda retenida en el biorreactor formando una biopelícula sobre un soporte. Además, la formación de una biopelícula favorece la supervivencia de los microorganismos ante condiciones adversas como el pH ácido, las altas concentraciones de metales, sulfuro y otros inhibidores del desarrollo celular. A fin de escrutar la capacidad de inmovilización de diferentes soportes, se requiere un método sencillo y veloz que barra una cantidad numerosa de materiales en pocos ensayos para una posterior utilización en biorreactores continuos, los cuales implican un trabajo prolongado y laborioso.

Es este capítulo se estudió mediante ensayos simples el efecto del tipo de soporte y del tamaño de partícula del mismo sobre la capacidad de adhesión celular y la estequiometría microbiana de la comunidad de BRS *R*, para seleccionar las matrices óptimas para su utilización en reactores sulfidogénicos. Además se caracterizaron mediante DGGE los consorcios bacterianos formados en presencia de cada una de las matrices.

Se demostró que todos los soportes estudiados (perlita, carbón vegetal, vermiculita, arena, perlas de vidrio y esponja de poliuretano) permitieron la reducción biológica de sulfato, pero con rendimientos disímiles. Además, los resultados de DGGE demostraron una diferencia en la composición de las comunidades microbianas formadas en las distintas matrices. Mientras que la arena y la vermiculita presentaron reactividad con el sulfuro biológicamente generado; la perlita fue el soporte estudiado que indujo mayor adhesión celular y una alta capacidad reductora de sulfato.

3.1. Objetivo

- Diseñar ensayos sencillos y rápidos para evaluar de modo preliminar diferentes matrices de inmovilización celular adecuadas para la producción de ácido sulfhídrico en procesos continuos con células inmovilizadas.
- Determinar la influencia del tipo de soporte (carbón vegetal, espuma de poliuretano, arena, perlita, vermiculita y perlas de vidrio) y el tamaño de partícula de cada matriz sobre la adhesión celular, la estequiometría microbiana y la composición de los consorcios bacterianos inmovilizados.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. *Inóculo y medios de cultivo*

El inóculo utilizado fue el consorcio *R* enriquecido de los sedimentos del efluente de una curtiembre del Río Luján (Capítulo 2). Los experimentos se realizaron utilizando el medio de cultivo sintético Postgate G (Tabla 2.4) a pH 7,0.

3.2.2. *Propiedades físicas de los materiales de soporte*

Se probaron materiales de bajo costo y alta disponibilidad: carbón vegetal (CV); perlita (P), vermiculita (V), arena (A), perlas de vidrio (PV) y espuma de poliuretano (EP). El CV se trituró en un mortero para generar pequeñas partículas. Las partículas de EP fueron hechas por el corte de una hoja de poliuretano de 1 cm de espesor en rectángulos de 1 cm de ancho y 10 cm de alto. Los granos de A y las PV se lavaron con ácido nítrico 5 % (p/v) y luego sucesivamente con agua destilada hasta pH neutro. La EP se lavó con agua destilada. Los materiales restantes fueron hidratados durante 72 horas y luego el pH fue neutralizado. Todos los materiales se secaron a 60 °C hasta peso

constante. Las PV tenían un diámetro promedio de 3,0 mm. P, V, A y CV fueron fraccionados por tamizado. Las fracciones tenían un tamaño de malla de -10 a +16 (fracción 1: 2,0 mm a 1,19 mm de diámetro promedio), -16 a +20 (fracción 2: 1,19 mm a 0,84 mm) y -50 a + 60 (fracción 3: 297 μm a 250 μm). La densidad específica aparente de los materiales (determinada como el peso de 1 L de soporte) fueron: CV 0,38 g/mL; P 0,16 g/mL; V 0,36 g/mL; A 1,65 g/mL; PV 1,78 g/mL y EP 0,02 g/mL.

3.2.3. Ensayo de inmovilización / actividad

La prueba de inmovilización se realizó para todos los materiales y todos los tamaños de partícula en botellas hemólisis de 120 mL. Aproximadamente 10 mL de soporte y 110 mL de medio de cultivo se colocaron en cada botella y luego fueron tapadas herméticamente con tapones de goma y virolas metálicas. Las botellas fueron esterilizadas en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Se añadió 10 mL de inóculo a las botellas de cultivo, previamente suplementadas con solución de anaerobiosis (Tabla 2.3) y de vitaminas (Tabla 2.5) y burbujeadas con nitrógeno gaseoso esterilizado con un filtro para aire de 0,22 μm . También se prepararon botellas de control abiótico, las cuales no fueron inoculadas y fueron tratadas de la misma manera que los otros experimentos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Las botellas se incubaron durante 20 días en un agitador rotatorio a 200 rpm a 30 °C. Luego, se retiró el medio en condiciones asépticas y fue reservado para cuantificar las células planctónicas, para los ensayos de PCR-DGGE y para determinar las concentraciones de sulfato, ácido láctico y ácido acético. A partir de estos últimos datos se calcularon los rendimientos estequiométricos de producción de acetato ($Y_{P/S}$) y de reducción de sulfato ($Y_{SO_4/S}$) según las siguientes ecuaciones:

$$Y_{P/S} = [A]_f / ([S]_i - [S]_f) \quad [3.1]$$

$$Y_{SO_4/S} = ([SO_4^{2-}]_i - [SO_4^{2-}]_f) / ([S]_i - [S]_f) \quad [3.2]$$

Donde, $[A]_f$ es la concentración de acetato al final del cultivo, $[S]_i$ y $[S]_f$ son las concentraciones inicial y final de lactato (sustrato limitante), $[SO_4^{2-}]_i$ y $[SO_4^{2-}]_f$ son las concentraciones inicial y final de sulfato.

Los soportes se lavaron dos veces con agua estéril para eliminar la mayor cantidad posible de bacterias planctónicas, fueron colocados en frascos previamente tarados y se les agregaron 10 mL de agua estéril. Las células presentes en la biopelícula fijada al material fueron despegadas por un tratamiento de ultrasonido durante 30 minutos. El líquido se retiró y se utilizó para cuantificar la biomasa adherida. Los contenedores tarados se secaron y se pesaron para computar la cantidad de soporte usado y relativizar la biomasa adherida.

3.2.4. Métodos analíticos

Se determinaron las concentraciones de sulfato, ácido láctico y acético según se describe en las Secciones 2.2.5.1 y 2.2.5.3.

3.2.5. Determinación de proteínas

La concentración de biomasa adherida y planctónica se estimó mediante la cuantificación de proteínas basada en el método de Bradford utilizando un espectrofotómetro de microplacas (Benchmark, BIO-RAD) y albúmina sérica bovina como estándar. Cada determinación se realizó por triplicado. A 20 μ L de muestra se agregaron 50 μ L de NaOH 1N y se incubó 15 minutos para romper la pared celular. Luego, se agregó 1 mL de reactivo de Bradford (100 mg/L Coomassie Blue G250; 100 mL/L H₃PO₄ 85 % (v/v); 50 mL/L Etanol 96 % (v/v)). Al cabo de 5 minutos se leyó la absorbancia a 590 nm. La curva de calibración se realizó entre 0 y 50 ppm de proteínas.

3.2.6. Extracción de ADN - PCR - DGGE

El ADN total de las células planctónicas y las células adheridas se extrajo de los experimentos con P, V y CV del diámetro de partícula de la fracción 1 y de PV y EP utilizando el kit comercial Soil DNA Kit (Omega Bio-Tek). Se realizó sobre dos de las

tres réplicas realizadas en cada ensayo. Las muestras de ADN total se utilizaron para el ensayo de PCR-DGGE según las técnicas descritas en las Secciones 2.2.8.2 a 2.2.8.4.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Ensayo de actividad

La Figura 3.1 muestra los seis soportes utilizados para la prueba. La observación bajo lupa mostró que, a pesar de tener el mismo diámetro de partícula, la P presentó una forma redondeada y una estructura altamente porosa; la V plana y delgada, con forma de escamas o láminas y no porosa; y las partículas de CV poligonales de bordes rectos y aguzados, con poros correspondientes a los vasos xilemáticos y zonas densas y compactas.



Figura 3.1. Soportes de inmovilización. Carbón Vegetal (CV); Perlita (P); Perlas de Vidrio (PV); Vermiculita (V); Arena (A); y Esponja de Poliuretano (EP).

El CV y la EP fueron reportados como soportes de inmovilización en sistemas de cultivo continuo de alta eficiencia de reducción de sulfato (Silva *et al.*, 2006). También lo fueron las PV (Baskaran y Nemati, 2006; Amman *et al.*, 1992) y la A (Baskaran y Nemati, 2006; Jong y Parry, 2003; Elliot *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2003; Tsukamoto *et al.*, 2004). Sin embargo, según la bibliografía consultada, la V y la P no fueron estudiadas en sistemas reductores de sulfato. El ensayo de actividad realizado sobre las matrices en sus diferentes fracciones demostró que los sistemas eran capaces de agotar prácticamente toda la fuente de carbono (lactato), de modo que la presencia de ninguno de los soportes estudiados inhibió el crecimiento de la comunidad bacteriana. La medición de sulfato y de acetato demostró que el consorcio mantenía la actividad reductora de sulfato, y que la fuente de carbono era oxidada de forma incompleta generando acetato y CO₂ como productos; mientras que los testigos abióticos no mostraron cambios en la concentración de sulfato, ácido láctico y ácido acético.

Los rendimientos $Y_{SO_4/S}$ e $Y_{P/S}$ obtenidos en presencia de cada soporte fueron independientes del diámetro promedio de las partículas del material (Tabla 3.1). En publicaciones anteriores, se registraron $Y_{SO_4/S}$ de 0,45 g/g para *Desulfovibrio desulfuricans* creciendo en suspensión (Okabe y Characklis, 1992), valores similares a los obtenidos en este estudio para P, CV y PV (0,48 g/g, 0,45 g/g y 0,46 g/g, respectivamente). Los otros soportes presentaron un menor consumo de sulfato. El valor publicado por Okabe y Characklis (1992) para el $Y_{P/S}$ fue de 0,62 g/g y en este estudio fue de 0,55 g/g, 0,57 g/g y 0,53 g/g para P, CV y PV, respectivamente. Se observó en el resto de los soportes (A, EP y V) una menor generación de acetato. Esto pudo ser consecuencia de la presencia de microorganismos capaces de consumir el acetato generado por las BRS, ya sean bacterias no reductoras de sulfato o BRS reductoras completas como *Desulfobacter* o *Desulfotomaculum* (Widdel, 1988). Si este último fuera el caso, se esperaría un aumento en el rendimiento de sulfato reducido en relación al lactato consumido, pero el obtenido (Tabla 3.1) es menor a los determinados para el resto de los soportes. Por lo tanto, los bajos valores de $Y_{P/S}$ en todos los casos pudo ser consecuencia de la presencia de BRS oxidantes incompletas con efectividad de reducción menor a las del género *Desulfovibrio*. Cualquiera sea el caso, resulta claro que la naturaleza del soporte afecta la actividad del consorcio de BRS.

Tabla 3.1. Rendimientos estequiométricos.

Soporte	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{SO_4/S}$ (g/g)
Arena (A) ^A	0,47±0,01	0,36±0,01
Carbón Vegetal (CV) ^A	0,57±0,00	0,45±0,05
Perlas de Vidrio (PV)	0,53±0,02	0,46±0,03
España de Poliuretano (EP)	0,44±0,04	0,38±0,03
Perlita (P) ^A	0,55±0,09	0,48±0,04
Vermiculita (V) ^A	0,46±0,01	0,33±0,05

^A Promedio de todos los diámetros de partícula ensayados.

Por lo nombrado anteriormente, se puede decir que los soportes que permitieron una mayor actividad reductora de sulfato y cuyos rendimientos estequiométricos se asemejaron a los esperables para el género *Desulfovibrio* fueron P, CV y PV. Diversos autores (van Houten *et al.*, 1995a; Celis *et al.*, 2009; Dar *et al.*, 2005; Dar *et al.*, 2007a; Pereyra *et al.*, 2008) que utilizaron reactores con BRS inmovilizadas demostraron por técnicas de biología molecular (FISH, DGGE, qPCR, secuenciación, entre otras) que los sistemas que presentaban mayor eficiencia contenían una población bacteriana con predominancia del género *Desulfovibrio*, por lo que resultó promisorio obtener resultados similares a los esperados para estas bacterias.

En el caso de A y V, se observó un ennegrecimiento del material y del medio debido a la probable formación de precipitados de sulfuro metálico, por acción del sulfuro biológicamente generado y metales provenientes del soporte (Figura 3.2). La reactividad de estos dos materiales y la formación de precipitados capaces de ocluir el lecho de un reactor, los descartó para futuras experiencias en reactores tubulares.

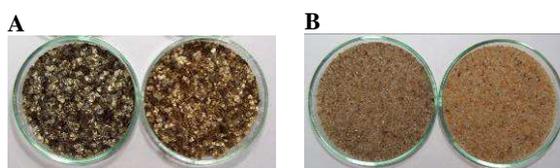


Figura 3.2. Soportes ennegrecidos por la actividad de las BRS. Las placas de la derecha corresponden a los tratamientos abióticos y las de la izquierda a los bióticos. **A.** Vermiculita; **B.** Arena.

La biomasa total obtenida por frasco (planctónica y adherida, estimada como cantidad de proteínas) fue dependiente del soporte ensayado (Figura 3.3). Los sistemas con EP y V, los cuales fueron menos eficientes en la reducción de sulfato, generaron la mayor cantidad de biomasa. No fue posible determinar la biomasa en el ensayo con A debido a la interferencia de los abundantes precipitados de sulfuro, que produjo cuantificaciones altamente aleatorias.

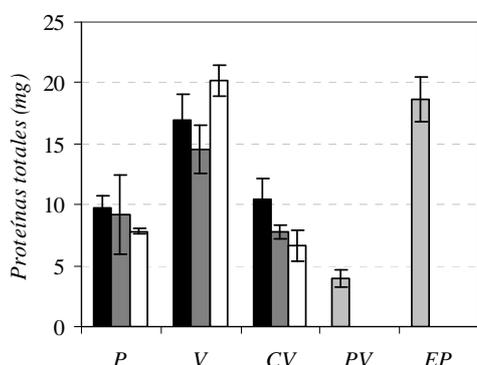


Figura 3.3. Contenido de proteínas totales por botella. P (Perlita); V (Vermiculita); CV (Carbón Vegetal); PV (Perlas de Vidrio) y EP (Esponja de Poliuretano). Diámetro de partícula promedio: 1 (2,0 mm a 1,19 mm), barras negras; 2 (1,19 mm a 0,84 mm), barras gris oscuras; y 3 (297 μ m a 250 μ m), barras blancas. PV y EP, barras gris claro. Las barras de error corresponden al error estándar entre las tres réplicas de cada ensayo.

3.3.2. Adhesión Celular

La determinación de proteínas en la biopelícula puede utilizarse como un indicador indirecto de la cantidad de células adheridas al soporte de inmovilización. Se determinaron las proteínas adheridas y planctónicas en cada uno de los ensayos. La medida se estableció como masa de proteína (g) por volumen de lecho (L) (Figura 3.4.A) y se calculó el porcentaje de adhesión relativo a la cantidad total de proteínas por ensayo (suma de las proteínas adheridas y las planctónicas) (Figura 3.4.B).

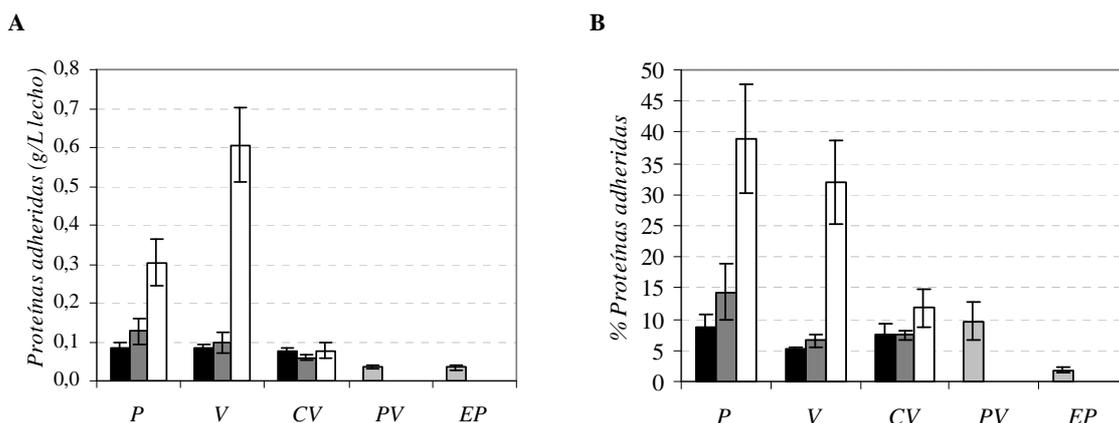


Figura 3.4. Proteínas adheridas. **A.** Proteínas adheridas por volumen de lecho (g/L); **B.** Porcentaje de proteínas adheridas relativo al total de proteínas obtenidas por ensayo (adheridas y planctónicas). P (Perlita); V (Vermiculita); CV (Carbón Vegetal); PV (Perlas de Vidrio) y EP (Esponja de Poliuretano). Diámetro de partícula promedio: 1 (2,0 mm a 1,19 mm), barras negras; 2 (1,19 mm a 0,84 mm), barras gris oscuras; y 3 (297 µm a 250 µm), barras blancas. PV y EP, barras gris claro. Las barras de error corresponden al error estándar entre las tres réplicas de cada ensayo.

La cantidad de biomasa inmovilizada resultó ser fuertemente dependiente del tipo de soporte y del tamaño de partícula del mismo, presentando predicablemente mayor adhesión por unidad de volumen a menor tamaño de partícula. Sin embargo, el CV poseyó una buena adhesión en las fracciones 1, 2 y 3, pero no obtuvo un aumento consistente con la disminución del tamaño de partícula. Se observó que el soporte con mayor adhesión celular en todos los tamaños de partículas fue P, alcanzando un 39,0 % de proteínas adheridas en la fracción 3 (diámetro promedio: 297 µm a 250 µm), donde la cantidad de proteínas por volumen de lecho fue 0,30 g/L (Figura 3.4.A). La V presentó una adhesión similar a la P en las fracciones 1 y 2, pero la reactividad del lecho (que impide su aplicación en reactores biotecnológicos) y su menor eficiencia de reducción de sulfato (Tabla 3.1) la dejaron en desventaja con respecto a la P. Sin embargo, en la fracción 3 la V inmovilizó un 50 % más de biomasa que la P, salvando la desventaja de la eficacia reductora. La PV presentó una buena inmovilización (9,72 %; 0,04 g/L) a pesar de su menor superficie disponible. La EP, que en otros trabajos fue utilizada con alta efectividad (Silva *et al.*, 2006), no presentó resultados superiores a los obtenidos con los otros soportes (1,88 %; 0,03 g/L). La causa de la alta adhesión que mostró la P se puede atribuir a la altísima superficie disponible (García Calderón *et al.*, 1998), reportado en estudios anteriores como principal causa de disminución del t_R en reactores con células inmovilizadas (Baskaran y Nemati, 2006).

La cuantificación de proteínas como estimativo de la adhesión bacteriana fue un método útil para comparar con los reportes de otros autores. Celis *et al.* (2009) obtuvo

en un reactor de lecho fluidizado con flujo descendente (RLFFD) inoculado con un lodo granular e inmovilizado sobre partículas de polietileno (diámetro de partícula: 0,5 a 1,0 mm), $3,6 \cdot 10^{-4}$ g/L de proteínas, un valor muy inferior al obtenido en este estudio para todos los soportes estudiados, aun para los diámetros de partículas mayores. Por otro lado, Sowmeryan y Swaminathan (2008) reportaron un RLFFD relleno con P de 1 mm de diámetro con una adhesión de biomasa de 0,135 g/L de sólidos volátiles adheridos. Estos datos son ampliamente inferiores a los obtenidos en este estudio a pesar de tratarse del mismo material y de diámetro menor. Se determinó que la proporción de proteínas / biomasa para un cultivo de células libres del consorcio R fue del 33 % (p/p). Realizando la conversión pertinente, obtenemos 0,39 g de biomasa /L para P en la fracción 2 (diámetro de partícula comparable). Sin embargo, nuestros resultados son inferiores a los mostrados por Silva *et al.* (2006) sobre CV y EP (25 y 10 g/L de sólidos volátiles, respectivamente) en sistemas de cultivo continuo. Estos resultados indican que el origen del inóculo afecta fuertemente la adhesión sobre un tipo de soporte en particular. Pruden *et al.* (2007) demostraron que la naturaleza del consorcio microbiano influencia el desempeño de una zona reactiva permeable reductora de sulfato utilizada para el tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados. Pereyra *et al.* (2008) encontraron que el inóculo influenciaba el rendimiento de un sistema de cultivo en lote para la remediación de un drenaje de mina.

Otros autores reportaron la cantidad de biomasa adherida por volumen de lecho para otro tipo de materiales. van Houten *et al.* (1995a) cuantificaron entre 1 y 8 g/L de sólidos volátiles desarrollados sobre partículas de 0,2 a 0,5 mm de piedra pómez obtenidas de un reactor *gas-lift*. Silva *et al.* (2006) aplicaron además de CV y EP, polietileno de baja densidad y cerámica a base de alúmina, con una adhesión de 10 y 21 g/L de sólidos volátiles pero con una reducción de sulfato ineficiente. Kuo y Shu (2004) utilizaron cubos de tricloroacetato de celulosa, obteniendo 13 g/L de biomasa. Celis *et al.* (2009) reportaron 0,76 g/L de sólidos volátiles inmovilizados sobre partículas de polietileno de baja densidad en un reactor de lecho fluidizado.

3.3.3. Análisis del patrón de bandas de DGGE

Por lo general, los reactores anaerobios utilizados para la reducción de sulfato se inoculan con consorcios indefinidos de microorganismos anaerobios y es deseable que una población de BRS se desarrolle en la biopelícula. Varios autores han señalado que la composición de la comunidad microbiana influye en la estabilidad y el rendimiento de los reactores anaerobios, de ahí la importancia de entender estos consorcios (Celis *et al.*, 2009). La técnica de PCR-DGGE se aplicó a las muestras tomadas de las células adheridas y en suspensión para P, V y CV (de diámetro de partícula entre 2,0 mm y 1,19 mm, fracción 1) y para PV y EP con el objetivo de determinar si las diferencias en los rendimientos estequiométricos se debían a variaciones en la composición de la comunidad bacteriana presente.

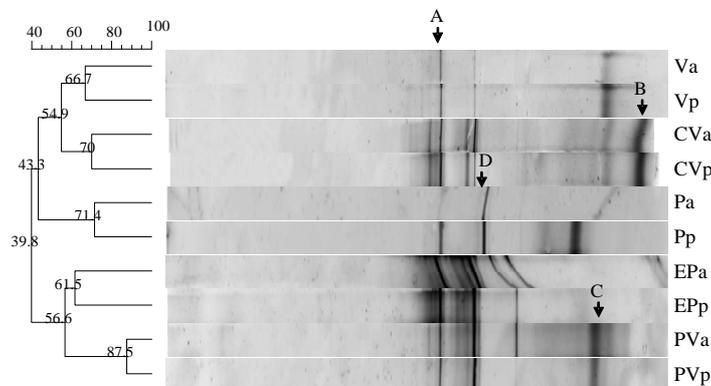


Figura 3.5. DGGE y análisis de agrupamiento de las comunidades bacterianas adheridas y planctónicas de los diferentes soportes. P (Perlita); V (Vermiculita); CV (Carbón Vegetal); PV (Perlas de Vidrio) y EP (Esponja de Poliuretano). a: Células adheridas. p: Células planctónicas. Los números de la izquierda de las ramas indican los coeficientes de similitud de Dice. Tolerancia 1,00 % y optimización 1,00 %.

La Figura 3.5 muestra los patrones de bandas correspondientes a las bacterias desarrolladas en las biopelículas y en suspensión para cada soporte. Se observaron al menos 21 bandas diferenciadas en todas las muestras. Mientras que algunas especies estaban presentes en todas las muestras, como la indicada con la letra A, algunos miembros de la población microbiana se hallaron sólo en algún soporte, como en el caso la banda B detectada sólo en CV o la C encontrada sólo en PV. Algunos microorganismos fueron favorecidos por la presencia de un determinado soporte, como en el caso del indicado por la flecha D en la Figura 3.5 presente en la biopelícula formada sobre P. En base a la cantidad de bandas, las poblaciones presentes en los sistemas con PV, EP y CV fueron mas ricas que las observadas con V y P. Como se ve, la presencia de una determinada matriz de inmovilización influyó en la composición de la comunidad bacteriana en cada sistema.

Diversos autores utilizaron la técnica de DGGE como estrategia de análisis de los consorcios microbianos asociados a biopelículas desarrolladas en distintos sistemas como por ejemplo cañerías de petróleo corroídas microbiológicamente (Neria-González *et al.*, 2006); reactores aeróbicos y anaeróbicos de tratamiento de efluentes (Muyzer *et al.*, 1993); un reactor fluidizado tipo filtro anaeróbico con sílice de 0,5 a 1 mm como soporte de inmovilización celular (Kaksonen *et al.*, 2006a). Lima de Oliveira *et al.* (2009) realizaron ensayos de PCR-DGGE de las biopelículas desarrolladas sobre diferentes tipos de soportes en reactores de lecho fijo. En ese trabajo se estudió la presencia / ausencia de bandas en geles de DGGE tras una amplificación con cebadores para bacterias totales y por otro lado con cebadores específicos para BRS, detectando diferencias entre los patrones obtenidos a partir de arcilla expandida, EP y carbón. Los materiales utilizados allí influyeron en el desarrollo de la comunidad microbiana, ya que seleccionaron algunos microorganismos en detrimento de otros; de modo similar a lo observado en este capítulo.

Por otro lado, a pesar de que los patrones de bandas de las células inmovilizadas y las libres desarrolladas en presencia de un soporte en particular no fueron iguales, algunas especies fueron halladas como planctónicas y también pertenecientes a las biopelículas, indicando que ciertas especies microbianas poseían la misma tendencia a desarrollarse en suspensión como adheridas. De todas formas, excepto para la P, se observó mayor diversidad en la población de células inmovilizadas que planctónicas.

Con el objetivo de demostrar la confiabilidad de la técnica, se realizaron réplicas de extracción de ADN y PCR-DGGE. La Figura 3.6 muestra algunos duplicados donde se observan patrones de bandas muy similares o idénticos, lo que demuestra la alta reproducibilidad del ensayo.

El análisis de agrupamiento de la Figura 3.5 ilustra que el consorcio presente en la biopelícula y las células en suspensión para cada soporte fue similar en todos los casos, pero la mayor similitud se encontró para PV (coeficiente de similitud de Dice 87 %) y la menor para EP (61 %). Por otro lado, las



Figura 3.6. Patrón de bandas de DGGE para réplicas independientes de diferentes ensayos de inmovilización. P (Perlita); V (Vermiculita); CV (Carbón Vegetal); PV (Perlas de Vidrio) y EP (Esponja de Poliuretano). a: Células adheridas. p: Células planctónicas. *: réplica.

comunidades provenientes de los ensayos de PV y EP fueron agrupadas (57 %), mientras que V y CV fueron agrupados separadamente (55 %). Por último, los ensayos con P presentaron los consorcios más diferenciados (43 %).

Zhang y Fang (2000) aplicaron el análisis de agrupamiento de los perfiles de DGGE digitalizados para comparar un consorcio reductor de sulfato crecido un cultivo en suspensión y formando una biopelícula sobre cupones de acero, con un procedimiento de digitalización muy similar al aplicado en este estudio. Los gráficos de agrupamiento obtenidos por los investigadores hallaron que la inmovilización produjo un efecto similar sobre la comunidad microbiana, agrupando los consorcios pertenecientes a las biopelículas separadamente de los crecidos en suspensión. Por otro lado, encontraron que los patrones de DGGE de las células adheridas diferían menos entre si que los perfiles de los cultivos en suspensión, indicando que los microorganismos en biopelículas son más estables y menos susceptibles al entrono que las comunidades en suspensión. Estos resultados son similares al encontrado por Acinas *et al.* (1999) utilizando DGGE.

3.4. Conclusiones

Se evaluó la inmovilización de un consorcio de BRS mediante cultivos en lote de un modo rápido y simple permitiendo seleccionar los soportes apropiados para la posterior reducción biológica de sulfato en un sistema continuo.

Ninguno de los soportes estudiados (perlita P; carbón vegetal CV, vermiculita V, arena A, perlas de vidrio PV y esponja de poliuretano EP) inhibieron la actividad reductora de sulfato del inóculo. Sin embargo, iones metálicos provenientes de A y V reaccionaron con el sulfuro, descartando estos materiales para la aplicación en reactores biológicos.

El tipo de soporte de inmovilización influyó la estequiometría de reducción del sulfato, la de producción de acetato, la cantidad de biopelícula formada y la composición del consorcio bacteriano desarrollado.

La P presentó una adhesión celular superior al resto de los soportes ensayados y a los reportados por otros autores, exhibió altos rendimientos de reducción de sulfato y promovió la formación de una biopelícula diferenciada.

Los soportes que obtuvieron una alta efectividad de adhesión de células, buenos rendimientos estequiométrico y que resultaron inertes al sulfuro biológicamente producido (P, CV, EP, PV), se seleccionaron para ser utilizados en sistemas continuos de células inmovilizadas que permitan obtener velocidades de reducción de sulfato altas y tiempos de retención bajos con respecto a los sistemas con células libres.

Capítulo 4

Reactor de lecho empaquetado de flujo ascendente

La inmovilización celular es ampliamente utilizada en los reactores anaerobios de tratamiento de aguas residuales para incrementar la concentración de la biomasa y evitar su pérdida por arrastre, permitiendo operar el reactor con tiempos de retención hidráulicos (t_R) más cortos.

En este capítulo se estudió la eficiencia del consorcio *R* en un cultivo en lote con células suspendidas y en un reactor de lecho empaquetado con flujo ascendente (RLEFA). Se evaluaron en los RLEFA individualmente las matrices seleccionadas en el Capítulo 3: carbón vegetal (CV), perlita (P), perlas de vidrio (PV) y esponja de poliuretano (EP). Se determinó para cada sistema el menor t_R que permitía mantener 100 % de consumo de la fuente de carbono (sustrato limitante) ($t_R^{\text{mínimo}}$) y las velocidades volumétricas de consumo de sustratos. Se estudió la biopelícula formada sobre cada matriz por microscopía electrónica de barrido (MEB), DGGE, PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) y se cuantificó la biomasa inmovilizada.

El RLEFA con cualquiera de los soportes estudiados presentó una velocidad de reducción de sulfato (r_{SO_4}) mayor y un $t_R^{\text{mínimo}}$ menor que el del sistema en lote; siendo la P el soporte más efectivo. Así mismo, fue la matriz que presentó mayor cantidad de biomasa adherida (probablemente debido a su mayor área específica) y una comunidad microbiana diferenciada de los otros sistemas, tal como se demostró en el Capítulo 3 en los ensayos en lote con células inmovilizadas. Además, a diferencia de los otros soportes, la totalidad de las bacterias inmovilizadas sobre P pertenecieron al grupo de las BRS.

4.1. Objetivo

- Evaluar la productividad del RLEFA empaquetado con los cuatro materiales seleccionados en el Capítulo 3 (carbón vegetal (CV), esponja de poliuretano (EP), perlita (P) y perlas de vidrio (PV)) y compararla con la de un cultivo en lote de células en suspensión utilizando el consorcio *R* como inóculo.
- Estudiar la biopelícula inmovilizada en la superficie de los diferentes tipos de soporte utilizados en el RLEFA.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Inóculo y medios de cultivo

El inóculo utilizado fue el consorcio de BRS *R*. Los experimentos se realizaron en medio de cultivo sintético Postgate G (Tabla 2.4) a pH 7,0.

4.2.2. Cultivo en lote con células en suspensión

Se utilizó un reactor tipo tanque agitado con capacidad de 2 L para realizar cultivos en lote con el objeto de determinar los parámetros cinéticos de la comunidad *R* y de la cepa *Desulfovibrio sp.* (ATCC 27882), utilizada como microorganismo de referencia. El biorreactor conteniendo 1,5 L de medio de cultivo fue esterilizado en autoclave a 121 °C por 30 minutos y luego enfriado y purgado por 2 horas con nitrógeno gaseoso esterilizado mediante un filtro de aire de 0,22 µm. Luego, se agregaron 100 mL de inóculo y se incubó a 30 °C agitando a 210 rpm. La salida de gases se mantuvo cerrada y no se utilizó control de pH. Este experimento se realizó por duplicado para cada inóculo.

Durante el transcurso del cultivo se tomaron muestras a intervalos de tiempo apropiados y sobre ellas se determinó DO y concentraciones de proteínas, lactato,

acetato y sulfato. A partir de estos datos se calcularon los rendimientos estequiométricos de producción de acetato ($Y_{P/S}$) y de reducción de sulfato ($Y_{SO_4/S}$) según se describe en la Sección 3.2.3. Además se determinó la velocidad de crecimiento específica máxima ($\mu_{\text{máxima}}$) y la velocidad de reducción de sulfato (r_{SO_4}) según se describió en la Sección 2.2.2.

4.2.3. Reactores de lecho fijo de flujo ascendente (RLEFA)

4.2.3.1 Soportes utilizados

Los materiales usados para estos ensayos fueron: carbón vegetal (CV); perlita (P); perlas de vidrio (PV); y esponja de poliuretano (EP). Los materiales fueron preparados como se describe en la Sección 3.2.2. Las PV usadas tuvieron un diámetro de 3,0 mm. La EP se cortó en cilindros de 4 cm de diámetro (diámetro interno de la columna de vidrio utilizada como reactor). La P y el CV utilizado fue de tamaño de partícula entre 2,0 mm y 1,19 mm. El área superficial de los materiales se determinó por el método BET (Brunauer–Emmett–Teller).

4.2.3.2. RLEFA

Los RLEFA se hicieron con columnas de vidrio (\emptyset , 4 cm, H, 21 cm) con dos puertos laterales y dos puertos en los extremos superior e inferior de las columnas. La parte inferior y superior de cada biorreactor contenía un disco de lana de vidrio de 4 cm de diámetro. El reactor se llenó con la matriz de inmovilización designada.

4.2.3.3. Determinación del módulo de dispersión axial

Con el objetivo de determinar el comportamiento fluido dinámico de los RLEFA, se determinó el módulo de dispersión axial para los reactores rellenos con P y CV. Se cargó la columna con una solución buffer de pH 4,0 (bifalato de potasio 10,21 g/L) y se alimentó con otra solución buffer de pH 8,90 (tetaborato de sodio 5,04 g/L). Se ensayó un caudal de alimentación de 287 mL/h. Se tomaron muestras desde el comienzo de la alimentación a intervalos de 1 minuto y a cada una se le hizo una medida de pH. Con el pH se calculó la concentración de protones $[H^+]$ según:

$$[H^+] = 10^{-pH} \quad [4.1]$$

Luego se graficó $[H^+]$ en función del tiempo. La curva obtenida mostró un escalón de $[H^+]$ que indicó el momento en el que comenzó a salir la solución buffer de mayor pH. Luego se graficó la derivada en cada punto de la curva anterior en función del tiempo medio del intervalo considerado. El valor máximo representó el tiempo de retención (t_R).

Para el cálculo de la derivada se utilizó la ecuación siguiente:

$$d[H^+](i)/dt = ([H^+]_{i+1} - [H^+]_i) / \Delta t \quad [4.2]$$

El tiempo medio del intervalo considerado se calculó como:

$$t(i) = t_i + (\Delta t / 2) \quad [4.3]$$

El tiempo de retención medio t_R fue el primer momento de la distribución dada por la gráfica de $d[H^+](i)/dt$ en función de $t(i)$ y se calculó analíticamente mediante:

$$t_R = \frac{\sum_i d[H^+](i)/dt \cdot t(i) \cdot \Delta t}{\sum_i d[H^+](i)/dt \cdot \Delta t} \quad [4.4]$$

La varianza de la curva $d[H^+](i)/dt$ en función de $t(i)$ dió una idea del grado de dispersión que sufrió el escalón a través de la columna, correspondiente al segundo momento de la distribución.

$$\sigma^2 = \frac{\sum_i d[H^+](i)/dt \cdot t(i)^2 \cdot \Delta t}{\sum_i d[H^+](i)/dt \cdot \Delta t} - t_R^2 \quad [4.5]$$

Con los valores de t_R y σ^2 se calculó el módulo de Peclet (Pe) mediante la ecuación aproximada (válida para $\sigma^2/(t_R)^2 \leq 0,3$):

$$\sigma^2/(t_R)^2 = 2 / (Pe + 1) \quad [4.6]$$

$$Pe = v \cdot L / D_z \quad [4.7]$$

Donde, v = velocidad del fluido dentro del reactor, L = largo del reactor y D_z = coeficiente de dispersión axial. La inversa de Pe se conoce como módulo de dispersión.

Toma valores de 0,002 para dispersiones pequeñas, de 0,02 para dispersiones intermedias y de 0,2 para dispersiones grandes (Farina *et al.*, 1986).

4.2.3.4. Operación del reactor

El efecto de la matriz de inmovilización sobre el desempeño del biorreactor fue estudiada mediante la realización independiente de corridas experimentales con CV, P, PV y EP. La Figura 4.1 muestra un esquema del montaje experimental utilizado. El medio líquido se introdujo al reactor mediante una bomba peristáltica y se esterilizó durante 30 minutos a 121 °C con el puerto efluente abierto y su manguera sumergida en una botella con medio de cultivo para eliminar el aire y garantizar que el medio llenara completamente los huecos.

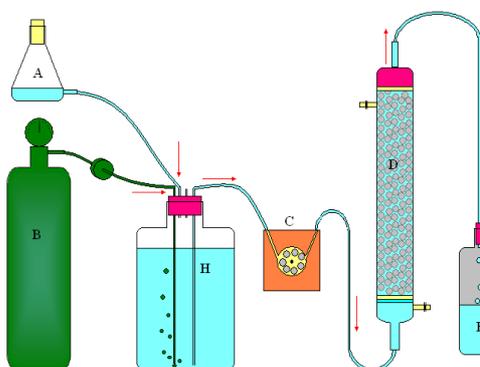


Figura 4.1. Diagrama esquemático del proceso.

A. Erlenmeyer de salida lateral para integrar el medio de cultivo con las soluciones esterilizadas por filtración; B. Nitrógeno con filtro esterilizante de 0,22 μm; C. Bomba peristáltica; D. Reactor tubular conteniendo el soporte; E. Recipiente colector del efluente; F. Trampa; G. Recipiente con solución de Fe(II) para capturar el H₂S en fase gaseosa; H. Reservorio de medio de cultivo fresco.

100 mL de inóculo se bombearon al reactor por los puertos laterales y este fue cerrado por 20 días e incubado a 30 °C en cámara termostatzada para permitir la inmovilización pasiva de las células bacterianas. Luego del período de formación de la biopelícula, el líquido contenido en los biorreactores fue repuesto por completo con medio de cultivo fresco a un alto caudal de alimentación (alrededor de 50 mL/h) con el objetivo de eliminar la mayor cantidad posible de microorganismos en suspensión. Posteriormente, se alimentó inicialmente la columna a caudal bajo, de modo de trabajar a un t_R similar a la inversa de la $\mu_{m\acute{a}xima}$ del consorcio. A ese instante se lo denominó como tiempo cero. El t_R se calculó según:

$$t_R = V_h / Q \quad [4.8]$$

Donde, el volumen hueco (V_h) se midió como el volumen de líquido drenado por cada lecho y el caudal (Q) se determinó midiendo el volumen de efluente retenido durante un cierto período de tiempo.

Luego, tras el establecimiento del estado estacionario, el t_R se disminuyó de forma escalonada. La condición de estado estacionario se supuso que se establecía durante un período de funcionamiento igual a $1,5 t_R$. El depósito conteniendo medio fresco se burbujeó continuamente con nitrógeno gaseoso estéril para mantener las condiciones anaeróbicas.

Se tomaron diariamente muestras del puerto efluente y fueron analizadas para determinar concentración de sulfato, lactato y acetato. Los valores medios de los datos en un estado estacionario para los regímenes de carga volumétrica correspondientes se utilizaron para determinar la velocidad volumétrica de consumo de lactato (r_S) y de reducción de sulfato (r_{SO_4}) y para comparar el rendimiento de los biorreactores en diferentes condiciones. Dichos cálculos se realizaron mediante las siguientes ecuaciones:

$$r_S = ([S]_r - [S]_e) / t_R \quad [4.9]$$

$$r_{SO_4} = ([SO_4^{2-}]_r - [SO_4^{2-}]_e) / t_R \quad [4.10]$$

$$Y_{P/S} = [A]_e / ([S]_r - [S]_e) \quad [4.11]$$

$$Y_{SO_4/S} = ([SO_4^{2-}]_r - [SO_4^{2-}]_e) / ([S]_r - [S]_e) \quad [4.12]$$

$$\% \text{ Consumo de lactato} = ([S]_r - [S]_e) \cdot 100 / [S]_r \quad [4.13]$$

$$\% \text{ Consumo de sulfato} = ([SO_4^{2-}]_r - [SO_4^{2-}]_e) \cdot 100 / [SO_4^{2-}]_r \quad [4.14]$$

Donde, $[S]_r$ y $[S]_e$ son las concentraciones de lactato (sustrato limitante) en el reservorio y en el efluente del biorreactor, $[SO_4^{2-}]_r$ y $[SO_4^{2-}]_e$ son las concentraciones de sulfato en el reservorio y en el efluente del biorreactor, $[A]_e$ es la concentración de acetato en el efluente del biorreactor, t_R es el tiempo de retención correspondiente.

La disminución gradual del t_R continuó hasta que se detectó lactato (fuente de carbono y sustrato limitante del crecimiento) en el efluente líquido. Se denominó como $t_R^{\text{mínimo}}$, al menor t_R aplicado que permitió a cada sistema mantener la velocidad de reducción de sulfato constante y agotar completamente el lactato.

Después de eso, el material de inmovilización drenado fue fraccionado en porciones de 1 cm de acuerdo a la longitud de la columna. Las fracciones superior e inferior fueron tomadas de la cola y la cabeza de la columna, respectivamente, y la fracción media fue tomada a la altura media del reactor. Las fracciones inferior, media y superior (denominadas 1, 2 y 3, respectivamente) de cada reactor fueron utilizadas por separado para las determinaciones de biomasa adherida, para observar la biopelícula microscópicamente (MEB y FISH) y para la extracción de ADN y posterior análisis por PCR-DGGE y qPCR.

4.2.4. Métodos analíticos

Se determinaron las concentraciones de sulfato y ácido láctico y acético según se describe en las Secciones 2.2.5.1 y 2.2.5.3; La DO se determinó como se detalla en la Sección 2.2.5.4.

4.2.5. Microscopía electrónica de barrido

La efectiva formación de la biopelícula sobre la superficie de la P y el CV se examinó por microscopía electrónica de barrido (MEB). Partículas de P y CV tomadas de las zonas medias de ambos biorreactores se analizaron con el equipamiento Philips SEM 505. Las muestras fueron recubiertas con una capa de oro con el Sputter Coater Edwards S150B. Se utilizaron como testigos de referencia, partículas de CV y P sin biopelícula adherida.

4.2.6. Determinación de proteínas

La concentración de biomasa adherida se estimó mediante la cuantificación de proteínas basada en el método de Bradford. Luego de lavar los soportes con agua destilada estéril, se colocaron cantidades establecidas de cada uno de ellos en frascos previamente tarados para determinar la masa de proteínas inmovilizadas por volumen de

lecho según se describe en la Sección 3.2.5. Cada determinación se realizó por triplicado.

4.2.7. Extracción de ADN - PCR - DGGE

El ADN total de las células adheridas se extrajo de los soportes utilizando el kit comercial Soil DNA Kit (Omega Bio-Tek) según las indicaciones del fabricante. Se realizaron dos extracciones de cada zona de cada reactor. Las muestras de ADN total de las células adheridas se utilizaron para el ensayo de PCR - DGGE según las técnicas que se describen en las Secciones 2.2.8.2 a 2.2.8.4 y para qPCR. En un sólo gel de DGGE se compararon todos los soportes y las zonas de los reactores. Luego, diferentes geles se emplearon para observar la similitud de los patrones de bandas de las réplicas de extracción de ADN – PCR – DGGE de cada soporte y cada zona de reactor, los cuáles se alinearon utilizando la muestra de la zona media del reactor con P.

4.2.8. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

4.2.8.1. Estándar de ADN

El estándar de ADN para las curvas de calibración para qPCR se preparó amplificando el gen ADNr 16S casi-completo de la cepa *Desulfovibrio gigas* Le gall (DSM 496). El ADN total se extrajo hirviendo un cultivo por 10 minutos, centrifugando y utilizando el sobrenadante como molde para la PCR con la combinación de cebadores universales para Eubacterias 27f (5'-GAGTTTG(AC)TCCTGGCTCAG- 3') – 1541r (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC- 3'). La mezcla de reacción contuvo 0,5 µM de cada cebador; dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 0,25 µM cada uno; y 8 mU de GoTaq DNA polymerase (Promega) en Green GoTaq Buffer. El programa de amplificación fue de 30 ciclos de 30 seg desnaturalización a 95 °C, 45 seg apareamiento de los cebadores a 52 °C y elongación a 72 °C por 60 seg. El producto de PCR se purificó utilizando el kit comercial Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) según el protocolo del fabricante. La concentración de ADN se determinó en µg ADN/µL con el fluorómetro Qubit

Biophotometer (Invitrogen). La concentración de copias del producto de PCR se calculó a partir de la concentración de ADN y el tamaño del fragmento:

$$\text{Copias del ADN blanco } /\mu\text{L} = A \cdot N_A / (B \cdot C \cdot 10^{12}) \quad [4.15]$$

Donde, A es la concentración de ADN en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, B es el peso de un kb de ADN por pmol (0,66 $\mu\text{g}/\text{pmol}$), N_A la constante de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}/\text{mol}$) y C el largo del amplicón (1532 pb).

4.2.8.2. PCR Cuantitativa

El conjunto de cebadores U1040f y U1402r se usaron para medir la cantidad de copias del gen codificante del gen ARNr 16S de Eubacterias totales, y 385f y 907r se utilizaron para cuantificar la cantidad de copias del mismo gen de BRS totales (Tabla 4.1). En el trabajo de Amann *et al.* (1992) se utilizó el último par para realizar PCR convencional. Este conjunto de cebadores posee el mayor abarcamiento del ARNr 16S de las BRS, sin embargo no se habían sido utilizados anteriormente para ensayos de qPCR. En este trabajo se adapta ese ensayo y se utiliza la combinación de los cebadores 385f y 907r en un ensayo de qPCR con SYBR Green y el gen ARNr 16S como blanco para la cuantificación de BRS totales.

Tabla 4.1. Cebadores utilizados para la qPCR

Blanco	Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto (pb)	Temperatura de apareamiento	Referencia
Eubacterias	U1040f	TGCATGGYYGTCGTCAGCT	362	55°C	Zammit <i>et al.</i> , 2008
	U1402r	TGGTKTGACGGGCGGTGT			
BRS	385f	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	540	53°C	Amann <i>et al.</i> , 1992
	907r	CCGTCAATTCCTTTRAGTTT			

Las curvas de calibración fueron construidas usando las correspondientes combinaciones de cebadores con concentraciones de ADN estándar de 10^8 a 10 copias en diluciones seriadas de 1/10 por triplicado. La eficiencia de amplificación E se calculó por la ecuación:

$$E = [10^{(-1/m)} - 1] \cdot 100 \quad [4.16]$$

Donde, m es la pendiente de la recta de calibración de la cantidad de ciclos necesarios para superar un umbral de señal fluorescente (*threshold cycle* o C_t) versus el logaritmo decimal de la cantidad de copias del ADN blanco. En la práctica, una curva

de calibración confiable debe tener un pendiente entre $-3,0$ y $-3,9$ correspondiente a una E de 80 - 115 %.

Para cuantificar las copias del gen ARNr 16S en los soportes y para determinar si existían sustancias que produjeran inhibición de la PCR, las muestras se midieron en cuatro diluciones seriadas 1/10 y se determinó la E de cada una. Las mediciones se realizaron por triplicado. Al menos tres réplicas de controles sin ADN se realizaron en cada prueba de qPCR, donde la muestra fue sustituida por agua. Además, en la qPCR para cuantificar BRS se usó un control negativo de amplificación conteniendo ADN de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270.

La qPCR se realizó con el equipo Mx3000P QPCR System (Stratagene) y su respectivo programa informático (MxProTM QPCR Software). La amplificación se realizó en un volumen total de 25 μ L usando SYBR GreenER qPCR Supermix Universal (Invitrogen) con 500 mM de cada cebador, 3 mM de MgCl₂ adicional al incluido en el kit y 5 μ L de muestra. El programa de amplificación constó de una etapa inicial de 2 min a 50 °C y 10 min a 95 °C, seguido por ciclos de 30 seg desnaturalización a 95 °C, 60 seg de apareamiento de los cebadores a la temperatura específica para cada par de cebadores (Tabla 4.1) y una elongación a 72 °C por 60 seg.

Debido a que el SYBR Green se une de forma inespecífica a todas las moléculas de ADN de doble cadena, se obtuvieron las curvas de disociación para garantizar que las señales conseguidas correspondiesen a productos de amplificación específicos y no a productos inespecíficos, dímeros de cebadores u otro tipo de arreglos. El programa de amplificación fue seguido por una etapa final de curva de fusión con una rampa de temperatura de 60 a 95 °C. Posteriormente, se corroboró que la longitud de los productos de PCR sea la correcta para el amplicón deseado por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % con un marcador de peso molecular con incrementos de 100 pb (Invitrogen).

El límite de cuantificación de cada curva de calibración fue determinado por la concentración que produjo un C_t tal que: (i) el valor de C_t fuera mayor al del control negativo (ii) el análisis de la curva de fusión revelara el mismo pico que el de la mayor concentración y/o (iii) el producto de PCR correcto fuera visible por electroforesis en gel de agarosa (Stubner, 2004).

4.2.8.3. Cálculos y análisis estadístico

A partir de los valores de concentración obtenidos por qPCR se calculó el número de copias del gen ARNr 16S por volumen de lecho (mL) en función de las diluciones utilizadas para la amplificación y la cantidad de matriz utilizada para la extracción de ADN. El número de copias para cada ensayo se promedió a partir de las determinaciones de los dos extractos de ADN (tres repeticiones de cada dilución diferente). El número de copias se comparó mediante análisis de prueba-t de a pares con un nivel de significancia (α) de 0,05 y los valores se combinaron en una media ponderada.

4.2.9. FISH (*Hibridación in situ con sondas fluorescentes*)

4.2.9.1. Fijación de las células

Los soportes de inmovilización de los reactores rellenos con P y CV fueron lavados con PBS estéril. Luego, 1 mL de cada soporte fue tratado con ultrasonido durante 10 minutos con 1 mL de PBS estéril para desprender la biopelícula sin dañar la integridad celular. Las células así obtenidas fueron fijadas según la Sección 2.2.6.1. Dos muestras de cada fracción fueron tomadas y dos pocillos del portaobjetos de pocillos múltiples fueron usados para cada una.

4.2.9.2. Hibridación

Los oligonucleótidos marcados con Cy3 usados para la hibridación se describen en la Tabla 4.2. La hibridación se llevó a cabo utilizando formamida 35 % (v/v) con las sondas SRB385, ARCH915, EUB338 y NON338 para la detección específica de BRS, Arqueas, Eubacterias y para la hibridación inespecífica, respectivamente. El buffer de hibridación contenía por mL: 0,18 mL de NaCl 5M, 0,2 mL de Tris HCl pH 7,4 1M, 0,35 mL de formamida y 1 μ L de SDS (dodecil sulfato de sodio) 10% (p/v). Los portaobjetos fueron colocados en una cámara húmeda para la hibridación durante 2 horas a 46 °C en horno (HL-200 HybriLinker, UVP Laboratory Products). Luego, fueron lavados con buffer de lavado (conteniendo por mL: NaCl 5M, 0,014 mL; Tris

HCl 1M pH 7,4, 0,2 mL; EDTA 0,5 M pH 8,0, 0,010 mL y SDS 10% (p/v), 0,5 μ L) por 20 minutos a 48 °C y enjuagados con agua.

Tabla 4.2. Oligonucleótidos utilizados para el ensayo de FISH.

Sonda	Blanco	Secuencia (5'-3')	Referencia
SRB385	BRS	CGCGTCGCTGCGTCAGG	Amann <i>et al.</i> , 1990
EUB338	Eubacterias	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	
ARCH915	Arqueas	GTGCTCCCCGCAATTC	Stahl y Amann, 1991
NON338	Control negativo	ACTCCTACGGGAGGCAGC	Manz <i>et al.</i> , 1992

4.2.9.3. Tinción con DAPI y observación microscópica

La tinción con DAPI se realizó según la Sección 2.2.6.2. El ensayo de hibridación *in situ* se investigó usando un microscopio de epifluorescencia (Leica 2500). Diferentes campos microscópicos de cada pocillo fueron analizados para confirmar los resultados. Las células hibridadas fueron analizadas para determinar la fracción de señales positivas visualizadas para cada sonda en relación a la observada para la sonda general para bacterias EUB338 o a las células totales teñidas con DAPI.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Cultivo en lote de células en suspensión

Los capítulos anteriores demostraron la alta eficiencia de reducción de sulfato de la comunidad de BRS *R*. Para estudiar en detalle su cinética y su estequiometría se realizó un cultivo en lote en un reactor tipo tanque agitado. El cultivo fue seguido mediante la determinación de la DO (como estimativo del crecimiento celular, Figura 4.2.A) y se determinaron las concentraciones de sulfato, lactato, acetato y proteínas a intervalos de tiempo adecuados (Figura 4.2.B, C y D, respectivamente).

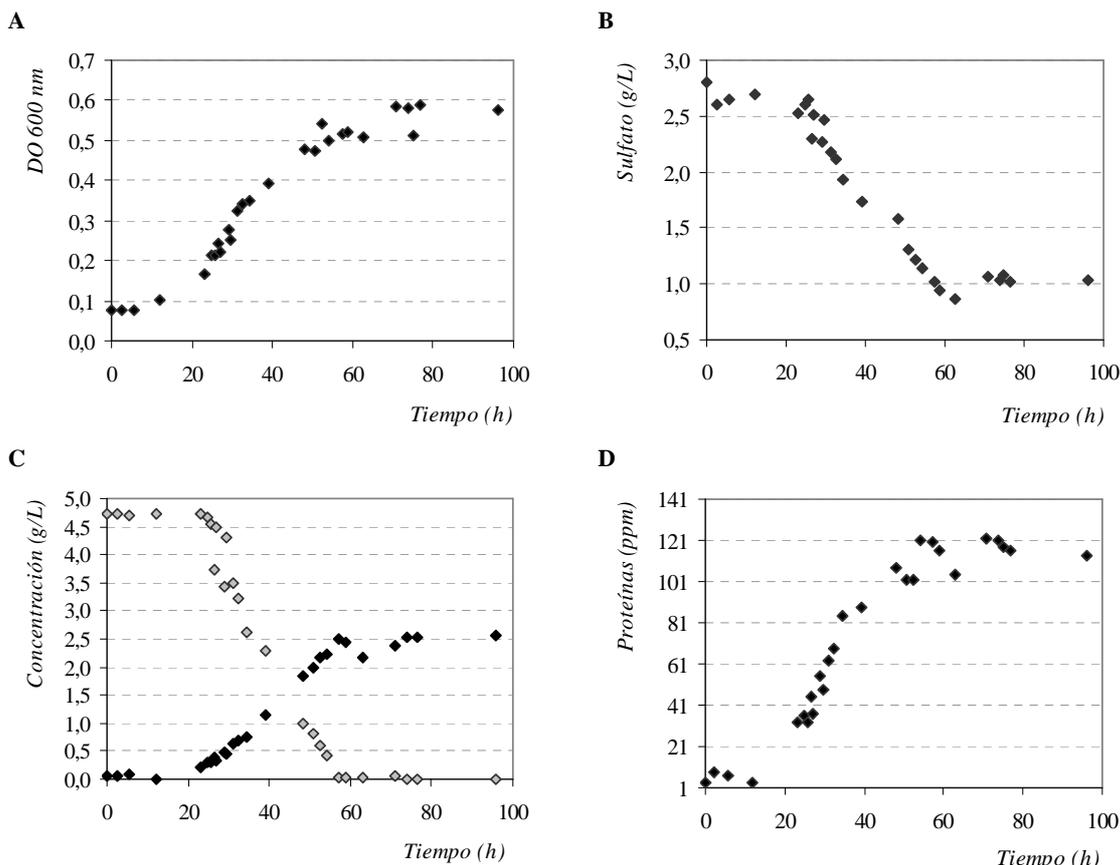


Figura 4.2. Curvas de crecimiento del cultivo en lote en reactor tipo tanque agitado del consorcio R. A. Estimación del crecimiento microbiano por DO a 600 nm en función del tiempo; B. Concentración de sulfato en función del tiempo; C. Concentración de ácido láctico (rombos grises) y de ácido acético (rombos negros) en función del tiempo; D. Concentración de proteínas en función del tiempo.

En base a la concentración de proteínas durante la fase exponencial del crecimiento se estimó una $\mu_{\text{máxima}}$ de $0,07 \text{ h}^{-1}$ correspondiente a un t_R de 14 h (Figura 4.3) y una r_{SO_4} de $0,042 \text{ g/L.h}$. Moosa *et al.* (2002) cultivaron en suspensión un inóculo proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales en un reactor tipo tanque agitado, con acetato y peptona como fuente de carbono y pH 8,0. Con un t_R de 90 h obtuvieron una r_{SO_4} de $0,007 \text{ g/L.h}$, un

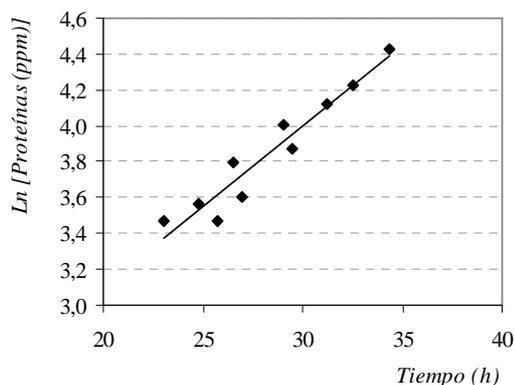


Figura 4.3. Determinación de la velocidad específica de crecimiento máxima $\mu_{\text{máxima}}$ del consorcio R. Pendiente $0,07 \text{ h}^{-1}$; R^2 0,90.

resultado ampliamente inferior al obtenido con el consorcio R. Los cultivos efectuados con *Desulfovibrio sp.* generaron las curvas de la Figura 4.4. La $\mu_{\text{máxima}}$ observada fue $0,10 \text{ h}^{-1}$ correspondiente a un t_R de 9,8 h y una r_{SO_4} de $0,053 \text{ g/L.h}$. Los valores de

$\mu_{\text{máxima}}$ obtenido para *Desulfovibrio sp.* y *R* fueron del orden de los reportados por diferentes autores para aislados del género *Desulfovibrio* (Tabla 2.10).

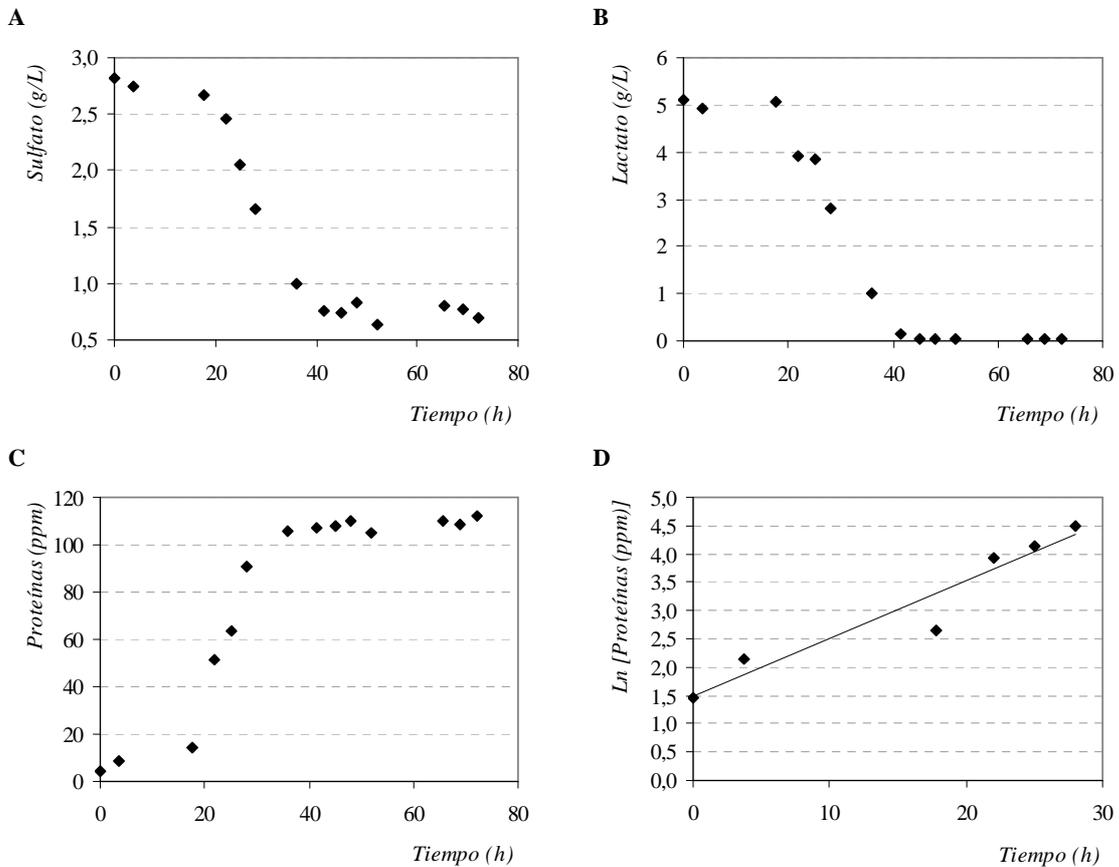


Figura 4.4. Curvas de crecimiento del cultivo en lote en reactor tipo tanque agitado de *Desulfovibrio sp.*. **A.** Concentración de sulfato en función del tiempo; **B.** Concentración de ácido láctico en función del tiempo; **C.** Concentración de proteínas en función del tiempo; **D.** Determinación de la $\mu_{\text{máxima}}$ (Pendiente $0,10 \text{ h}^{-1}$; R^2 0,92).

Ambos cultivos agotaron completamente la fuente de carbono y redujeron una cantidad de sulfato similar correspondiente a un $Y_{\text{SO}_4/\text{S}}$ de 0,42 y 0,41 g/g para *Desulfovibrio sp.* y *R*, respectivamente. Tal como se observó en el Capítulo 2, el consorcio *R* presenta parámetros cinéticos similares a los observados para la cepa de referencia *Desulfovibrio sp.*. Sin embargo, en dicho capítulo se calcularon a partir de cultivos estáticos r_{SO_4} de 0,010 y 0,013 g/L.h para *Desulfovibrio sp.* y *R*, respectivamente, valores inferiores a los obtenidos en estos ensayos. La causa de la diferencia entre los resultados pudo ser que el biorreactor poseía una amplia cámara de gas superior inicialmente formada por N_2 por lo que el H_2S generado por el cultivo fue diluido en un gran volumen, en comparación con los frascos utilizados en el ensayo anterior con poca o nula cámara gaseosa, donde la concentración de H_2S en fase gaseosa pudo ser mayor, causando inhibición del desarrollo microbiano, como se detalla en el

Capítulo 1. Por otro lado, el $Y_{SO_4/S}$ (0,41 g/g) y el $Y_{P/S}$ (0,54 g/g) observado para el consorcio *R* crecido en suspensión fueron similares a los obtenidos para los cultivos inmovilizados sobre P, PV y CV reportados en el Capítulo 3 ($Y_{SO_4/S}$: 0,48, 0,46 y 0,45 g/g; $Y_{P/S}$: 0,55, 0,53 y 0,57 g/g; respectivamente), lo que indica que la estequiometría no se modificó.

4.3.2. Módulo de dispersión axial del RLEFA

Se realizaron gráficas de valores de $[H^+]$ en función del tiempo (Figura 4.5) y las de la primera derivada de dichos valores (Figura 4.6) para el RLEFA relleno con P y CV, como modelos para la columna a utilizar. Se calculó un módulo de dispersión de 0,017 y 0,012 para el P y CV, respectivamente, demostrando que los reactores a utilizar se comportaron como un sistema de flujo pistón con dispersión axial intermedia. Por lo tanto, fue posible aplicar los modelos hidráulicos pertinentes para la operación de los RLEFA, considerando un tiempo de operación de 1,5 veces el t_R para el establecimiento del estado estacionario. Por otro lado, el t_R obtenido experimentalmente para cada sistema (1,1 y 0,9 h para P y CV, respectivamente) fue mayor al calculado teóricamente en base al caudal de alimentación (Q) y el volumen hueco (V_h) (0,6 y 0,5 h para P y CV, respectivamente). Esta diferencia puede atribuirse a la interacción de las matrices con los trazadores utilizados, por ejemplo adsorción del trazador. El efecto de esta interacción es aumentar la dispersión por lo cual el valor real del modulo de dispersión es eventualmente menor al calculado para cada columna.

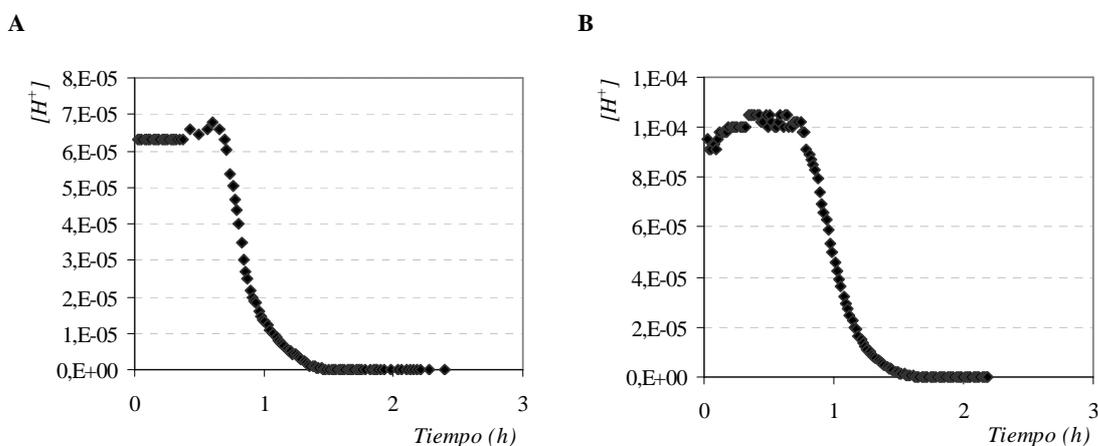


Figura 4.5. Gráfica de pH en función del tiempo para la determinación del módulo de dispersión axial del RLEFA relleno con diferentes soportes. A. Carbón vegetal; B. Perlita.

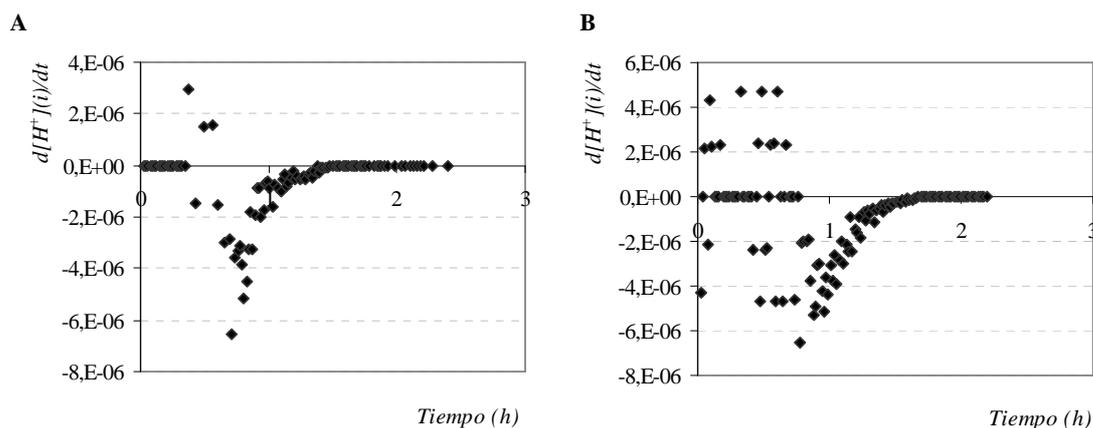


Figura 4.6. Gráfica de derivada del pH en función del tiempo para la determinación del módulo de dispersión axial del RLEFA relleno con diferentes soportes. A. CV; B. P.

4.3.3. Comportamiento del RLEFA

Se determinó que la fracción hueca de las columnas fueron: CV 57 %; P 67 %; EP 91 % y PV 41 %. Los cuatro RLEFA (Figura 4.7) rellenos con P, CV, EP y PV se mantuvieron funcionando por un tiempo prolongado (2200, 1291, 1797 y 744 horas, respectivamente) sin presentar inconvenientes de oclusión ni contaminaciones microbiológicas, demostrando que los sistemas fueron lo suficientemente estables como lo reflejan las curvas de concentraciones de sulfato, lactato y acetato en el efluente de los biorreactores durante el transcurso del experimento (Figura 4.8). Al t_R inicial, similar para todos los reactores, el tiempo requerido para obtener una biopelícula madura capaz de alcanzar valores de concentración constantes en el efluente fue de 4,6, 6,0, 1,5 y 3,2 veces el t_R , para P, CV, EP y PV, respectivamente. Diferentes autores han reportado la necesidad de operar reactores sulfidogénicos durante una fase inicial prolongada con el objetivo de establecer una biopelícula estable capaz de reducir sulfato de modo eficiente y constante (Sahinkaya y Gungor, 2010; Kaksonen *et al.*, 2006a; Sahinkaya *et al.*, 2007; Villa-Gómez *et al.*, 2011; Celis *et al.*, 2009; Sahinkaya *et al.*, 2011).



Figura 4.7. Fotografía del sistema de reactor de lecho fijo de flujo ascendente para la EP y P.

Todos los sistemas mostraron un $t_R^{\text{mínimo}}$ menor y un valor de r_{SO_4} mayor que el del sistema con células en suspensión, siendo P el soporte más eficiente (P 2,98 h, 0,58 g/L.h; CV 4,15 h, 0,40 g/L.h; EP 9,94 h, 0,19 g/L.h; PV 8,53 h, 0,21 g/L.h, respectivamente) (Figura 4.9 y 4.10). Debido a que los $t_R^{\text{mínimo}}$ obtenidos en los cuatro casos fueron menores al del sistema con células en suspensión, se verifica que la actividad reductora de sulfato fue llevada a cabo por la biopelícula, ya que a estos caudales las células en suspensión fueron lavadas del reactor por arrastre. Los valores de r_{SO_4} reportados en la literatura para diferentes sistemas de cultivo de BRS, como se resume en la Tabla 1.10, se hallan entre 0,004 y 2,7 g/L.h, encontrándose los resultados de este estudio en este rango. En la Tabla 4.3 se detallan algunas experiencias realizadas con sistemas de células inmovilizadas junto con los resultados de este trabajo. Como puede apreciarse allí, para PV de 3 mm de diámetro con lactato como fuente de carbono en un RLEFA, el valor reportado por Baskaran y Nemati (2006) de t_R fue superior y el de r_{SO_4} inferior (28,6 h, 0,04 g/L.h) a los obtenidos en este capítulo para el mismo material y para el cultivo en lote con células en suspensión. Esto infiere que la comunidad *R* sería más eficiente que la utilizada por dichos autores. Sin embargo, los resultados son deficientes en comparación a los obtenidos por los mismos autores con arena de cuarzo de 0,225 mm (0,5 h, 1,7 g/L.h); lo cuál es esperable debido al tamaño de partícula casi 10 veces menor al de la P de este estudio; sin embargo ambos materiales poseían un área superficial similar (éste parámetro fue determinado por BET;

Tabla 4.3). Estos rendimientos se obtuvieron para una concentración en la alimentación de 1 g/L de sulfato; pero con 2,5 g/L, una concentración similar a la usada en este trabajo (2,8 g/L), para la arena de cuarzo el t_R aumentaba y la r_{SO_4} disminuía (2,7 h y 0,81 g/L.h), mostrando un efecto negativo del aumento de la concentración de sulfato. A concentraciones de sulfato comparables, los resultados obtenidos con P en este capítulo y los obtenidos con arena de cuarzo reportados por Baskaran y Nemati (2006) mostraron t_R y r_{SO_4} similares; a pesar de que los autores no obtuvieron un 100 % de consumo de la fuente de carbono a dicho t_R . Por lo tanto, la causa de la alta efectividad de la P se puede atribuir a la elevada superficie disponible para la adhesión celular, reportado en estudios anteriores como principal causa de disminución de los t_R (Baskaran y Nemati, 2006; García Calderón *et al.*, 1998). Por otro lado, Jong y Parry (2003; 2006) realizaron experiencias con lactato como sustrato orgánico en RLEFA empleando arena de 2 mm como soporte de inmovilización, pero los r_{SO_4} que obtuvieron a un t_R de 16 h fueron de al menos un orden de magnitud menor a los aquí registrados. Esta deficiencia pudo deberse a que dichos sistemas eran de pH ácido, lo cuál afecta severamente a las BRS como se describe en el Capítulo 1. Sahinkaya y Gungor (2010) aplicaron un reactor de lecho fluidizado de flujo descendente (RLFFD) con esponja y un RLEFA con zeolita como soportes y ácido láctico como fuente de carbono. A pH neutro, 2 g/L de sulfato y un t_R de 12 h, estos autores encontraron r_{SO_4} similares entre ambos sistemas (0,060 y 0,064 g/L.h, respectivamente), los cuales fueron muy inferiores a los aquí obtenidos. En procesos con sustratos orgánicos diferentes al lactato los resultados encontrados en la literatura fueron variables. van Houten *et al.* (1995a) obtuvieron altos r_{SO_4} con un sistema *gas-lift* a t_R 4,5 h. Otros trabajos que utilizan lecho empaquetado con fuentes carbonadas diferentes al lactato muestran r_{SO_4} inferiores a los resultados aquí obtenidos (Silva *et al.*, 2006; Kuo y Shu, 2004; Venkata Mohan *et al.*, 2005; Celis *et al.*, 2009).

Por otro lado, el $Y_{SO_4/S}$ para el cultivo en lote de células libres (0,41 g/g) fue similar al de los cuatro sistemas de lecho empaquetado, siendo poco variable para los diferentes t_R para cada uno de los soportes (P $0,38 \pm 0,03$ g/g; CV $0,39 \pm 0,02$ g/g; EP $0,38 \pm 0,03$ g/g; PV $0,40 \pm 0,03$ g/g; los errores corresponden a la desviación estándar entre los diferentes t_R) (Figura 4.9). Estos valores resultaron comparables con los rendimientos estequiométricos reportados para *Desulfovibrio desulfuricans* (0,45 g/g) (Okabe y Characklis, 1992). Paralelamente, el valor de $Y_{P/S}$ aumentó con la disminución

del t_R para todos los soportes desde alrededor de 0,45 hasta llegar a 0,60 g/g al $t_R^{\text{mínimo}}$ (Figura 4.10); un valor superior al obtenido en cultivo en lote (0,46 g/g) pero similar al 0,62 g/g reportado para *Desulfovibrio desulfuricans* (Okabe y Characklis, 1992). Estos resultados sugieren que en las biopelículas inicialmente formadas sobre las matrices estaban presentes bacterias consumidoras de ácido acético que no resistieron elevados caudales de alimentación. El valor de $Y_{SO_4/S}$ (g/g) encontrado en el Capítulo 3 para el crecimiento en lote de células inmovilizadas en P, CV, EP y PV (0,48, 0,45, 0,38 y 0,46, respectivamente) fue en algunos casos similar al encontrado en los RLEFA (0,38, 0,39, 0,38 y 0,40). Sin embargo el $Y_{P/S}$ (g/g) (0,55, 0,57, 0,44 y 0,53) resultó menor al encontrado en los RLEFA al $t_R^{\text{mínimo}}$.

Todos los RLEFA empacados con las diferentes matrices fueron capaces de consumir el 100 % de la fuente de carbono en alguna o varias de las velocidades de dilución ensayadas (Figura 4.11). El porcentaje de reducción de sulfato máximo fue similar para los cuatro reactores (alrededor de 67 %), resultado lógico dado que los $Y_{SO_4/S}$ fueron similares para todos los soportes y el ácido láctico, sustrato limitante del crecimiento, fue agotado. Baskaran y Nematí (2006) usaron un medio de cultivo conteniendo una cantidad similar de sulfato (6,7 g/L de lactato y 2,5 g/L de sulfato) en relación 2,7 lactato / sulfato, mientras que en este capítulo se utilizó una relación 1,6 y una concentración de sulfato de 2,8 g/L. Según los autores, el porcentaje de conversión de lactato y sulfato fue 48 y 79 % (consumo de 3,2 g/L y 2,0 g/L), respectivamente, para un RLEFA de t_R y r_{SO_4} similar al obtenido aquí para la P, donde los % fueron 100 y 61 (consumo de 4,5 g/L y 1,7 g/L). Por lo tanto, el sistema usado por los investigadores mostró ser más eficiente en la reducción de sulfato en relación al consumo de la fuente de carbono, no así en cuanto al aprovechamiento de esta.

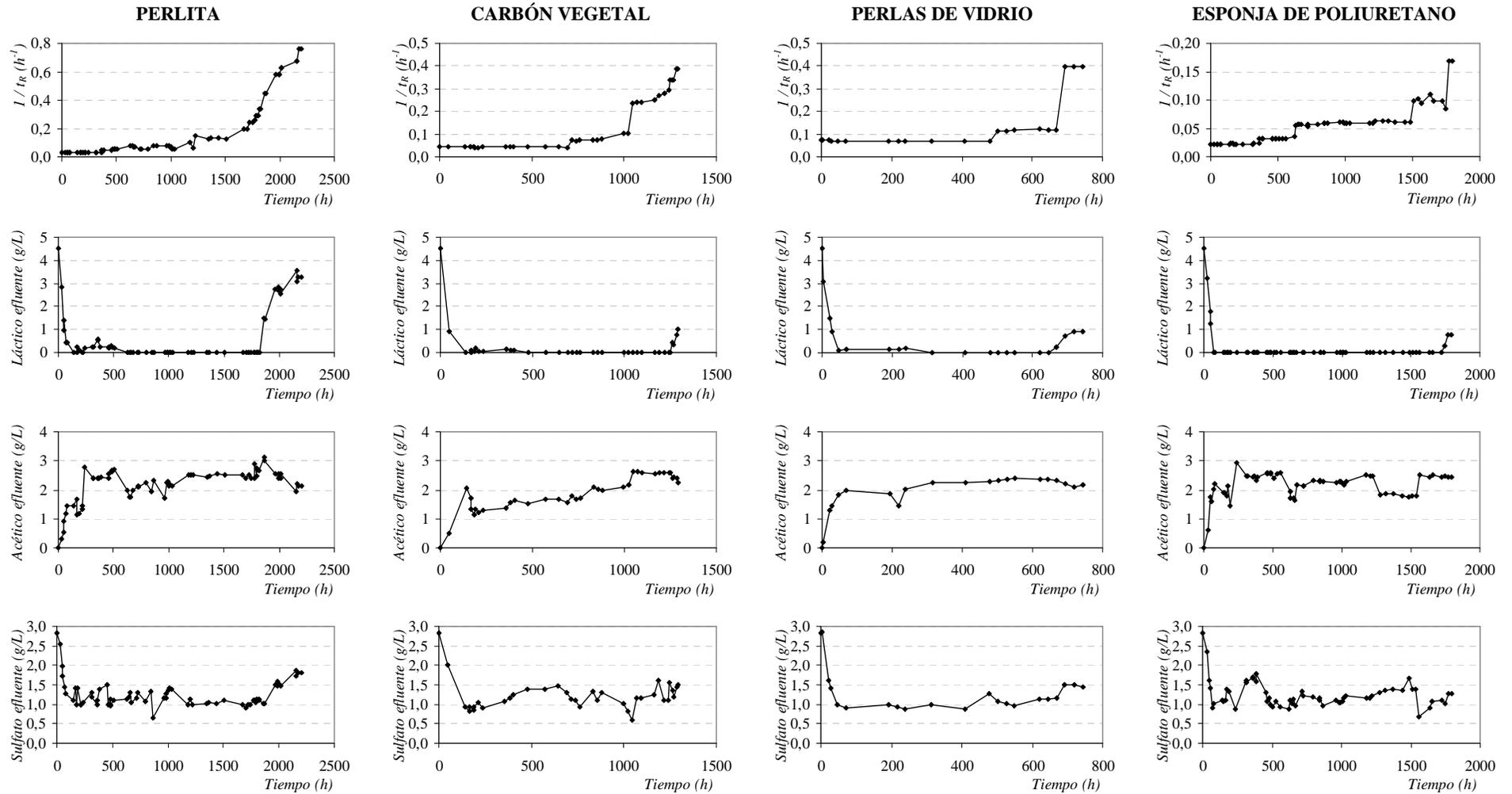


Figura 4.8. t_R aplicados y concentraciones de ácido láctico, acético y sulfato en el efluente de los RLEFA empacados con perlita, carbón vegetal, perlas de vidrio y esponja de poliuretano en función del tiempo de operación.

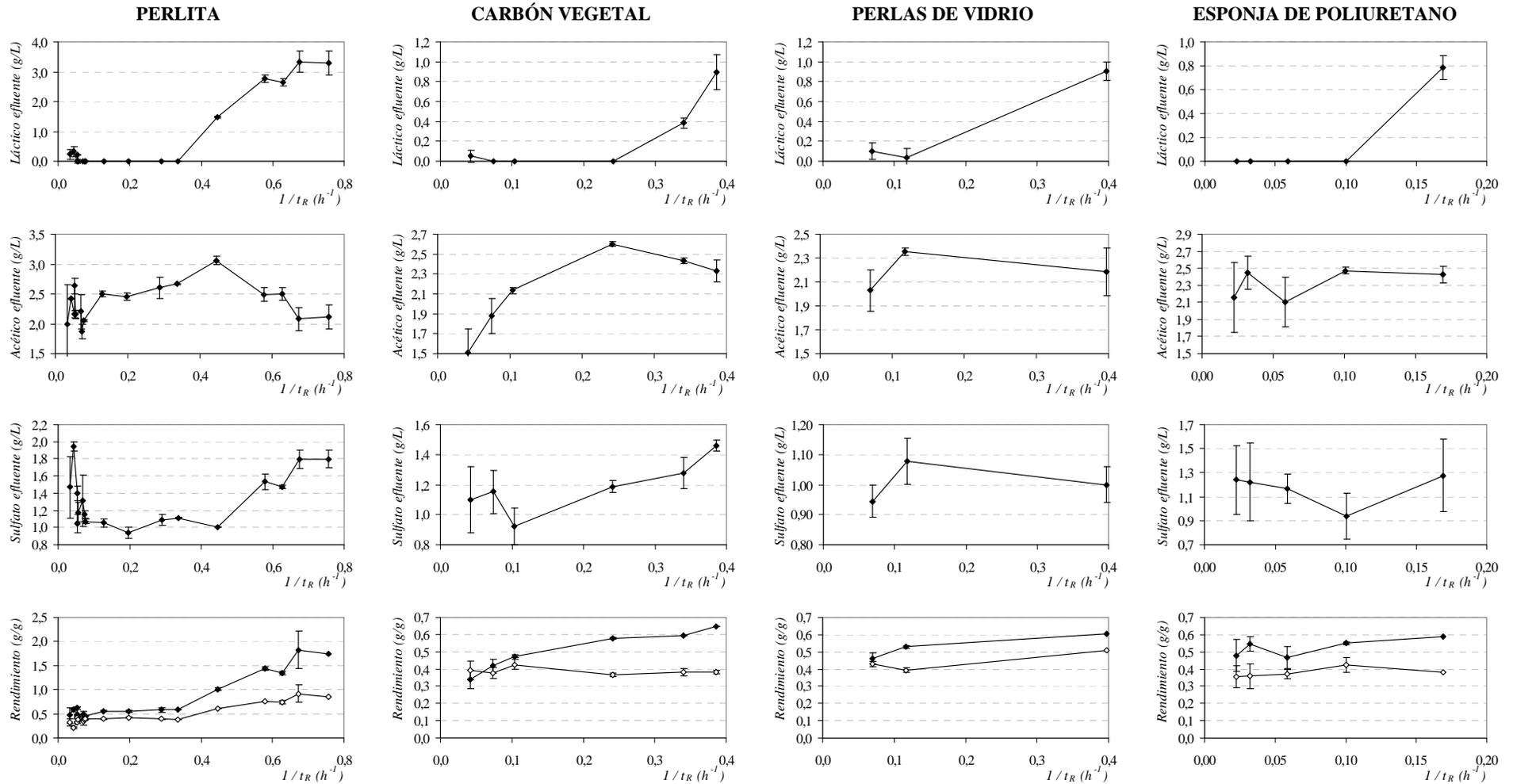


Figura 4.9. Rendimientos estequiométricos y concentraciones de ácido láctico, acético y sulfato en el efluente de los RLEFA empacados con perlita, carbón vegetal, perlas de vidrio y esponja de poliuretano en función de la inversa del t_R . Rendimientos: $Y_{P/S}$, rombos llenos; $Y_{SO_4/S}$, rombos vacíos.

Tabla 4.3. Características de varios biorreactores sulfidogénicos con células inmovilizadas.

Inóculo	Reactor	Temp. (°C)	pH	Soporte			Fuente de carbono y energía				Sulfato			Biopelícula		Referencia															
				Naturaleza	Diámetro partícula (mm)	Área superficial (m ² /mL)	Naturaleza	Concentración inicial (g/L)	Consumo (%)	t _R (h)	Concentración inicial (g/L)	Consumo (%)	r _{SO4} (g/L.h)	Biomasa inmovilizada (g/L)	BRS / totales (%)																
Agua producida en un depósito de petróleo	RLE FA	22	7	Arena de cuarzo	0,225	0,321	Lactato	2,7	63	0,5 ^A	1,0	73	1,7 ^A	na	na	Baskaran y Nemati, 2006															
							6,7	48	2,7 ^A	2,5	79	0,81 ^A																			
							13,3	25	2,7 ^A	5,0	35	0,68 ^A																			
				Cubos de estropajo poroso	-	0,007	2,7	63	5,3 ^A	1,0	89	0,2 ^A																			
Agua de humedal de sitio minero	RLE FA	25	4,5	Perlas de vidrio	3	0,001				28,6 ^A	1,0	100	0,04 ^A	na	na	Jong y Parry, 2003															
				Arena	>2	na	Lactato	3,7	na	16,2 ^A	2,5	82	0,02 ^A																		
Agua de humedal de sitio minero	RLE FA	Amb.	6	Arena	>2	na	Lactato	4,76	na	16,3 ^A	0,09	73	0,0042 ^A	na	na	Jong y Parry, 2006															
												76	0,0040 ^A																		
												74	0,0072 ^A																		
												69	0,0038 ^A																		
												80	0,0022 ^A																		
Agregados de BRS y bacterias homo-acetogénicas	GLI	30	5,0	Piedra pómez	0,2-0,5	na	H ₂ , CO ₂	-	na	4,5	4,8	0	0	0 ^D	na	van Houten <i>et al.</i> , 1995a															
												20	0,21	1 ^D																	
												52	0,52	5 ^D																	
												68	0,67	7 ^D																	
												80	0,83	8 ^D																	
												100	1,08	8 ^D																	
Lodo de UASB	RLE de flujo horizontal	30	na	Carbón vegetal	na	1,790	Agua residual	0,00123 ^{DQO}	90	0,02 ^b	0,0014	45	0,03	25 ^D	55,4 ^C	Silva <i>et al.</i> , 2006															
				España de poliuretano	-	1,007	de carne, almidón, sacarosa, soja, detergente		86		39		0,02	10 ^D	44,8 ^C																
				Polietileno de baja densidad	na	0,820		84		0	0	10 ^D	32,7 ^C																		
				Cerámica a base de alúmina	-	na		86		0	0	21 ^D	18,1 ^C																		
				Cubos de triacetato de celulosa	-	-	Glucosa	4 ^{DQO}	71	48	0,4	98	0,008	13,3 ^E	na		Kuo y Shu, 2004														
				75	24	0,4	87	0,015	na																						
				77	12	0,4	75	0,025																							
				81	48	0,8	93	0,016																							
Lodo de UASB	UASB burbujeador con N ₂	55	6	Gránulos de lodo	2	-	Almidón, sacarosa, lactato, propionato y acetato	6,87 ^{DQO}	na	3,8	0,7	90	0,166	na	na	Lens <i>et al.</i> , 2003b															
																	3,5	4,27 ^{DQO}	4,2	0,3	100	0,069									
Lodo de tratamiento anaeróbico	UASB	28	7,2-7,8-	-	-	-	-	0,3 ^{DQO}	66-78	0,028	0,15	42	0,004	12,5 ^D	na	Hien Hoa <i>et al.</i> , 2007															

Tabla 4.3. Características de varios biorreactores sulfidogénicos con células inmovilizadas.

Inóculo	Reactor	Temp. (°C)	pH	Soporte			Fuente de carbono y energía				Sulfato			Biopelícula		Referencia																																
				Naturaleza	Diámetro partícula (mm)	Área superficial (m ² /mL)	Naturaleza	Concentración inicial (g/L)	Consumo (%)	t _R (h)	Concentración inicial (g/L)	Consumo (%)	r _{SO4} (g/L.h)	Biomasa inmovilizada (g/L)	BRS / totales (%)																																	
Lodo de reactor anaeróbico	UASB	55	6	-	-	-	Sacarosa	1,46 ^{DQO}	100	10	0,15	100	0,35	na	na	Lopes <i>et al.</i> , 2007																																
			5	-	-	-					0,15	80-95	0,28-0,33																																			
			4	-	-	-					0,40	80-95	0,8-0,95																																			
				-	-	-					0,15	55-65	0,19-0,23																																			
Lodo de UASB	UASB	30	7-7,5	-	-	-	Etanol	0,6	100	4	1,5	>93	>0,375	10 ⁸ ufc/mL ^F	50 ^C	Dar <i>et al.</i> , 2007b																																
Lodo de UASB	RLF FA	30	7,1	Bolitas de alginato	-	-	Agua de desecho	6 ^{DQO}	78	0,06	1,6	80	na	na	14 ^F	Mohan <i>et al.</i> , 2005																																
Efluente de digestor anaeróbico	RLF FA	35	7	Zeolita	0,5-1	na	Lactato	0,67 ^{DQO}	92	12	1	19	0,016	na	na	Sahinkaya y Gungor, 2010																																
			6-7								37	0,064																																				
			5,5								61	0,100																																				
			5								95	0,092																																				
											95	0,120																																				
											90	0,144																																				
											80	0,132																																				
	RLF FD	35	4	Cubos de esponja	0,5	na	Lactato	0,67 ^{DQO}	95	12	1	14	0,012	na	na	Sahinkaya y Gungor, 2010																																
			6-7								36	0,060																																				
			5,5								94	0,092																																				
			5								93	0,068																																				
											91	0,072																																				
											86	0,096																																				
											70	0,108																																				
RLF FA	25	6,5	Polietileno de baja densidad	0,5-1,0	na	Etanol	1	72	48	1,66	22	0,0075	0,76 ^D	na	Celis <i>et al.</i> , 2009																																	
		RLF FD								25	7,0	Polietileno de baja densidad	3	na	Lactato	5,0 ^{DQO}	34	24	1,0	70	0,03	0,74 ^{D,G} 1,29 ^{D,H}	na	Villa-Gómez <i>et al.</i> , 2011																								
																									RLE FA	30	7,0	Perlita	2,0-1,2	0,3381	Lactato	4,5	100	2,98 ^A	2,8	61	0,58 ^A	0,52	100	Este estudio								
																																		Carbón vegetal	2,0-1,2	na	100	4,15 ^A			58	0,40 ^A	0,24	4				
																																						Perlas de vidrio	3,0		0,0018	99,1	8,53 ^A		62	0,21 ^A	0,02	70
																																											Esponja de poliuretano	-	0,6541	100	9,94 ^A	

^A En base al volumen hueco del lecho; ^B En base al volumen total del reactor; ^C % de BRS sobre células totales determinado por FISH; ^D Sólidos volátiles; ^E En base a la cantidad de nitrógeno de la biomasa; ^F Cuantificación por cultivo; ^G Parte superior del lecho; ^H Parte inferior del lecho; na: No analizado; -: No corresponde; RLF: Reactor de lecho fluidizado, RLE: Reactor de lecho empacado, UASB: reactor de lodo de flujo ascendente, FA: Filtro anaeróbico, GLI: *Gas-lift* con células inmovilizadas; FA: Flujo ascendente, FD: Flujo descendente; ^{DQO}: g de DQO/L.

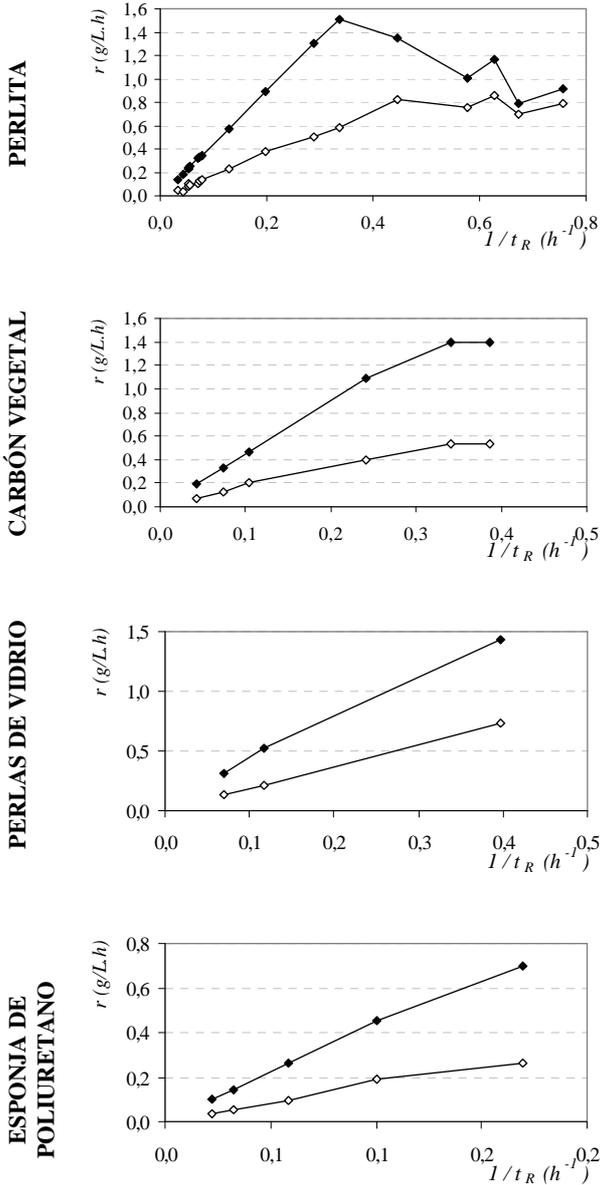


Figura 4.10. Velocidad volumétrica de consumo de ácido láctico (r_s , rombos llenos) y de reducción de sulfato (r_{SO_4} , rombos vacíos) en los RLEFA en función de la inversa del t_R .

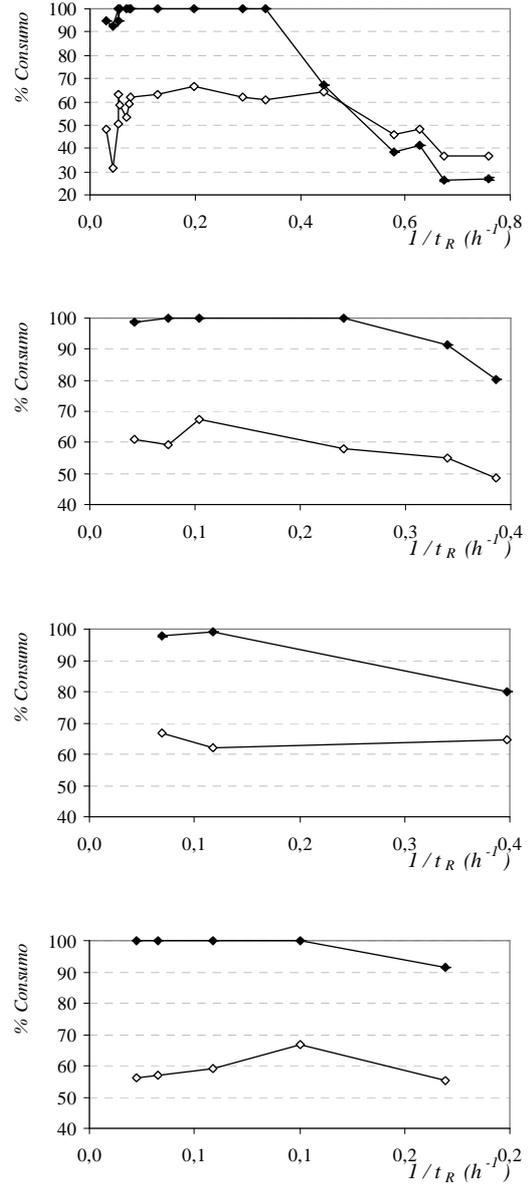


Figura 4.11. Porcentaje de consumo de ácido láctico (rombos llenos) y sulfato (rombos vacíos) en los RLEFA en función de la inversa del t_R .

4.3.4. Biopelícula inmobilizada

El examen de las partículas de P y CV (soportes que presentaban mayor rendimiento) de la zona media de cada biorreactor con MEB mostró imágenes similares a las encontradas en numerosos estudios con el objetivo de apreciar la formación de

biopelículas en sistemas de BRS inmovilizadas (Selvaraj *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2006; Baskaran y Nemati, 2006; Kuo y Shu, 2004; Celis *et al.*, 2009; Kolmert y Johnson, 2001); lo que indicaría el establecimiento de la biopelícula. Se evidenció una pátina rugosa en la superficie de las partículas de los reactores (Figura 4.12.D y 4.12.F) en comparación con los materiales sin tratamiento microbiológico que mostraban superficies limpias y lisas.

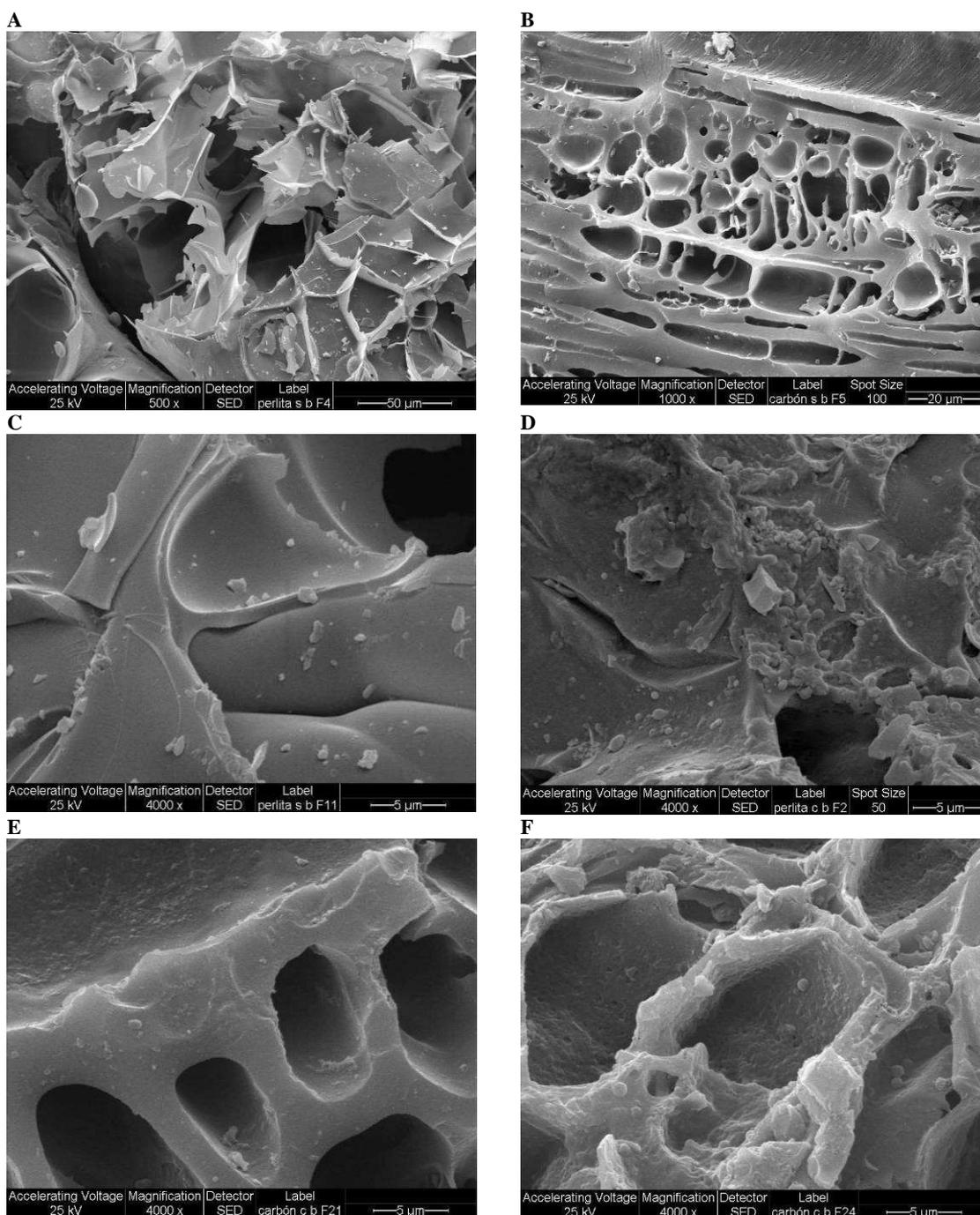


Figura 4.12. Microscopía Electrónica de Barrido. A. Perlita (500X); B. Carbón Vegetal (1000X); C. Perlita control; D. Perlita del biorreactor; E. Carbón Vegetal control; F. Carbón Vegetal del biorreactor (4000X).

Por otro lado, la naturaleza porosa de la P se puede apreciar en la Figura 4.12.A, al igual que la estructura de los vasos xilemáticos del CV en la 4.12.B. Estas imágenes mostraron que los poros de ambos materiales eran de un diámetro mayor a 10 μm , adecuado para la entrada de los microorganismos y su aglomeración. Hay muchos factores responsables de la formación de biopelículas y la adhesión de las células a superficies inertes. De estos factores, el tamaño del poro ha sido descrito como el más importante, con mayor efecto que la rugosidad superficial macroscópica y la superficie total (Huysman *et al.*, 1983; Seth *et al.*, 1995; Joo-Hwa *et al.*, 1996). El diámetro de poro óptimo está en el rango de uno a cinco veces el diámetro mayor del microorganismo, de manera que los materiales con poros en el rango de 1-10 μm son ideales para la inmovilización de las células bacterianas (Ince *et al.*, 2000). La importancia de estos poros se deriva de su capacidad para proporcionar un entorno protegido de la velocidad de corte donde las células pueden establecer monocapas que servirán de base para el crecimiento de la biopelícula (Rajbir *et al.*, 2006).

Se determinaron las proteínas adheridas en cada uno de los soportes en las diferentes zonas del biorreactor; y se observó que el orden relativo de proteínas adheridas por volumen de lecho promedio en todo el reactor para cada matriz (P: 0,52 g/L; CV: 0,24 g/L; EP: 0,04 g/L; PV: 0,02 g/L) (Fig. 4. 13) fue inverso al $t_R^{\text{mínimo}}$ determinado (P: 2,98 h; CV: 4,15 h; EP: 9,94 h; PV: 8,53 h). De modo que, se puede suponer que el aumento de la productividad de los

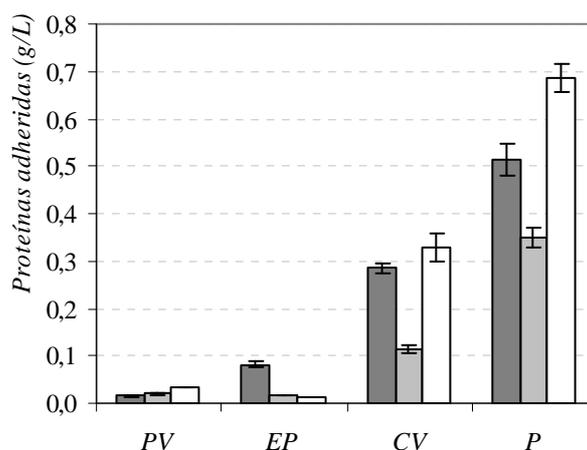


Figura 4.13. Masa de proteínas adheridas por volumen de lecho. CV (Carbón Vegetal); P (Perlita); PV (Perlas de Vidrio) y EP (Esponja de Poliuretano). Zona del reactor: inferior (1, barras gris oscuro); media (2, barras gris claro) y superior (3, barras blancas).

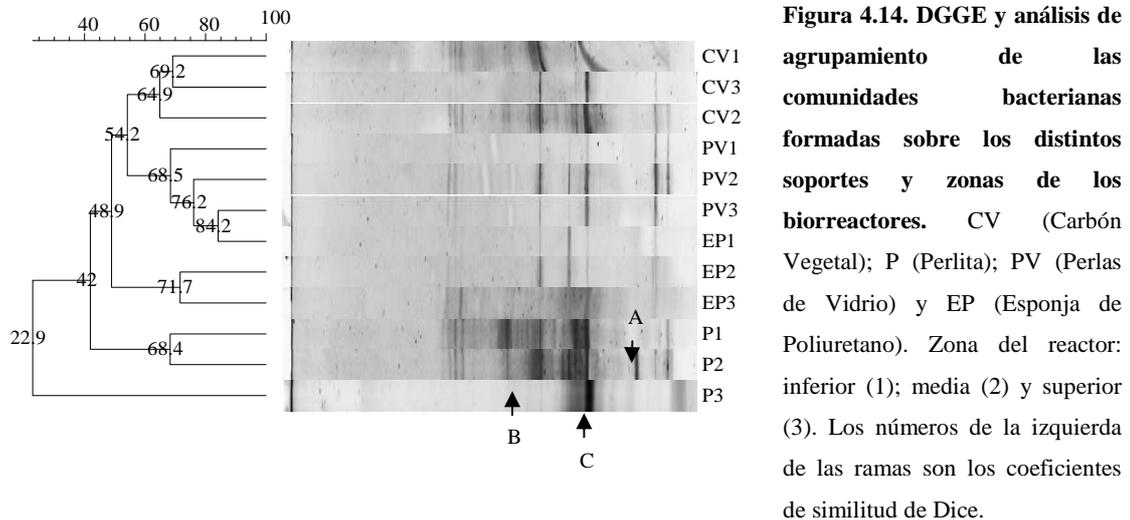
reactores fue consecuencia directa de una mayor cantidad de biomasa inmovilizada causada por una mayor superficie disponible (área superficial: P, 0,3381 m^2/mL ; EP, 0,6541 m^2/mL ; PV, 0,0018 m^2/mL). Sin embargo, la EP no obtuvo un resultado proporcional a su área superficial, lo que hace suponer que existieron otras características de las matrices que influenciaron la inmovilización celular.

Las cantidades de proteínas inmovilizadas sobre PV y EP resultaron similares a las obtenidas en los cultivos en lote sobre estos mismos soportes (Capítulo 3), mientras que en los sistema de cultivo continuo con P y CV adhirieron al menos 5 veces más biomasa que los cultivos del Capítulo 3 en el mismo tamaño de partícula. Por otro lado, se percibió que en los RLEFA con mayor adhesión microbiana, P y VC, la cola de los reactores (zona 3) contenía más células que la cabeza (zona 1) y el medio de los mismos (zona 2). Las cuantificaciones de biomasa inmovilizada encontrada en diferentes reportes muestran valores entre 0,8 y 25 g/L de lecho (Tabla 4.3). Considerando una proporción de proteínas / biomasa de 33 % (p/p) (Capítulo 3), la cantidad de biomasa inmovilizada sobre cada material (P, CV, EP y PV 1,58 g/L, 0,72 g/L, 0,12 g/L, y 0,06 g/L, respectivamente) resultó similar o baja con respecto a otros autores. Villa-Gómez *et al.* (2011) encontraron que la cantidad de biomasa inmovilizada en un RLFFD dependía de la zona del lecho. Hallaron, de forma similar a lo observado aquí, que existían menos microorganismos adheridos al soporte presente en la entrada del biorreactor que en el material más cercano al puerto efluente.

4.3.5. Estructura de las comunidades bacterianas de las biopelículas (DGGE)

Por lo general, los reactores anaerobios utilizados para la reducción de sulfato se inoculan con consorcios indefinidos de microorganismos anaerobios y por lo tanto es deseable que una población de BRS se desarrolle en la biopelícula, para producir el sulfuro. En un sistema de cultivo continuo alimentado con una fuente única de nutrición y parámetros de operación constantes, la competencia entre las especies podría tender a reducir la diversidad de las mismas. Sin embargo, especies fisiológicamente competidoras pueden coexistir si ocupan diferentes nichos. Celis *et al.* (2009) han señalado que la composición de la comunidad microbiana influye en la estabilidad y el rendimiento de los reactores anaerobios, de ahí la importancia de entender a estos consorcios. La caracterización microbiana de la biopelícula puede ayudar a conseguir un buen funcionamiento del reactor. Una técnica de gran alcance que ayuda a caracterizar toda la comunidad es la DGGE con el gen ARNr 16S como blanco.

La técnica molecular de PCR-DGGE fue aplicada a las muestras tomadas de las diferentes zonas de los reactores (inferior, media y superior o 1, 2 y 3) con el objetivo de determinar si los t_R observados respondían sólo a la cantidad de biomasa adherida o si además existían variaciones en la composición de la comunidad bacteriana presente en la biopelícula que influenciaban la efectividad de los soportes. La Figura 4.14 muestra los geles de DGGE correspondientes al dominio Bacteria de la biomasa inmovilizada sobre los soportes en las zonas 1, 2 y 3 de cada RLEFA. Se observan al menos 30 bandas identificables en todas las muestras. Se registró en los patrones de bandas variabilidad entre soportes (como ya se había observado en el estudio preliminar del Capítulo 3) y entre las distintas zonas de los reactores. Además, se pudo apreciar que las muestras pertenecientes al sistema con P poseían comunidades bacterianas más ricas que los otros soportes, presentando mayor cantidad de bandas diferenciadas, en especial en las zonas inferiores y media. Algunas especies pudieron ser encontradas sólo en algunas muestras, como la población representada por la banda A de la zona media de la P. Algunos microorganismos fueron más favorecidos en algunos reactores, como el indicado por la flecha B para el reactor con P. Otros predominaron sobre una población, como la banda C en la zona superior de la P.



El dendrograma obtenido a partir del gel de DGGE se da en la Figura 4.14, donde se ilustra que el consorcio presente en las tres zonas del reactor de CV y de PV son las más similares entre sí (coeficiente de Dice 65 % y 69 %, respectivamente); mientras que la zona inferior de EP presenta un consorcio diferente al del resto del reactor y la P (el soporte con mayor biomasa adherida y menor $t_R^{\text{mínimo}}$) en su zona superior es el consorcio más diferenciado de todos los estudiados (23 %). Estas diferencias en la

composición de los consorcios bacterianos y en la cantidad de biomasa inmovilizada a lo largo de las columnas evidencia el comportamiento fluidodinámico tipo flujo pistón, como fue indicado inicialmente por la determinación del módulo de dispersión axial.

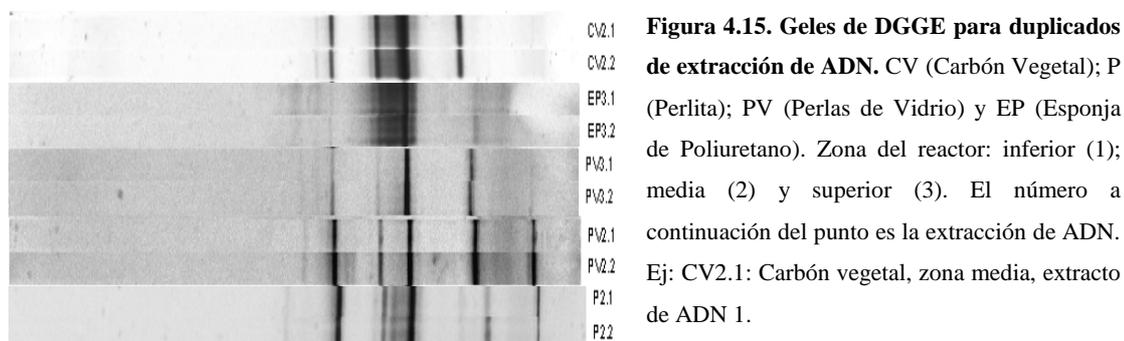


Figura 4.15. Geles de DGGE para duplicados de extracción de ADN. CV (Carbón Vegetal); P (Perlita); PV (Perlas de Vidrio) y EP (Esponja de Poliuretano). Zona del reactor: inferior (1); media (2) y superior (3). El número a continuación del punto es la extracción de ADN. Ej: CV2.1: Carbón vegetal, zona media, extracto de ADN 1.

La robustez del análisis se constata en los patrones de bandas muy similares o idénticos obtenidos para los duplicados de las extracciones de ADN. En la Figura 4.15 se muestran algunas de estas réplicas para las cuales el coeficiente de Dice fue del 100 %.

Distintos trabajos aplican el ensayo de PCR-DGGE para analizar el efecto de distintas variables sobre los consorcios microbianos inmovilizados en biorreactores sulfidogénicos. Sahinkaya *et al.* (2007) realizaron ensayos utilizando dicha técnica para detectar cambios temporales en los consorcios formados sobre silicato en un RLFFA. Por otro lado, Lima de Oliveira *et al.* (2009) aplicaron la misma herramienta sobre las biopelículas desarrolladas sobre arcilla expandida, esponja de poliuretano y carbón en reactores de lecho fijo. Estos autores demostraron que el tipo de soporte influía la composición de la comunidad microbiana, en analogía con los resultados encontrados aquí.

4.3.6. Composición de los consorcios bacterianos (qPCR - FISH)

El estudio de la composición cuantitativa de la comunidad es esencial para una mejor comprensión de la ecología de la reducción de sulfato. La qPCR es ideal para el análisis cuantitativo de las estructuras de la comunidad microbiana, en el que varios grupos de bacterias se pueden cuantificar.

La enumeración de bacterias totales por qPCR mediante el uso del par de cebadores U1040f y U1402r se realizó mediante curvas estándar cuyo rango de cuantificación lineal fue de 10^2 a 10^8 copias por PCR; el coeficiente de regresión lineal (R^2) fue de al menos 0,93 y la eficiencia de amplificación (E) 104 % (Figura 4.16). Zammit *et al.* (2008) obtuvieron para estos mismos cebadores una E entre 102 y 98 %, y un R^2 entre 1,00 y 0,98. Stubner (2002) obtuvo una E entre 121 y 133 % para diferentes cebadores que amplificaban el ARNr 16S.

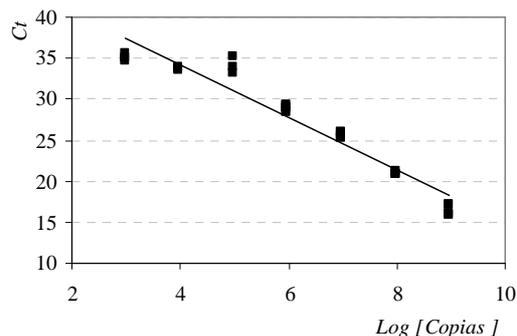


Figura 4.16. Curva de calibración para cuantificación de las copias del gen ARNr 16S de eubacterias totales. $Y = -3,214 X + 47,032$; $R^2 = 0,93$.

La amplificación de las diluciones seriadas 1/10 de los extractos de ADN de los soportes mostró que todas las matrices presentaron inhibición en las muestras sin diluir (inhibición completa de la PCR o un incremento en el C_t) y un incremento lineal en el C_t en la gráfica logarítmica de las diluciones entre 1/10 y 1/10³ con una E apropiada (Figura 4.17). Estas últimas diluciones fueron las utilizadas para la cuantificación.

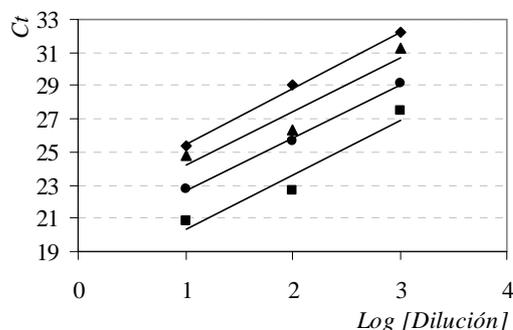


Figura 4.17. Inhibición de la PCR determinada por la E de las diluciones seriadas de los extractos de ADN de cada soporte. Pendiente de la recta (m), eficiencia (E) y R^2 para cada ensayo: Perlita (P - rombos), $m = 3,39$, $E = 102,1\%$, $R^2 = 0,98$; Carbón Vegetal (CV - cuadrados), $m = 3,29$, $E = 99,1\%$, $R^2 = 0,94$; Perlas vidrio (PV - triángulos), $m = 3,22$, $E = 97,0\%$, $R^2 = 0,91$; y Esponja de Poliuretano (EP - círculos), $m = 3,16$, $E = 95,2\%$, $R^2 = 1,00$.

La primera derivada de las curvas de disociación generó sólo un máximo a 84 - 86 °C para el ADN estándar y para las muestras extraídas de los soportes, lo que refiere que la señal obtenida correspondió al amplicón deseado y no a un artefacto o producto de amplificación inespecífico. Un ejemplo de esto se muestra en la Figura 4.18 para PV y para los estándares de la curva de calibración. Una electroforesis en gel de agarosa confirmó el tamaño correcto de los amplicones (362 pb).

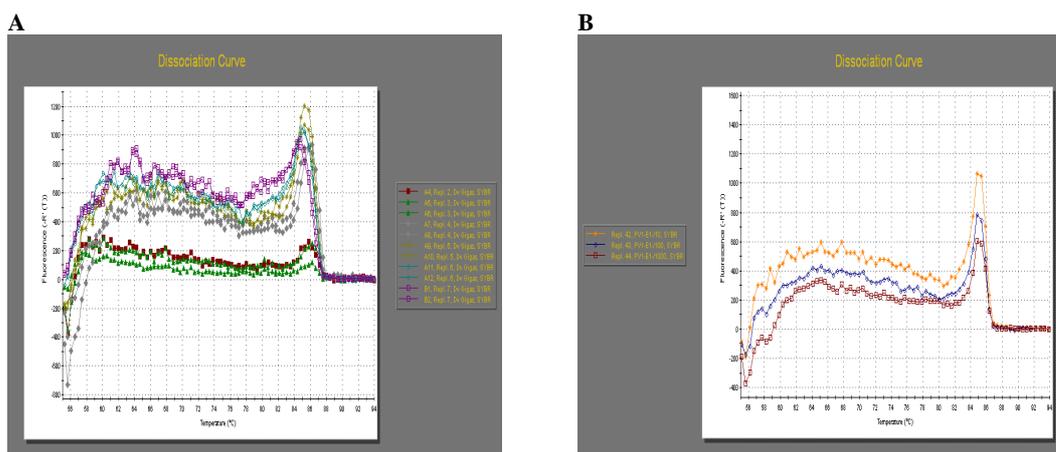


Figura 4.18. Primera derivada de las curvas de disociación para el ensayo de qPCR para Eubacterias totales.
A. *Desulfovibrio gigas* Le Gall (estándar); **B.** Extractos de ADN de PV a diferentes diluciones 1/10 a 1/10³ (naranja, azul y rojo respectivamente).

Las dos extracciones de ADN de cada muestra no tuvieron diferencias significativas en base a la prueba-t de comparación de medias ($\alpha < 0.05$), por lo que se utilizaron para calcular las medias y los errores estándar. La cantidad de copias del gen ARNr 16S de bacterias totales por mL de lecho promedio en cada reactor fue de: P $6,6 \cdot 10^{11}$ copias/mL; CV $1,9 \cdot 10^{10}$ copias/mL; EP $3,7 \cdot 10^9$ copias/mL y PV $1,8 \cdot 10^9$ copias/mL (Tabla 4.4). Además, las tres zonas de cada reactor contuvieron distintas cantidades de copias por mL (Figura 4.21). El orden relativo de adhesión celular entre los distintos soportes y entre las diferentes zonas de cada reactor fue comparable con el obtenido por cuantificación de proteínas adheridas (Figura 4.13). La cantidad de microorganismos inmobilizados fue superior al reportado por Dar *et al.* (2007b), los cuales cuantificaron mediante técnicas de cultivo tradicionales 10^8 bacterias por mL de lecho en un UASB.

El rango de cuantificación lineal de las curvas estándar utilizadas para cuantificar las copias del gen ARNr 16S de BRS totales (mediante los cebadores 385f y 907r) fue desde 10^6 a 10^{10} copias por PCR (Figura 4.19). El coeficiente de regresión lineal (R^2) para las curvas de calibración para todas las qPCR realizadas fue de al menos 0,98 y la E 100,2 %. La temperatura de fusión observada para los estándares de

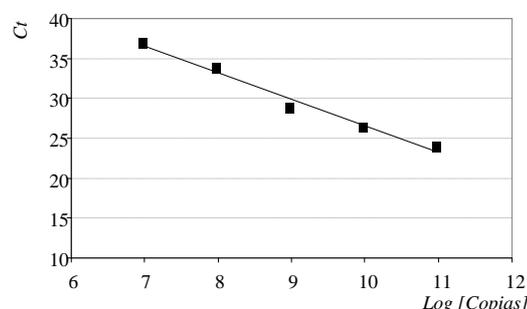


Figura 4.19. Curva de calibración para la cuantificación de las copias del gen ADNr 16S de BRS totales. $Y = -3,257 X + 59,833$; $R^2 = 0,98$.

la curva de calibración fue 75 a 77 °C (Figura 4.20.A). Para la mayor parte de las muestras, se conservó esta temperatura (Figura 4.20.B). Sin embargo, las curvas de disociación de algunas de las muestras mostraron picos poco definidos (Figura 4.20.C). No obstante, una electroforesis en gel de agarosa confirmó que el producto de PCR era del tamaño correcto (540 pb). Esto pudo ser consecuencia de las diferentes temperaturas de disociación causadas por las variaciones de las secuencias del gen ARNr 16S, reportado por Zammit *et al.* (2008) como promotoras de varios picos en las curvas de disociación pero de un único tamaño de amplicón, descartando artefactos como los dímeros de cebadores. Estos autores realizaron dichas observaciones con cebadores que amplificaban el primer tercio del gen ARNr 16S, mientras que el par U1040f y U1402r no mostraba estas ambigüedades; concluyendo que las variaciones de secuencia se hallan en las primeras 1040 pb del gen ARNr 16S, dentro del cuál amplifican los cebadores 385f y 907r. Stubner (2002) obtuvo curvas de amplificación poco definidas para todas las muestras ambientales ensayadas pero un tamaño de amplicón único, y atribuyó este hecho a la variabilidad de secuencias, a pesar de que estudió el segundo y último tercio del gen ARNr 16S.

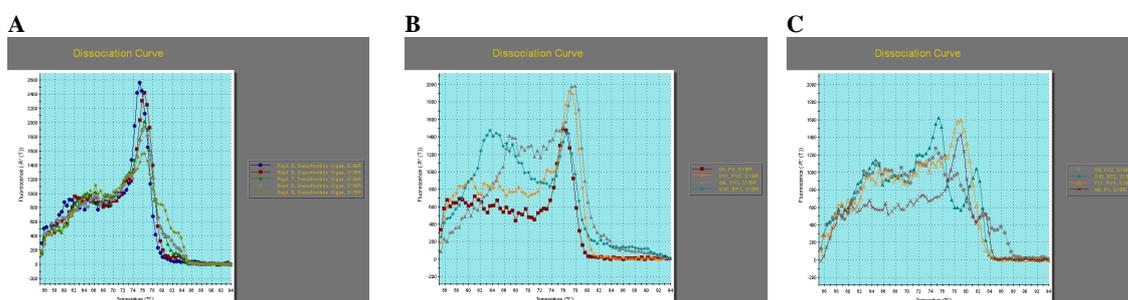


Figura 4.20. Primera derivada de las curvas de disociación para el ensayo de qPCR para cuantificación de BRS. A. *Desulfovibrio gigas* Le Gall (estándar); **B.** Extractos de ADN de P, PV, CV y EP (rojo, naranja, gris y verde, respectivamente) con picos de disociación definidos; **C.** Extractos de ADN de P, PV, CV y EP (rojo, naranja, gris y verde, respectivamente) con curvas de disociación indefinidas.

El ensayo específico para BRS obtuvo un número de copias promedio en cada reactor de $7,96 \cdot 10^{11}$, $6,70 \cdot 10^8$, $6,31 \cdot 10^8$ y $1,24 \cdot 10^9$ por mL de soporte en P, CV, EP y PV, respectivamente (Tabla 4.4). El ensayo de qPCR desarrollado se utilizó para enumerar e identificar los cambios en la población de BRS en los diferentes reactores, mediante la cuantificación de BRS en relación a la cantidad de bacterias totales. La normalización constituye un medio para evaluar el nivel de BRS proporcional al tamaño de la población total. La abundancia relativa en comparación al número de copias del gen ARNr 16S de bacterias totales promedio dentro de cada reactor fue 100 %

(resultado mayor de 100 debido al error del ensayo); 4 %; 17 % y 70 % para P, CV, EP y PV, respectivamente (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Resultados obtenidos para los RLEFA rellenos con los distintos soportes.

Parámetros	P	CV	EP	PV
$t_{R\text{ mínimo}}$ (h ⁻¹)	3,0	4,2	9,9	8,5
r_{SO_4} (g/L.h)	0,6	0,4	0,2	0,2
Fracción hueca (%)	67	57	91	41
Área superficial (m ² /mL)	0,3381	nd	0,6541	0,0018
Proteínas adheridas (g/L)	0,52	0,24	0,04	0,02
Bacterias totales (copias/mL)	$6,6 \cdot 10^{11}$	$1,9 \cdot 10^{10}$	$3,7 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^9$
BRS totales (copias/mL)	$8,0 \cdot 10^{11}$	$6,7 \cdot 10^8$	$6,3 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^9$
% BRS	100 ^A	4	17	70

^A Porcentaje mayor de 100 debido al error del ensayo; nd: no fue posible realizar la determinación.

El número de copias del gen ADNr 16S de BRS cuantificados en cada zona de los reactores se representan junto al número de copias del gen de bacterias totales en la Figura 4.21. Se observó que la EP presentó una baja proporción de BRS, lo que explica la poca productividad del reactor relleno con dicho soporte. Por otro lado, el CV presentó también una baja proporción de BRS, pero esto se compensa con la mayor cantidad de biomasa adherida.

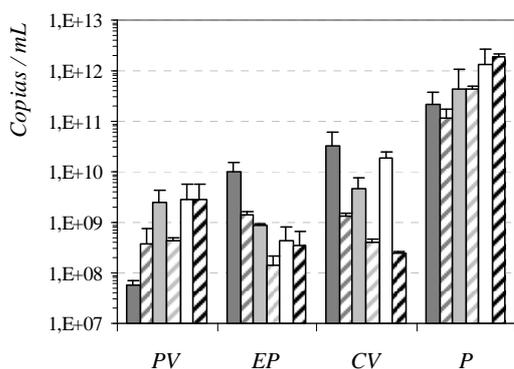


Figura 4.21. Cuantificación del número de copias del gen ARNr 16S de bacterias totales y de BRS adheridas por volumen de lecho a los diferentes soportes en las tres zonas de los reactores usando el ensayo qPCR con SYBR Green. Medias de los triplicados de qPCR y los duplicados de las extracciones de ADN. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias. CV (Carbón Vegetal); P (Perlita); PV (Perlas de Vidrio) y EP (Esponja de Poliuretano). Zona del reactor: inferior (1, barras gris oscuro); media (2, barras gris claro) y superior (3, barras blancas). Las barras lisas corresponden a las bacterias totales y las ralladas adyacentes a las BRS.

Pereyra *et al.* (2008) observaron que a pesar de la alta reproducibilidad determinada para la técnica de qPCR, las réplicas biológicas presentaban diferencias estadísticamente significativas. Schmidtova y Baldwin (2011) observaron una relación directa entre el porcentaje de BRS sobre la población total (determinado por qPCR) con la velocidad de reducción de sulfato de un consorcio bacteriano. Silva *et al.* (2006), que compararon RLE rellenos con distintos materiales, observaron mediante FISH altas proporciones de BRS (55 y 45 %) en sistemas empacados con CV y EP que reducían eficientemente sulfato (0,03 y 0,02 g/L.h). Estos mismos materiales inmovilizaron, en

este estudio, sólo el 4 y 17 %, respectivamente. Dar et al. (2007b) reportaron un 50 % de BRS sobre bacterias totales para un UASB. Venkata Mohan *et al.* (2005) observaron sólo un 14 % en un RLFFA, pero en base a técnicas dependientes de cultivo (Tabla 4.3). Por otro lado, los resultados de cuantificación de copias del gen ARNr 16S pueden ser recalculados como bacterias/mL de soporte asumiendo que el número de copias promedio del gen en bacterias es 3,6 (Klappenbach *et al.*, 2001) y considerando como modelo a *Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris* cuyo número de copias es 5 (Muyzer y Stams, 2008). Con esta consideración, los porcentajes calculados en base a las bacterias por volumen de lecho son menores a los calculados en base a las copias del gen ARNr 16S.

Estudios anteriores utilizaron la qPCR como método de cuantificación de BRS totales utilizando como diana el gen *dsr* (Schmidtova y Baldwin, 2011; Ben-Dov *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Kock y Schippers, 2008; Kondo *et al.*, 2008) y de diferentes grupos taxonómicos de BRS (Stubner, 2002, 2004; Pereyra *et al.*, 2008) en relación a las Eubacterias totales, ambos detectados por el gen ARNr 16S; sin embargo, la técnica desarrollada en este capítulo utiliza sólo el gen ARNr 16S para estimar la población de BRS totales y la de Eubacterias. Además, la aplicación del sistema de detección con SYBR Green libera la necesidad de utilizar sondas específicas para la detección de amplicones, para lo cuál se requiere conocer la secuencia completa del gen ARNr 16S.

La técnica FISH fue empleada en diversos estudios para identificar BRS en biopelículas formadas en reactores de células inmovilizadas (Amann *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 2006; Dar *et al.*, 2007b, 2008). Esta práctica puede emplearse de forma complementaria a la de qPCR, tal como lo hicieron Kock y Schippers (2008). Con este objetivo, se aplicó FISH sobre los soportes de las diferentes zonas de los reactores con P y CV, usando sondas para detectar Eubacterias totales (EUB338), Arqueas (ARCH915) y BRS totales (SRB385); además de una sonda para determinar la hibridación inespecífica (NON338) y DAPI para observar las células totales. Las imágenes conseguidas se exponen en la Figura 4.22 y 4.23.

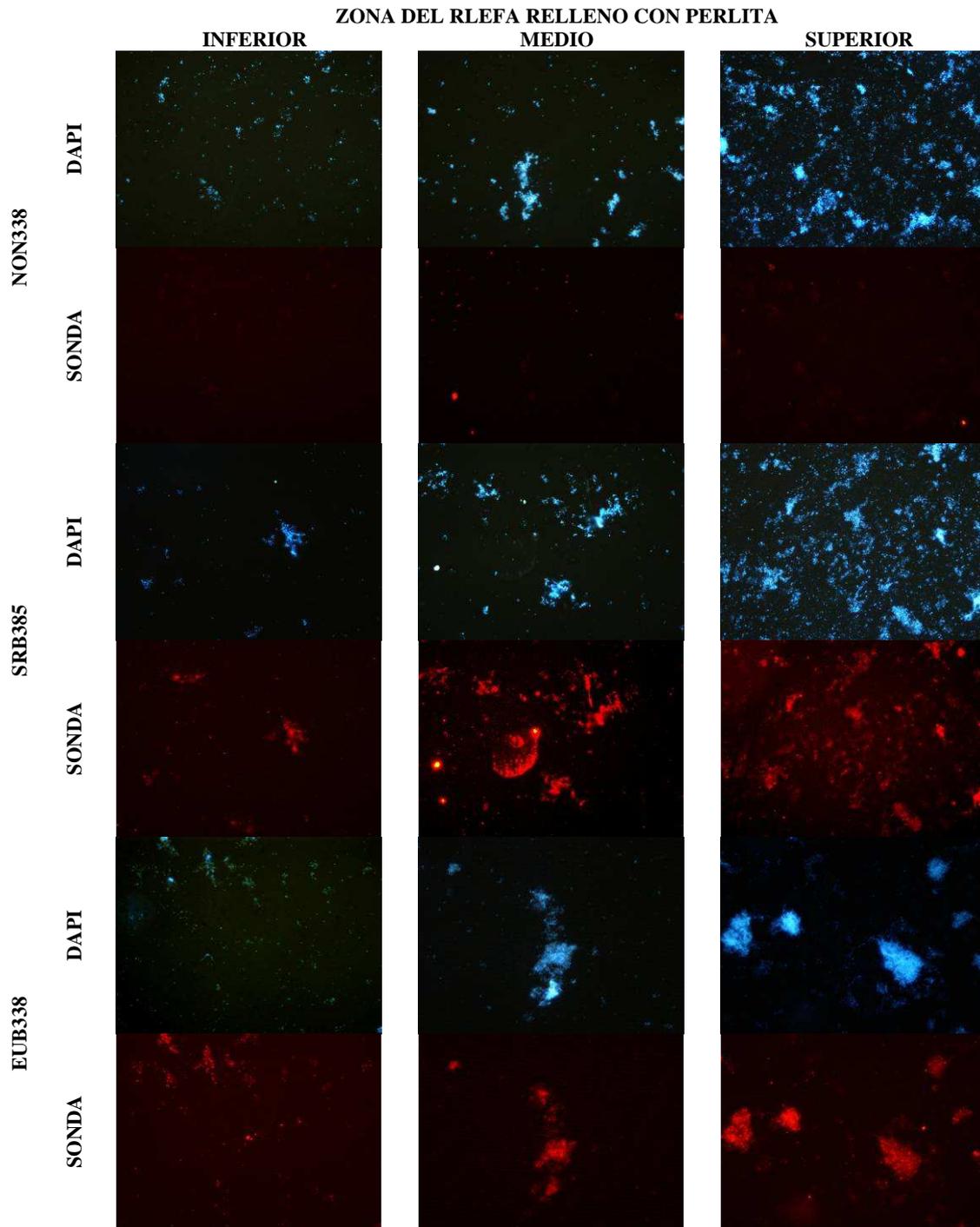


Figura 4.22. Hibridación *in situ* de la biopelícula formada sobre perlita en las diferentes zonas del RLEFA (inferior, medio y superior) con las sondas NON338 (hibridación inespecífica), SRB385 (específico para BRS), ARCH915 (específica para arqueas) y EUB338 (específica para eubacterias) marcadas con Cy3 (color rojo) y tinción de DAPI (color azul) para observar las células totales. 400X.

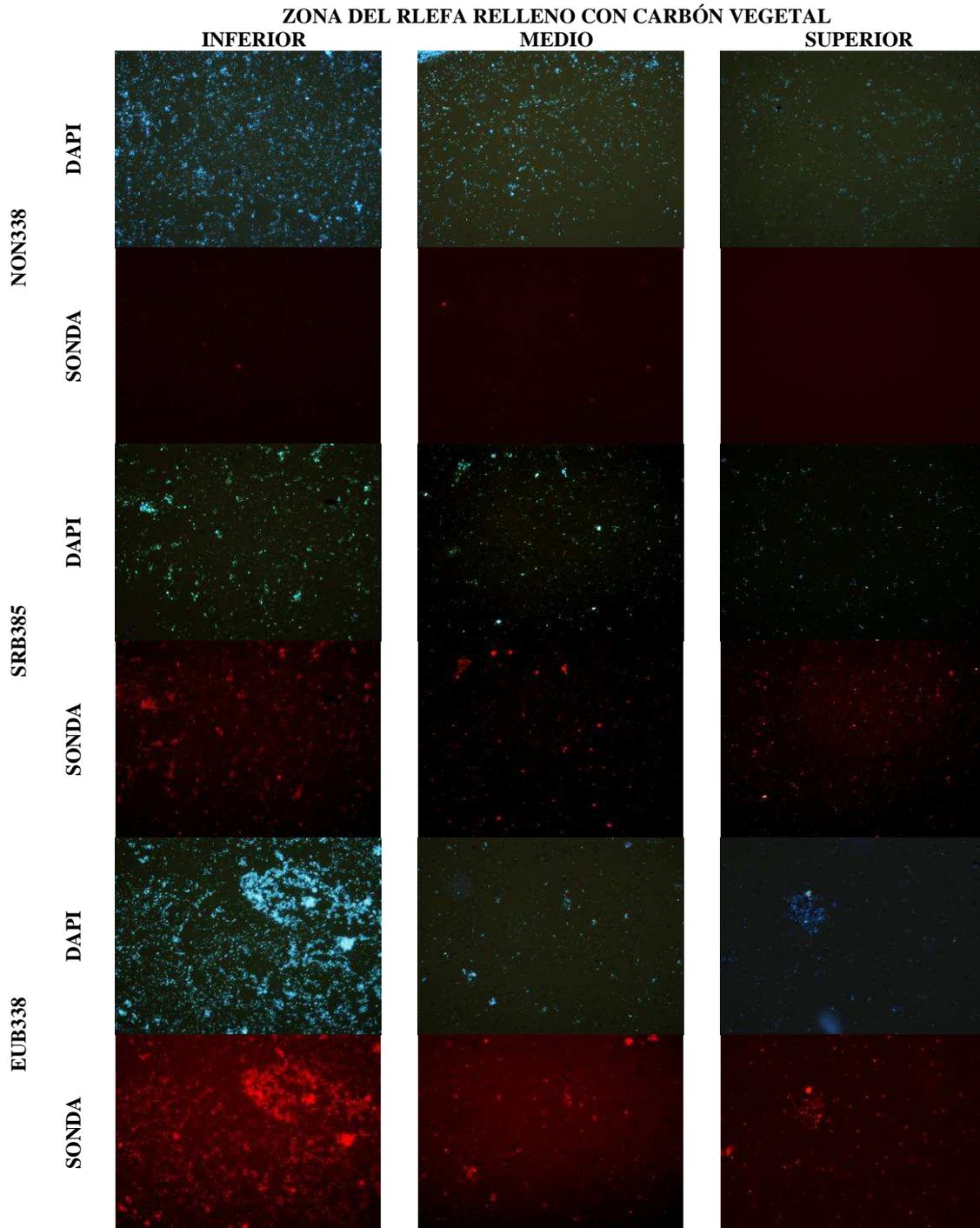


Figura 4.23. Hibridación *in situ* de la biopelícula formada sobre carbón vegetal en las diferentes zonas del RLEFA (inferior, medio y superior) con las sondas NON338 (hibridación inespecífica), SRB385 (específico para BRS), ARCH915 (específica para arqueas) y EUB338 (específica para eubacterias) marcadas con Cy3 (color rojo) y tinción de DAPI (color azul) para observar las células totales. 400X.

Con respecto al comportamiento de las sondas, se observó que SRB385 y NON338 generaban algunas zonas de hibridación inespecífica que no presentaba tinción con DAPI. Por otro lado, la sonda ARCH915 no presentó hibridación en ninguna de las muestras. Se pudo observar que P poseía mayor cantidad de bacterias totales que CV;

sobre todo en la zona superior del reactor, lo cuál se cuantificó por qPCR y por la determinación de proteínas adheridas a P. Además, cualitativamente, la proporción de BRS sobre las bacterias totales resultó superior en el caso de la P, tal como se determinó por qPCR.

4.4. Conclusión

Todos los RLEFA fueron operados a t_R superiores al del cultivo con células libres y lograron mayores r_{SO_4} .

Los $Y_{SO_4/S}$ fueron similares para los soportes individuales a los diferentes caudales de alimentación, entre los cuatro sistemas de lecho fijo y al obtenido para el cultivo en lote con células en suspensión. El $Y_{P/S}$ para los cuatro soportes a t_R altos fue similar al obtenido en cultivo en lote con células en suspensión. Sin embargo, para todos los soportes el $Y_{P/S}$ aumentó al disminuir el t_R , sugiriendo que en los consorcios iniciales estaban presentes bacterias consumidores de ácido acético que no resistieron elevados caudales de alimentación.

El cultivo en RLEFA empaquetado con P fue el sistema de cultivo que permitió menor $t_R^{\text{mínimo}}$ y una mayor r_{SO_4} . La productividad superior de P se debió no sólo a la alta cantidad de biomasa adherida sino que además la estructura del consorcio microbiano de la biopelícula formada sobre P se diferenció de los formados sobre otros soportes y presentó la mayor proporción de BRS con respecto a las bacterias totales. Estos resultados fueron correctamente aproximados por los ensayos efectuados en el Capítulo 3.

Capítulo 5

Reactor de lecho fluidizado de flujo descendente

Los biorreactores sulfidogénicos con células inmovilizadas pueden ser de una etapa (el sulfuro de metal precipitado se mantienen en el biorreactor junto con la biomasa) o dos etapas (la producción de sulfuro y los procesos de precipitación se separan para permitir la recuperación de metal). El reactor de lecho fluidizado con flujo descendente (RLFFD) es un proceso de una etapa en la que el soporte de inmovilización flota en la parte superior del reactor y se fluidiza por el caudal descendente y la recirculación del efluente. Los precipitados de sulfuro metálico se depositan en el fondo del reactor separado de la biomasa, permitiendo su recuperación e impidiendo la oclusión del reactor. Adicionalmente, el diseño del RLFFD permite el tratamiento de aguas residuales ácidas y con inhibidores celulares como las altas concentraciones de metales pesados y el H_2S generado por las BRS.

En este trabajo se evaluaron perlita (P) y bolitas de polipropileno (PP) como matrices de inmovilización en reactores de flujo descendente (RFD) sin recirculación en una etapa (el soporte de inmovilización flota en la parte superior del reactor y el caudal provoca una leve expansión del lecho) y en RLFFD, alimentados con soluciones ácidas de Cu(II). Se estudiaron el tiempo de residencia mínimo ($t_R^{\text{mínimo}}$), la velocidad volumétrica de reducción de sulfato (r_{SO_4}), de consumo de lactato (r_S), de precipitación de Cu(II) (r_{PP}) y la estequiometría de los procesos. Además, se analizó la biopelícula formada en los RFD caracterizando la comunidad bacteriana presente (FISH y MEB) y cuantificando la cantidad de biomasa inmovilizada.

El RFD con P obtuvo un $t_R^{\text{mínimo}}$ menor y una r_{SO_4} mayor con respecto a PP (y similares al RLEFA del Capítulo 4 relleno con el mismo material) debido a que permitió inmovilizar mayor cantidad de biomasa, a pesar de que la proporción de BRS sobre las bacterias totales fue similar en ambos RFD. Por otro lado, mientras que el RLFFD con P no pudo aplicarse (ya que el material decantó por efecto de la fluidización) el RLFFD con PP permitió velocidades volumétricas menores que el RFD relleno con el mismo material.

5.1. Objetivo

- Operar reactores de flujo descendente (RFD) en una etapa sin recirculación con P y PP como materiales de soporte para estudiar la productividad de reducción de sulfato y de precipitación de Cu(II). Estudiar la biopelícula formada sobre cada matriz de inmovilización.
- Utilizar reactores de lecho fluidizado de flujo descendente (RLFFD) con P y PP para remediar agua residual ácida sintética conteniendo altas concentraciones de Cu(II).

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. *Inóculo y medios de cultivo*

El inóculo utilizado fue el consorcio *R* de BRS enriquecido de los sedimentos del efluente de una curtiembre del Río Luján en el Capítulo 2.

5.2.2. *Propiedades físicas de los materiales de inmovilización*

Los materiales usados para estos ensayos fueron perlita (P) y perlas de polipropileno (PP). La P fue preparada como se describe en la Sección 3.2.2 con un tamaño de partícula entre 2,0 mm y 1,19 mm. La densidad aparente del PP se determinó como se describe en la Sección 3.2.2 y el tamaño de partícula medio se midió con un calibre.

5.2.3. *Reactor de flujo descendente (RFD)*

5.2.3.1. Determinación del $t_R^{\text{mínimo}}$

Los RFD se hicieron con columnas de vidrio (ϕ , 4 cm, H, 21 cm) con un puerto superior, dos laterales y un fondo cónico para la colección de los precipitados de sulfuro metálico. La Figura 5.1 muestra un diagrama esquemático del montaje experimental utilizado. En este experimento no se utilizó la recirculación del medio de cultivo para la fluidización del reactor, sólo se aplicó el caudal de alimentación descendente para lograr la separación del sulfuro metálico. El biorreactor se llenó con 125 mL (50 % del volumen total del reactor) de la matriz de inmovilización designada y se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121 °C. Los ensayos fueron realizados con medio de cultivo sintético Postgate G (Tabla 2.4) a pH 7,0. El medio líquido estéril se introdujo en el reactor mediante una bomba peristáltica junto con 100 mL de inóculo, luego de lo cual se permitió la inmovilización pasiva de la biopelícula y se operó el reactor tal como se describe en la Sección 4.2.3.4, para lo cual se supuso que la condición de estado estacionario se estableció durante un período de funcionamiento igual a cuatro veces el t_R .

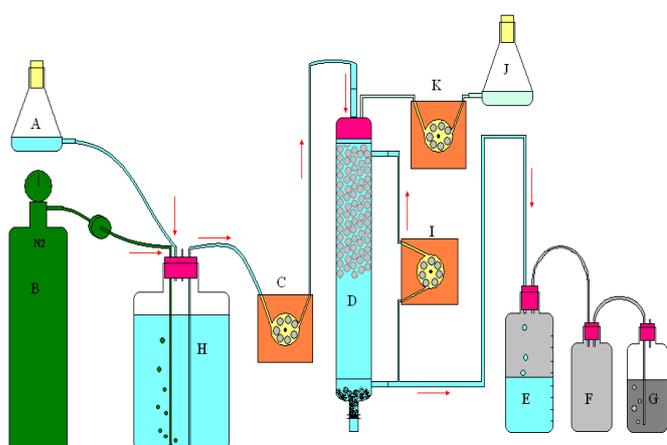


Figura 5.1. Diagrama esquemático del proceso. A. Erlenmeyer de salida lateral para integrar el medio de cultivo; B. Nitrógeno con filtro de 0.22 μm ; C. Bomba peristáltica; D. Reactor conteniendo el soporte; E. Recipiente colector; F. Trampa; G. Recipiente con Fe(II) para capturar el H_2S en fase gaseosa; H. Reservorio de medio de cultivo fresco; I. Bomba para recirculación; J. Reservorio con metales pesados; K. Bomba peristáltica para alimentación con metales pesados.

Se tomaron muestras diariamente del puerto efluente y fueron analizadas para determinar concentraciones de sulfato, lactato y acetato. Los valores medios de los datos en el estado estacionario para los regímenes de carga volumétrica correspondientes se utilizaron para determinar el $t_R^{\text{mínimo}}$, los rendimientos $Y_{\text{SO}_4/\text{S}}$ e $Y_{\text{P}/\text{S}}$, los porcentajes de consumo de los sustratos y las velocidades r_{SO_4} y r_{S} según se detalla en la Sección 4.2.3.4.

5.2.3.2. Determinación de la velocidad volumétrica de precipitación de cobre

Se operó el RFD para remediar una solución de alrededor de 0,5 g/L de Cu(II) y pH 5,0 (esterilizada mediante filtración con una membrana de 0,22 μm) alimentada por un puerto independiente al puerto de alimentación de medio de cultivo, mediante una aguja que inyectaba la solución metálica en la zona donde terminaba el lecho. La alimentación de medio de cultivo se mantuvo constante al caudal (Q) establecido por el $t_R^{\text{mínimo}}$ y el caudal de alimentación de la solución de cobre (Q_{metal}) se aumentó gradualmente hasta detectar la presencia de Cu(II) en el efluente. A partir de estos datos se calcularon el porcentaje de precipitación de cobre y la velocidad volumétrica de precipitación (r_{PP} , mmol/L.h) a dicho Q_{metal} . Finalizado el ensayo se retiró de la columna el material soporte conteniendo la biopelícula y se utilizó para determinar la biomasa adherida y observar la biopelícula microscópicamente (FISH, MEB).

5.2.3.3. Determinación de proteínas

La concentración de biomasa adherida al lecho de P y PP se estimó según se describe en la Sección 3.2.5.

5.2.3.4. FISH

Se lavaron muestras de soporte de inmovilización de los reactores rellenos con P y PP con PBS estéril y 1 mL de cada soporte fue tratado con ultrasonido durante 10 minutos con 1 mL de PBS estéril para desprender la biopelícula. Las células así obtenidas fueron fijadas según la Sección 2.2.6.1. Los oligonucleótidos marcados con Cy3 usados para la hibridación junto con el protocolo de hibridación y tinción con DAPI se describen en las Secciones 4.2.9.2 y 4.2.9.3.

5.2.3.5. Microscopía electrónica de barrido

La efectiva formación de la biopelícula sobre la superficie del PP se examinó por microscopía electrónica de barrido (MEB) según se describe en la Sección 4.2.5. Se utilizaron como testigos de referencia partículas sin biopelícula adherida.

5.2.4. Reactor de lecho fluidizado de flujo descendente (RLFFD)

El RLFFD utilizado fue similar al del ensayo 5.2.3.1 pero más pequeño (ϕ , 4 cm, H, 15 cm). El mismo fue relleno con un volumen menor de soporte (equivalente a un 15 % del volumen total del reactor) y se recirculó el efluente con un caudal mayor a 200 mL/h; logrando expandir el lecho levemente (menos del 10 %) de modo de homogenizar el líquido dentro del reactor y permitir que el precipitado de sulfuro metálico decantase y pudiese ser recogido por la base del reactor. La esterilización e inoculación de los biorreactores fue idéntica al ensayo de la Sección 5.2.3.1, utilizando en estos pasos medio sintético Postgate G (Tabla 2.4) a pH 7,0. Luego de la formación de la biopelícula, la alimentación se realizó con un agua residual sintética de pH ácido (3,5) y alto contenido de Cu(II) (alrededor de 0,6 g/L), características similares a las de un drenaje ácido de minas (DAM). La concentración de cobre en relación a la de lactato (sustrato limitante del crecimiento) utilizadas en el residuo líquido sintético y la velocidad volumétrica de administración de dichos compuestos se calcularon a partir de los ensayos de precipitación de la Sección 5.2.3.2, de modo que el sulfuro generado fuese equimolar a la cantidad de cobre presente. La composición del residuo líquido sintético se basó en la del medio Postgate G (Tabla 5.1). El mismo se suplementó con un coagulante con el objetivo de promover la decantación de los precipitados de sulfuro de cobre.

Tabla 5.1. Residuo líquido sintético.

Sustancia	Cantidad (por litro)
NaCl	1,20 g
KCl	0,30 g
NH ₄ Cl	0,30 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,40 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,15 g
KH ₂ PO ₄	0,31 g
Lactato de sodio	5,60 g
Na ₂ SO ₄	4,20 g
CuCl ₂ ·2H ₂ O ^A	1,65 g
Solución de anaerobiosis ^{A, B}	5,0 mL
Solución de vitaminas ^{A, B}	1,0 mL
Solución de microelementos ^B	1,0 mL
Solución de selenito ^B	1,0 mL
Coagulante ^A	0,5 mL
pH	3,5

^A Esterilizado por separado, mediante filtración; ^B Tablas 2.3, 2.5, 2.6 y 2.7.

El caudal de alimentación fue constante y determinado por el $t_R^{\text{mínimo}}$ calculado previamente para cada soporte. Se tomaron muestras diariamente del puerto efluente y fueron analizadas para determinar concentraciones de sulfato, cobre en solución, lactato y acetato en el estado estacionario. Dichos datos se utilizaron para calcular las

velocidades volumétricas y los porcentajes de precipitación de cobre y de consumo de sulfato y lactato tal como se describió anteriormente.

5.2.5. Métodos analíticos

Se determinaron las concentraciones de sulfato, cobre y ácido láctico y acético según se describe en las Secciones 2.2.5.1, 2.2.5.2 y 2.2.5.3, respectivamente.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. RFD

Las perlas de PP y la P (Figura 5.2) poseían una densidad aparente de 0,92 y 0,16 g/mL, respectivamente; ambas menores a la del agua, lo que permitió que las matrices permanecieran flotando cuando se colocaron en los biorreactores con medio líquido. El tamaño de partícula fue de 4,1 mm y

de 1,19 a 2 mm para PP y P, respectivamente; y la fracción hueca 26 % y 39 %, respectivamente. Ambos reactores se mantuvieron funcionando por un tiempo prolongado (1464 y 792 horas, respectivamente) sin presentar inconvenientes de oclusión ni contaminaciones microbiológicas, demostrando que los sistemas fueron lo suficientemente estables (Figura 5.3). Al t_R inicial, similar para ambos reactores, el tiempo requerido para alcanzar valores de concentración constantes en el efluente fue de 6,4 y 14 veces el t_R , para P y PP, respectivamente.

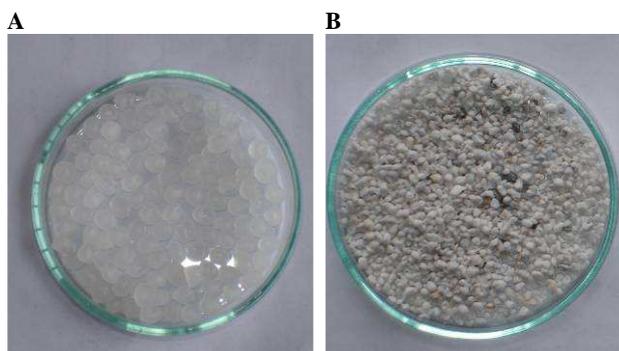


Figura 5.2. Soportes de inmovilización. A. Bolitas de polipropileno (PP); B. Perlita (P).

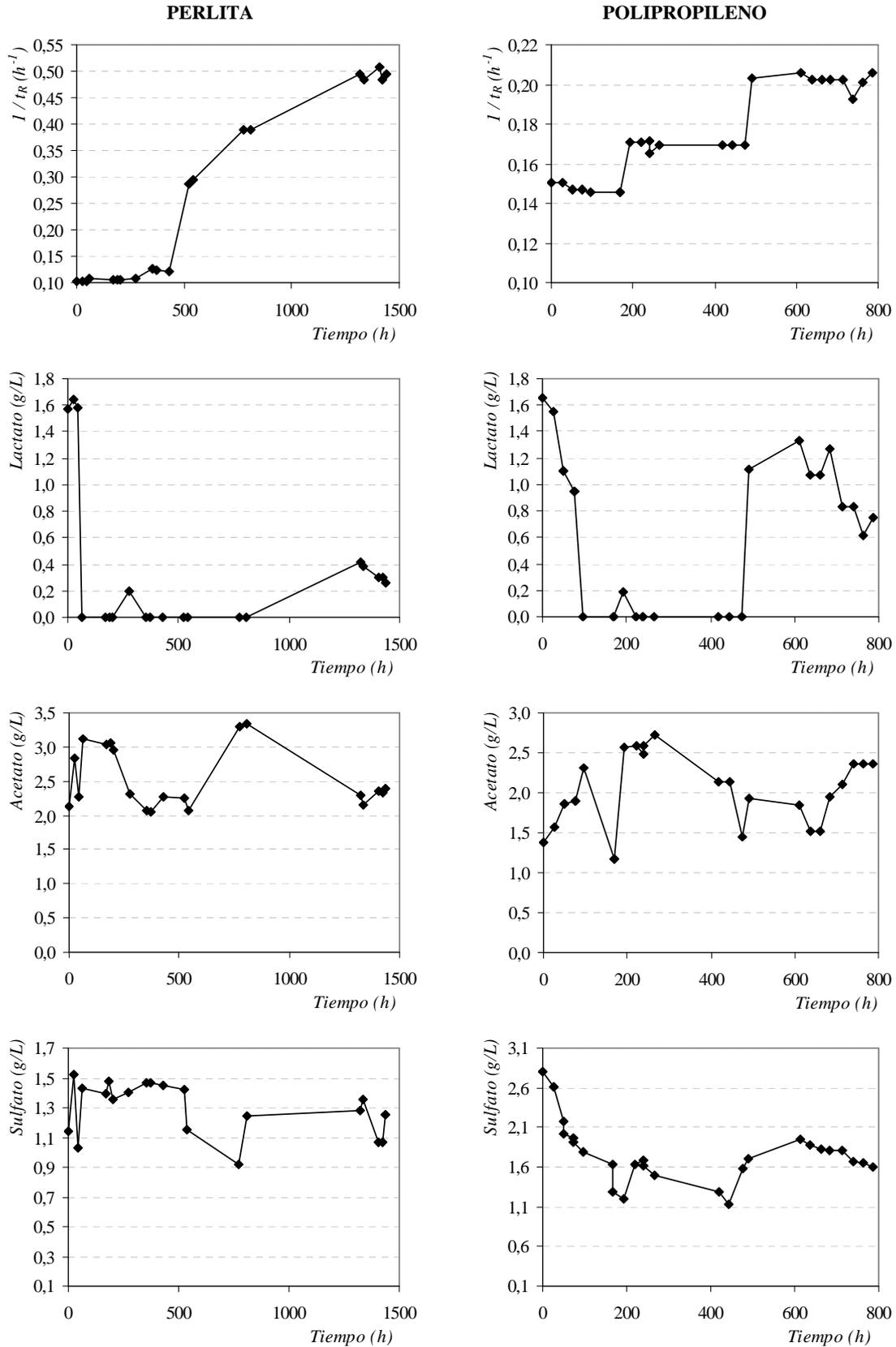


Figura 5.3. t_R aplicados y concentraciones de ácido láctico, acético y sulfato en el efluente de los reactores de flujo descendente rellenos con P y PP en función del tiempo de proceso.

La P resultó el soporte más eficiente con un $t_R^{\text{mínimo}}$ de 2,6 h y una r_{SO_4} de 0,7 g/L.h. Estos valores fueron similares a los obtenidos para el RLEFA empacado con P ensayado en Capítulo 4 (3,0 h y 0,6 g/L.h). Para el PP, el $t_R^{\text{mínimo}}$ fue mayor y el r_{SO_4} menor respecto a la P (5,9 h y 0,3 g/L.h, respectivamente) (Figura 5.4). Algunos experimentos reportados han utilizado RLFFD sulfidogénicos, algunos de los cuales se encuentran detallados en la Tabla 5.2. Se puede observar que los resultados cinéticos obtenidos en este estudio fueron superiores a los de los RLFFD.

Tabla 5.2. Reactores de lecho fluidizado de flujo descendente sulfidogénicos encontrados en la literatura.

Inóculo	Sustrato			Soporte			Biomasa adherida (g/L)	t_R (h)	Sulfato			pH		Referencia	
	Naturaleza	Concentración (g/L)	Remoción (%)	Naturaleza	Diámetro (mm)	Expansión (%)			Concentración inicial (g/L)	Remoción (%)	r_{SO_4} (g/L.h)	Temp. (°C)	Inicial		Final
Efluente de curtiembre	de Lactato	4,5	100	Polipropileno	4,1	-	1,2	5,9	2,8	55	0,3	30	7,0	>7,8	RFD de estudio
			100	Perlita	2,0-1,19	-	6,5	2,6		61	0,7		7,0		
Lodo	Etanol	1	72	Polietileno de baja densidad	0,5-1	25	0,7	48	1,7	22	0,008	25	6,5	7,7	Celis <i>et al.</i> , 2009
	Lactato	2	60												
Efluente de digestor anaeróbico	de Lactato	2 ^A	70	Polietileno de baja densidad	3	30	0,7-1,3	24	1	70	0,030	25	7,0	7,0	Sahinkaya y Gungor, 2010 Villa-Gómez <i>et al.</i> , 2011
Lodo de digestor anaeróbico	de Lactato	5 ^A	34	Cubos de esponja	0,5	15-20	na	12	2	66	0,108	35	5	8	

^A Expresado como g de DQO/L.

Por otro lado, el $Y_{SO_4/S}$ de los dos reactores fue poco variable para los diferentes t_R (P $0,38 \pm 0,04$ g/g y PP $0,40 \pm 0,03$ g/g; los errores corresponden a la desviación estándar entre los diferentes t_R) (Figura 5.4). Estos valores resultaron comparables a los rendimientos reportados para *Desulfovibrio desulfuricans* (0,45 g/g) (Okabe y Characklis, 1992) y a los encontrados en los diferentes RLEFA del Capítulo 4 (en promedio, 0,39 g/g). Paralelamente, los $Y_{P/S}$ presentaron un comportamiento errático en el caso de la P y se mantuvieron constantes para el PP en función del t_R (P $0,64 \pm 0,13$ g/g y PP $0,59 \pm 0,04$); ambos similares a los observados para los RLEFA del Capítulo 4 (0,60 g/g) y al reportado para *Desulfovibrio desulfuricans* (0,63 g/g) (Okabe y Characklis, 1992). Los dos RFD sin recirculación fueron capaces de consumir el 100 % de la fuente de carbono en alguno o varios de los t_R aplicados. El porcentaje de reducción de sulfato máximo fue de 55 % para PP y 61 % para P, ambos inferiores a los observados en los RLEFA (67 %) (Figura 5.4).

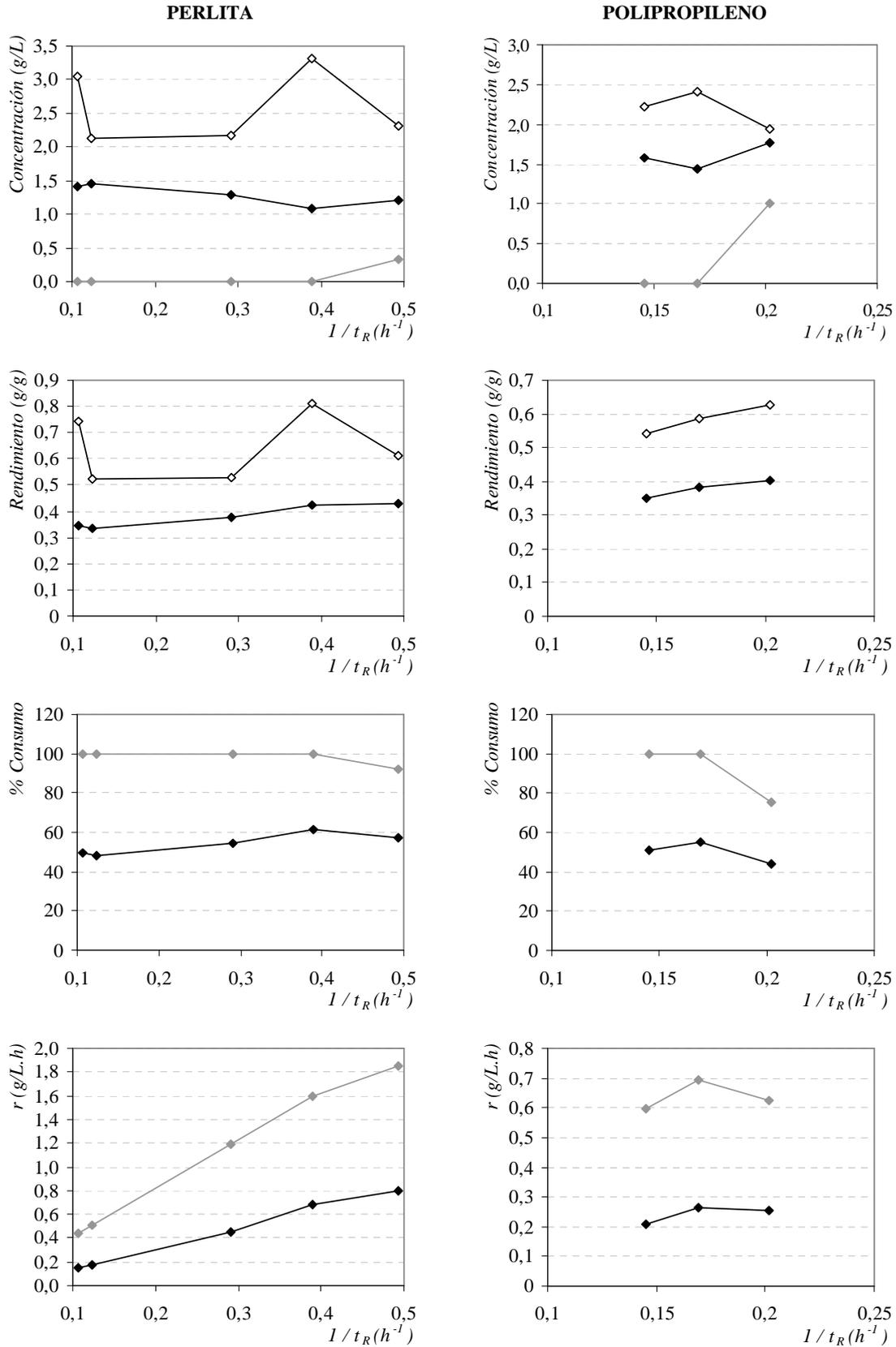


Figura 5.4. Rendimientos, concentraciones de ácido láctico, acético y sulfato en el efluente, porcentajes de consumo y velocidades volumétricas de consumo de láctico y sulfato de los reactores de flujo descendente relleno con P y PP en función del t_R . Lactato, rombos grises; Acetato, rombos vacíos; Sulfato, rombos llenos. Rendimientos: $Y_{P/S}$, rombos vacíos; $Y_{SO_4/S}$, rombos llenos.

Luego, se procedió operar el RFD para remediar un solución de pH 5,0 y 0,5 g/L de Cu(II), donde la alimentación de medio de cultivo se mantuvo constante al caudal establecido por el $t_R^{\text{mínimo}}$ (P 2,6 h; PP 5,9 h) y el caudal de alimentación de la solución de cobre (Q_{metal}) se aumentó gradualmente determinando la velocidad volumétrica de precipitación (r_{PP} , mmol/L.h) máxima de cada sistema a la cuál el porcentaje de precipitación de cobre se mantenía cercano al 100 %. Se observó que el RFD relleno con PP poseía una r_{PP} de cobre máxima igual a 4,69 mmol/L.h, donde la precipitación del metal era de 99,8 %. En el caso de la P, la r_{PP} fue 5,60 mmol/L.h con una precipitación del 99,3 %. En la Tabla 5.3 se resumen diferentes trabajos donde se aplicaron sistemas sulfidogénicos para bioprecipitar cobre. La precipitación en todos los casos fue alta, pero la concentración de cobre inicial fue muy inferior a la utilizada en este capítulo. Sin embargo, cabe destacar que a diferencia de los otros trabajos, es este estudio la solución de metales pesados ingresante no se mantuvo en contacto directo con el lecho conteniendo los microorganismos inmovilizados, lo que reduce un posible efecto inhibitorio. De este modo, la separación espacial entre la entrada de medio y la entrada de la solución metálica al reactor permitió tratar una concentración de Cu(II) cinco veces mas elevada que el valor máximo reportado en la literatura. Por otro lado, en general las publicaciones no exponen la velocidad volumétrica de precipitación de metales, sino que sólo marcan el porcentaje de precipitación.

Tabla 5.3. Remoción de cobre mediante algunos reactores sulfidogénicos reportados en la literatura (Neculita *et al.*, 2007).

Reactor	Vol. (L)	Sustrato orgánico	pH		Sulfato (g/L)		Cu(II) (mg/L)		Referencia
			Entrada	Salida	Entrada	Salida	Entrada	Salida	
RFD de laboratorio	0,25	Lactato	5,0	6,8-7,8	2,8	1,1 1,3	500	3,5 ^A 1,0 ^A	Este estudio (Perlita) Este estudio (Polipropileno)
Biorreactor de campo	92.000-108.000	Estiércol y paja	3,3-7,5	6,5-7,5	0,07-0,23	na	0,003-3,1	<2	Zaluski <i>et al.</i> , 2003
Escala piloto	20.000	Estiércol, heno, aserrín y alfalfa	3,5-7,5	6,5-7,5	<0,060	<0,040	2-23	<2	Reisinger <i>et al.</i> , 2000
Escala piloto	570	Tallos de arroz, estiércol y piedra caliza	3,6	6,2	na	na	1,5	0,08	Cheong <i>et al.</i> , 1998
Escala piloto	200	madera, heno, aserrín, alfalfa, y estiércol	3-3,5	5,5-7	3-3,5	2,5-4,5	3,5-7	<0,5	Reisman <i>et al.</i> , 2003
Laboratorio	45	Estiércol, aserrín y suero	2,5-3,5	6,5	<1	<0,3	20	<0,1	Drury, 1999
Laboratorio	25-29	Estiércol	2,7-6,2	6,3-7,1	1	0,9-1	8	0	Willow y Cohen, 2003
Laboratorio	4,8	Lactato	4,5	7,2	2,3	<0,4	5,1-50,3	<1,1	Jong y Parry, 2003
Columna	9	madera, compostaje y estiércol	3,8-4	7	1,5	1,2	1,4	<1	Beaulieu <i>et al.</i> , 2000
Columna	0,25	compostaje, madera, lodos y suelos ricos en materia orgánica	6,8	7-8,5	2,6	0,2-0,7	50	<5	Chang <i>et al.</i> , 2000
RLFFD de laboratorio	de 5	Lodo de digestor anaeróbico	7	7	1	0,3	10	0,3	Villa-Gómez <i>et al.</i> , 2011
RLFFD de laboratorio	de 0,3	Lactato	5	8	2	0,7	100	1-2	Sahinkaya y Gungor, 2010
Cultivo lote	31	Suero	3,0-4,4	3,5-6,0	0,9	0,7	4,5-9,9	<1,7	Christensen <i>et al.</i> , 1996

^A Calculado en base a la concentración de cobre medida, el Q_{metal} y el caudal de alimentación de medio de cultivo.

En ambos reactores las r_{SO_4} , r_S y los parámetros estequiométricos se mantuvieron en valores similares a los obtenidos en los mismos sistemas sin el agregado de la solución metálica. Por otro lado, a pesar de que el Q_{metal} llegó a triplicar el caudal de alimentación del medio de cultivo, el efluente (de pH inicial 5,0) alcanzó en todos los casos un valor de pH entre 6,8 y 7,8. Diferentes autores han reportado la alcalinización de efluentes ácidos conteniendo metales pesados mediante sistemas sulfidogénicos (Tabla 5.2) con valores finales de pH entre 3,5 y 8,5. De este modo, se observa que el sistema fue capaz de remediar una solución precipitando el cobre, consumiendo el sulfato y neutralizando el pH ácido.

La cantidad de proteínas adheridas por volumen de lecho (P: $2,13 \pm 0,01$ g/L; PP: $0,39 \pm 0,02$ g/L) fue inversa al $t_R^{mínimo}$ observado para cada reactor (P: 2,6 h; PP: 5,9 h). De modo que se puede suponer que el aumento de la productividad de los reactores fue consecuencia directa de una mayor cantidad de biomasa inmovilizada; y que además, esto fue esperable en función de la gran área superficial de la P, adhiriéndose más células como consecuencia de una mayor superficie disponible.

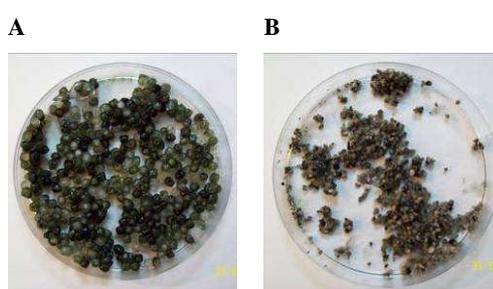


Figura 5.5. Soportes de inmovilización luego del tratamiento. a. Bolitas de polipropileno (PP); b. Perlita (P).

Los valores de biomasa inmovilizada, calculados en base a la cantidad de proteínas adheridas y la relación 0,33 g de proteínas por g de biomasa (obtenido en el Capítulo 3), muestran que la cantidad de biopelícula formada sobre la P y el PP es superior a la reportada por otros autores para sistemas de RLFFD (Tabla 5.2). Celis *et al.* (2009) marcan la importancia de la velocidad de recirculación sobre la cantidad de biopelícula inmovilizada: una alta velocidad superficial, que causa una expansión del lecho grande, genera fricción entre las partículas de soporte y un consecuente desprendimiento de la biomasa, existiendo un compromiso entre la fluidización y la formación de la biopelícula. La ausencia de recirculación en esta etapa del experimento favoreció probablemente la deposición de una gran cantidad de microorganismos en la superficie de las matrices.

La observación por MEB de las partículas de PP mostró imágenes similares a las visualizadas en el Capítulo 4 para otros soportes con formación de biopelícula, sugiriendo la presencia de microorganismos (Figura 5.6).

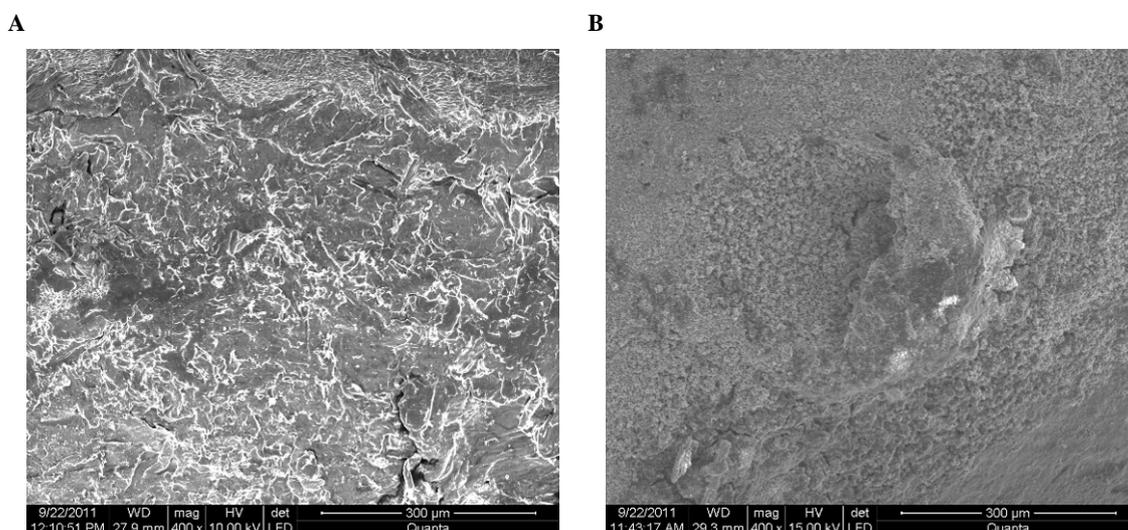


Figura 5.6. Microscopía electrónica de barrido. A. Polipropileno sin biopelícula; **B.** Polipropileno con biopelícula. 400X.

En el ensayo de FISH (Figura 5.7) se pudo observar que la biopelícula formada sobre P y PP estaba formada casi totalmente por Bacterias, siendo muy baja la señal obtenida con las sondas específicas para Arqueas (ARCH915) y similares a las obtenidas con la hibridación inespecífica revelada con la sonda del control negativo (NON338). Casi la totalidad de las células teñidas por DAPI fueron hibridadas con la sonda para Eubacterias (EUB338). Además, la intensidad obtenida con la sonda específica para BRS (SRB385) fue muy similar a la obtenida para Eubacterias, sugiriendo que la mayor parte de la población presente en la biopelícula formaba parte del grupo de las BRS. Dar *et al.* (2007b) ya había utilizado esta técnica para relacionar la efectividad de los biorreactores sulfidogénicos con la proporción de BRS sobre la población microbiana total.

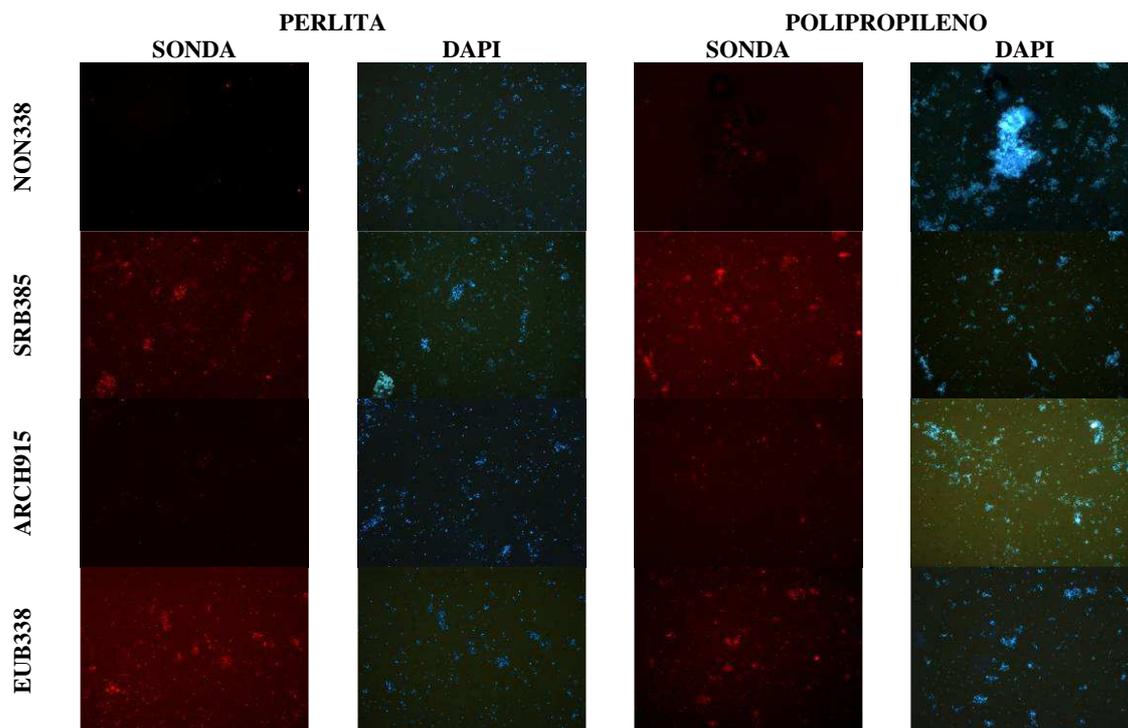


Figura 5.7. Hibridación *in situ* de la biopelícula formada sobre los soportes de inmovilización en el RFD sin recirculación con las sondas NON338 (hibridación inespecífica), SRB385 (específico para BRS), ARCH915 (específica para arqueas) y EUB338 (específica para eubacterias) marcadas con Cy3 (color rojo) y tinción de DAPI (color azul) para observar las células totales. 400X.

5.3.2. RLFFD

El reactor utilizado en este ensayo fue de menor volumen total y contuvo menor cantidad de matriz de inmovilización que el anterior con el objetivo de fluidizar más fácilmente el lecho mediante bombas peristálticas de laboratorio. En el caso de la P, la recirculación constante del efluente causó la precipitación del lecho por hidratación total de las partículas de P al final de la etapa de inmovilización pasiva de la biopelícula. La P es un material cerámico expandido que se caracteriza por poseer aire en su interior, y esa característica le confiere la ligereza y la baja densidad. Al recircular líquido constantemente, la P se hidrató, perdiendo el aire que la mantenía flotando y precipitándola al fondo del reactor. Sin embargo, algunos autores han reportado la utilización de P en RLFFD (Sowmeyan y Swaminathan, 2008; García-Calderón *et al.*, 1998). Por lo tanto, más allá de que este material poseía características de adhesión celular superiores y de que el $t_R^{\text{mínimo}}$ fue menor, no fue posible utilizarlo en sistemas con recirculación. Sólo pudieron hacerse mediciones en el sistema conteniendo PP.

Para formular el residuo sintético en base al medio Postgate G conteniendo cobre y de pH 3,5 que se utilizaría para alimentar el sistema por un solo puerto, se utilizaron los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos en el ensayo realizado con el RFD sin recirculación. Como al $t_R^{\text{mínimo}}$ (5,9 h) el sistema con PP consumió en promedio 1,6 g/L de sulfato (equivalente a 0,017 moles/L de sulfuro generado) se supuso que se podrían precipitar cantidades equimolares de Cu(II) (equivalentes a 1,06 g/L de Cu(II) o 2,90 g/L de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). El residuo sintético se formuló finalmente con 0,60 g/L de Cu(II) con el fin de evitar la inhibición celular por la presencia de altas concentraciones de metal en caso de que el pH ácido no permitiese cinéticas microbianas óptimas.

Para el sistema de RLFFD relleno con PP operado a t_R 5,9 h las velocidades volumétricas fueron r_{PP} 1,50 mmol/L.h, r_{SO_4} 0,18 g/L y r_S 0,26 g/L.h y se obtuvo una precipitación de cobre del 96,4 %, un consumo de sulfato del 36,6 % y de lactato del 37,2 %; elevando el valor del pH de 3,5 a 7,4. Estos resultados fueron deficientes en comparación con los registrados por el RFD sin recirculación relleno con PP operado al mismo t_R (r_{PP} de 4,69 mmol/L.h, r_{SO_4} 0,30 g/L.h y r_S 0,69 g/L.h; 99,8 % de Cu(II), 55 % de sulfato y 100 % de lactato). Una de las causas posibles de la diferencia del rendimiento de ambos sistemas pudo ser la separación espacial entre la entrada de medio de cultivo y la entrada de la solución metálica del RFD sin recirculación que permitió que la zona superior del lecho no fuese inhibida por la alta concentración de cobre y el pH ácido. Por otro lado, el RLFFD fue alimentado con una solución de pH más ácido y con mayor cantidad de Cu(II) que el RFD sin recirculación, lo que inhibiría a las BRS. Sin embargo, estas desventajas deberían haber sido salvadas por la recirculación del efluente remediado de pH alcalino y con poca cantidad de metales en solución, lo que neutralizaría el pH y diluiría los metales. Por otro lado, la expansión del lecho promueve el desprendimiento de la biopelícula, lo que podría disminuir la eficiencia del biorreactor (Celis *et al.*, 2009).

5.4. Conclusiones

El cultivo continuo en un RFD sin recirculación con P permitió menor $t_R^{\text{mínimo}}$ y mayor r_{SO_4} que el mismo sistema con PP. Estos valores fueron similares a los obtenidos con el mismo material en un sistema de lecho empacado de flujo ascendente. La causa de la alta efectividad de la P se pudo atribuir a una mayor formación de biopelícula. Además, los organismos presentes en la misma pertenecían en su mayoría al grupo de las BRS. Por otro lado, el $Y_{SO_4/S}$ e $Y_{P/S}$ para la P y el PP fueron cercanos los de *Desulfovibrio desulfuricans*.

En el RFD sin recirculación relleno con P se obtuvo una mayor velocidad de precipitación de Cu(II) que en el relleno con PP, mientras que los porcentajes de precipitación de Cu(II) fueron similares. En ambos casos se logró neutralizar el pH inicial de valor 5,0. La separación espacial entre la entrada de medio y la entrada de la solución metálica al reactor permitió tratar una concentración de Cu(II) cinco veces mas elevada que el valor máximo reportado en la literatura.

En el RLFFD con recirculación la P se hidrató, perdiendo el aire que la mantenía flotando y precipitándola al fondo del reactor; lo que impidió su utilización. El sistema conteniendo PP generó velocidades volumétricas y porcentajes de eliminación de lactato, sulfato y cobre inferiores a los registrados para el RFD sin recirculación; neutralizando el pH inicial de valor 3,5.

Capítulo 6

Conclusiones generales

Se obtuvieron consorcios y aislados de BRS de ambientes naturales. Se seleccionó al consorcio *R* (oxidante incompleto de lactato) para su aplicación en sistemas sulfidogénicos en base a su eficiencia en la reducción de sulfato, su resistencia a metales pesados en solución (presencia individual y simultánea de Cu(II), Zn(II), Co(II), Cr(III), Cd(II) y Ni(II)) y su tolerancia a valores de pH entre 7,0 y 5,5.

R fue capaz de bioprecipitar diferentes metales (Cu(II), Zn(II), Co(II), Cd(II) y Ni(II)) casi por completo; siendo el Cr(III) el único que permaneció soluble (50 %).

Se logró evaluar certeramente la inmovilización del consorcio de BRS mediante cultivos en lote de un modo rápido y simple, permitiendo seleccionar los soportes apropiados para la posterior reducción biológica de sulfato en un sistema continuo. Se distinguió que la matriz influyó los rendimientos estequiométricos, la cantidad de biomasa inmovilizada y la estructura microbiana de los consorcios formados. Se eligieron perlita P; carbón vegetal CV, perlas de vidrio PV y esponja de poliuretano EP en base a que su efectiva de adhesión de células, buenos rendimientos estequiométrico y a que resultaron inertes al sulfuro biológicamente producido. Además, se observó de forma preliminar que la P promovió una adhesión celular y rendimientos superiores.

El cultivo en RLEFA empaquetado con P fue el sistema de cultivo que permitió menor $t_R^{\text{mínimo}}$ y una mayor r_{SO_4} con respecto al cultivo en lote con células libres y al RLEFA con CV, PV y EP. La productividad superior de P se debió a la alta cantidad de biomasa adherida y a que la estructura del consorcio microbiano de la biopelícula formada sobre P se diferenció de los formados sobre otros soportes, presentando la mayor proporción de BRS con respecto a las bacterias totales.

El cultivo continuo en un RFD sin recirculación con P permitió menor $t_R^{\text{mínimo}}$ y una mayor r_{SO_4} con respecto al mismo sistema con polipropileno (PP), debido a que inmovilizó mayor cantidad de biomasa. Además, los organismos presentes en la misma pertenecían en su mayoría al grupo de las BRS. El $t_R^{\text{mínimo}}$ y la r_{SO_4} del RFD con P fueron similares a los obtenidos con el mismo material en el RLEFA.

El RFD sin recirculación relleno con P obtuvo una r_{PP} mayor y un porcentaje de precipitación de Cu(II) similar al logrado con PP (99 %). En ambos casos se logró neutralizar el pH inicial de valor 5,0. En el RLFFD con recirculación la P decantó al fondo del reactor por efecto de la recirculación; lo que impidió su utilización a pesar de ser el soporte más efectivo. El RLFFD conteniendo PP generó velocidades volumétricas y porcentajes de eliminación de lactato, sulfato y cobre inferiores al registrado para el RFD sin recirculación; neutralizando el pH inicial de valor 3,5. La ventaja del RFD sin recirculación radicó en la separación espacial en el reactor de la entrada de metales pesados y el lecho.

Referencias bibliográficas

- Abdollahi H., Wimpenny J.W.T., 1990.** Effects of the oxygen on the growth of *Desulfovibrio desulfuricans*. J. Gen. Microbiol. 136, 1025-1030.
- Acinas S.G., Anton J., Rodríguez V.F., 1999.** Diversity of free-living and attached bacteria in offshore western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 65, 514-522.
- Alexandrino M., Macías F., Costa R., Gomes N.C.M., Canário A.V.M., Costa M.C., 2011.** A bacterial consortium isolated from an Icelandic fumarole displays exceptionally high levels of sulfate reduction and metals resistance. Journal of Hazardous Materials 187, 362-370.
- Alvarez M.T., Pozzo T., Mattiasson B., 2006.** Enhancement of sulphide production in anaerobic packed bed bench-scale biofilm reactors by sulphate reducing bacteria. Biotechnology Letters 28 (3), 175-181.
- Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A., 1990.** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1919-1925.
- Amann R.I., Stromley J., Devereux R., Key R., Stahl A., 1992.** Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in a multispecies biofilm. Appl. Environ. Microbiol. 58 (2), 614-623.
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H., 1995.** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59, 143-169.
- Annachatre A.P., Suktrakoolvait S., 2001a.** Biological sulfate reduction using molasses as a carbon source. Water Environ. Res. 73, 118-126.
- Annachatre A.P., Suktrakoolvait S., 2001b.** Biological sulfide oxidation in a fluidized bed reactor. Environ. Technol. 22, 661-672.
- Azabou S., Mechichi T., Sayadi S., 2007.** Zinc precipitation by heavy-metal tolerant sulfate-reducing bacteria enriched on phosphogypsum as a sulfate source. Minerals Engineering 20, 173-178.
- Barber W.P., Stuckey D.C., 2000.** Effect of sulfate reduction on chemical oxygen demand removal in an anaerobic baffled reactor. Water Environ. Res. 72, 593-601.
- Baskaran V., Nemati M., 2006.** Anaerobic reduction of sulfate in immobilized cell bioreactors, using a microbial culture originated from an oil reservoir. Biochemical Engineering Journal 31, 148-159.
- Baumgartner L.K., Reid R.P., Dupraz C., Decho A.W., Buckley D.H., Spear J.R., Przekop K.M., Visscher P.T., 2006.** Sulfate reducing bacteria in microbial mats: Changing paradigms, new discoveries. Sedimentary Geology 185, 131-145.

Beaulieu S., Zagury G.J., Deschenes L., Samson R., 2000. Bioactivation and bioaugmentation of a passive reactor for acid mine drainage treatment. Environmental issues and management of waste in energy and mineral production. Singhal y A.K. Mehrotra (Ed.). Netherlands. 533-537.

Beeder J., Nilsen R.K., Rosnes J.T., Torsvik T., Lien T., 1994. Archaeoglobus fulgidus Isolated from Hot North Sea Oil Field Waters. Appl. Environ. Microbiol. 60 (4), 1227-1231.

Beeder J., Torsvik T., Lien T., 1995. *Thermodesulforhabdus norvegicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic sulfate-reducing bacterium from oil field water. Archives of Microbiology 164, 331-336.

Ben-Dov E., Brenner A., Kushmaro A., 2007. Quantification of Sulfate-reducing Bacteria in Industrial Wastewater, by Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) Using *dsrA* and *apsA* Genes. Microbial Ecology 54, 439-451.

Benner S.G., Blowes D.W., Ptacek C.J., Mayer K.U., 2002. Rates of sulfate reduction and metal sulfide precipitation in a permeable reactive barrier. Appl. Geochem. 17, 301-320.

Bharathi P.A.L., Sathe V., Chandramohan D., 1990. Effect of lead, mercury and cadmium on a sulphate-reducing bacterium. Environmental Pollution 67, 361-374.

Boshoff G., Duncan J., Rose P.D., 2004. Tannery effluent as a carbon source for biological sulphate reduction. Water Research. 38 (11), 2651-2658.

Cabrera G., Pérez R., Gómez J.M., Ábalo A., Cantero D., 2006. Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio sp.* strains. Journal of Hazardous Materials A135, 40-46.

Cadavid D.L., Zaiat M., Foresti E., 1999. Performance of horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor treating synthetic substrate subjected to decreasing COD to sulfate ratios. Water Science and Technology 39 (10-11), 99-106.

Cammack R., Fernandez V.M., Hatchikian E.C., 1994. Nickel-iron hydrogenase. Methods Enzymol. 243, 43-68.

Cappenberg Th.E., 1975. A study of mixed continuous cultures of sulfate-reducing bacteria. Microbiol. Ecol. 2, 60-72.

Cattony E.B.M., Chinalia F.A., Ribeiro R., Zaiat M., Foresti E., Varesche M.B.A., 2005. Ethanol and toluene removal in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor in the presence of sulfate. Biotechnology and Bioengineering 91(2), 244-253.

Celis L.B., Villa-Gómez D., Alpuche-Solís A.G., Ortega-Morales B.O., Razo-Flores E., 2009. Characterization of sulfate-reducing bacteria dominated surface communities during start-up of a down-flow fluidized bed reactor. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36, 111-121.

Celis-García M.L.B., Ramírez F., Revah S., Razo-Flores E., Monroy O., 2004. Sulphide and oxygen inhibition over the anaerobic digestion of organic matter: influence of microbial immobilization type. Environ. Technol. 25 (11), 1265-1275.

Chang S. I., Shin P. K., Kim B. H., 2000. Biological treatment of acid mine drainage under sulphate-reducing conditions with solid waste materials as substrate. Water Research 34 (4), 1269-1277.

Chauhan K., Trivedi U., Patel K.C., 2007. Statistical screening of medium components by Plackett-Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus sp.* KCP01 using date juice. Bioresource Technology 98, 98-103.

Chen Y., 2003. On the analysis of unreplicated factorial designs. Tesis doctoral. University of Dortmund. China.

Chen Y.R., Hashimoto A.G., 1980. Substrate utilization kinetic model for biological treatment processes. Biotechnology and Bioengineering 22, 2081-2095.

Chen C.I., Mueller R.F., Griebel T., 1994. Kinetic analysis of microbial sulphate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in an anaerobic upflow porous media biofilm reactor. Biotechnology and Bioengineering 43, 267-274.

- Cheong Y.W., Min J.S., Kwon K.S., 1998.** Metal removal efficiencies of substrates for treating acid mine drainage of a Dalsung mine, South Korea. *Journal of Geochemical Exploration* 64, 147-152.
- Chiacchiarini P., Lavallo L., Giaveno A., Donati E., 2010.** First assessment of acidophilic microorganisms from geothermal Copahue–Caviahue system. *Hydrometallurgy* 104, 334-341.
- Choi E., Rim J.M., 1991.** Competition and inhibition of sulfate reducers and methane producers in anaerobic treatment. *Water Sci. Technol.* 23, 1259-1264.
- Christensen B., Laake M., Lien T., 1996.** Treatment of acid mine water by sulfate-reducing bacteria; results from a bench scale experiment. *Water Res.* 30, 1617-1624.
- Chuichulcherm S., Nagpal S., Peeva L., Livingston A., 2001.** Treatment of metalcontaining wastewaters with a novel extractive membrane reactor using sulfate-reducing bacteria. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76, 61-68.
- Church C.D., Wilkin R.T., Alpers C.N., Rye R.O., McCleskey R.B., 2007.** Microbial sulfate reduction and metal attenuation in pH 4 acid mine water. *Geochemical Transactions* 8, 10.
- Colleran E., Finnegan S., O’Keeffe R.B., 1994.** Anaerobic digestion of high sulphate containing waste water from the industrial production of citric acid. *Water Science and Technology* 30, 263-273.
- Colleran E., Finnegan S., Lens P., 1995.** Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. *Antonie van Leeuwenhoek* 67 (1), 29-46.
- Cooney M.J., Roschi E., Marison I.W., Comminellis Ch., von Stockar U., 1996.** Physiologic studies with the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*: Evaluation for use in a biofuel cell. *Enzyme and Microbial Technology* 18, 358-365.
- Cord-Ruwisch R., Seitz H., Conrad R., 1988.** The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Archives of Microbiology* 149, 350-357.
- Costerton W.J., Wilson M., 2004.** Introducing biofilms. *Biofilms* 1(1), 1-4.
- Cruz Viggi C.C., Pagnanelli F., Cibati A., Uccelletti D., Palleschi C., Toro L., 2010.** Biotreatment and bioassessment of heavy metal removal by sulphate reducing bacteria in fixed bed reactors. *Water Research* 44, 151-158.
- Cypionka H., 2000.** Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. *Ann. Rev. Microbiol.* 54, 827-848.
- Cypionka H., Widdel F., Pfennig N., 1985.** Survival of sulfatereducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfate free oxygen-sulfide gradients. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 39-45.
- Daly K., Sharp R.J., McCarthy A.J., 2000.** Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria. *Microbiology* 146, 1693-1705.
- Dar S.A., Stams A.J.M., Kuenen J.G., Muyzer G., 2005.** Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (5), 2325-2330.
- Dar S.A., Yao L., van Dongen U., Kuenen J.G., Muyzer G., 2007a.** Analysis of diversity and activity of sulfatereducing bacterial communities in sulfidogenic bioreactors using 16S rRNA and *dsrB* genes as molecular markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 594-604.
- Dar S.A., Stams A.J.M., Kuenen J.G., Muyzer G., 2007b.** Co-existence of physiologically similar sulfate-reducing bacteria in a full-scale sulfidogenic bioreactor fed with a single organic electron donor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 1463-1472.

- Dar S.A., Kleerebezem R., Stams A.J.M., Kuenen G., Muyzer G., 2008.** Competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 1045-1055.
- de Smul A., Verstraete W., 1999.** Retention of sulfate-reducing bacteria in expanded granular-sludge-blanket reactors. *Water Environ. Res.* 71, 427-31.
- de Smul A., Goethals L., Verstraete W., 1999.** Effect of COD to sulphate ratio and temperature in expanded-granular-sludge-blanket reactors for sulphate reduction. *Process Biochemistry* 34 (4), 407-416.
- Deswaef S., Salmon T., Hilgsmann S., Taillieu X., Milande N., Thonart P., 1996.** Treatment of gypsum waste in a two stage anaerobic reactor. *Water Science and Technology* 34 (5-6), 367-374.
- Dhillon A., Teske A., Dillon J., Stahl D.A., Sogin M.L., 2003.** Molecular Characterization of Sulfate-Reducing Bacteria in the Guaymas Basin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (5), 2765-2772.
- Dilling W., Cypionka H., 1990.** Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 71, 123-128.
- Dolla A., Fournier M., Dermoun Z., 2006.** Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *Journal of Biotechnology* 126, 87-100.
- Dries J., De Smul A., Goethals L., Grootaerd H., Verstraete W., 1998.** High rate biological treatment of sulphate-rich wastewater in an acetate-fed EGSB reactor. *Biodegradation* 9, 103-111.
- Drury W.J., 1999.** Treatment of acid mine drainage with anaerobic solid substrate reactors. *Water Environment Research* 71, 1244-1250.
- du Preez L.A., Maree J.P., 1995.** Pilot-scale biological sulphate and nitrate removal utilizing producer gas as energy source. *Water Sci. Technol.* 30, 275-85.
- Dvorak D.H., Hedin R.S., Edenborn H.M., McIntire P.E., 1992.** Treatment of metalcontaminated water using bacterial sulphate reduction: results from pilot-scale reactors. *Biotechnology and Bioengineering* 40, 609.
- Eccles H., 1999.** Treatment of metal-contaminated wastes: Why select a biological process?. *Trends in Biotechnology* 17, 462-465.
- Elliott P., Ragusa S., Catcheside D., 1998.** Growth of sulfate-reducing bacteria under acidic conditions in an upflow anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage. *Water Research.* 32 (12), 3724-3730.
- Fardeau M.L., Ollivier B., Patel B.K.C., Dwivedi P., Ragot M., Garcia J.L., 1995.** Isolation and characterization of a thermophilic sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum thermosapovorans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45 (2), 218-221.
- Farina I.H., Ferretti O.A., Barreto G.F., 1986.** Introducción al diseño de reactores químicos. Editorial EUDEBA. Argentina.
- Fedorovich V., Greben M., Kalyuzhnyi S., Lens P., Hulshoff Pol L., 2000.** Use of hydrophobic membranes to supply hydrogen to sulphate reducing bioreactors. *Biodegradation* 11 (5), 295-303.
- Feio M.J., Beech I.B., Carepo M., Lopes J.M., Cheung C.W.S., Franco R., Guezennec J., Smith J.R., Mitchell J.I., Moura J.J.G., Lino A.R., 1998.** Isolation and characterisation of a novel sulphate-reducing bacterium of the *Desulfovibrio* genus. *Anaerobe* 4, 117-130.
- Fischer S.G., Lerman L.S., 1979.** Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16, 191-200.
- Fortin D., Southam G., Beveridge T.J., 1994.** Nickel sulfide, iron nickel sulfide and iron sulfide precipitation by a newly isolated *Desulfotomaculum* species and its relation to nickel resistance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 14 (2), 121-132.

- Fortin D., Davis B., Beveridge T.J., 1996.** Role of *Thiobacillus* and sulfate-reducing bacteria in iron biocycling in oxic and acidic mine tailings. *FEMS Microbiol. Ecol.* 21, 11-24.
- Foucher S., Battaglia-Brunet F., Ignatiadis I., Morin D., 2001.** Treatment by sulfatereducing bacteria of Chessy acid-mine drainage and metals recovery. *Chemical Engineering Science* 56, 1639-1645.
- Fournier M., Aubert C., Dermoun Z., Durand M.C., Moinier D., Dolla A., 2006.** Response of the anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough to oxidative conditions: Proteome and transcript analysis. *Biochimie* 88, 85-94.68, 480-485.
- Fromin N., Hamelin J., Tarnawski S., Roesti D., Jourdain-Miserez K., Forestier N., Teyssier-Cuvette S., Gillet F., Aragno M., Rossi P., 2002.** Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* 4 (11), 634-643.
- García C., Moreno D.A., Ballester A., Belazquez M.L., Gonzalez F., 2001.** Biorremediation of an industrial acid mine water by metal-tolerant sulphate-reducing bacteria. *Minerals Engineering* 14 (9), 997-1008.
- Garcia-Calderon D., Buffiere P., Moletta R., Elmaleh S., 1998.** Anaerobic digestion of wine distillery wastewater in down-flow fluidized bed. *Wat. Res.* 32 (12), 3593-3600.
- Geets J., Borremans B., Diels L., Springael D., Vangronsveld J., van der Lelie D., Vanbroekhoven K., 2006.** DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulphate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Methods* 66, 194-205.
- Gibert O., de Pablo J., Cortina J.L., Ayora C., 2002.** Treatment of acid mine drainage by sulphate-reducing bacteria using permeable reactive barriers: A review from laboratory to full-scale experiments. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 1: 327-333.
- Gibert O., de Pablo J., Cortina J.L., Ayora C., 2003.** Evaluation of municipal compost/limestone/iron mixtures as filling material for permeable reactive barriers for in situ acid mine drainage treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78, 489-496.
- Gibert O., de Pablo J., Cortina J.L., Ayora C., 2004.** Chemical characterization of natural organic substrates for biological mitigation of acid mine drainage. *Water Res.* 38, 4186-4196.
- Gibson G.R., 1990.** Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 69, 769-797.
- Glombitza F., 2001.** Treatment of acid lignite mine flooding water by means of microbial sulfate reduction. *Waste Management.* 21, 197-203.
- Goorissen H.P., Boschker H.T.S., Stams A.J.M., Hansen T.A., 2003.** Isolation of thermophilic *Desulfotomaculum* strains with methanol and sulfite from solfataric mud pools, and characterization of *Desulfotomaculum solfataricum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1223-1229.
- Greben H.A., Maree J.P., Eloff E., Murray K., 2005.** Improved sulphate removal rates at increased sulphide concentration in the sulphidogenic bioreactor. *Water SA* 31 (3), 351- 368.
- Greenberg A.E., Trussell R.R., Clesceri, L.S., 1985.** (Ed). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* APHA-AWWA-WPCF, Washington.
- Hamilton W.A., 1998.** Bioenergetics of sulphate-reducing bacteria in relation to their environmental impact. *Biodegradation* 9, 201-212.
- Hammack R.W., Edenborn H.M., 1992.** The removal of nickel from mine waters using bacterial sulfate reduction. *Appl. Microbiol. Biot.* 37, 674-678
- Hammack R.W., Edenborn H.M., Dvorak D.H., 1994.** Treatment of water from an open pit copper mine using biogenic sulfide and limestone: a feasibility study. *Water Resources* 28, 2321-2329.

- Hao O.J., Huang L., Chen J.M., Buglass R.L., 1994.** Effects of metal addition on sulphate reduction activity in wastewater. *Toxicol. Environ. Chem.* 46, 197-212.
- Hao J.H., Chen J.M., Huang L., Buglass R.L., 1996.** Sulfate-reducing bacteria. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 26 (1), 155-87.
- Hard B.C., Friedrich S., Babel W., 1997.** Bioremediation of acid mine water using facultatively methylotrophic metal-tolerant sulphate-reducing bacteria. *Microbiology Research* 152, 65-73.
- Head I.M., Saunders J.R., Pickup R.W., 1998.** Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* 35, 1-21.
- Henry J.G., Prasad D., 2000.** Anaerobic treatment of landfill leachate by sulfate reduction. *Water Sci Technol* 41 (3):239-246.
- Hensgens C.M., Vonck J., Van Beeumen J., van Bruggen E.F., Hansen T.A., 1993.** Purification and characterization of an oxygen-labile, NAD-dependent alcohol dehydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *J. Bacteriol.* 175, 2859-2863.
- Hernandez E.G., Fardeau M.L., Patel B.K.C., Macarie H., Garcia J.L., Ollivier B., 2000.** *Desulfovibrio mexicanus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from an up flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating cheese wastewaters. *Anaerobe* 6, 305-312.
- Herrera L., Hernandez J., Bravo L., Romo L., Vera L., 1997.** Biological process for sulfate and metals abatement from mine effluents. *Environmental Toxicology and Water Quality* 12, 101-107.
- Hicks R., Amann R.I., Stahl D.A., 1992.** Dual staining of natural bacterioplankton with 4',6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom level 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2158-2163.
- Hien Hoa T.T., Liamleam W., Annachhatre A.P., 2007.** Lead removal through biological sulfate reduction process. *Bioresource Technology* 98, 2538-2548.
- Hilgsmann S., Deswaef S., Tailieu X., Crine M., Milande N., Thonart P., 1996.** Production of sulfur from gypsum as an industrial byproduct. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57/58, 959-969.
- Hilton B.L., Oleszkiewicz J.A., 1988.** Sulfide induced inhibition of anaerobic digestion. *Journal of Environmental Engineering* 114, 1377-1391.
- Hines M.E., Evans R.S., Sharak Genthner B.R., Willis S.W., Friedman S., Rooney-Varga J.N., Devereux R., 1999.** Molecular phylogenetic and biogeochemical studies of sulfate-reducing bacteria in the rhizosphere of *Spartina alterniflora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2209-2216.
- Hulshoff Pol L.W., Lens P.N.L., Stams A.J.M., Lettinga G., 1998.** Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. *Biodegradation* 9, 213-224.
- Hulshoff Pol L.W., Lens P.N.L., Weijima J., Stams A.J.M., 2001.** New developments in reactor and process technology for sulfate reduction. *Water Sci. Technol.* 44, 67-76.
- Huysman P., Van Meenen P., Van Assche P., Verstraete W., 1983.** Factors affecting the colonization of non porous and porous packing material in model upflow methane reactors. *Biotechnology Letters* 5 (9), 643-648.
- Icgen B., Harrison S., 2006a.** Exposure to sulfide causes populations shifts in sulfate-reducing consortia. *Research in Microbiology* 157, 784-791.
- Icgen B., Harrison S., 2006b.** Identification of population dynamics in sulfate-reducing consortia on exposure to sulfate. *Research in Microbiology* 157, 922-927.
- Ince O., Ince K., Donnelly T., 2000.** Attachment, strength and performance of a porous media in an upflow anaerobic filter treating dairy wastewater. *Water Science and Technology* 41(4-5), 261-70.

- Ingvorsen K., Jorgensen B.B., 1984.** Kinetics of sulfate uptake by freshwater and marine species of *Desulfovibrio*. Arch. Microbiol. 139, 61-66.
- Ingvorsen K., Zehnder A.J.B., Jorgensen B.B., 1984.** Kinetics of sulphate uptake by *Desulfobacter postgatei*. Applied and Environmental Microbiology 47, 403-408.
- Isa, Z., Grusenmeyer, S. and Verstraete, W., 1986a.** Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: technical aspects. Appl. Environ. Microbiol. 51 (3), 572-579.
- Isa, Z., Grusenmeyer, S. and Verstraete, W., 1986b.** Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: microbiological aspects. Appl. Environ. Microbiol. 51 (3), 580-587.
- Jeanthon C. L'Haridon S., Cueff V., Banta A., Reysenbach A.L., Prieur D., 2002.** *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 765-772.
- Johnson D.B., Hallberg K.B., 2002.** Pitfalls of passive mine water treatment. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 1, 335-343.
- Johnson D.B., Hallberg K.B., 2005a.** Acid mine drainage remediation options: a review. Science of the Total Environment 338, 3-14.
- Johnson D.B., Hallberg K.B., 2005b.** Biogeochemistry of the compost bioreactor components of a composite acid mine drainage passive remediation system. Science of Total Environment 338, 81-93.
- Johnson D.B., Ghauri M.A., McGinness S., 1993.** Biogeochemical cycling of iron and sulphur in leaching environments. FEMS Microbiological Reviews 11, 63-70.
- Johnson D.B., Jameson E., Rowe O.F., Wakeman K., Hallberg K.B., 2009.** Sulfidogenesis at low pH by acidophilic bacteria and its potential for the selective recovery of transition metals from mine water. Advanced material reserch 71-73, 693-696.
- Jong T., Parry D.L., 2003.** Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. Water Research 37, 3379-3389.
- Jong T., Parry D.L., 2006.** Microbial sulfate reduction under sequentially acidic conditions in an upflow anaerobic packed bed bioreactor. Water Res. 40 (13), 2561.
- Joo-Hwa T, S. J., Kuan-Yeow S., 1996.** Performance of anaerobic packed-bed system with different media characteristics. Water Science and Technology 34 (5-6), 453-459.
- Joulian C., Ramsing N.B., Ingvorsen., 2001.** Congruent phylogenies of most common small-subunit rRNA and dissimilatory sulfite reductase gene sequences retrieved from estuarine sediments. Applied and Environmental Microbiology 67 (7), 3314-3318.
- Kaksonen A.H., Puhakka J.A., 2007.** Sulfate Reduction Based Bioprocesses for the Treatment of Acid Mine Drainage and the Recovery of Metals. Eng. Life Sci. 2007, 7, No. 6, 541-564
- Kaksonen A.H., Franzmann P.D., Puhakka J.A., 2003a.** Performance and ethanol oxidation kinetics of a sulfate-reducing fluidized-bed reactor treating acidic metal-containing wastewater. Biodegradation 14, 207-217.
- Kaksonen A.H., Riekkola-Vanhanen M.L., Puhakka J.A., 2003b.** Optimization of metal sulphide precipitation in fluidized-bed treatment of acidic wastewater. Water Res. 37, 255-266.
- Kaksonen A.H., Franzmann P.D., Puhakka J.A., 2004a.** Effects of hydraulic retention time and sulfide toxicity on ethanol and acetate oxidation in sulfate-reducing metal-precipitating fluidized-bed reactor. Biotechnology and Bioengineering 86 (3), 332-343.

Kaksonen A.H., Plumb J.J., Franzmann P.D., Puhakka J.A., 2004b. Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acidic metal- and sulfate containing wastewater. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 279-289.

Kaksonen A.H., Plumb J.J., Robertson W.J., Riekkola-Vanhanen M., Franzmann P.D., Puhakka J.A., 2006a. The performance, kinetics and microbiology of sulfidogenic fluidized-bed treatment of acidic metal- and sulfate-containing wastewater. *Hydrometallurgy* 83, 204-213.

Kaksonen A.H., Plumb J.J., Robertson W.J., Spring S., Schumann P., Franzmann P.D., Puhakka J.A., 2006b. Novel thermophilic sulfate-reducing bacteria from a geothermally active underground mine in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (5), 3759-3762.

Kalyuzhnyi S.V., de Fragoso L.C., Martinez R.J., 1997. Biological sulfate reduction in a UASB reactor using ethanol as electron donor. *Mikrobiologiya* 66 (5), 687-693.

Kieu H.T.Q., Müller E., Horn H., 2011. Heavy metal removal in anaerobic semi-continuous stirred tank reactors by a consortium of sulfate-reducing bacteria. *Water Research* 45, 3863-3870.

Kikot P., Mignone C., Viera M., Donati E., 2010. Study of the effect of pH and dissolved heavy metals on the growth of sulfate-reducing bacteria by a fractional factorial design. *Hydrometallurgy* 104 (3-4), 494-500.

Kimura S., Hallberg K.B., Johnson D.B., 2006. Sulfidogenesis in low pH (3.8-4.2) media by a mixed population of acidophilic bacteria. *Biodegradation* 17, 159-167.

Kjeldsen K.U., Tang L., Jørgensen M.G., Ingvorsen K., 2009. Enumeration and identification of dominant types of sulfate-reducing bacteria in pulp from a paper-recycling plant: a multiphasic approach. *FEMS Microbiol. Ecol.* 69, 481-493.

Klappenbach J.A., Saxman P.R., Cole J.R., Schmidt T.M., 2001. rrnDB: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res.* 29, 181-184.

Kleikemper J., Schroth M.H., Sigler W.V., Schmucki M., Bernasconi S.M., Zeyer J., 2002. Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (4), 1516-1523.

Kniemeyer O., Musat F., Sievert S.M., Knittel K., Wilkes H., Blumenberg M., Michaelis W., Classen A., Bolm C., Joye S.B., Widdel F., 2007. Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. *Nature* 449, 898-900.

Knittel K., Boetius A., Lemke A., Eilers H., Lochte K., Pfannkuche O., Linke P., Amann R., 2003. Activity, distribution, and diversity of sulfate reducers and other bacteria in sediments above gas hydrate (Cascadia Margin, Oregon). *Geomicrobiol. J.* 20, 269-294.

Kock D., Schippers A., 2008. Quantitative microbial community analysis of three different sulfidic mine tailing dumps generating acid mine drainage. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (16), 5211-5219.

Kolmert A., Johnson D.B., 2001. Remediation of acidic waste waters using immobilised, acidophilic sulphate-reducing bacteria. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76, 836-843.

Kolmert A., Henrysson T., Hallberg R., Mattiasson B., 1997. Optimization of sulphide production in an anaerobic continuous biofilm process with sulphate reducing bacteria. *Biotechnology Letters* 19 (10), 971-975.

Kondo R., Nedwell D.B., Purdy K.J., Silva S.Q., 2004. Detection and enumeration of sulphate-reducing bacteria in estuarine sediments by competitive PCR. *Geomicrobiology Journal* 21, 145-157.

Kondo R., Shigematsu K., Butani J., 2008. Rapid enumeration of sulphate-reducing bacteria from aquatic environments using real-time PCR. *Plankton Benthos Res* 3 (3), 180-183.

Koschorreck M., 2008. Microbial sulphate reduction at low pH. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64, 329-342.

- 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 (6), 1159-1162.
- Koschorreck M., Wendt-Potthoff K., Scharf B., Richnow H.H., 2008.** Methanogenesis in the sediment of the acidic Lake Caviahue in Argentina. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 178, 197-204.
- Krekeler D., Cypionka H., 1995.** The preferred electron acceptor of *Desulfovibrio desulfuricans* CSN. *FEMS Microbiol. Ecol.* 17, 271-278.
- Krekeler D., Sigalevich P., Teske A., Cypionka H., Cohen Y., 1997.** Sulfate-reducing bacterium from the oxic layer of a microbial mat from Solar lake (Sinai), *Desulfovibrio* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 167, 369-375.
- Kuo W.C., Shu T.Y., 2004.** Biological pre-treatment of wastewater containing sulfate using anaerobic immobilized cells. *Journal of Hazardous Materials B113*, 147-155.
- Küsel K., Roth U., Trinkwalter T., Peiffer S., 2001.** Effect of pH on the anaerobic microbial cycling of sulfur in mining-impacted freshwater lake sediments. *Env. Exp. Bot.* 46, 213-223.
- Laanbroek H.J., Geerligs H.J., Sijtsma L., Veldkamp H., 1984.** Competition for sulfate and ethanol among *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, and *Desulfovibrio* species isolated from intertidal sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 329-334.
- Le Gall J., Xavier A.V., 1996.** Anaerobes response to oxygen: The sulfate-reducing bacteria. *Anaerobe* 2, 1-9.
- Leloup J., Quillet L., Oger C., Boust D., Petit F., 2004.** Molecular quantification of sulfate-reducing microorganisms (carrying *dsrAB* genes) by competitive PCR in estuarine sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 47, 207-214.
- Leloup J., Quillet L., Thierry B., Petit F., 2005.** Diversity of the *dsrAB* (dissimilatory sulfite reductase) gene sequences retrieved from two contrasting mudflats of the Seine estuary, France. *FEMS Microbiology Ecology* 55, 230-238.
- Lens P.N.L., Visser A., Jansen A.J.H., Hulshoff Pol L.W., Lettinga G., 1998.** Biotechnological treatment of organic sulphate-rich wastewaters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 28, 41-88.
- Lens P.N.L., Vallero M., Esposito G., Zandvoort M., 2002.** Perspectives of sulfate reducing bioreactors in environmental biotechnology. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 1, 311-325.
- Lens P.N.L., Gastesi R., Lettinga G., 2003a.** Use of sulfate reducing cell suspension bioreactors for the treatment of SO₂ rich flue gases. *Biodegradation* 14(3), 229-240.
- Lens P.N.L., Klijn R., van Lier J.B., Lettinga G., 2003b.** Effect of specific gas loading rate on thermophilic (55 °C) acidifying (pH 6) and sulfate reducing granular sludge reactors. *Water Research* 37, 1033-1047.
- Leu J.Y., McGovern-Traa C.P., Porter A.J.R., Harris W.J., Hamilton W.A., 1998.** Identification and phylogenetic analysis of thermophilic sulfate-reducing bacteria in oil field samples by 16S rDNA gene cloning and sequencing. *Anaerobe* 4, 165-174.
- Lewis A.E., 2010.** Review of metal sulphide precipitation. *Hydrometallurgy* 104, 222-234.
- Liamleam W., Annachatre A.P., 2007.** Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnology Advances* 25, 452-463.
- Lima de Oliveira L., Duarte I.C.S., Sakamoto I.K., Varesche M.B.A., 2009.** Influence of support material on the immobilization of biomass for the degradation of linear alkylbenzene sulfonate in anaerobic reactors. *Journal of Environmental Management* 90, 1261-1268.
- Lin Y.H., Lee K., 2001.** Verification of anaerobic biofilm model for phenol degradation with sulfate reduction. *J. Environ. Eng.* 127 (2), 119-125.

- Liu X.Z., Zhang L.M., Prosser J.I., He J.Z., 2009.** Abundance and community structure of sulfate reducing prokaryotes in a paddy soil of southern China under different fertilization regimes. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 687-694.
- Llobet-Brossa E., Rabus R., Böttcher M.E., Könneke M., Finke N., Schramm A., Meyer R.L., Gröttschel S., Rosselló-Mora R., Amann R., 2002.** Community structure and activity of sulfate-reducing bacteria in an intertidal surface sediment: a multi-method approach. *Aquat. Microb. Ecol.* 29, 211-226.
- Loka Bharathi P.A., Sathe V., Chandramohan D., 1990.** Effect of lead, mercury, and cadmium on a sulfate-reducing bacterium. *Environ. Pollut.* 67 (4), 361-374.
- Lopes S.I.C., Sulistyawati I., Capela M.I., Lens P.N.L., 2007.** Low pH (6,5 and 4) sulfate reduction during the acidification of sucrose under thermophilic (55 °C) conditions. *Process Biochemistry* 42, 580-591.
- Luptakova A., Kusnierova M., 2005.** Bioremediation of acid mine drainage contaminated by sulphate-reducing bacterias. *Hydrometallurgy* 77, 97-102.
- Lyew D., Sheppard J.D., 1997.** Effects of physical parameters of a gravel bed on the activity of sulphate-reducing bacteria in the presence of acid mine drainage. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 70, 223-230.
- Machemer S.D., Reynolds J.S., Lavdon L.S., Wilderman T.R., 1993.** Balance of S in a constructed wetland built to treat acid mine drainage Idaho Springs, Colorado. *Journal of Applied Geochemistry* 8 (6), 587-603.
- Mack C., Burgess J.E., Duncan J.R., 2004.** Membrane bioreactors for metal recovery from wastewater: A review. *Water SA* 30, 521-532.
- Maillacheruvu K.Y., Parkin G.F., 1996.** Kinetics of growth, substrate utilisation and sulphide toxicity for propionate, acetate and hydrogen utilisers in anaerobic systems. *Water Environment Research* 68, 1099-1106.
- Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., Schleifer K.H., 1992.** Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: Problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 593-600.
- Maree J.P., Hill G.E., 1987.** An integrated process for biological treatment of sulfate-containing industrial effluents. *Journal Water Pollution Control Federation* 59 (12), 1069-1074.
- Maree J.P., Strydom W.F., 1985.** Biological sulphate removal in an upflow packed bed reactor. *Water Res.* 19, 1101-1106.
- Maree J.P., Hulse G., Dods D., Schutte C.E., 1991.** Pilot plant studies on biological sulphate removal from industrial effluent. *Water Sci. Technol.* 23, 1293-1300.
- Marschall C., Frenzel C., Cypionka H., 1993.** Influence of oxygen on sulphate reduction and growth of sulphate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* 159, 168-173.
- Martins M., Faleiro M.L., Barros R.J., Veríssimo A.R., Barreiros M.A., Costa M.C., 2009.** Characterization and activity studies of highly heavy metal resistant sulphate-reducing bacteria to be used in acid mine drainage decontamination. *Journal of Hazardous Materials* 166, 706-713.
- Matías P.M., Pereira I.A.C., Soares C.M., Carrondo M.A., 2005.** Sulphate respiration from hydrogen in *Desulfovibrio* bacteria: a structural biology overview. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 89, 292-329.
- McCartney D.M., Oleszkiewicz J.A., 1991.** Sulfide inhibition of anaerobic degradation of lactate and acetate. *Water Research* 25, 203-209.
- McCartney D.M., Oleszkiewicz J.A., 1993.** Competition between methanogens and sulphate reducers: effect of COD: sulphate ratio and acclimation. *Water Environment Research* 65, 655-664.
- McMahon M.J.L., 2007.** Development of a sulfate reducing packed bed bioreactor for use in a sustainable hydrogen production process. Thesis Master of Science. Queen's University Kingston, Ontario, Canada.

- Medírcio S., Leão V.A., Teixeira M., 2007.** Specific growth rate of sulfate reducing bacteria in the presence of manganese and cadmium. *Journal of Hazardous Materials* 143, 593-596.
- Minz D., Flax J.L., Green S.J., Muyzer G., Cohen Y., Wagner M., Rittmann B.E., Stahl S.A., 1999.** Diversity of sulfate-reducing bacteria in oxic and anoxic regions of a microbial mat characterized by comparative analysis of dissimilatory sulfite reductase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4666-4671.
- Mizuno O., Li Y.Y., Noike T., 1994.** Effects of sulfate concentration and sludge retention time on the interaction between methane production and sulfate reduction for butyrate. *Water Sci. Technol.* 30, 45-54.
- Montgomery D.C., 1991.** Design and analysis of experiments. John Wiley y Sons (Ed). New York.
- Moosa S., Nemati M., Harrison S.T.L., 2002.** A kinetic study on aerobic reduction of sulphate, part I: Effect of sulphate concentration. *Chemical Engineering Science* 57, 2773-2780.
- Moosa S., Nemati M., Harrison S.T.L., 2005.** A kinetic study on aerobic reduction of sulphate, part II: Incorporation of temperature effects in the kinetic model. *Chemical Engineering Science* 60, 3517-3524.
- Morton R.L., Yanko W.A., Graham D.W., Arnold R.G., 1991.** Relationships between metal concentration and crown corrosion in Los Angeles country sewers. *Res. J. Water Pollut. Control Fed.* 63, 789-798.
- Moura I., Bursakov S., Costa C., Moura J.J.G., 1997.** Nitrate and nitrite utilization in sulfate-reducing bacteria. *Anaerobe* 3, 279-290.
- Mussmann M., Ishii K., Rabus R., Amann R., 2005.** Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured Deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden Sea. *Environ. Microbiol.* 7, 405-418.
- Muthumbi W., Boon N., Boterdaele R., De Vreese I., Top E.M., Verstraete W., 2001.** Microbial sulfate reduction with acetate: process performance and composition of the bacterial communities in the reactor at different salinity levels. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55 (6), 787-793.
- Muyzer G., 1999.** DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2, 317-322.
- Muyzer G., Stams A.J.M., 2008.** The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 6, 441-454.
- Muyzer G., deWaal E.C., Uitterlinden A.G., 1993.** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
- Nagpal S., Chuichulcherm S., Peeva L., Livingston A., 2000.** Microbial sulfate reduction in a liquid–solid fluidized bed reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 70, 370-380.
- Nakagawa T., Hanada S., Maruyama A., Marumo K., Urabe T., Fukui M., 2002.** Distribution and diversity of thermophilic sulfate-reducing bacteria within a Cu-Pb-Zn mine (Toyoha, Japan). *FEMS Microbiology Ecology* 41 199-209.
- Nanninga H.J., Gottschal J.C., 1987.** Properties of *Desulfovibrio carbinolicus* sp. nov. and other sulfate-reducing bacteria isolated from an anaerobic-purification plant. *Applied and Environmental Microbiology* 53 (4), 802-809.
- Neculita C.M., Zagury G. J., Bussière B., 2007.** Passive treatment of acid mine drainage in bioreactors using sulfate-reducing bacteria: Critical review and research needs. *J. Environ. Qual.* 36, 1-16.
- Neria-González I., Wang E.T., Ramírez F., Romero J.M., Hernández-Rodríguez C., 2006.** Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico. *Anaerobe* 12, 122-133.
- Nilsen R.K., Torsvik T., Lien T., 1996a.** *Desulfotomaculum thermocisternum* sp. nov., a sulfate reducer isolated from a hot North Sea oil reservoir. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 397-402.

Nilsen R.K., Beeder J., Thostenson T., Torsvik T., 1996b. Distribution of thermophilic marine sulfate reducers in North Sea oil field waters and oil reservoirs. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1793-1798.

O'Flaherty V., Colleran E., 1999. Effect of sulphate addition on volatile fatty acid and ethanol degradation in an anaerobic hybrid reactor. I: process disturbance and remediation. *Bioresour. Technol.* 68 (2), 101-107.

O'Flaherty V., Mahony T., O'Kennedy R., Colleran E., 1998. Effect of pH on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulphate-reducing bacteria. *Process Biochem.* 33 (5), 555-569.

O'Flaherty V., Colohan S., Mulkerrins D., Colleran E., 1999. Effect of sulphate addition on volatile fatty acid and ethanol degradation in an anaerobic hybrid reactor. II: microbial interactions and toxic effects. *Bioresour. Technol.* 68 (2), 109-120.

Okabe S., Characklis W.G., 1992. Effects of temperature and phosphorous concentration on microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biotechnology and Bioengineering* 39 (10), 1031-1042.

Okabe S., Nielsen P.H., Jones W.L., Characklis W.G., 1992. Factors affecting microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* continuous culture: Limiting nutrients and sulfide concentration. *Biotechnology and Bioengineering* 40, 725-734.

Okabe S., Nielsen P.H., Jones W.L., Characklis W.G., 1995. Sulfide product inhibition of *Desulfovibrio desulfuricans* in batch and continuous cultures. *War. Res.* 29 (2), 571-578.

Omil F., Lens P.N.L., Hulshoff Pol L.W., Lettinga G., 1996. Effect of upward velocity and sulfide concentration on volatile fatty acid degradation in a sulphidogenic granular sludge reactor. *Process Biochem.* 31, 699-710.

Omil F., Lens P., Hulshoff Pol L.W., Lettinga G., 1997. Characterization of biomass from a sulfidogenic, volatile fatty acid-degrading granular sludge reactor. *Enzyme and Microbial Technology* 20 (3), 229-236.

Omil F., Lens P., Visser A., Hulshoff Pol L.W., Lettinga G., 1998. Long-term competition between sulfate reducing and methanogenic bacteria in UASB reactors treating volatile fatty acids. *Biotechnol. Bioeng.* 57, 676-685.

Oude Elferink S.J.W.H., Visser A., Hulshoff-Pol L.W., Stams A.J.M., 1994. Sulphate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 119-136.

Pereyra L.P., Hiibel S.R., Pruden A., Reardon K.F., 2008. Comparison of microbial community composition and activity in sulfate-reducing batch systems remediating mine drainage. *Biotechnol. Bioeng.* 101 (4), 702-713.

Pershad R., Jia C.Q., 1998. Copper toxicity on sulphate-reducing bacteria. *Waste Processing and Recycling III S.* Rao R., Amaratunga L.M., Richards G.G., Kondos P.D. (Ed). The Metallurgical Society of CIM 455-466.

Petrova O.E., Tarasova N.B., Davydova M.N., 2002. Biotechnological potential of sulfate-reducing bacteria for transformation of nitrocellulose. *Anaerobe* 8, 315-317.

Petrova O.E., Tarasova N.B., Alyabyev A.Ju., Davydova M.N., Loseva N.L., 2006. Calorimetric studies of the growth of *Desulfovibrio desulfuricans* in the presence of nitrocellulose. *Thermochemica Acta* 445, 67-69.

Phillips C.J., Harris D., Dollhopf S.L., Gross K.L., Prosser J.I., Paul E.A., 2000. Effects of agronomic treatments on structure and function of ammonia-oxidizing communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5410-5418.

Pirt S.J., 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications. United Kingdom.

Plugge M.C., Balk M., Stams A.J.M., 2002. *Desulfotomaculum thermobenzoicum subsp. thermosyntrophicum* subsp. nov., a thermophilic, syntrophic, propionateoxidizing, spore-forming bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 391-399.

Polpresert C., Haas C.N., 1995. Effect of sulfate on anaerobic processes fed with dual substrate. *Water Sci. Technol.* 31, 101-107.

- Postgate J.R., 1984.** The sulphate-reducing bacteria. Cambridge University Press. United Kingdom.
- Poulson S.R., Colberg P.J.S., Drever J.I., 1997.** Toxicity of heavy metals (Ni, Zn) to *Desulfovibrio desulfuricans*. Geomicrobiol. J. 14, 41-49.
- Pruden A., Messner N., Pereyra L., Hanson R.E., Hiibel S.R., Reardon K.F., 2007.** The effect of inoculum on the performance of sulfate-reducing columns treating heavy metal contaminated water. Water research 41, 904-914.
- Rabus R., Brüchert V., Amann J., Könneke M., 2002.** Physiological response to temperature changes of the marine, sulfate-reducing bacterium *Desulfobacterium autotrophicum*. FEMS Microbiology Ecology 42, 409-417.
- Rabus R., Hansen T.A., Widdel F., 2006.** Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. Prokaryotes 2, 659-768.
- Radhika V., Subramanian S., Natarajan K.A., 2006.** Bioremediation of zinc using *Desulfotomaculum nigrificans*: Bioprecipitation and characterization studies. Water Research 40, 3628-3636.
- Rajbir S., Debarati P., Rakesh K.J., 2006.** Biofilms: implications in bioremediation. TRENDS in Microbiology 14 (9), 389-397.
- Rees G.N., Grassia G.S., Sheehy A.J., Dwivedi P.P., Patel B.K.C., 1995.** *Desulfacinum infernum* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfate-reducing bacterium from a petroleum reservoir. International Journal of Systematic Bacteriology 45, 85-89.
- Reis M.A.M., Lemos P.C., Almeida J.S., Carrondo M.J.T., 1990.** Influence of produced acetic acid on growth of sulfate reducing bacteria. Biotechnol. Lett. 12, 145-148.
- Reis M.A.M., Almeida J.S., Lemos P.C., Carrondo M.J.T., 1992.** Effect of hydrogen sulphide on growth of sulphate reducing bacteria. Biotechnology and Bioengineering 40 (5), 593-600.
- Reisinger R.W., Gusek J.J., Richmond T.C., 2000.** Pilot-scale passive treatment test of contaminated waters at the historic Ferris- Haggarty Mine, Wyoming. 5th Int. Conf. on Acid Rock Drainage, Denver, CO. 1071-1077.
- Reisman D.J., Gusek J.J., Bishop M., 2003.** A pre-treatability study to provide data for construction of a demonstration bioreactor. 10th Int. Conf. on Tailings and Mine Waste. Vail, CO. 305-315.
- Rintala J., Lettinga G., 1992.** Effects of temperature elevation from 37 to 55 °C on anaerobic treatment of sulphate rich acidified wastewaters. Environmental Technology 13, 801-812.
- Rissati J.B., Capman W.C., Stahl D.A., 1994.** Community structure of a microbial mat: the phylogenetic dimension. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 10173-10177.
- Roedera R.S., Lenz J., Tarne P., Gebel J., Exner M., Szewzyk U., 2010.** Long-term effects of disinfectants on the community composition of drinking water biofilms. International Journal of Hygiene and Environmental Health 213, 183-189
- Rosner J.T., Torsvik T., Lien T., 1991.** Spore-forming thermophilic sulfate-reducing bacteria isolated from North Sea oil field waters. Applied and Environmental Microbiology 57 (8), 2302-2307.
- Sahinkaya E., Gungor M., 2010.** Comparison of sulfidogenic up-flow and down-flow fluidized-bed reactors for the biotreatment of acidic metal-containing wastewater. Bioresource Technology 101, 9508-9514.
- Sahinkaya E., Özkaya B., Kaksonen A.H., Puhakka J.A., 2007.** Sulfidogenic fluidized bed treatment of metal-containing wastewater at low and high temperatures. Biotechnol. Bioeng. 96, 1064-1072.
- Sahinkaya E., Gunes F.M., Ucar D., Kaksonen A.H., 2011.** Sulfidogenic fluidized treatment of real acid mine drainage water. Bioresource Thechnology 102, 683-689.
- Sanchez R.F., Cordoba P., Sineriz F., 1997.** Use of the USAB for the anaerobic treatment of stillage from sugar-cane molasses. Biotechnology and Bioengineering 27 (12), 1710-1716

- Sani R.K., Geesey G., Peyton B.M., 2001a.** Assessment of lead toxicity to *Desulfovibrio desulfuricans* G20: influence of components of Lactate C medium. *Adv. Environ. Res.* 5, 269-276.
- Sani R.K., Peyton B.M., Brown L.T., 2001b.** Copper-induced inhibition of growth on *Desulfovibrio desulfuricans* G20: assessment of its toxicity and correlation with those of zinc and lead. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4765-4772.
- Sanz J.L., Köchling T., 2007.** Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry* 42, 119-133.
- Sass H., Berchtold M., Branke J., König H., Cypionka H., Babenzien H.D., 1998a.** Psychrotolerant sulfate-reducing bacteria from an oxic freshwater sediment, description of *Desulfovibrio cuneatus* sp. nov. and *Desulfovibrio litoralis* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 21, 212-219.
- Sass H., Wieringa E., Cypionka H., Babenzien H.D., Overmann J., 1998b.** High genetic and physiological diversity of sulfate-reducing bacteria isolated from an oligotrophic lake sediment. *Arch. Microbiol.* 170, 243-251.
- Schmidtova J., Baldwin S.A., 2011.** Correlation of bacterial communities supported by different organic materials with sulfate reduction in metal-rich landfill leachate. *Water Research* 45, 1115-1128.
- Selvaraj P.T., Little M.H., Kaufman E.N., 1997.** Biodesulfurization of flue gases and other sulfate/sulfite waste streams using immobilized mixed sulfate-reducing bacteria. *Biotechnol. Prog.* 13, 583-589.
- Sen A.M., 2001.** Acidophilic sulphate reducing bacteria: Candidates for bioremediation of acid mine drainage pollution. Tesis doctoral. University of Wales.
- Seth R., Goyal S.K., Handa B.K., 1995.** Fixed film biomethanation of distillery spentwash using low cost porous media. *Resources, Conservation and Recycling* 14 (2), 79-89.
- Sheoran A.S., Sheoran V., Choudhary R.P., 2010.** Bioremediation of acid-rock drainage by sulphate-reducing prokaryotes: A review. *Minerals Engineering* 23, 1073-1100.
- Sigalevich P., Meshorer E., Helman Y., Cohen Y., 2000a.** Transition for anaerobic to aerobic growth conditions for the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio oxyclinae* results in flocculation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5005-5012.
- Sigalevich P., Baev M.V., Teske A., Cohen Y., 2000b.** Sulfate reduction and possible aerobic metabolism of the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio oxyclinae* in a chemostat coculture with *Marinobacter* sp. strain MB under exposure to increasing oxygen conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5013-5018.
- Silva A.J., Varesche M.B., Zaiat M., 2002.** Sulphate removal from industrial wastewater using a pack-bed anaerobic reactor. *Process Biochem.* 37 (9), 927-35.
- Silva A.J., Hirasawa J.S., Varesche M.B., Foresti E., Zaiat M., 2006.** Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. *Anaerobe* 12, 93-98.
- Sipma J., Lens P., Vieira A., Miron Y., van Lier J.B., Hulshoff Pol L.W., 1999.** Thermophilic sulphate reduction in upflow anaerobic sludge bed reactors under acidifying conditions. *Process Biochem.* 35, 509-22.
- Song Y.C., Piak B.C., Shin H.S., La S.J., 1998.** Influence of electron donor and toxic materials on the activity of sulfate reducing bacteria for the treatment of electroplating wastewater. *Water Sci. Technol.* 38 (4-5), 187-194.
- Sowmeyan R., Swaminathan G., 2008.** Performance of inverse anaerobic fluidized bed reactor for treating high strength organic wastewater during start-up phase. *Bioresource Technology* 99, 6280-6284.
- Speece R.E., 1983.** Anaerobic biotechnology of industrial wastewaters. *Environmental Science and Technology.* 17, 416A-427A.
- Stadnitskaia A., Muyzer G., Abbas B., Coolen M.J.L., Hopmans E.C., Baas M., Weering T.C.E. van, Ivanov M.K., Poludetkina E., Sinninghe Damsté J.S., 2005.** Biomarker and 16S rDNA evidence for anaerobic oxidation of methane and related carbonate precipitation in deep-sea mud volcanoes of the Sorokin Trough, Black Sea. *Mar. Geol.* 217, 67-96.

- Stahl D.A., Amann R., 1991.** Development and application of nucleic acid probes. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt E. y Goodfellow M. (Ed). Wiley, Chichester, England, 205-248.
- Stams A.J.M., Hansen T.A., 1982.** Oxygen-labile l(+) lactate dehydrogenase activity in *Desulfovibrio desulfuricans*. FEMS Microbiol. Lett. 13, 389-394.
- Stetter K.O., Huber R., Blöchl E., Kurr M., Eden R.D., Fielder M., Cash H., Vance I., 1993.** Hyperthermophilic archaea are thriving in the deep north sea and Alaskan oil reservoirs. Nature 365, 743-745.
- Stubner S., 2002.** Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen detection. Journal of Microbiological Methods 50, 155-164.
- Stubner S., 2004.** Quantification of Gram-negative sulfate-reducing bacteria in rice field soil by 16S rRNA gene-targeted real-time PCR. Journal of Microbiological methods 57, 219-230.
- Stubner S., Meuser K., 2000.** Detection of *Desulfotomaculum* in an Italian rice paddy soil by 16S ribosomal nucleic acid analysis. FEMS Microbiology Ecology 34, 73-80.
- Stucki G., Hanselmann K.W., Hurzeler, 1993.** Biological sulfuric acid transformation: Reactor design and process optimization. Biotechnol Bioeng 41, 303-315.
- Tabak H.H., Govind R., 2003.** Advances in biotreatment of acid mine drainage and biorecovery of metals: 2. Membrane bioreactor system for sulfate reduction. Biodegradation 14, 437-452.
- Tang Y., Shigematsu T., Ikbal, Morimura S., Kida K., 2004.** The effects of microaeration on the phylogenetic diversity of microorganisms in a thermophilic anaerobic municipal solid-waste digester. Water Res. 38,2537-2550.
- Tang K., Baskaran V., Nemati M., 2009.** Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. Biochemical Engineering Journal 44, 73-94.
- Teitzel G.M., Parsek M.R., 2003.** Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology 69 (4), 2313-2320.
- Teske A., Wawer C., Muyzer G., Ramsung N., 1996.** Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified Fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. Applied and environmental microbiology 62 (4), 1405-1415.
- Torsvik V., Ovreas L., Thingstad T.F., 2003.** Prokaryotic diversity: Magnitude, dynamics and controlling factors. Science 296, 1064-1066.
- Traore A.S., Hatchikian C.E., Belaich J.P., Le Gall J., 1981.** Microcalorimetric studies of the growth of sulfate-reducing bacteria: Energetics of *Desulfovibrio vulgaris* growth. Journal of Bacteriology 145 (1), 191-199.
- Traore A.S., Hatchikian C.E., Belaich J.P., Le Gall J., 1982.** Microcalorimetric studies of the growth of sulfate-reducing bacteria: Comparison of the growth parameters of some *Desulfovibrio* species. Journal of Bacteriology 149 (2), 606-611.
- Tsukamoto T.K., Miller G.C., 1999.** Methanol as a carbon source for microbiological treatment of acid mine drainage. Water Research 33 (6), 1365-1370.
- Tsukamoto T.K., Killion H.A., Miller G.C., 2004.** Column experiments for microbiological treatment of acid mine drainage: low-temperature, low-pH and matrix investigations. Water Research 38 (6), 1405-1418.
- Tuttle J.H., Dugan P.R., Randles C.L., 1969.** Microbial sulphate reduction and its potential utility as an acid mine water pollution abatement procedure. Applied Microbiology 17 (2), 297-302.
- Ueki K., Ueki A., Itoh K., Tanaka T., Satoh A., 1991.** Removal of sulfate and heavy metals from acid mine water by anaerobic treatment with cattle waste: Effects of heavy metals on sulfate reduction. J. Environ. Sci. Health A26, 1471-1489.

- Utgikar V.P., Chen B.Y., Chaudhary N., Tabak H.H., Haines J.R., Govind R., 2001.** Acute toxicity of heavy metals to acetate-utilizing mixed cultures of sulfatereducing bacteria: EC100 and EC50. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (12), 2662-2669.
- Utgikar V.P., Harmon S.M., Chaudhary N., Tabak H.H., Govind R., Haines J.R., 2002.** Inhibition of sulfate-reducing bacteria by metal sulfide formation in bioremediation of acid mine drainage. *Environmental Toxicology* 17, 40-48.
- Utgikar V.P., H.H. Tabak, J.R. Haines, R. Govind, 2003.** Quantification of toxic inhibitory impact of copper and zinc on mixed cultures of sulfate-reducing bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 82, 306-312.
- Utgikar V.P., Chaudhary N., Koeniger A., Tabak H.H., Haines J.R., Govind. R. 2004.** Toxicity of metals and metal mixtures: Analysis of concentration and time dependence for zinc and copper. *Water Research* 38, 3651-3658.
- Vallero M.V.G., Hulshoff Pol L.W., Lettinga G., Lens P.N.L., 2003.** Effect of NaCl on thermophilic (55 °C) methanol degradation in sulfate reducing granular sludge reactor. *Water Research* 37, 2269-2280.
- Vallero M.V.G., Lettinga G., Lens P.N.L., 2005.** High rate sulfate reduction in a submerged anaerobic membrane bioreactor (SAMBaR) at high salinity. *Journal of Membrane Science* 253 (1-2), 217-32.
- van den Ende, F.P., Meier, J., van Gemerden, H., 1997.** Syntrophic growth of sulfate-reducing bacteria and colorless bacteria during oxygen limitation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23, 65-80.
- van Houten R.T., Hulshoff Pol L.W., Lettinga G., 1994.** Biological sulphate reduction using gas-lift reactors fed with hydrogen and carbon dioxide as energy and carbon source. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 586-594.
- van Houten R.T., Oude Elferink S.J.W.H., van Hamel S.E., Hulshoff Pol L.W., Lettinga G., 1995a.** Sulfate reduction by aggregates of sulfate reducing bacteria and homo-acetogenic bacteria in a lab-scale gas-lift reactor. *Bioresource Technology* 54, 73-79.
- van Houten R.T., van Aelst A.C., Lettinga G., 1995b.** Aggregation of sulphatereducing bacteria in a homo-acetogenic bacteria in a lab-scale gaslift reactor. *Water Sci. Technol.* 32 (8), 85-90.
- van Houten R.T., van der Spoel H., van Aelst A.C., Hulshoff Pol L.W., Lettinga G., 1996.** Biological sulfate reduction using synthesis gas as energy and carbon source. *Biotechnology and Bioengineering* 50 (2), 136-144.
- van Houten R.T., Yun S.Y., Lettinga G., 1997.** Thermophilic sulphate and sulphite reduction in lab-scale gas-lift reactors using H₂ and CO₂ as energy and carbon source. *Biotechnology and Bioengineering* 55 (5), 807-814.
- van Niel E.W.J, Gottschal J.C., 1998.** Oxygen consumption by *Desulfovibrio* strains with and without polyglucose. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (3), 1034-1039.
- Vander Heyden Y., Nijhuis A., Smeyers-Verbeke J., Vandeginste B.G.M., Massart D.L., 2001.** Guidance for robustness: ruggedness tests in method validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24, 723-753.
- Velasco A., Ramirez M., Volke-Sepulveda T., Gonzalez-Sanchez A., Revah S., 2008.** Evaluation of feed COD/sulfate ratio as a control criterion for the biological hydrogen sulfide production and lead precipitation. *J. Hazard. Mater.* 151, 407- 413.
- Venkata Mohan S., Chandrasekhara Rao N., Krishna Prasad K., Sarma P.N., 2005.** Bioaugmentation of an anaerobic sequencing batch biofilm reactor (AnSBBR) with immobilized sulphate reducing bacteria (SRB) for the treatment of sulphate bearing chemical wastewater. *Process Biochemistry* 40, 2849-2857.
- Videla H.A., Herrera L.K., 2005.** Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *International Microbiology* 8, 169-180.
- Villa-Gomez D., Ababneh H., Papirio S., Rousseau D.P., Lens P.N., 2011.** Effect of sulfide concentration on the location of the metal precipitates in inversed fluidized bed reactors. *Journal of Hazardous Materials* 192 (1), 200-207.
- Visser, A., 1995.** The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. Tesis doctoral. Wageningen University. Wageningen, The Netherlands.

- Visser A., Gao Y., Lettinga G., 1992.** Anaerobic Treatment of synthetic sulfate-containing wastewater under thermophilic conditions. *Water Science and Technology* 25 (7), 193-202.
- Waybrant K.R., Blowes D.W., Ptacek C.J., 1998.** Selection of reactive mixtures for use in permeable reactive walls for treatment of mine drainage. *Environ. Sci. Technol.* 32 (13), 1972-1979.
- Waybrant K.R., Ptacek C.J., Blowes D.W., 2002.** Treatment of mine drainage using permeable reactive barriers: Column experiments. *Environmental Science and Technology* 36, 1349-1356.
- Weijma J., Stams A.J.M., Hulshoff Pol L.W., Lettinga G., 2000.** Thermophilic sulphate reduction and methanogenesis with methanol in a high rate anaerobic reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 67 (3), 354-363.
- Weijma J., Chi T.M., Hulshoff Pol L.W., Stams A.J.M., Lettinga G., 2003.** The effect of sulphate on methanol conversion in mesophilic upflow anaerobic sludge bed reactors. *Process Biochemistry* 38 (9), 1259-1266.
- Wendt-Potthoff K., Koschorreck M., 2002.** Functional groups and activities of bacteria in a highly acidic volcanic mountain stream and lake in Patagonia, Argentina. *Microb. Ecol.* 43, 92-106.
- White C., Gadd G.M., 1996.** Mixed sulphate-reducing bacterial cultures for bioprecipitation of toxic metals: Factorial and response surface analysis of the effects of dilution rate, sulphate and substrate concentration. *Microbiology* 142, 2197-2205.
- White C., Gadd G.M., 1998.** Accumulation and effects of cadmium on sulphate-reducing bacterial biofilms. *Microbiology* 144, 1407-1415.
- White C., Gadd G.M., 2000.** Copper accumulation by sulphate-reducing bacterial biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 183, 313-318.
- Widdel F., 1988.** Microbiology and ecology of sulphate and sulphur reducing bacteria. *Biology of anaerobic microorganisms.* Zehnder A.J.B., (Ed). Wiley Interscience, New York, USA. 469-586.
- Widdel F., 1992.** The genus *Desulfotomaculum*. *The Prokaryotes* (segunda edición). Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W. y Schleifer K.H. (Ed). Springer Verlag, New York, USA. 1793-1799.
- Widdel F., Pfennig N., 1981.** Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. *Archives of Microbiology* 129, 395-400.
- Widdel F., Pfennig N., 1982.** Studies on dissimilatory sulphate-reducing bacteria that decompose fatty acids II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus*, gen. nov., sp. nov. *Archives of Microbiology* 131, 360-365.
- Willis C.L., Cummings J.H., Neale G., Gibson G.R., 1997.** Nutritional aspects of dissimilatory sulfate reduction in the human large intestine. *Current Microbiology* 35, 294-298.
- Willow M.A., Cohen R.R.H., 2003.** pH, dissolved oxygen and adsorption effects on metal removal in anaerobic bioreactors. *Journal of Environmental Quality* 32, 1212-1221.
- Woese C.R., 1987.** Bacterial evolution. *Microbiology Reviews* 51, 221-271.
- Zagury G.J., Kulnieks V., Neculita C.M., 2006.** Characterization and reactivity assessment of organic substrates for sulfate reducing bacteria in acid mine drainage treatment. *Chemosphere* 64, 944-954.
- Zaluski M.H., Trudnowski J.M., Harrington-Baker M.A., Bless. D.R., 2003.** Post-mortem findings on the performance of engineered SRB field-bioreactors for acid mine drainage control. 6th Int. Conf. on Acid Rock Drainage, Cairns, QLD. 845-853.
- Zammit C.M., Mutch L.A., Watling H.R., Watkin E.L.J., 2008.** Evaluation of quantitative real-time polymerase chain reaction for enumeration of biomining microorganisms in culture. *Hydrometallurgy* 94, 185-189.

Zellner G., Jargon A., 1997. Evidence for a tungsten-stimulated aldehyde dehydrogenase activity of *Desulfovibrio simplex* that oxidizes aliphatic and aromatic aldehydes with flavins as coenzymes. Arch. Microbiol. 168(6), 480-485.

Zhang T., Fang H.H.P., 2000. Digitization of DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) profile and cluster analysis of microbial communities. Biotechnology Letters 22, 399-405.

Apéndice

Diseños factoriales fraccionados de dos niveles

A medida que el número de factores en un diseño 2^k aumenta, el número de ensayos necesarios para obtener una réplica completa sobrepasa rápidamente los recursos de la mayoría de los experimentadores. Una réplica completa de un diseño 2^6 requiere 64 ensayos. En este diseño sólo 6 de los 63 grados de libertad corresponden a los efectos principales, y únicamente 15 a las interacciones de dos factores. Los 42 restantes corresponden a las interacciones de tres o más factores.

Si el experimento puede suponer razonablemente que algunas interacciones de orden superior son despreciables, la información sobre los efectos principales y las interacciones de menor orden puede obtenerse realizando sólo una fracción del diseño factorial completo.

Un uso importante de los factoriales fraccionarios se da en los experimentos de escrutinio, donde se consideran muchos factores con el fin de identificar aquellos que tienen efectos importantes, de haberlos. Los experimentos de escrutinio suelen realizarse en las primeras fases de un proyecto cuando es probable que muchos de los factores inicialmente considerados tengan poco o ningún efecto sobre la respuesta. Los factores que se identifican como importantes se investigan entonces con mayor detalle en experimentos posteriores.

Las experiencias con estudios que involucran muchos factores han conducido a la observación de que, en algún punto, las interacciones de alto orden tienden a convertirse en despreciables y pueden ignorarse en el esquema general de las investigaciones preliminares. En la práctica, los efectos principales tienden a ser mayores que las interacciones de dos factores, que a su vez tienden a ser mayores que las interacciones de tres factores y así sucesivamente. El factorial completo tiene cierto grado de redundancia si el investigador puede estar más o menos seguro de que las interacciones de alto orden son despreciables. En estas circunstancias, las estimaciones de efectos principales e interacciones de bajo orden se pueden obtener a partir de una fracción del diseño completo.

El uso de diseños factoriales fraccionados en la investigación industrial o en biotecnología se basa primordialmente en la hipótesis de diversidad de factores que supone que

una pequeña fracción de los efectos de factores es significativa para un proceso, mientras que el resto de los efectos es inerte para propósitos prácticos.

La ventaja de reducir el tamaño del experimento tiene un precio: la pérdida de parte de la información sobre algunos efectos.

Resolución del diseño relacionada con la aleatorización

Los diseños factoriales fraccionados se agrupan en clases de acuerdo con las relaciones de aleatorización que existen en el diseño, estos grupos se identifican por su resolución. Los diseños más comunes son aquellos con resolución III, IV y V.

Resolución III: diseño en el que ningún efecto principal se confunde con otro efecto principal, pero los efectos principales se confunden con interacciones de dos factores y éstas con otras interacciones de dos factores.

Resolución IV: diseño en el que ningún efecto principal se confunde con otro efecto principal o con una interacción de dos factores, pero éstos se confunden entre sí.

Resolución V: diseño en el que ningún efecto principal ni interacción de dos factores se confunde con otro efecto principal o interacción de dos factores, pero estas últimas se confunden con las interacciones de tres factores.

En general, cualquier diseño factorial fraccionado de resolución R no tiene interacciones de q factores confundidas con efectos que tengan menos de $R-q$ factores. La notación usada para identificar un diseño junto con su resolución contiene un subíndice romano para indicar la resolución del diseño; de esta manera, la notación 2_v^{5-1} identifica un factorial fraccionario 2^{5-1} con resolución V.

Examen de los efectos con una gráfica de probabilidad normal

Se supone que las observaciones del experimento tienen una distribución normal con varianza constante σ^2 , pues representan la variación normal aleatoria alrededor de una media fija cuando los cambios en los niveles de los factores no tienen efecto real sobre la respuesta. Así, los efectos factoriales estimados a partir de estas observaciones tienen una distribución normal alrededor de una media 0 con varianza σ^2 cuando los factores no tienen efecto y la gráfica de los efectos estimados será una línea recta en la gráfica de probabilidad normal, pero los efectos estimados que no se ajustan a una línea recta no se pueden explicar como variación aleatoria.

Diseño de resolución III con N unidades experimentales para $N - 1$ factores

Un diseño de resolución III se puede construir para investigar $n = N - 1$ factores con N

unidades experimentales, donde N es un múltiplo de 4. Por ejemplo, la fracción media del factorial 2^3 que se encuentra en la Tabla 2 es un factorial fraccionario de 2_{III}^{3-1} , que tiene $N - 1 = 3$ factores investigados con $N = 4$ unidades experimentales. En los diseños con resolución III los efectos principales no son alias entre si, pero lo son de las interacción de dos factores. Un diseño 2^{n-p} con resolución III requiere p generadores de diseño. Suponiendo que se desea un diseño de resolución III para $N - 1 = 7$ factores en $N = 8$ corridas, estas ultimas serían la fracción $(1/16)$ de las $27 = 128$ necesarias para el factorial completo. Así, el diseño es un factorial fraccionario 2_{III}^{7-4} que requiere $p = 4$ generadores de diseño. La construcción del diseño se inicia escribiendo los coeficientes + y - para los $n - p$ efectos principales en orden normal.

En la Tabla 1 se muestran los coeficientes + y - para $n - p = 3$ efectos principales, A, B y C , en orden normal para un factorial completo de $2^{7-4} = 2^3$.

Unidad	A	B	C	D = AB	E = AC	F = BC	G = ABC	Tratamiento
1	-	-	-	-	+	+	-	def
2	+	-	-	-	-	+	+	afg
3	-	+	-	-	+	-	+	beg
4	+	+	-	+	-	-	-	abd
5	-	-	+	+	-	-	+	cdg
6	+	-	+	-	+	-	-	ace
7	-	+	+	-	-	+	-	bcf
8	+	+	+	+	+	+	+	abcdefg

Tabla 1. Un factorial fraccionario 2_{III}^{7-4} con generadores de diseño ABD, ACE, BCF y ABCG.

Los coeficientes necesarios para el resto de los factores, D, E, F y G se asocian con los coeficientes de todas las columnas de interacción de A, B y C , de este modo, las columnas que indican los niveles de los factores D, E, F y G se generan a partir de las siguientes relaciones de equivalencia: $D=AB \ E=AC \ F=BC \ G=ABC$.

Entonces, los $p = 4$ generadores de diseño son: $D \times AB = ABD ; E \times AC = ACE ; F \times BC = BCF ; G \times ABC = ABCG$.

La relación de definición se encuentra con la multiplicación de los cuatro generadores en todas las formas posibles. La relación de definición completa es: $I = ABD = ACE = AFG = BCF = BEG = CDG = DEF = ABCG = ABEF = ACDF = ADEG = BCDE = BDFG = CEFG = ABCDEFG$.

La estructura de los alias del diseño para los efectos principales se encuentra multiplicando cada uno de estos por las interacciones incluidas en la relación de definición. Las interacciones de dos factores que son alias de los efectos principales son: $A = BD = CE = FG ; B = AD = CF = EF ; C = AE = BF = DG ; D = AB = CG = EF ; E = AC = BG = DF ; F = AG = BC = DE ; G = AF = BE = CD$.

Los diseños de resolución IV requieren 2N unidades experimentales para N-1 factores

Los diseños de 2^{n-p} de resolución IV no tienen efectos principales que sean alias de otros o de interacciones de dos factores y se pueden estimar sin que se hayan confundido con interacciones de dos factores, lo que no era el caso con los diseños de resolución III. Un diseño de 2_{IV}^{n-p} con $N = n$ debe tener al menos $2n$ unidades experimentales o corridas. Un diseño de resolución IV con n factores se puede generar a partir de un diseño de resolución III con $n - 1$ factores mediante una técnica de dobléz, que consiste en agregar una segunda fracción a un diseño de resolución III para $n - 1$ factores en n corridas, todos los signos en la segunda fracción son los inversos de la primera: La columna I en la primera fracción tiene coeficientes +, mientras que en la segunda fracción la columna I tiene sólo coeficientes -, esta columna de coeficientes se usa para un factor agregado el diseño ahora tiene n factores con $2n$ corridas.

Tabla 2. Diseños de factoriales fraccionados 2^{n-p} .

Número de factores	Unidades experimentales	Fracción	Resolución del diseño	Generador de diseño*
3	4	$\frac{1}{2}$	III	$C = AB$
4	8	$\frac{1}{2}$	IV	$D = ABC$
5	8	$\frac{1}{4}$	III	$D = AB$ $E = AC$
	16	$\frac{1}{2}$	V	$E = ABCD$
6	16	$\frac{1}{4}$	IV	$E = ABC$ $F = BCD$
	8	$\frac{1}{8}$	III	$D = AB$ $E = AC$ $F = BC$
7	32	$\frac{1}{4}$	IV	$F = ABCD$ $G = ABDE$
	16	$\frac{1}{8}$	IV	$E = ABC$ $F = BCD$ $G = ACD$
	8	$\frac{1}{16}$	III	$D = AB$ $E = AC$ $F = BC$ $G = ABC$
8	64	$\frac{1}{4}$	V	$G = ABCD$ $H = ABEF$
	32	$\frac{1}{8}$	IV	$F = ABC$ $G = ABD$ $H = BCDE$
	16	$\frac{1}{16}$	IV	$E = BCD$ $F = ACD$ $G = ABC$ $H = ABD$

Referencia:

Kuehl R. O., 2001. Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones. Segunda edición. International Thomson Editores, S.A..