



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**BIORREMEDIACIÓN DE METALES PESADOS POR  
SULFIDOGÉNESIS UTILIZANDO COMUNIDADES Y  
MICROORGANISMOS SULFATO-REDUCTORES**

**Trabajo de Tesis Doctoral**

Graciana Willis Poratti

Director: Dr. Edgardo Donati

**Año  
2016**



Este Trabajo de Tesis Doctoral es presentado para optar al  
grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas

Fue realizado en CINDEFI (CCT La Plata-CONICET, UNLP)





*A Mamá, Papá y Juan,  
por acompañarme siempre*



## *Reconocimientos*

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haber hecho posible la realización del presente Trabajo de Tesis Doctoral.

Al CINDEFI (Centro de Investigación en Fermentaciones Industriales) y a toda la gente que lo conforma por haberme brindado el lugar físico para la realización del presente trabajo.

Al Prof. Dr. David Barrie Johnson (Bangor Acidophile Research Team) de la Universidad de Bangor, Gales por permitirme realizar parte del trabajo de Tesis Doctoral en su laboratorio.

A los Dres. Goh Kian Mau de la Universiti Teknologi, Malaysia y Kok-Gan Chan de la University of Malaya, por la colaboración en la secuenciación del genoma de la cepa LMa1.

Al Ente Provincial de Termas de Neuquén (EPROTEN) por permitir la toma de muestra en el Parque Geotermal Copahue.

Al grupo de la Dra. Alejandra Giaveno perteneciente al IDEPA (CONICET, UNCo) y a la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional del Comahue, por la organización de las campañas de muestreo a la zona de Copahue.





## *Agradecimientos*

A mi director Dr. Edgardo Donati, por haber depositado su confianza en la realización de este trabajo, por dirigirme y haberme dado la oportunidad de viajar y formarme. Muchas Gracias.

A Sabrina Hedrich e Iván Ñancucho por recibirme el primer día que llegué a Gales y ayudarme dentro y fuera del laboratorio siempre que los necesité.

A Carmen Falagán, por compartir charlas de laboratorio, almuerzos, viajes, bailes y salidas y hacer de mi estadía en Gales una de las mejores experiencias. Te quiero mucho!

A Amira Suriaty Yaakop por ayudarme y darme ánimo en la extracción de ADN para la secuenciación del genoma, pero sobre todo por la gran amistad en el corto tiempo que estuvimos juntas.

A mis compañeros de laboratorio, los de hoy, y a los que estuvieron durante todo el camino, por ayudarme siempre que lo necesite.

A “Los Mosqueteros”: Cami, Pato y Sara por estar en las buenas y en las malas durante estos cinco años y darme ánimo constante. Muchas Gracias! Los quiero!

A Marce, por el apoyo y aliento constante en cada ensayo, en cada charla y por estar siempre en los momentos buenos y malos. Gracias por ser una parte importante de mi vida en tan poco tiempo.

A Ceci, por las “charlas de café” y el consejo permanente.

A mis amigos y colegas del IBBM: Carla, Piru, Fran, Jose, etc., por responder mis “dudas moleculares” cada vez que los necesite. A Piru especialmente por ayudarme con la edición.

A mis colegas biotecnólogos, gracias por las risas de los asados y salidas que han hecho estos años muy divertidos.

A mis amigas: Fabri, Tefi, Vicky, Agus, María, Silvi, Estefi y Gime. Gracias por estar en cada momento, en cada logro y en cada fracaso para ayudarme a levantarme y salir adelante. Las quiero!

A mis compañeros del CINDEFI. A Andre, Leo y Tere por compartir los almuerzos y a todos los que siempre estuvieron para ayudarme. Gracias!

A mis tíos: Icha, Eli, Nenona y Huguito, por estar siempre. A mis primos. A mis abuelos que ya no están. Gracias!

A Mami, Papi y Juan, gracias por estar incondicionalmente a mi lado.

... Y a todos los que estuvieron al lado mío durante todo el recorrido...

# Índice

## CAPÍTULO I:

<b>Introducción y Objetivos</b> .....	17
<b>I.1. CONTAMINACIONES CON METALES PESADOS</b> .....	17
<i>I.1.1. Metales pesados y especiación</i> .....	17
<i>I.1.2. Origen de la contaminación con metales pesados</i> .....	17
<i>I.1.3. Contaminaciones antropogénicas de metales pesados en recursos naturales: agua, suelo y aire</i> .....	19
<i>I.1.3.1. Actividades industriales</i> .....	19
<i>I.1.3.2. Actividades agrícolas y residuos domésticos</i> .....	22
<i>I.1.4. Efectos de los metales pesados sobre los ecosistemas y seres vivos</i> .....	23
<b>I.2. TECNOLOGÍAS DE REMEDIACIÓN</b> .....	26
<i>I.2.1. Métodos fisicoquímicos de remediación de metales pesados</i> .....	26
<i>I.2.2. Alternativas biológicas de remediación</i> .....	28
<i>I.2.3. Mecanismos biológicos de remoción de metales pesados de sitios contaminados</i> .....	31
<b>I.3. BIOPRECIPITACIÓN DE METALES PESADOS</b> .....	33
<b>I.4. OBJETIVOS</b> .....	45

## CAPÍTULO II:

<b>Búsqueda de consorcios de microorganismos sulfato-reductores. Caracterización molecular</b> .....	51
<b>II.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	51
<b>II.2. DESCRIPCIÓN DEL SITIO DE MUESTREO</b> .....	53
<i>II.2.1. Ubicación del área</i> .....	53
<i>II.2.2. El volcán Copahue, Río Agrio y Lago Caviahue</i> .....	55
<i>II.2.3. Las Máquinas</i> .....	58
<i>II.2.4. Las Maquinitas</i> .....	59
<i>II.2.5. Termas de Copahue</i> .....	60
<b>II.3. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS FISICOQUÍMICO</b> .....	62
<i>II.3.1. Sitios de recolección de muestras</i> .....	62
<i>II.3.2. Parámetros fisicoquímicos</i> .....	64
<i>II.3.3. Resultados y Discusión</i> .....	65
<b>II.4. PROCEDIMIENTOS DE ENRIQUECIMIENTO</b> .....	69
<i>II.4.1. Consorcios de MSR a pH neutro</i> .....	69

II.4.1.1. <i>Discusión de los resultados</i> .....	70
II.4.1.2. <i>Cinética de crecimiento de los consorcios de MSR a pH neutro</i> .....	72
II.4.1.2.1. <i>Discusión de los resultados</i> .....	74
II.4.2. <i>Conorcios acidófilos de MSR</i> .....	77
II.4.2.1. <i>Discusión de los resultados</i> .....	79
II.5. <b>CARACTERIZACIÓN MOLECULAR</b> .....	83
II.5.1. <i>Sedimentos anaerobios del volcán Copahue</i> .....	83
II.5.1.1. <i>Metodología</i> .....	83
II.5.1.2. <i>T-RFLP arqueas y bacterias - Resultados y Discusión</i> .....	85
II.5.1.3. <i>Bibliotecas del gen 16S rARN de bacterias - Resultados y Discusión</i> .....	92
II.5.1.3.1. <i>Muestra AL1</i> .....	92
II.5.1.3.2. <i>Muestra LMi</i> .....	98
II.5.2. <i>Conorcios de MSR</i> .....	105
II.5.2.1. <i>Metodología</i> .....	105
II.5.2.2. <i>Conorcios acidófilas de MSR. Resultados y discusión</i> .....	106
II.5.2.3. <i>Conorcios a pH neutro de MSR. Resultados y discusión</i> .....	112
II.6. <b>POSIBLES MODELOS GEOMICROBIOLOGICOS</b> .....	116
II.7. <b>CONCLUSIONES FINALES DEL CAPITULO</b> .....	120
<b>CAPÍTULO III:</b>	
<b>Aislamiento y caracterización de microorganismos sulfato-reductores</b> .....	125
III.1. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	125
III.2. <b>AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS SULFATO-REDUCTORES</b> .....	126
III.2.1. <i>Técnica de la doble capa</i> .....	126
III.2.2. <i>Metodología de aislamiento de MSR</i> .....	127
III.2.3. <i>Resultados y discusión</i> .....	128
III.3. <b>CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS</b> .....	131
III.3.1. <i>Metodología</i> .....	131
III.3.2. <i>Resultados y discusión</i> .....	132
III.4. <b>CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LOS AISLADOS</b> .....	139
III.4.1. <i>Caracterización morfológica</i> .....	139
III.4.1.1. <i>Metodología</i> .....	139
III.4.1.2. <i>Resultados y discusión</i> .....	140
III.4.2. <i>Estequiometría de crecimiento</i> .....	152
III.4.2.1. <i>Metodología</i> .....	152

III.4.2.2. Resultados y discusión .....	153
III.4.3. Influencia del pH .....	159
III.4.3.1. Metodología .....	159
III.4.3.2. Resultados y discusión .....	160
III.4.4. Influencia de la temperatura .....	165
III.4.4.1. Metodología .....	165
III.4.4.2. Resultados y discusión .....	166
III.4.5. Influencia de las fuentes de carbono .....	168
III.4.5.1. Metodología .....	168
III.4.5.2. Resultados y discusión .....	169
III.5. SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DE LAS NUEVAS ESPECIES.....	182
III.5.1. Metodología .....	182
III.5.2. Resultados y discusión.....	183
III.5.2.1. Oxidación incompleta de compuestos orgánicos.....	185
III.5.2.2. Reducción de sulfato y conservación de la energía .....	187
III.6. CONCLUSIONES FINALES DEL CAPÍTULO .....	189
<b>CAPÍTULO IV:</b>	
<b>Bioprecipitación de metales pesados en condiciones ácidas .....</b>	<b>195</b>
IV.1. INTRODUCCIÓN .....	195
IV.2. METALES UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS .....	196
IV.3. BIOPRECIPITACIÓN DE METALES PESADOS A BAJOS pH .....	198
IV.3.1. Metodología .....	198
IV.3.2. Resultados y Discusión .....	199
IV.3.2.1. Efecto de los metales pesados sobre el crecimiento del consorcio .....	199
IV.3.2.2. Remoción de metales en solución .....	202
IV.4. BIOPRECIPITACION EN UN SISTEMA REAL .....	211
IV.4.1. Metodología .....	214
IV.4.2. Resultados y Discusión .....	218
IV.4.2.1. Efecto del drenaje ácido sobre el crecimiento del consorcio.....	218
IV.4.2.2. Precipitación de metales en el drenaje ácido del pasivo minero Pan de Azúcar .....	220
IV.5. CONCLUSIONES FINALES DEL CAPÍTULO .....	225
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>229</b>

Anexo I: Métodos Analíticos.....	239
Anexo II: Medios de cultivo .....	250
Anexo III: Protocolos de Biología Molecular .....	256
Anexo IV: Protocolos para microscopía.....	267
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	273

# Capítulo I

---

## Introducción y Objetivos





## CONTENIDO

### **I.1. CONTAMINACIONES CON METALES PESADOS**

- I.1.1. Metales pesados y especiación
- I.1.2. Origen de la contaminación con metales pesados
- I.1.3. Contaminaciones antropogénicas en recursos naturales: suelo, agua, aire
- I.1.4. Efectos sobre los ecosistemas y seres vivos

### **I.2. TECNOLOGÍAS DE REMEDIACIÓN**

- I.2.1. Métodos fisicoquímicos
- I.2.2. Alternativas biológicas de remediación

### **I.3. BIOPRECIPITACIÓN DE METALES PESADOS**

- I.3.1. Microorganismos sulfato-reductores
- I.3.2. MSR en la remoción de sulfato y biosorción
- I.3.3. MSR en la biocorrosión

### **I.4. OBJETIVOS**



## CAPÍTULO I: Introducción y Objetivos

### I.1. CONTAMINACIONES CON METALES PESADOS

#### I.1.1. Metales pesados y especiación

El término “*metales pesados*” es comúnmente utilizado para referirse a un grupo de metales y metaloides asociados a la contaminación ambiental y cuya toxicidad afecta tanto a los seres humanos como a otras formas de vida. La utilización de esta definición es aplicada de forma irregular e inconsistente en la literatura científica y suele provocar confusiones. En realidad, el término –aunque ampliamente extendido en la literatura científica y técnica- nunca ha sido formalmente definido por alguna autoridad formal (Colin y col., 2012).

La definición más antigua se basa en la densidad de estos elementos, clasificando a los metales pesados como aquellos que tienen una densidad igual o superior a 7 g/cm<sup>3</sup> cuando están en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalino-térreos). Elementos como el selenio (Se) y el arsénico (As), aunque metaloides, también se suelen incluir en este grupo, debido a que comúnmente se encuentran asociados a los metales en el ambiente y a que su apariencia y propiedades físicas son muy similares. No obstante, su comportamiento químico en muchos aspectos se asemeja más al de los no-metales (Colin y col., 2012).

Los metales pesados pueden clasificarse en cuatro categorías, de acuerdo con la forma química o especiación en la que se encuentran más habitualmente en el ambiente, pudiendo algunos elementos aparecer en más de una categoría: los *catiónicos* (Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Cr<sup>+3</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Hg<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Pb<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>), los *nativos* (Hg, V), los *oxoaniónicos* (AsO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, CrO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, MnO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, HSeO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SeO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) y los *organocomplejos* (organocomplejos de Ag, As, Hg, Se, Te, Tl).

#### I.1.2. Origen de la contaminación con metales pesados

Los metales pesados están presentes en concentraciones relativamente bajas (0,1-0,01%) en la corteza terrestre, en los suelos y/o en las plantas. La presencia de los

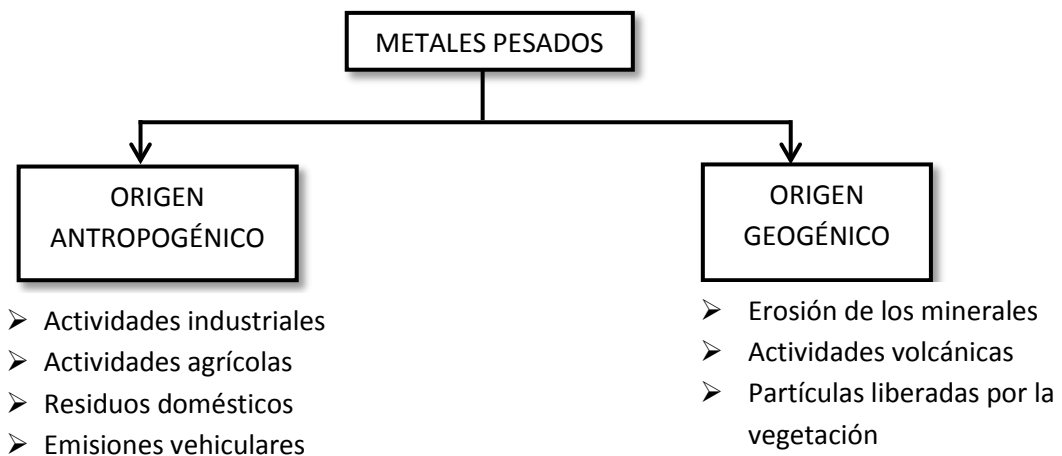
mismos en los suelos y aguas superficiales o subterráneas puede ser de origen **geogénico** o **antropogénico**. La cantidad de metales en el suelo de **origen geogénico** (Figura 1.1) depende en gran medida de los procesos internos de constitución de los mismos (procesos edafogénicos) y de la geodisponibilidad. Esta última se define como aquella porción del contenido total de un elemento o compuesto que puede liberarse a la superficie por procesos mecánicos, químicos o biológicos. Los metales pesados geodisponibles son los que pasan de la roca madre a los suelos tras ser liberados por meteorización, emisiones volcánicas y lixiviación de mineralizaciones y se consideran la **f fuente natural** de metales pesados (Siegel, 2002). La liberación de cationes metálicos de una roca por meteorización depende de muchos parámetros como el clima, la topografía y la permeabilidad de la roca y, en particular, de la actividad biológica. El papel de los microorganismos en la degradación de los minerales es muy importante. De hecho, los microorganismos participan en los ciclos geoquímicos de los principales nutrientes (C, Fe, S, etc.) y de muchos metales (Galán Huertos y Romero Baena, 2008). Cuando estos procesos naturales son perturbados y/o acelerados, los metales pesados tienden a acumularse en los suelos incluso en concentraciones que pueden ser tóxicas para el ser humano, las plantas y los animales (Wuana y Okieimen, 2011).

Por otro lado, la presencia de metales en lagos, lagunas, ríos, acuíferos, se encuentra principalmente influenciada por la composición mineral y química del suelo el cual están en contacto. Los procesos de lixiviado del suelo y, en consecuencia, la posibilidad de transferencia de metales a las aguas en contacto, estarán influenciados por el pH, la temperatura, el potencial redox, la composición microbiana, etc. (Siegel, 2002).

La geodisponibilidad de los metales pesados presentes en las rocas y su aportación al suelo y aguas en muchos casos suele ser insignificante en relación con las derivadas de las **actividades antropogénicas** (Figura 1.1). El crecimiento demográfico y los avances tecnológicos e industriales han incrementado significativamente la contaminación por metales pesados. Los efluentes y los desechos conteniendo elevadas concentraciones de metales pesados son frecuentemente liberados al medio ambiente sin un tratamiento adecuado (Marbán y col., 1999), generando su dispersión en suelos, aguas superficiales y subterráneas e incluso en el aire. Estas

contaminaciones inevitablemente provocan una disminución de la calidad de vida y afectan seriamente la biodiversidad y son, por esa razón, consideradas un problema ambiental muy grave a nivel mundial.

Entre las actividades antropogénicas que generan concentraciones tóxicas de metales pesados en suelos, aguas superficiales y subterráneas y el aire, se encuentran: la extracción de metales en las minas, el refinamiento de productos mineros, la liberación al ambiente de efluentes industriales y las emisiones vehiculares. También son fuentes de concentraciones tóxicas de metales, la aplicación de plaguicidas y los derrames de petróleo (Galán Huertos y Romero Baena, 2008).



**Figura 1.1.** Fuentes de metales pesados en el ambiente (Dixit y col., 2015)

### ***1.1.3. Contaminaciones antropogénicas de metales pesados en recursos naturales: agua, suelo y aire***

#### ***1.1.3.1. Actividades industriales***

Como se ha mencionado, una gran variedad de industrias producen efluentes con elevadas concentraciones de metales pesados. Las industrias que utilizan y, en muchos casos dispersan Cr, Cd, Cu, Ni, As, Pb y Zn se encuentran entre las más peligrosas. Por ejemplo, los **procesos de galvanizado** generan grandes cantidades de aguas residuales que contienen elevadas concentraciones de Cr en su forma

hexavalente que es la más tóxica y soluble (Barakat, 2011). Debido a que este proceso requiere condiciones ácidas, los efluentes de estos procesos tienen bajo pH, donde la mayoría de los metales son altamente solubles, de modo que es común que el Cr esté acompañado por otros metales y también de otros iones no metálicos como  $\text{SO}_4^{-2}$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{Cl}^-$  (Chang y Kim, 2007). Las **industrias** de procesamiento de la **madera** también suelen ser fuente de contaminación con metales pesados ya que el tratamiento de la misma se realiza con soluciones de Cr, Cu y  $\text{AsO}_4^{-3}$ . Otras industrias como las **textiles** y las del **curtido del cuero** también emplean grandes cantidades de Cr en el tratamiento de los cueros y telas. En el **refinado del petróleo** se utilizan catalizadores que contienen Ni, V y Cr, usados para transformar las fracciones pesadas de baja calidad que se obtienen en la destilación primaria (Barakat, 2011).

La **combustión del carbón** es una de las principales fuentes de deposición de metales en el suelo, y las centrales térmicas que usan petróleo pueden ser fuente de Pb, Ni y V y, por otro lado, contribuyen con más de un 90% de la carga metálica en la atmósfera. Las **emisiones vehiculares**, los derrames de petróleo y la depuración de lodos también generan concentraciones tóxicas de metales (Azabou y col., 2007; Efremova e Izosimova, 2012).



**Figura 1.2.** El curtido del cuero y la industria textil y metalúrgica liberan enormes cantidades de metales pesados al suelo

La mayoría de los minerales que son fuentes de metales, los contienen en muy bajas leyes (usualmente menores al 1% p/p); es por eso que la **industria minera** produce millones de toneladas de residuos durante la extracción y recuperación de cantidades significativas de las especies de interés. Estos residuos son dispuestos en la superficie terrestre en *diques de cola* donde los minerales son oxidados liberando grandes cantidades de metales pesados al ambiente y, en particular, a los suelos (Siegel, 2002). En general, los efectos más peligrosos de la liberación de los residuos mineros ocurren cuando los mismos entran en contacto con agua, oxígeno y microorganismos hierro y/o azufre oxidantes produciendo efluentes con elevada carga metálica (Figura 1.3).

Durante el proceso de tratamiento de los minerales, las rocas son trituradas y molidas aumentando su exposición al agua y al aire. Esto puede provocar la disolución, en algunos casos potenciada por acción microbiana, de metales y/o metaloides que contienen esos minerales y que son eventualmente transportados fuera de la mina a través de cursos de agua denominados "*drenajes de mina*". Estos procesos también pueden ocurrir en las rocas naturales ("*drenaje de roca*") pero su extensión está limitada por la baja exposición al aire y al agua.

En el caso de ciertos minerales sulfurados, los drenajes suelen ser ácidos y usualmente oxidantes (*drenajes ácidos de mina: DAM*); estas características permiten la continuidad de la disolución de otras especies minerales provocando una carga muy importante de metales y metaloides. El proceso de generación de los DAM es catalizado significativamente por la presencia de microorganismos hierro y azufre oxidantes, cuyos procesos metabólicos generan Fe(III) y ácido sulfúrico. Los DAM, debido a sus bajos valores de pH, altas concentraciones de Fe(III) y de otros metales pesados, pueden ejercer una acción devastadora incluso muy lejos de su lugar de origen. En las figuras 1.3 y 1.4 se muestran algunas imágenes vinculadas a los DAM.



**Figura 1.3.** Los residuos de las actividades mineras producen los drenajes ácidos de mina cuyo color característico se debe a la elevada concentración de hierro(III)



**Figura 1.4.** a) Drenaje ácido de la mina de oro de La Carolina (provincia de San Luis, Argentina). b) Mina de cobre Parys Mountain (Anglesey, Gales)

#### **1.1.3.2. Actividades agrícolas y residuos domésticos**

Algunos metales pesados asociados a especies lábiles en el suelo, pueden ser lixiviados del mismo directamente a través del riego. Al descargar estas aguas en suelos y/o en lagos o lagunas, los metales pueden acumularse y alcanzar concentraciones tóxicas. En algunos casos, esas aguas de riego pueden infiltrarse en las napas subterráneas contaminando las aguas de consumo doméstico.

Independientemente de los metales que pudieran estar asociados al suelo, los **fungicidas y herbicidas** que utilizan comúnmente para proteger los cultivos pueden contener elevadas concentraciones de metales pesados (Figura 1.5) y contribuir a la contaminación de cursos de agua, de cultivos y de napas subterráneas usadas para consumo humano. Muchos pesticidas químicos contienen Cu, Hg, Mn, Pb y Zn. Un ejemplo lo constituye el fungicida *Bordeaux mixture*, utilizado aun ampliamente en viñedos y cultivos de frutas, que contiene sulfato de cobre(II) y oxiclورو de cobre(II). También los **fertilizantes, abonos y el compost** puede estar contaminados con metales



pesados y contribuir a su dispersión ambiental (Wuana y Okieimen, 2011; Siegel, 2002).

Los **residuos domésticos** son otra posible fuente de contaminación con metales pesados; en promedio, el 10% de la basura está compuesta por metales (Figura 1.5). Su enterramiento también puede contaminar las aguas subterráneas, mientras que la incineración puede contaminar la atmosfera al liberar metales volátiles y contaminar los suelos por deposición de los mismos. Los desechos metálicos de uso doméstico con mayor impacto son aquellos que no son reciclados, como baterías, pilas, electrodomésticos y partes de automóviles, que contienen grandes cantidades de metales pesados y que usualmente no se disponen de manera adecuada (Siegel, 2002).



**Figura 1.5.** La basura, el riego, el uso de fungicidas y herbicidas y los residuos que son producto de los avances tecnológicos, producen la dispersión de los metales pesados en suelos y aguas subterráneas

#### ***1.1.4. Efectos de los metales pesados sobre los ecosistemas y seres vivos***

La contaminación por metales pesados es uno de los mayores problemas ambientales debido a que genera impactos significativos tanto en la salud humana como en los ecosistemas (Pagnanelli et al., 2010; Abioye, 2011; Viera y Donati, 2004).

Diversos factores afectan la movilización, dispersión, deposición y concentración de los metales pesados y, por consiguiente, también regulan sus efectos tóxicos en los ambientes naturales. Los factores intrínsecos de cada metal como solubilidad,

concentración y especiación, y también parámetros ambientales como pH, potencial redox, características del suelo, temperatura, demanda biológica de oxígeno (DBO) y salinidad, determinan la magnitud de la sorción o de la movilidad de los metales (Colin y col., 2012; Siegel, 2002; Singh y Gadi, 2009; Valls y Lorenzo, 2002) y también su biodisponibilidad y toxicidad sobre los seres vivos (Viera y Donati, 2004; Galán Huertos y Romero Baena, 2008).

En el medio ambiente, los metales pesados son más persistentes que los contaminantes orgánicos ya que no pueden ser destruidos ni degradados y, además, tienden a **bioacumularse** y **biomagnificarse** a través de la cadena trófica (Hashim y col., 2011; Viera y Donati, 2004). Así, los metales se acumulan en los organismos vivos alcanzando concentraciones mayores que en los alimentos o el medioambiente de los cuales provienen y, usualmente, estas concentraciones aumentan a medida que se asciende en la cadena trófica (Siegel, 2002).

El riesgo asociado a los suelos contaminados con metales pesados que se utilizan para la agricultura y la ganadería, está relacionado además con la *fito-disponibilidad* (disponibilidad para las plantas). Las plantas son componentes esenciales de los ecosistemas naturales y agroindustriales y los primeros eslabones de la cadena alimenticia. Cuando las plantas crecen en suelos contaminados con metales pesados, estos se acumulan en los tejidos vegetales que posteriormente son ingeridos por animales y, eventualmente, por seres humanos (Abioye, 2011; Efremova e Izosimova, 2012). Por otro lado, en forma independiente al impacto sobre el ecosistema y la salud de los seres humanos que pudieran consumirlas, en ocasiones las plantas que crecen en suelos cercanos a lugares contaminados con metales pesados, presentan un crecimiento anormal y con disminución en el rendimiento de las cosechas, afectando a la sociedad desde un punto de vista económico (Efremova e Izosimova, 2012).

Algunos metales pesados son considerados **oligoelementos o micronutrientes**, es decir, son requeridos en pequeñas cantidades o cantidades traza por plantas y animales y son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital. No obstante, es usual que cantidades mayores que cierto umbral los vuelven tóxicos. Dentro de este grupo se encuentran el B, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Se y Zn. Por otro lado,

los **metales pesados sin función biológica conocida** son tóxicos incluso en bajas concentraciones y su presencia trae aparejados trastornos en el funcionamiento de la mayoría de los seres vivos. Ellos son, principalmente, Cd, Hg, Pb, Sb y Bi (Tabla 1.1) (Abioye, 2011). La mayoría de estas especies son más tóxicas cuando se encuentran en su forma iónica más estable ( $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{As}^{+3}$ ,  $\text{Cr}^{+6}$ ), debido a que pueden reaccionar con las macromoléculas de los seres vivos para formar compuestos biológicos muy estables afectando además su función biológica (Hashim y col., 2011). Usualmente la acción directa de los metales pesados es a través de la inactivación enzimática por formación de enlaces entre el metal y los grupos -SH (sulfhidrilos) de las proteínas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos.

**Tabla 1.1.** Micronutrientes y macronutrientes para el óptimo funcionamiento de los organismos vivos (recopilado de distintas fuentes por Siegel, 2002).

<b>Metales pesados que son micronutrientes esenciales (unos pocos mg o <math>\mu\text{g}/\text{día}</math>)</b>	Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, V, Zn
<b>Otros micronutrientes esenciales</b>	F, I, Si
<b>Macronutrientes (100 mg o más por día)</b>	Ca, Cl, Mg, P, K, Na, S
<b>Metales pesados no esenciales</b>	Be, Cd, Hg, (Ni), Pb, Sb, (Sn), Ti

\*Los metales pesados entre paréntesis pueden ser esenciales

Los metales pueden manifestar su toxicidad al ser incorporados por diferentes vías; por ejemplo, el Cd es tóxico tanto por ingestión como por inhalación. Por otro lado los metales pueden afectar directamente a los seres vivos o indirectamente sustituyendo metales esenciales o impidiendo su entrada; así, el Cd, por ejemplo, afecta la biodisponibilidad de Zn y lo reemplaza en los procesos metabólicos (Siegel, 2002).

Por otro lado, los efectos tóxicos de los metales pesados pueden ser intensificados cuando se ingieren otros elementos, tanto esenciales como no esenciales, que pueden actuar de forma sinérgica o antagonista. Por ejemplo, si se ingieren cantidades excesivas de As el mismo interfiere con el rol del Se en el metabolismo (Siegel, 2002).

## I.2. TECNOLOGÍAS DE REMEDIACIÓN

La **remediación ambiental** tiene como objetivo la remoción de la contaminación del medio ambiente como el suelo, aguas superficiales y subterráneas, sedimentos y el aire. La necesidad de proteger y restaurar el medio ambiente es un motor permanente para el desarrollo de métodos apropiados para la remoción de las contaminaciones (Colin y col., 2012). En lo que se refiere al cuidado del medio ambiente y de la salud humana, las legislaciones contemporáneas, tanto nacionales como internacionales, se basan en datos sobre las características químicas y físicas de la contaminación, especialmente en aquellos casos en donde las incidencias son directamente sobre los seres humanos (Wuana y Okieimen, 2011).

Para la eliminación de los contaminantes orgánicos e inorgánicos del suelo y de cuerpos de agua, se utiliza una amplia variedad de tecnologías (Hashim y col., 2011). La aplicación de métodos de remediación efectivos depende del conocimiento de los factores hidrológicos y geológicos del sitio y, en el caso de los metales pesados, también de la solubilidad y especiación (Barakat, 2011). Para el tratamiento se pueden utilizar **tecnologías fisicoquímicas** y/o **tecnologías de remediación biológica** que, en general, son más económicas y menos contaminantes que las primeras (Colin y col., 2012; Hashim y col., 2011; Sheoran y col., 2010; Viera y Donati, 2004).

### I.2.1. Métodos fisicoquímicos de remediación de metales pesados

En la mayoría de los países desarrollados, la eliminación de los metales pesados de los efluentes y del suelo se lleva a cabo principalmente utilizando **métodos fisicoquímicos** (Sheoran y col., 2010).

Los métodos fisicoquímicos más utilizados para la eliminación de metales pesados de los **suelos** incluyen:

1. *Sustitución del suelo*: se utiliza suelo "limpio" de metales para reemplazar, parcial o totalmente, al suelo contaminado. El objetivo es diluir la concentración de metales e incrementar la capacidad de cultivo del suelo (Yao y col., 2012).

2. *Desorción térmica*: consiste en el calentamiento del suelo para producir la volatilización de algunos contaminantes como Hg y As. Los metales pesados que fueron volatilizados se colectan utilizando presión negativa o un gas transportador (Yao y col., 2012).

3. *Lixiviación química*: en este proceso el suelo es “lavado” utilizando agua, soluciones acuosas con ciertos reactivos u otros fluidos. Entre los reactivos más utilizados se incluyen los agentes quelantes y los surfactantes. Los contaminantes son lixiviados del suelo y luego recuperados del efluente mediante el empleo de técnicas como el intercambio iónico, precipitación, adsorción, etc. (Yao y col., 2012).

La remoción de metales pesados de los **efluentes líquidos** suele hacerse también por métodos fisicoquímicos; los más relevantes son: óxido-reducción, ósmosis inversa, filtración, tratamientos electroquímicos, evaporación, intercambio iónico y precipitación química (Azabou y col., 2007; Viera y Donati, 2004).

La **precipitación química** es el método más utilizado en las industrias. En este proceso, los reactivos químicos reaccionan con los metales pesados para formar compuestos insolubles que luego pueden ser separados de la solución por sedimentación o filtración. Entre los procesos de precipitación química convencionales se incluyen la precipitación con formación de hidróxidos, carbonatos y sulfuros siendo la primera la más empleada (Fu y Wang, 2011).

La solubilidad de varios hidróxidos metálicos disminuye drásticamente en el rango de pH entre 8,0 a 11,0, por lo que el agregado de un agente neutralizante produce el aumento del pH y la precipitación de los metales. Algunos de los agentes neutralizantes utilizados son CaO y MgO,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , NaOH y MgOH. La adición de coagulantes como sales de hierro o polímeros orgánicos, puede incrementar la eficiencia del proceso (Fu y Wang, 2011; Johnson y Hallberg, 2005).

A pesar de ser ampliamente utilizada, la metodología de la precipitación presenta algunas limitaciones. En primer lugar, los precipitados formados son usualmente coloidales por lo que ocupan grandes volúmenes y son de difícil disposición. Por otro lado, algunos hidróxidos metálicos son anfóteros y, por lo tanto, su solubilidad es muy sensible a las variaciones de pH. En tercer lugar, los agentes

complejantes presentes en algunos efluentes pueden inhibir este tipo de precipitación (Fu y Wang, 2011). Otros inconvenientes asociados a esta metodología son el tratamiento de efluentes diluidos (donde la precipitación de hidróxidos y carbonatos ya no es tan efectiva), la necesidad de trabajar con valores de pH muy elevados y la baja selectividad (Bayrakdar y col., 2009; Cruz Viggi y col., 2010; Jameson y col., 2010; Jong y Parry, 2003).

El proceso de **intercambio iónico** ha sido ampliamente utilizado para remover metales pesados de los efluentes debido a que posee varias ventajas entre las que se encuentran la alta capacidad de remoción y la rapidez en el proceso. Las resinas de intercambio iónico, tanto sintéticas como naturales, tienen la capacidad de intercambiar sus cationes con los metales presentes en los efluentes. Las resinas ácidas con grupos sulfónicos ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ) y las débilmente ácidas con grupos carboxílicos ( $-\text{COOH}$ ) son las más utilizadas. El intercambio sucede cuando un efluente conteniendo metales pesados es transportado a través de una columna que contiene la resina y los protones ( $\text{H}^+$ ) son intercambiados por los cationes metálicos de la solución. Entre las resinas naturales más utilizadas se encuentran las zeolitas y los minerales de silicato, que poseen bajo costo y se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, aunque aún su aplicación comercial es muy reducida (Fu y Wang, 2011).

### **1.2.2. Alternativas biológicas de remediación**

En las últimas décadas, y como alternativa a los métodos fisicoquímicos tradicionales, se han desarrollado algunas técnicas de remediación que se basan en la capacidad de los microorganismos para degradar contaminantes y/o contribuir a la mitigación de la contaminación ambiental. Estas metodologías son reconocidas genéricamente como **biorremediación** y originalmente sólo se referían al uso de microorganismos para degradar ciertos compuestos orgánicos contaminantes, convirtiéndolos en compuestos más simples y menos tóxicos (Colin y col., 2012; Stenuit y col., 2008).

La biorremediación de compuestos orgánicos se ha utilizado esencialmente en el tratamiento de los derrames producidos por las actividades industriales vinculadas al

petróleo (extracción, transporte, distribución). Los **hidrocarburos** pueden transformarse y degradarse por acción biológica, llegando incluso en algunos casos a una mineralización completa (Morelli y col., 2005; Perelo, 2010; Ruberto y col., 2003). En el caso de los derrames de petróleo, se ha demostrado que una gran variedad de bacterias (incluyendo algunas cianobacterias), diversos hongos y levaduras, así como determinadas algas verdes, pueden degradar aeróbicamente los hidrocarburos presentes en el petróleo. El metano, el hidrocarburo más sencillo, es degradado por un grupo especializado de bacterias, las bacterias metanotróficas (Madigan et al., 2004).

La biorremediación también se ha utilizado para el tratamiento de contaminaciones producidas por plaguicidas. Los **plaguicidas** son compuestos xenobióticos (es decir, que no existen de manera natural) y son componentes frecuentes de los residuos tóxicos. Muchos xenobióticos están relacionados estructuralmente con compuestos naturales, por lo que pueden ser degradados naturalmente por enzimas que ya existen para realizar esa tarea. Los microorganismos con capacidad para metabolizar plaguicidas y herbicidas son bastante diversos e incluyen tanto bacterias como hongos. Algunos plaguicidas pueden servir como fuente de carbono y/o de energía e, incluso, ser degradados completamente a CO<sub>2</sub> (Madigan et al., 2004; Stenuit et al., 2008).

La biorremediación presenta algunas **ventajas** cuando se la compara con otras técnicas convencionales, en particular, cuando los contaminantes están en bajas concentraciones o ampliamente diseminados. Dichas ventajas son variables de acuerdo al tratamiento específico elegido, el tipo de contaminación y las condiciones de la misma (Radhika et al., 2006; Tomotada y Masao, 2001; Viera y Donati, 2004). Entre otras, esas ventajas incluyen:

- Menores costos de tratamiento
- Tratamiento in situ de los contaminantes
- Reducción y eliminación de productos finales
- Eliminación de un costoso equipamiento
- Menores cantidades de sedimentos
- Menor impacto residual

Las tecnologías de remediación biológica involucran, en algunas ocasiones, el **tratamiento in-situ** de los contaminantes, es decir en su localización original. Las tecnologías de biodegradación pueden utilizar diferentes contribuciones (Abioye, 2011; Colin y col., 2012; Dias y col., 2015; Haro y col., 2007; Johnson y Hallberg, 2005; Perelo, 2010; Sánchez-Andrea y col., 2014) que se detallan más abajo:

1) *Bioatenuación o atenuación natural*: en este caso, la tecnología aprovecha la degradación que se produce naturalmente en el lugar contaminado y consiste fundamentalmente en el monitoreo de la degradación del o de los contaminantes para asegurar que las concentraciones se reducen en el tiempo. En un estudio realizado por Magar (2001) se identificaron varios procesos químicos, físicos y biológicos que participan en la atenuación natural. Entre otros, se incluyen la deposición natural de los sedimentos contaminados, la sorción de los compuestos activos y la conversión de los contaminantes en compuestos más sencillos por parte de los microorganismos presentes en la comunidad del lugar.

2) *Bioestimulación*: en este caso la tecnología consiste en la adición de nutrientes, tanto orgánicos como inorgánicos, para aumentar la actividad de los microorganismos autóctonos y de esa manera producir la biodegradación de los contaminantes. Estas metodologías han sido aplicadas ampliamente y con éxito a la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Los nutrientes que normalmente se agregan son P, N y C. El agregado de piruvato y el uso de compost que estimulan el crecimiento microbiano y aumentan la velocidad de degradación de hidrocarburos (Abioye, 2011; Perelo, 2010) son ejemplos notables de bioestimulación.

3) *Bioaumentación*: en esta tecnología se inoculan microorganismos que poseen la capacidad de degradar ese contaminante para incrementar las capacidades de biodegradación y biotransformación de la comunidad autóctona de los sitios contaminados. En algunos casos, esta tecnología incluye la adición de microorganismos genéticamente modificados para degradar un contaminante. Esta tecnología ha perdido terreno en los últimos años debido a que siendo el suelo un ambiente complejo, la capacidad de degradación y/o transformación de los contaminantes por parte de los microorganismos exógenos pueden verse afectadas por las condiciones fisicoquímicas y biológicas del mismo. Además, el agregado de microorganismos



genéticamente modificados en los sitios contaminados puede alterar la ecología del ambiente así como también producir otros riesgos para la salud humana.

### **1.2.3. Mecanismos biológicos de remoción de metales pesados de sitios contaminados**

En esta sección se describirán algunos de los procesos por los cuales los microorganismos y/o diferentes tipos de materiales biológicos contribuyen a la remediación de los **metales pesados** presentes tanto en matrices sólidas cuya carga metálica debe reducirse, como en efluentes líquidos de los cuales deben removerse. Debido a que, como se ha anticipado, los metales no pueden degradarse, la mayoría de las metodologías de remediación consisten esencialmente en la **movilización** del metal (útil cuando el metal está presente en matrices sólidas) o en su inmovilización (cuando el mismo está en un efluente líquido).

El proceso de movilización de un metal por acción microbiana es denominado **biolixiviación**; está basado en la capacidad de algunos microorganismos de solubilizar determinados componentes presentes en una matriz sólida. Existen distintos mecanismos a través de los cuales los microorganismos pueden catalizar los procesos de solubilización de metales; entre ellos se destacan (Krebs, 1997; Viera y Donati, 2004):

- Producción de ácidos orgánicos (cítrico, oxálico) o inorgánicos (sulfúrico).
- Reacciones de óxido-reducción de los metales.
- Metilación de metales para dar compuestos más volátiles.
- Producción de agentes complejantes y sideróforos.

Un caso especialmente importante y con aplicaciones comerciales en el área de la recuperación de metales, es el de las bacterias y arqueas denominadas hierro y azufre oxidantes (Madigan et al., 2004; Donati y Sand, 2007). Estos microorganismos son capaces de generar medios ácidos (a través de la producción de ácido sulfúrico) y medios oxidantes (a través de la generación de hierro férrico). Estos medios se pueden utilizar para solubilizar metales presentes en muy diferentes matrices. Esta

metodología se aplica para la recuperación de metales a partir de minerales de baja ley pero puede ser extendida para la eliminación de metales presentes en residuos, lodos, materiales agotados, etc. (Donati y Sand, 2007; Marchevsky y col., 2015).

El proceso de **inmovilización** de un metal, es decir, el pasaje de un estado inicial en el cual es soluble en el efluente a un estado final en el que ya no lo es, puede realizarse utilizando biomasas viables o no viables (Gadd, 2004; Veglio y Beolchini, 1997). En el caso de utilizar microorganismos viables, los mismos deben ser resistentes o, al menos, tolerantes a los metales. La capacidad de los microorganismos para sobrevivir en ambientes con metales pesados está relacionada con diversos mecanismos que potencialmente podrían ser utilizados para el tratamiento de zonas contaminadas a través de procesos de inmovilización (Valls y de Lorenzo, 2002; Viera y Donati, 2004). En el caso de la inmovilización de metales pesados, las tecnologías que han alcanzado un mayor desarrollo son la **biosorción y la bioprecipitación**.

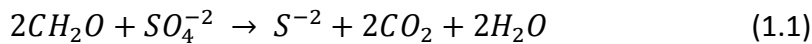
La **biosorción** es un proceso mediante el cual los organismos concentran metales sobre su superficie o en el interior de sus células. Existen numerosos mecanismos de biosorción siendo algunos mediados por el metabolismo microbiano mientras que otros son esencialmente procesos fisicoquímicos que ocurren entre el metal y diferentes grupos funcionales presentes en la biomasa. De ese modo, las biomasas, viables o no, pueden utilizarse para secuestrar metales presentes en soluciones acuosas. Factores como la disponibilidad de nutrientes durante el crecimiento (si se está trabajando con biomasa viable), el estado fisiológico de las células bacterianas, las condiciones ambientales (como el pH, fuerza iónica y temperatura), la presencia de iones competitivos y la concentración de la biomasa, pueden influir sobre el proceso de biosorción (Farooq y col., 2010; Sheoran y col., 2010). Debido a que es simple, económica y de alta eficiencia, esta tecnología ha alcanzado la fase de aplicación comercial.

El proceso de **bioprecipitación** se describirá con más detalle en la siguiente sección debido a que este trabajo de tesis lo tiene como eje fundamental.

### I.3. BIOPRECIPITACIÓN DE METALES PESADOS

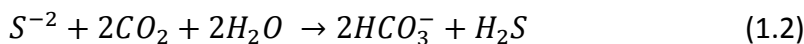
La **bioprecipitación** utiliza microorganismos capaces de generar metabolitos que precipitan con muchos de los metales pesados.

Dentro de los procesos de bioprecipitación, se destacan aquellos que utilizan microorganismos sulfato-reductores (MSR). Bajo condiciones de anaerobiosis, estos microorganismos son capaces de reducir  $SO_4^{-2}$  a  $S^{-2}$ , utilizando compuestos orgánicos sencillos como dadores de electrones. La energía resultante de este proceso es utilizada por los microorganismos para su crecimiento y desarrollo (ecuación 1.1) (Sheoran y col., 2010).

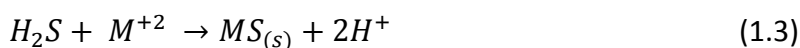


donde  $CH_2O$  representa la fuente de carbono y energía

El  $CO_2$  disuelto es parcialmente neutralizado (ecuación 1.2) y de esta manera se favorece la precipitación de minerales carbonatados.



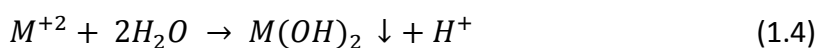
Las especies  $H_2S$ ,  $HS^-$  y  $S^{-2}$  pueden reaccionar con una variedad de metales para formar los precipitados correspondientes (la ecuación anterior lo ejemplifica para  $H_2S$ ):



donde M es un metal catiónico divalente cuyo sulfuro tiene bajo producto de solubilidad (Cd, Fe, Ni, Cu o Zn, entre otros).

En general, el balance ácido-base entre estos procesos provoca un aumento del pH aunque el resultado depende esencialmente del dador de electrones que se utilice, por ejemplo (lactato, acetato, propionato, glicerol, etc).

Los cationes metálicos divalentes pueden precipitar, no sólo como sulfuros, sino también como hidróxidos metálicos debido al incremento de pH (Sheoran y col., 2010).



Una de las ventajas de este tratamiento biológico en el cual la mayor parte de los precipitados son sulfuros, es la reducción del volumen de los sedimentos que se genera respecto de hidróxidos y carbonatos que suelen ser coloidales y más voluminosos. Además, bajo condiciones de anaerobiosis, los sulfuros metálicos son más estables e insolubles que los hidróxidos o carbonatos correspondientes (Gonzalez-Silva y col., 2009; Bhagat, 2004; Gonzalez-Silva y col., 2009; Sheoran y col., 2010). Por estas razones, la bioprecipitación usando MSR es una de las tecnologías más prometedoras para inmovilizar metales de efluentes contaminados (Oyekola y col., 2009).

La clasificación “*microorganismos sulfato-reductores*” es funcional e incluye a todos los microorganismos que realizan la respiración anaeróbica utilizando sulfato como aceptor final de los electrones. A pesar de que algunos microorganismos con capacidad sulfato-reductora son arqueas, en general, estos microorganismos son denominados “*bacterias sulfato-reductoras (BSR)*” ya que las bacterias son amplia mayoría. Las características morfológicas de estos microorganismos varían considerablemente según la especie que se trate; se han reportado bacilos, vibrios, cocos, espirilos, etc. Basados en el análisis de las secuencias del gen ARNr16S, los MSR se pueden clasificar del siguiente modo (Castro y col., 2000; Sheoran y col., 2010):

- *Subdivisión  $\delta$ -proteobacterias*: contiene a las BSR Gram-negativas mesófilas, con temperaturas de crecimiento óptimas entre 20 y 40°C. Este grupo es diverso, con una gran variedad de morfologías y características fisiológicas representativas, y dentro de él se encuentran bacterias de los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfomonile*, *Desulfonema*, *Desulfobotulus* y *Desulfoarculus*, entre otros.

- *Bacterias sulfato-reductoras Gram-positivas*: este grupo está mayormente representado por el género *Desulfotomaculum* y *Desulfosporosinus*, que fueron aislados en su mayoría de ambientes volcánicos. En cultivos puros estas bacterias requieren una temperatura de crecimiento similar a la de las mesófilas (alrededor de los 40°C) aunque algunas especies pueden soportar temperaturas mayores (Sheoran y col., 2010). Esta última característica se debe principalmente a la capacidad de formar *endoesporas*, que además le permiten resistir las elevadas temperaturas encontradas

en los ambientes volcánicos (Alazard y col., 2010; Aullo y col., 2013; Stackebrandt y col., 1997).

- *Bacterias sulfato-reductoras termófilas:* contiene los géneros *Thermodesulfobacterium* y *Thermodesulfovibrio*, entre otros. Estas bacterias tienen una temperatura óptima de crecimiento entre los 65 y 70°C y se encuentran en ambientes de elevada temperatura.

- *Arqueas termófilas:* se desarrollan a temperaturas superiores a los 80°C y han sido encontradas sólo en regiones marinas. Todos los microorganismos sulfato-reductores de este grupo encontrados hasta ahora pertenecen al género *Archaeoglobus*.

Todos los MSR llevan a cabo el proceso de reducción desasimilatoria de sulfato (Barton y Hamilton, 2007; Pagnanelli y col., 2010). Algunos MSR pueden usar otros aceptores de electrones diferentes del sulfato en la respiración anaerobia. Entre estos se incluyen S elemental, fumarato,  $\text{NO}_3^-$ , dimetilsulfóxido, Fe(III) y Mn(IV) (Barton y Hamilton, 2007; Chen y col., 2006). Debido a que la reacción desasimilatoria de sulfato es inhibida bajo condiciones aeróbicas, los MSR pueden crecer a expensas de la reducción de sulfato sólo en completa ausencia de oxígeno y es por esto que son consideradas anaerobios estrictos. Sin embargo, algunos MSR son capaces de mantener un metabolismo aerobio en un proceso que no sustenta el crecimiento y que probablemente sólo provea de la energía necesaria para el mantenimiento celular (Barton y Hamilton, 2007; Baumgartner y col., 2006; Portillo y Gonzalez, 2009).

Los MSR requieren un potencial redox de aproximadamente 0 a -200 mv (Azabou y col., 2007). El potencial redox ( $E^0$ ) de la dupla  $\text{SO}_4^{-2}/\text{HS}^-$  es -217 mV en condiciones normales (concentración 1M de  $\text{SO}_4^{-2}$  y  $\text{HS}^-$ , pH 7,0 y 25°C). En condiciones fisiológicas (< a 30 mM de sulfato y  $\text{HS}^-$  < a 1mM) el potencial es algo más positivo, aproximadamente -200 mV. Debido a esto, a cualquier concentración de  $\text{SO}_4^{-2}$  y  $\text{HS}^-$ , la mayoría de los compuestos orgánicos que son generados por las plantas o animales (incluyendo los carbohidratos, ácidos grasos, etc) pueden ser, en teoría, oxidados completamente a  $\text{CO}_2$  (Barton y Hamilton, 2007). En la tabla 1.2 se observan los

potenciales de algunos pares redox correspondientes a potenciales dadores de electrones en comparación al de la reducción de sulfato.

**Tabla 1.2.** Potenciales redox  $E^{\circ}$  de algunos dadores de electrones termodinámicamente capaces de reducir sulfato (Barton y Hamilton, 2007)

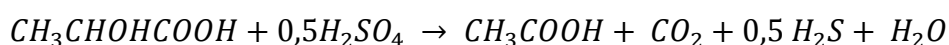
Par redox	n	$E^{\circ}$ (mV)
2CO <sub>2</sub> + 2acetato/hexosa	8	-670
CO <sub>2</sub> + acetato/piruvato	2	-660
CO <sub>2</sub> + acetato/lactato	4	-430
6CO <sub>2</sub> /hexosa	24	-410
CO <sub>2</sub> + acetato/glicerol	6	-290
2CO <sub>2</sub> /acetato	8	-290
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> /HS <sup>-</sup>	8	-217 (-200)*
2H <sup>+</sup> /H <sub>2</sub>	2	-414 (-270 a -300)*1
S <sup>0</sup> /H <sub>2</sub> S	2	-270 (-200)*2

\*Calculado para: [SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>]= 30mM y [HS<sup>-</sup>]=0,1 mM. \*1 Calculado para una presión parcial de H<sub>2</sub> de 1Pa y 10Pa respectivamente \*2 Calculado para: [HS<sup>-</sup>]=0,1 mM

Se ha demostrado que una diferencia de potencial ( $\Delta E'$ ) de +25 mV, equivalente a una variación de energía libre ( $\Delta G'$ ) de -20 KJ/mol, es suficiente para mantener el crecimiento de los MSR (Barton y Hamilton, 2007). Es por eso que los MSR utilizan muchos de los compuestos detallados en la tabla 1.3 (y otros no incluidos en ella), tanto individualmente como en relaciones sintróficas con otros microorganismos.

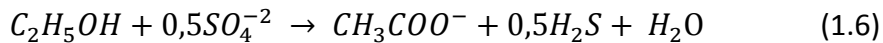
Entre los dadores de electrones más utilizados se encuentran los ácidos orgánicos de bajo peso molecular como lactato, formiato, acetato y algunos alcoholes como el etanol y glicerol (ecuación 1.5 y 1.6). La oxidación suele ser incompleta dando productos parcialmente oxidados; un caso habitual es la producción de acetato (razón por la cual, fue introducido en los pares redox de la tabla anterior).

1) Oxidación incompleta de ácido láctico a ácido acético y dióxido de carbono:



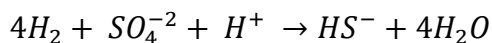
$$\Delta G^{0'} = -196,4 \text{ kJ/mol} \quad (1.5)$$

2) Oxidación de etanol:



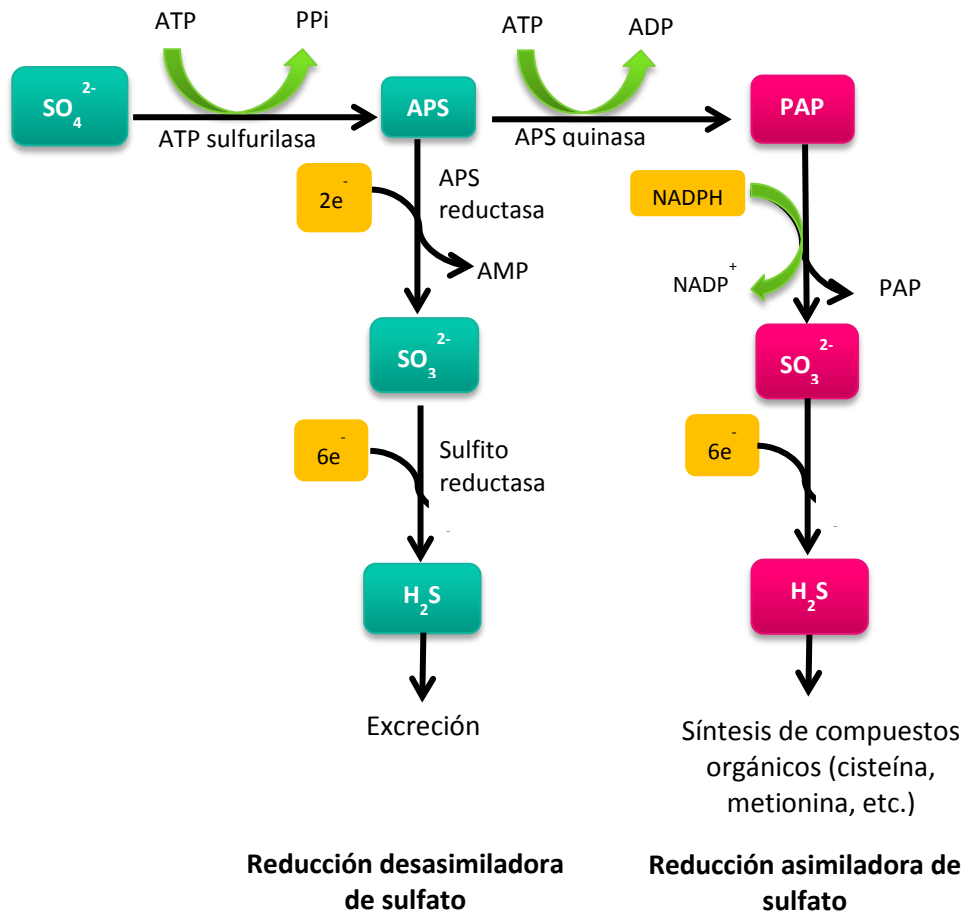
También existen algunas especies de MSR que son capaces de obtener energía a partir de la oxidación de hidrógeno molecular ( $H_2$ ) (ecuación 1.15); en este caso, el carbono necesario para la síntesis de proteínas es obtenido del  $CO_2$  por lo que pueden considerarse autótrofos. La energía libre obtenida en este proceso es más favorable de la que se obtiene con el mismo dador de electrones en la metanogénesis (Barton y Hamilton, 2007; Liamleam y col., 2007; Sheoran y col., 2010).

3) Oxidación de hidrógeno molecular:



$$\Delta G^{0'} = -151.8 \text{ kJ/mol} \quad (1.7)$$

La reducción de sulfato a  $H_2S$  no ocurre a través de una única etapa sino en un mecanismo que incluye algunas fases intermedias. El ion sulfato es estable y no puede reducirse si antes no está activado. La enzima **ATP sulfurilasa** cataliza la unión del sulfato a un fosfato del ATP, dando lugar a la formación de *adenosina fosfosulfato* (APS). En la reducción desasimilatoria de sulfato la parte sulfato del APS se reduce directamente a sulfito ( $SO_3^{-2}$ ), por la acción de la enzima **APS reductasa** con liberación de AMP. Una vez formado el sulfito, se forma  $H_2S$  mediante la enzima **sulfito reductasa** (DSR) que se encuentra también en los microorganismos que realizan la reacción asimiladora de sulfato (Figura 1.10) (Madigan y col., 2004).

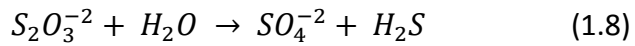


**Figura 1.10.** Esquema de la reducción asimiladora y desasimiladora de sulfato

En la reducción desasimiladora de sulfato, las reacciones de transporte de electrones dan lugar a la formación de una fuerza protón-motriz y ésta impulsa la síntesis de ATP por la ATPasa. Para algunos MSR como *Desulfovibrio vulgaris*, la enzima hidrogenasa parece desempeñar un papel fundamental en la reducción de sulfato con  $H_2$  como fuente de energía o con un compuesto orgánico como el lactato. El lactato se convierte en acetato con producción de  $H_2$ . Este hidrógeno es utilizado luego por la hidrogenasa para generar la fuerza protón motriz (Madigan y col., 2004).

Algunas BSR llevan a cabo una forma singular de metabolismo llamado reducción desproporcionada, usando compuestos de azufre de estado de oxidación intermedio. *Desulfovibrio sulfodismutans* puede reducir desproporcionadamente compuestos de azufre del siguiente modo:





$$\Delta G^{\circ} = -21,9 \text{ kJ/reacción}$$

Otros compuestos reducidos de azufre como el sulfito ( $SO_3^{2-}$ ) y el azufre ( $S^0$ ) también pueden resultar desproporcionados por la acción de diversos MSR. Estas formas de metabolismo podrían ser vías por las cuales estos microorganismos recuperan energía a partir de intermediarios del azufre producidos por la oxidación de  $H_2S$  debida a los quimiolitótrofos del azufre (como *At. thiooxidans*, *At. caldus*, etc.) que coexisten con ellos en la naturaleza (Madigan y col., 2004).

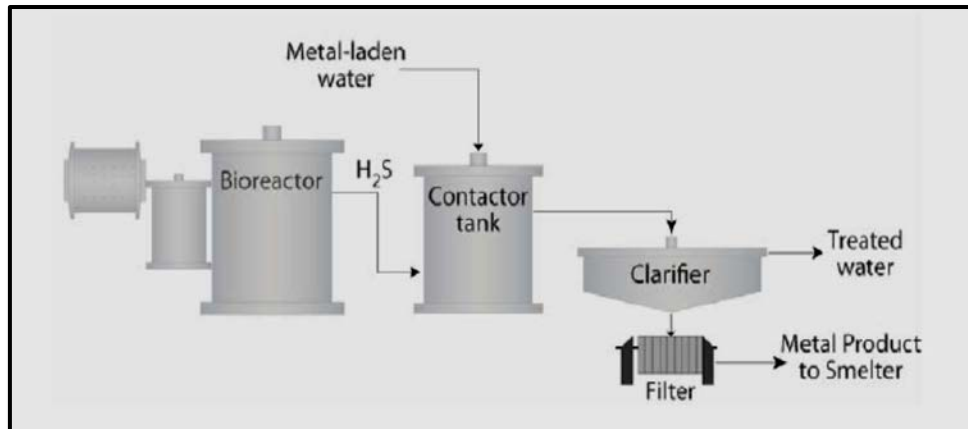
Los MSR crecen mejor bajo condiciones levemente alcalinas y en un rango de pH relativamente estrecho (entre 7,0 y 7,8). También existen especies con capacidad de desarrollarse en ambientes alcalinos (pH 9,5) (Barton, 1995). Los metales son importantes para el crecimiento de estos microorganismos y deben ser adicionados a los medios de cultivos porque actúan como cofactores enzimáticos: níquel y selenio son requeridos por la enzima hidrogenasa; calcio es importante para incrementar la eficiencia del crecimiento en placa; por otra parte, el hierro es un elemento esencial para la producción de la hidrogenasa y de los citocromos (Barton, 1995). Los metales pesados presentes en los medios de cultivo precipitan el sulfuro generado; esto evita la inhibición que sufren los MSR a altas concentraciones de sulfuros solubles (Sánchez-Andrea y col., 2014).

La presencia de MSR ha sido documentada en numerosos ambientes: en los sedimentos anaerobios de ambientes termales, en los drenajes ácidos de minas (donde la reducción de sulfato constituye un proceso dominante en la remineralización), en el tracto digestivo de animales, en instalaciones petroleras, en plantas de tratamientos de residuos y en reactores anaerobios (Kleikemper y col., 2002; Portillo y Gonzalez, 2009). El fenómeno de mineralización que se observa en los tapetes microbianos y estromatolitos se debe a la interacción a pH alcalino entre los cationes calcio y los exopolisacáridos (EPS) producidos por los MSR que forman parte del sistema (Baumgartner y col., 2006; Braissant y col., 2007).

Además, los MSR son componentes fundamentales de los ciclos del azufre y del carbono (Leloup et al., 2004) y coexisten con otros microorganismos, tanto aerobios como anaerobios, formando comunidades microbianas. En algunas de estas comunidades, los otros microorganismos tienen la capacidad de consumir las sustancias más complejas y formar productos orgánicos simples que pueden servir como fuente de carbono para los MSR (Bhagat, 2004; Barton y Hamilton, 2007).

Como ya se ha mencionado, uno de los problemas más graves producidos por la industria minera es el drenaje ácido de minas (DAM). Las características de los DAM, hacen a estos efluentes candidatos para la aplicación de tratamientos de bioprecipitación, ya que muchos de los metales y metaloides que se encuentran en los DAM tienen la capacidad de reaccionar con el sulfuro producido por los MSR. Por otro lado, el bicarbonato generado en el proceso metabólico de los MSR alcaliniza el medio. Debido a que la concentración del sulfuro generado por los MSR puede cambiarse variando el pH de la solución y la concentración de materia orgánica, es posible lograr una precipitación selectiva de los metales basada en su distinta solubilidad (Jiménez-Rodríguez y col., 2009; Johnson, 2012; Oyekola y col., 2009). Por ejemplo, manteniendo el pH en el rango 4-4,5, algunos metales como cobre, níquel y zinc pueden ser precipitados en forma diferencial mientras el hierro permanece en solución (Ñancuqueo y Johnson, 2012; Tabak y col., 2003; Veeken y col., 2003).

La principal limitación de la aplicación de la bioprecipitación al tratamiento de los DAM es que la gran mayoría de los MSR no son capaces de desarrollarse a bajos valores de pH. Este problema es eludido en el denominado proceso BioSulfide (Bratty y col., 2006) en donde el crecimiento de los MSR se produce en un reactor independiente. Luego, el sulfuro producido es conducido al reactor por el cual accede el DAM tal cual muestra la Figura 1.8 (Johnson, 2012).



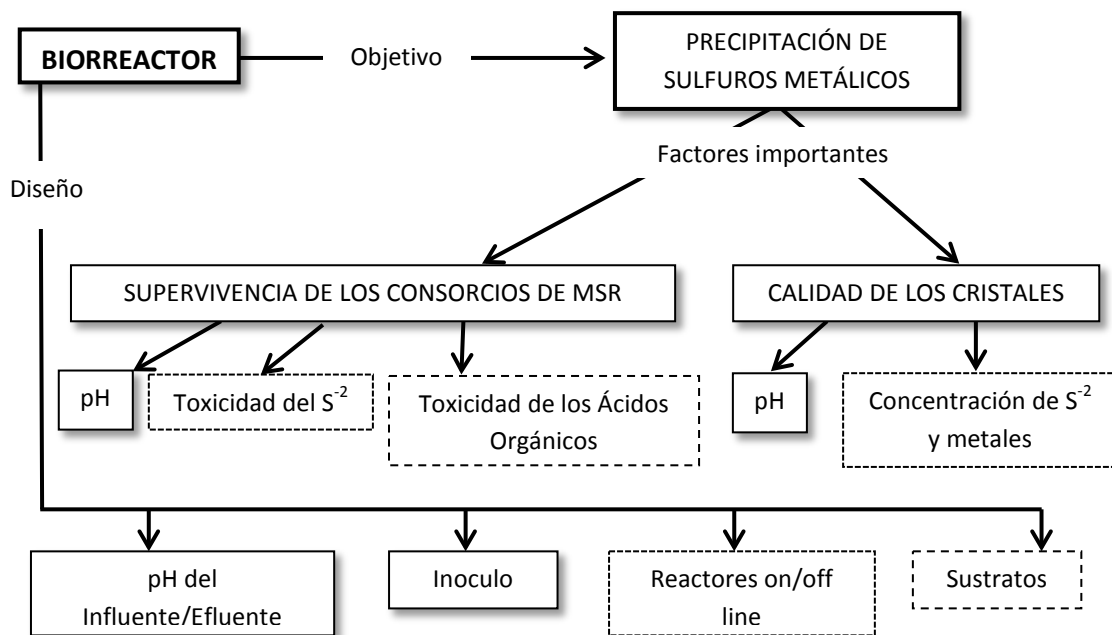
**Figura 1.8.** Diagrama del Proceso BioSulfide (Bratty y col., 2006)

La posibilidad de realizar el proceso en un solo reactor depende esencialmente de la disponibilidad de consorcios sulfato-reductoras capaces de reducir sulfato a bajos valores de pH (Johnson, 2012).

Estos reactores que operan a valores bajos de pH presentarían múltiples ventajas respecto de metodologías tradicionales, tanto químicas como biológicas, de remoción de metales pesados (Sánchez-Andrea y col, 2014):

- Menor concentración de metales en el efluente; la precipitación de hidróxidos metálicos no se produce a bajos valores de pH.
- Menor concentración de sulfato en el efluente debido a la gran eficiencia de remoción.
- Menor producción de desechos contaminantes
- Posibilidad de lograr la precipitación selectiva de los metales con el control del pH.

Si la precipitación selectiva de metales es el objetivo de un biorreactor de este tipo, existen dos factores claves para la formación de los sulfuros metálicos: la *supervivencia de los consorcios de MSR* y la *formación de los cristales*. Estos dos factores dependerán, a su vez, de parámetros que son importantes para el diseño de los biorreactores como el pH, la fuente de carbono y la concentración de sulfuro producido (figura 1.9) (Sánchez-Andrea y col., 2014).



**Figura 1.9.** Esquema de los diferentes factores que tienen impacto en el desarrollo de los consorcios sulfato-reductores y la formación de cristales. Las líneas definidas muestran cuales de estos factores afectan el diseño de los biorreactores. Fuente: Sánchez-Andrea y col., 2014).

Aunque se destaca su participación en procesos de bioprecipitación, los MSR también pueden participar en procesos de biosorción. En un rango de pH de 4 a 7 estos microorganismos pueden retener metales pesados por biosorción debido a que los componentes de la pared celular se encuentran en su estado desprotonado. Se ha reportado que la biosorción en estos microorganismos puede ser independiente del metabolismo (sorción sobre las paredes celulares) o dependiente del metabolismo (transporte, o el secuestro intracelular) (Chen y col., 2000; Sheoran y col., 2010; Veglio y Beolchini, 1997).

Aunque en el contexto de estas tesis, se analizará la bioprecipitación que es una tecnología positiva que puede contribuir a la mitigación de la contaminación ambiental, los MSR son responsables del deterioro de metales y otros materiales a través del proceso de biocorrosión o corrosión influenciada por microorganismos (MIC). Los microorganismos azufre oxidantes y los hierro reductores también participan en el MIC aunque en menor medida. Los mecanismos de biocorrosión son complejos; los mismos incluyen la despolarización de metales, la formación de minerales, la complejación con sustancias exopoliméricas (EPS), el ataque ácido y el flujo de los electrones. La adhesión de los microorganismos formando películas sobre la superficie de los metales (u otros materiales) establece concentraciones microelectrónicas que permiten que el flujo de electrones se inicie desde el ánodo hacia el cátodo. Durante la corrosión aeróbica, el área del metal debajo de las biopelículas actúa como ánodo resultando en la disolución del metal, mientras que las áreas circundantes actúan como cátodo (Gadd, 2010; Enning y Garrelfs, 2013; Gadd, 2010; Javed y col., 2015; Wikiel y col., 2013).



**I.4. OBJETIVOS**

La introducción previa sugiere que la tecnología de la bioprecipitación de metales pesados para la remediación de efluentes y, especialmente, de drenajes ácidos de minas, no sólo requiere estudios adicionales sino de consorcios microbianos más eficientes y capaces de desarrollarse aun en ambientes ácidos. Precisamente, este requerimiento constituye el punto de partida del presente trabajo de Tesis Doctoral, cuyos objetivos se detallan a continuación.

*General:*

- ❖ Contribuir al mejoramiento de la tecnología de la bioprecipitación utilizando consorcios microbianos sulfato-reductores extremas para remediar metales pesados en efluentes neutros y ácidos

*Específicos:*

- ❖ Relevar ambientes anóxicos del área geotermal de Copahue en la búsqueda de consorcios microbianos sulfato-reductores
- ❖ Caracterizar fisiológica y molecularmente los consorcios seleccionados
- ❖ Aislar y caracterizar microorganismos sulfato-reductores a pH neutro y acidófilos
- ❖ Utilizar los microorganismos y consorcios seleccionados en la bioprecipitación de metales pesados en efluentes neutros y ácidos





# Capítulo II

---

**Búsqueda de consorcios de microorganismos sulfato-reductores. Caracterización molecular**



## CONTENIDO

### II.1. INTRODUCCIÓN

### II.2. DESCRIPCIÓN DEL SITIO DE MUESTREO

- II.2.1. Ubicación del área
- II.2.2. El Volcán Copahue, Río Agrio y Lago Caviahue
- II.2.3. Las Máquinas
- II.2.4. Las Maquinitas
- II.2.5. Termas de Copahue

### II.3. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

- II.3.1. Recolección y conservación de las muestras
- II.3.2. Parámetros fisicoquímicos
- II.3.3. Resultados y discusión

### II.4. PROCEDIMIENTOS DE ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO

- II.4.1. Consorcios de MSR a pH neutro
- II.4.2. Consorcios acidófilos de MSR

### II.5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

- II.5.1. Sedimentos anaerobios del volcán Copahue
- II.5.2. Consorcios de MSR

### II.6. POSIBLES MODELOS GEOMICROBIOLÓGICOS

### II.7. CONCLUSIONES FINALES DEL CAPÍTULO



**CAPÍTULO II: Búsqueda de consorcios de microorganismos sulfato-reductores.****Caracterización molecular****II.1 INTRODUCCIÓN**

El interés por los microorganismos que habitan ambientes extremos se ha incrementado enormemente en los últimos años debido a su potencial aplicación en procesos biotecnológicos. Entre los ambientes extremos se encuentran aquellos caracterizados por bajos valores de pH incluyendo algunas zonas volcánicas y los drenajes ácidos de mina. Los microorganismos que se encuentran en estos nichos ecológicos son predominantemente acidófilos, mesófilos o termófilos, y frecuentemente involucrados en los ciclos del hierro y el azufre (Amils y col., 2007; Urbietta y col., 2012). Simultáneamente, muchos de estos ambientes contienen elevadas concentraciones de metales pesados por lo que algunos microorganismos presentes son tolerantes mientras que otros han desarrollado distintos mecanismos de resistencia.

Las características de estos ambientes los hacen ideales para el relevamiento y aislamiento de microorganismos y consorcios sulfato-reductores de características acidófilas, que permita su aplicación en procesos de biorremediación de metales pesados y, en particular, en cuerpos de aguas ácidas donde usualmente están inhibidos (Chiacchiarini y col., 2010; Johnson, 2012). Precisamente, la hipótesis de este trabajo de tesis establece que en ambientes ácidos y anóxicos, es posible el aislamiento de consorcios sulfato-reductores con capacidad para ser usados en la bioprecipitación de metales pesados en aguas ácidas.

La región geotermal del volcán Copahue, localizada en la provincia de Neuquén-Argentina, se seleccionó como área de estudio ya que cumple con las características fisicoquímicas mencionadas en la hipótesis. Las mismas son producto de diferentes sucesos naturales, de origen fluvial, glacial o volcánico, que modelaron el ambiente (González Díaz, 2005).

Los estudios sobre comunidades basados en las técnicas dependientes de cultivo están determinados por la capacidad de los microorganismos de crecer o no en un

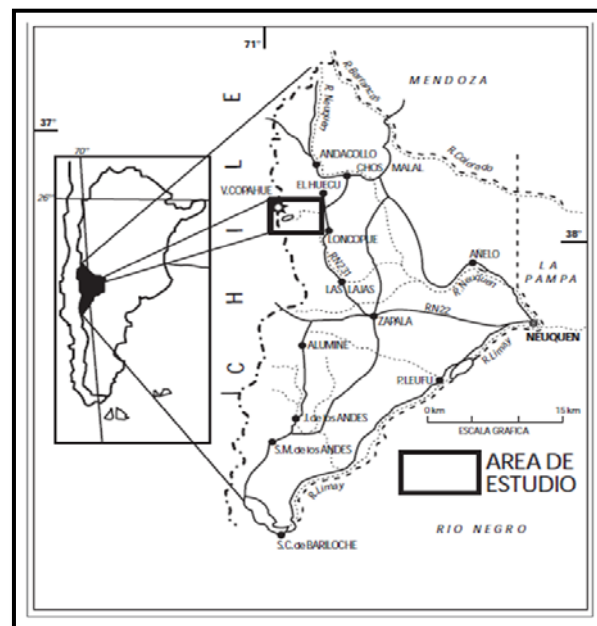
determinado medio de cultivo selectivo. No obstante, sólo un número muy pequeño de microorganismos ambientales son cultivables, debido a que los medios y/o las condiciones de cultivo que se requieren no se conocen con precisión. Esto ha provocado un incremento notable del uso de técnicas de biología molecular cultivo-independientes para estudiar las comunidades microbianas. Combinando ambas aproximaciones, se puede conocer más profundamente las comunidades microbianas tanto en cuanto a los miembros presentes como a la dinámica de desarrollo de las mismas (Leloup et al., 2004; Lu y col., 2010; Radhika et al., 2006). Estos estudios combinados sobre las comunidades presentes en ambientes naturales y, en particular, extremos, han abierto las puertas para mejorar procesos biotecnológicos ya conocidos y para el desarrollo de nuevas biotecnologías; además, se ha multiplicado el descubrimiento de muchas nuevas especies que no habían podido ser aisladas previamente con las técnicas cultivo-dependientes.

En este capítulo se realizará una descripción de los lugares seleccionados dentro de este trabajo de tesis, detallando algunas características relevantes del ambiente y las condiciones fisicoquímicas de cada sitio. Luego se describirán las técnicas empleadas para el enriquecimiento de las muestras en la búsqueda de microorganismos sulfato-reductores (MSR) y el análisis de los resultados. Finalmente, se analizará la diversidad microbiana presente en los sedimentos y en los enriquecimientos obtenidos del área geotermal del volcán Copahue.

## II.2. DESCRIPCIÓN DEL SITIO DE MUESTREO

### II.2.1. Ubicación del área

El Parque Provincial Copahue abarca un reducido sector de la Cordillera Norpatagónica, localizado en el departamento neuquino de Ñorquin, entre los paralelos  $37^{\circ} 45'S$  y  $38^{\circ} 00'S$ . En la figura 2.1 se muestra la ubicación del área de Copahue dentro del mapa de la República Argentina.



**Figura 2.1.** Ubicación geográfica de la región de Copahue en el mapa de la República Argentina (González Díaz, 2005)

La zona está dominada por la actividad del volcán Copahue. El nombre del volcán se compone de las voces mapuches *ko*, “agua”; *pa*, “azufre”; y *we*, “lugar”, que puede traducirse como “lugar de aguas sulfurosas”, cualidad que se refleja en las aguas termales de Copahue. Esta zona fue declarada Área Protegida en 1963 a través del Decreto Ley Provincial 387/63, con la finalidad de proteger las condiciones naturales de la región y preservar las especies y la diversidad genética. Existe una importante influencia antropogénica en este área debido a la presencia de dos villas, Caviahue y Copahue, de población variable a lo largo del año. Las mismas atraen gran cantidad de

turistas que disfrutaban de los beneficios terapéuticos del complejo termal en verano y de las prácticas deportivas en la nieve durante el invierno (Chiacchiarini y col., 2010).

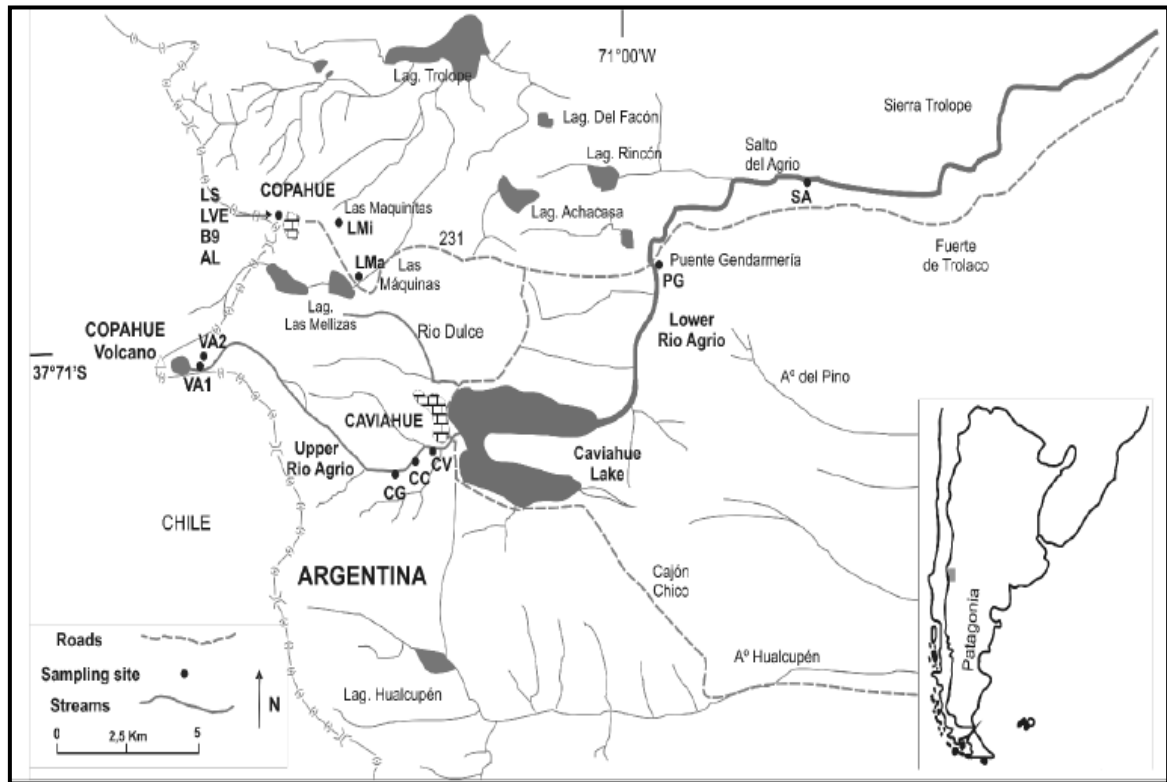
El gobierno de la provincia del Neuquén en la década de 1980 estudió e hizo dos perforaciones al pie del volcán, con fines geotérmicos, lo que produjo la instalación de una usina piloto generadora de energía para abastecer a la localidad de Caviahue-Copahue (Jurío, 1977; Pesce, 1989; Panarello y col., 1988). A su vez, y para aprovechar los fluidos geotérmicos, se realizó una inversión importante para calefaccionar las calles del Centro Turístico Termal Copahue y mantener abierto el centro en invierno, ya que el Centro se encuentra a 2.000 m.s.n.m. y en inviernos normales no puede accederse debido a la acumulación de nieve. Las aguas termales de la zona fueron estudiadas inicialmente hacia el año 1930 por el científico Gregorio Álvarez (Álvarez, 1938).

Aunque existen estudios sobre la geoquímica del lugar desde hace varias décadas, los estudios sobre ecología y microbiología en este ambiente son relativamente recientes y, la mayoría de ellos, desarrollados por nuestro grupo (Giaveno y col., 2013; Urbietta y col., 2013a; Urbietta y col., 2014a; Urbietta y col., 2015a; Urbietta y col., 2015b; Willis Poratti y col., 2013). Estos estudios han consistido en el aislamiento y caracterización de bacterias, arqueas, levaduras y algas que, en general, tienen la capacidad de desarrollarse a bajos valores de pH (Juárez y Vélez, 1993; Pedrozo y col., 2001; Russo y col., 2002; Wendt-Potthoff y Koschorreck, 2002). También se realizaron muchos estudios de aplicaciones biotecnológicas utilizando cepas puras o consorcios aislados de la zona (Chiacchiarini y col., 2009; Giaveno y col., 2009; Lavalle y col., 2005; Giaveno y col., 2013).

En el Parque Provincial Copahue se destacan algunos puntos geográficos: el **volcán Copahue**, el **Río Agrío**, el **Lago Caviahue** y tres de los campos geotérmicos del lugar: **la villa Copahue**, **Las Maquinitas** y **Las Máquinas**. En los tres últimos lugares se detectaron varios pozos termales con bajos valores de pH, gran cantidad de sedimentos de color negro-grisáceo (probablemente debido a la formación de sulfuros de hierro) y valores negativos de potencial redox (Eh). Precisamente estas características son las requeridas para la búsqueda de MSR acidófilos con



potencialidad de ser aplicadas en procesos de bioprecipitación. La figura 2.2 muestra un esquema de la zona estudiada destacando aquellos sitios donde se realizó la toma de muestras.



**Figura 2.2.** Esquema simplificado del sistema geotermal Caviahue-Copahue y localización aproximada de los puntos de muestreo (Chiacchiarini y col., 2010)

A continuación se realiza una breve descripción de las características más relevantes del volcán Copahue y de cada uno de los lugares de muestreo (campos geotérmicos de la villa Copahue, Las Máquinas y Las Maquinitas).

### **II.2.2. El volcán Copahue, Río Agrio y Lago Caviahue**

El volcán Copahue, ubicado a  $37^{\circ}51'S$ ,  $71^{\circ}10.2'O$  y con una altitud de 2977 s.n.m, es un estratovolcán activo que forma parte del Complejo Efusivo Copahue-Caviahue situado en los Andes, en la frontera de Chile y Argentina. Esta estructura constituye una porción del arco volcánico activo andino con una extensión de aproximadamente

220 km (Folguera y Ramos, 2000). La evolución del Complejo Efusivo Copahue-Caviahue comenzó con actividad volcánica en el Mioceno superior (Muñoz Bravo y col., 1989) y continúa hasta el presente (Más, 1993; Delpino y Bermúdez, 1993; Varekamp y col., 2001).

En el cráter del volcán se encontraba una laguna ácida (desaparecida posteriormente en los episodios de actividad del volcán), denominada Laguna del Volcán (pH 0,2–1,1; temperatura 13,8-100°C). El agua de la laguna tenía notorias diferencias en su composición con las del resto de la región (termales o no), por su elevada mineralización y altas concentraciones de HCl. En el lado este de la montaña, por debajo de la laguna, dos manantiales ácidos denominados Fuente Sur y Fuente Norte (VA1 y VA2 respectivamente en la figura 2.2) alimentan al Río Agrio. Luego de varias cascadas (CG, CC, CV, figura 2.2), el río desemboca en la Laguna Caviahue que tiene un pH entre 2,1 y 3,7. Uno de los brazos de la Laguna Caviahue, da lugar al río Río Agrio Inferior con un valor de pH entre 2,1 y 6,0 que posteriormente genera una gran cascada denominada Salto del Agrio (Pedrozo, 2008; Chiacchiarini y col., 2009; Varekamp, 2004). En la figura 2.3 se observan imágenes de los lugares descriptos anteriormente.



**Figura 2.3.**A) Cascada Cabellera de la Virgen. B) Vista del Volcán Copahue. C) y D) Fotografías de la Laguna Caviahue y del Salto del Agrio, respectivamente

Alineadas según el rumbo N 40°O, se observan manifestaciones termales activas tales como fumarolas, manantiales calientes, conos de barro, olletas y lagunas, agrupadas en cinco zonas principales: **Centro Termal Copahue (Villa de Copahue), Las Máquinas, Las Maquinitas, Anfiteatro y Chanco-Co**, esta última en territorio chileno.

La composición química de las aguas surgentes calientes de estas zonas fue determinada en un estudio de JICA (JICA-EPEN, 1992) en el que se definen dos tipos principales, bicarbonatadas en la villa de Copahue y sulfatadas en los otros centros. Vallés y col. (2004) establecieron que la mayoría de las aguas en contacto con los fangos son ácidas, presentando las mayores concentraciones de iones (altos valores de conductividad), mientras que las de los surgentes calientes son en su mayoría neutras con menores cantidades de electrolitos presentes representados por sus bajos o intermedios valores de conductividad.

De las cuatro zonas con actividad geotérmica mencionados, sólo se realizaron muestreos en los tres primeros y por esa razón, se describen con más detalle a continuación.

### **II.2.3. Las Máquinas**

El sector denominado Las Máquinas (figura 2.4), distante 2,2 Km al SE de la villa Copahue, es el sitio menos afectado por obras de infraestructura y actividades antrópicas ya que hace tiempo no se usa para baños termales públicos. Las instalaciones (actualmente de propiedad de Gendarmería) se encuentran hoy derruidas y abandonadas.

Este lugar se encuentra en una depresión del terreno donde se observan numerosas fumarolas, algunas con vapor a alta presión, surgentes calientes y pequeños cursos de agua que emanan de estos surgentes. En el sector Norte, en el centro de la depresión, se destaca una laguna caliente de 480 m<sup>2</sup>. Dentro de ella, se observan fango de color grisáceo oscuro que prácticamente llega a la superficie, pocos centímetros de agua sobrenadante y burbujeos constantes de vapor y gases.

Los minerales encontrados en el fango satisfacen los requerimientos de estabilidad termal y son compatibles con las soluciones en contacto. El carbono detectado en el análisis químico es atribuible a un origen biológico, ya que no se encuentran minerales que contengan este elemento y tampoco está presente en las emanaciones de gases magmáticos. Sobre las paredes de las fumarolas se forma azufre y pirita cristalizada; también se encuentran hematita y jarosita en la superficie de las olletas (Valles y col., 2005).

Las características fisicoquímicas de este lugar (detalladas más adelante en este capítulo), sumado a la baja influencia antrópica, lo convierten en un lugar ideal para la búsqueda de microorganismos.



**Figura 2.4.** Campo geotérmico de Las Máquinas. Arriba: laguna principal e instalaciones actualmente abandonadas. Abajo: fumarolas y olletas a la orilla del arroyo que cruza por el centro de esta depresión y que proviene de la Laguna Las Mellizas

#### **II.2.4. Las Maquinitas**

Esta es la menor de las manifestaciones termales en el campo geotérmico Copahue y consiste en dos pequeñas depresiones localizadas a diferentes alturas (figura 2.5). De esas depresiones, sólo una está activa y los fluidos de descarga no exceden los 92°C (temperatura de ebullición del agua a la altitud a la que se encuentra el campo). Los vapores sobrecalentados, con una temperatura de 132 °C, han podido ser determinados en algunas de las fumarolas y respiraderos que se abren paso entre las rocas dejando depósitos visibles de azufre cristalizado en la superficie más fría de las paredes de estas chimeneas (Mas y col., 1996).



**Figura 2.5.** Campo geotérmico Las Maquinitas. Arriba: zona acondicionada para baños. Abajo: área que se reserva para vapores aprovechando las emanaciones de las fumarolas con desprendimientos de gases sulfurados

### **II.2.5. Termas de Copahue**

Las denominadas Termas de Copahue, localizadas en la pequeña villa homónima, constituyen la mayor manifestación termal dentro de este campo geotérmico. Debido a su uso como baños públicos desde hace más de un siglo, han sufrido constantes modificaciones durante la construcción y adaptación de las diferentes instalaciones a los requerimientos de lugareños y turistas que llegan de todas partes del país para recibir tratamientos médicos (baños en piletas de agua caliente, aplicación de barro y inhalación de vapores). Las construcciones que permitieron el desarrollo urbano de la villa Copahue han originado algunas zonas de anegamiento que constituyen lagunas artificiales: Laguna Sulfurosa, Laguna del Chancho, Baño 9, Laguna de las Algas y Laguna Verde.

La Figura 2.6 (derecha) muestra parte de la **Laguna Verde** cuyo color verde se debe a la presencia de microalgas. A la izquierda se observa la **Laguna Sulfurosa**. El agua de ambas lagunas se utiliza para baños de inmersión en el interior del complejo sanitario cuyas instalaciones se ven en el fondo de la imagen. En la parte inferior se

muestra una imagen de la **Laguna de las Algas**, donde se observa el desarrollo de algas filamentosas en forma de biofilms. En la parte inferior de los mismos se han detectado zonas de bajo potencial redox, propicio para el desarrollo de comunidades anaeróbicas de microorganismos.



**Figura 2.6.** A) Laguna Verde, B) Laguna Sulfurosa, C) Laguna de las Algas ubicadas en la villa Copahue

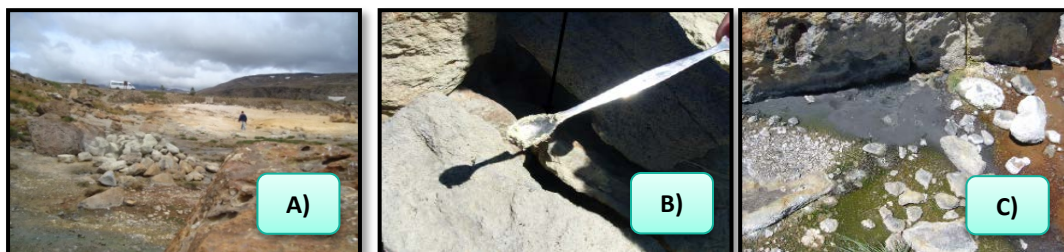
El sector de baños termales denominado **Baño 9** (B9) (figura 2.7) es particularmente interesante debido a que presenta variados rangos de pH (2-7) y temperatura (15-90 °C). La zona B9 se encuentra surcada por pequeños cursos de agua, fumarolas y pozos donde emanan gases. Los barros presentan diferente grado de alteración y en la zona central de B9 se ha construido una pileta artificial para permitir el almacenamiento de aguas y la maduración de barros; este pequeño dique provee de material (agua y barro) para los tratamientos médicos y estéticos que se realizan en el complejo medicinal de la Villa Copahue.



**Figura 2.7.** Fotografías del sector denominado Baño 9

El lugar denominado **Agua del Limón** (AL), figura 2.8, es un área de fumarolas y surgentes de carácter ácido, con alta concentración de sulfatos, ubicado en el extremo Este de las Termas. Agua del limón es la zona menos afectada por las construcciones de la villa, de modo que el terreno se presenta casi en su estado natural. Allí se observan en la parte más externa, afloramientos de rocas volcánicas; hacia el centro, con relieve topográfico de lomas suaves y redondeadas, se encuentra una zona de intensa alteración hidrotermal. Esta asociación de alteración de bajo pH se produce por la liberación de gases ácidos, principalmente dióxido de carbono y sulfuro de hidrógeno.

En general, la temperatura de las aguas es variada; hay olletas que están a temperatura moderada y con valores de pH ácidos, mientras que en otras, donde las temperaturas son cercanas a la ebullición, se encuentran valores de pH próximos a la neutralidad. La presencia de sales disueltas en las aguas surgentes le confiere una alta conductividad a estas aguas (Más y col., 1996; Valles y col., 2005).



**Figura 2.8. A)** Vista panorámica del sector denominado Agua del Limón. **B)** Diferentes minerales que afloran de las zonas de alteración ácida. **C)** Pozo termal característico

### II.3. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

#### II.3.1. Sitios de recolección de muestras

Para la realización de este trabajo de Tesis, se llevaron a cabo dos campañas de muestreo (febrero 2011 y febrero 2012) en el parque geotermal Copahue. Se recolectaron muestras de sedimentos que fueron usadas para el análisis de la



diversidad en las comunidades anaeróbicas presentes, para la selección de consorcios sulfato-reductores de características adecuadas y para el aislamiento de microorganismos específicos dentro de ellas. Estas muestras fueron tomadas en los siguientes lugares (entre paréntesis se indican sus abreviaturas de los puntos para su uso posterior en el texto de este trabajo de tesis):

- Laguna principal en la zona de Las Máquinas (**LMa2**)
- Un pequeño pozo en el costado de la laguna principal de Las Máquinas (**LMa1**)
- Un pozo termal de elevada temperatura (90°C) y características anaeróbicas en la zona de Las Maquinitas (**LMi**)
- Dos pozos termales de temperatura moderada (40°C) y pH ácido en la zona de Agua del Limón (**AL1 y AL2**)
- Pileta mayor en la zona de Baño 9 (**B9 Lag**) y tres pozos termales aledaños a esa zona (**B9-1, B9-2 y B9-3**)
- Biofilm anaerobio presente en la zona del Salto del Agrio, por debajo de la capa naranja que se observa a simple vista (**SAp**).

En todos los casos las muestras fueron recogidas en tubos Falcon de 50 mL estériles, los cuales se llenaron totalmente y posteriormente se cerraron con parafilm (Bemis, NA) para evitar la entrada de oxígeno. Los tubos se conservaron a 4°C hasta su posterior procesamiento. Las muestras para enriquecimiento y aislamiento fueron conservadas a temperatura ambiente. Las muestras consistían principalmente en sedimentos junto con parte de la columna de agua por encima de los mismos. En las siguientes imágenes se muestran algunos de los pozos termales de los cuales se tomaron muestras.

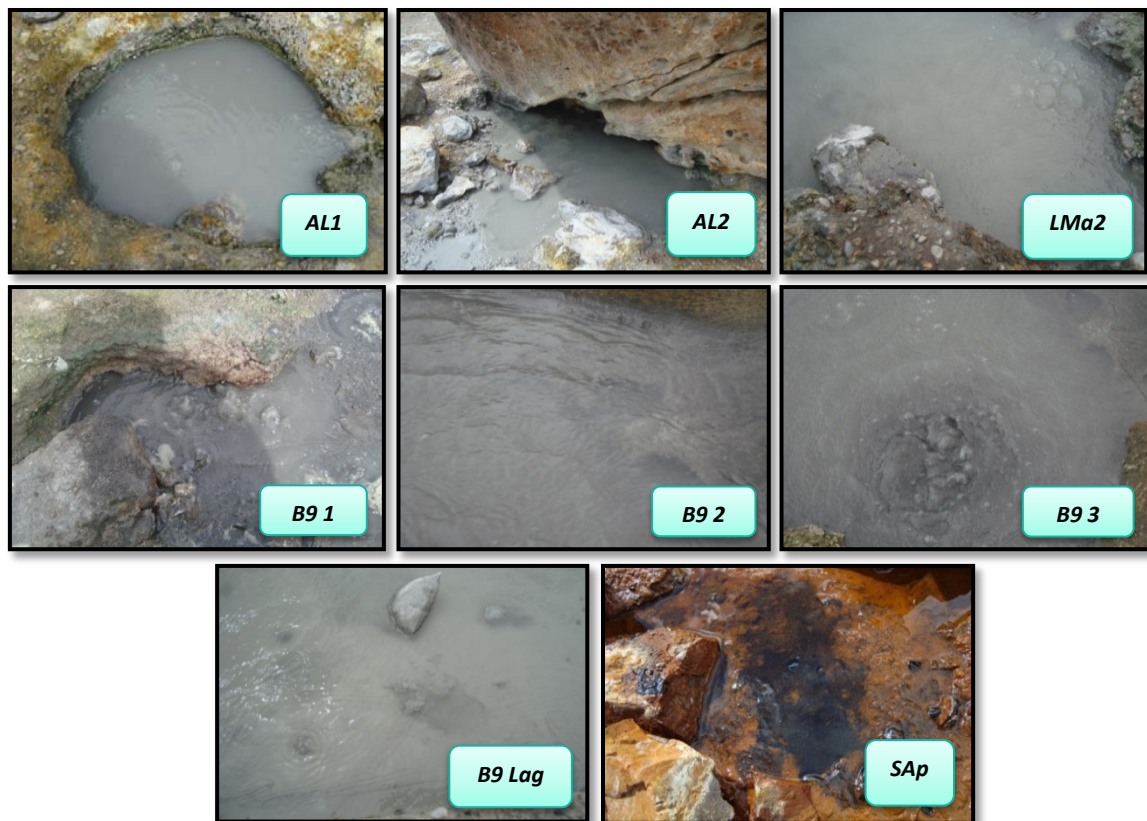


Figura 2.9. Imágenes de los pozos termales donde se realizó la toma de muestra

### II.3.2. Parámetros fisicoquímicos

Los valores de pH, potencial de reducción (Eh), concentración del oxígeno disuelto, temperatura y concentración de sulfuros en las muestras, fueron determinados *in situ* para cada punto de muestreo. El pH en las muestras se determinó utilizando papel indicador Merck (pH entre 0 y 2,5), para aquellos lugares donde se observaba un valor muy bajo de pH, y papel indicador Macherey-Nagel (pH entre 1 y 11) en los demás casos. El potencial de reducción se determinó utilizando un electrodo de Eh acoplado a un equipo Hanna HI 8424, mientras que el oxígeno disuelto en las aguas en contacto con los sedimentos fue medido con un equipo JPB-607A. La concentración de sulfuros se determinó con un equipo Hach DR-850 utilizando la técnica del azul de metileno (APHA, AWWA, WPCF, 1985).

En las aguas en contacto con los sedimentos se determinaron las concentraciones de aniones y cationes de interés. Para ello, las muestras fueron

filtradas *in situ*, utilizando filtros de nitrocelulosa de 0,22  $\mu\text{m}$  para eliminar sedimentos y microorganismos. La determinación de la concentración total de diversos cationes metálicos (Zn, Fe, Pb, Ca y Cu) en los medios líquidos se realizó posteriormente en el laboratorio por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) utilizando un equipo AA-CC66-50 (Anexo I). La determinación de sulfato en las muestras se realizó mediante una técnica turbidimétrica descrita en el Anexo I.

Las muestras de sedimentos fueron homogeneizadas por agitación durante 5 minutos utilizando un vórtex. El contenido de metales se determinó por EAA en los lixiviados provenientes de la digestión ácida de los sedimentos. La humedad de las muestras se determinó a través de la diferencia de masas observada al secar una muestra en una estufa a 105 °C hasta peso constante. El contenido en carbono orgánico total (COT) se midió utilizando la técnica descrita en el Anexo I.

### II.3.3. Resultados y Discusión

Las tablas 2.1, 2.2 y 2.3 muestran los valores de los parámetros mencionados anteriormente medidos en cada punto de muestreo. En algunas muestras se contaba con escasa cantidad de sedimentos por lo que fueron usados fundamentalmente para los enriquecimientos; por esa razón, algunas determinaciones no fueron realizadas y se indicaron con ND (no determinado) en la tabla.

**Tabla 2.1.** Parámetros fisicoquímicos determinados *in-situ*

Lugar	Muestra	pH	T (°C)	Eh (mV)	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> (mg/L)	S <sup>-2</sup> (mg/L)	OD*
Las Máquinas	LMa1	4	74	-249	1219,1	1,5	1,6
Las Máquinas	LMa2	3	38	-70	1464,6	0,9	1
Las Maquinitas	LMi	5	90	-126	3005,2	0,65	0,6
Agua del Limón	AL1	2	41	-200	2632,5	0,35	0,3
Agua del Limón	AL2	2	77	+44	520,3	0,5	2,2
Baño 9	B9 Lag	2	44	-70	1406,9	1,35	0,3
Baño 9	B9 1	5	84	-90,1	1505,8	ND	ND
Baño 9	B9 2	5	57	-130,9	1621,3	ND	ND
Baño 9	B9 3	5	67	-290	1450,7	ND	ND
Salto del Agrío	SAp	3	24	+70	136,7	0,03	0,3

\* OD: Oxígeno Disuelto. ND: No Determinado

**Tabla 2.2.** Concentración de metales en las aguas en contacto con los sedimentos. Los valores están expresados en mg/L. ND: No Determinado

Muestra	Zn	Fe	Pb	Cu	Ca
LMa1	ND	ND	ND	ND	ND
LMa2	0,9	17,5	<0,2	<0,10	0,8
LMi	1,0	119,9	<0,2	<0,10	<0,1
AL1	0,9	14,0	<0,2	<0,10	<0,1
AL2	ND	ND	ND	ND	ND
B9 Lag	1,0	12,3	<0,2	<0,10	<0,1
B9 1	ND	ND	ND	ND	ND
B9 2	0,8	14,5	<0,2	<0,10	<0,1
B9 3	1,3	13,2	<0,2	<0,10	<0,1
SAP	0,9	1,4	<0,2	<0,10	1,1

**Tabla 2.3.** Cantidad de metales en los sedimentos (mg/g de muestra), porcentaje de carbono orgánico total (%COT) y porcentaje de humedad (%H). ND: No Determinado

Muestra	Metales (mg/g muestra)					%COT	%H
	Fe	Cu	Pb	Cr	Ni		
LMa1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	40,4
LMa2	22,1	0,03	0,05	0,01	0,005	0,8	69,4
LMi	26,3	0,04	0,03	0,02	0,006	0,7	47,1
AL1	25,3	0,02	0,04	0,01	0,007	2,2	53,0
AL2	23,2	0,40	0,22	0,04	0,02	1,2	70,0
B9 Lag	26,6	0,25	0,09	0,05	0,02	1,9	60,8
B9 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	53,7
B9 2	16,8	0,09	0,10	0,06	0,02	0,8	62,6
B9 3	40,0	0,04	0,07	0,05	0,01	1,0	41,8
SAP	ND	ND	ND	ND	ND	0,6	ND

Debido a que este trabajo está focalizado en la detección de MSR acidófilos o, eventualmente, a los ácido-tolerantes, se han priorizado los sitios que presentaban pH ácido, potenciales de reducción (Eh) negativos y bajos valores de oxígeno disuelto.

Como puede verse en la tabla 2.1 las muestras recolectadas se encuentran en un rango de pH entre 2 y 5. Los valores más bajos de pH se encontraron en las muestras recolectadas de Agua del Limón, Las Maquinas (laguna principal), Baño 9 (laguna principal) y el Salto del Agrio. Estos valores sugieren que las comunidades microbianas

presentes en estos ambientes pueden tener algún tipo de resistencia a las condiciones de acidez.

La mayor parte de las muestras recogidas poseían bajas concentraciones de oxígeno disuelto y, consecuentemente, potenciales de reducción negativos. Estas características sugieren un ambiente fuertemente reducido y con características anóxicas que, además, presenta altas concentraciones de sulfato, lo que es ideal para el desarrollo de MSR.

En la tabla 2.3 puede observarse que los valores de COT de las muestras de Copahue son relativamente bajos (en general, menores a 2 %) comparado con otros ambientes volcánicos con las mismas características donde usualmente hay entre 2 y 4% de COT (Lantican y col., 2011). No obstante, aún bajos valores de COT son, en general, suficientes para el desarrollo de MSR y, más aún, incluso pueden evitar la inhibición que éstos pueden sufrir por altas concentraciones de ciertos compuestos orgánicos (ácidos carboxílicos de bajo peso molecular, algunos alcoholes y fenoles), especialmente a bajos valores de pH.

Como se ha mencionado previamente, los metales pesados son generalmente tóxicos para los microorganismos incluidos los MSR. Las aguas de contacto con los sedimentos tienen baja concentración de los metales, con excepción de Fe que tiene los mayores valores en casi todas las muestras. La presencia de estos metales en los sedimentos es compatible con la actividad de los MSR que puede precipitar los metales como sulfuros como parte de un mecanismo de detoxificación. En las zonas ácidas, la concentración mayor de Fe en las aguas se debe a la mayor solubilidad de su sulfuro a bajos pH respecto de la de los otros sulfuros metálicos.

En las zonas menos ácidas, pueden observarse precipitados rojizos en la superficie mientras que en las zonas anóxicas por debajo de la superficie (de potenciales redox negativos) se observan precipitados negros (figura 2.10). Los precipitados de la superficie son oxohidroxos y sales básicas de hierro(III) mientras que los precipitados bajo la superficie son de FeS y, probablemente, de otros sulfuros menos abundantes.



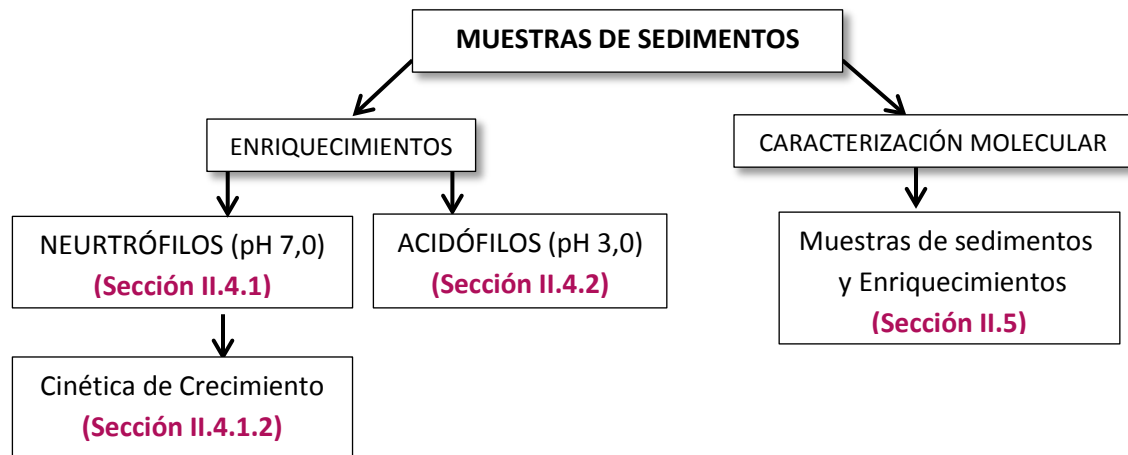
**Figura 2.10.** Precipitados rojizos superficiales (oxohidroxos y sales básicas de hierro(III)) y precipitados negros (FeS) debajo de la superficie (Salto del Agrío)

Basándose exclusivamente en las características fisicoquímicas, es posible considerar la zona geotermal de Copahue como una potencial fuente de MSR que, además, se estarían desarrollando en condiciones algo alejadas a las usadas normalmente para cultivarlas en el laboratorio (Lavalle y col., 2005) y, por lo tanto, podrían ser de interés para aplicaciones no convencionales.

Desde el punto de vista ecológico, es interesante conocer otros microorganismos que pueden estar presentes en las muestras de sedimentos y que, eventualmente, podrían interactuar con los MSR y/o ser de interés para otros procesos industriales.

En las siguientes dos secciones se detallarán los procedimientos de enriquecimiento de consorcios sulfato-reductores (tanto a pH neutro como ácido) a partir de las muestras de Copahue. Luego se realizará la identificación de los microorganismos presentes en esos consorcios, utilizando diversas técnicas de biología molecular.

Hacia el final del capítulo se hará énfasis en la caracterización molecular de los sedimentos anaerobios de Copahue. Utilizando los resultados de los métodos dependientes de cultivo (enriquecimientos de comunidades sulfato-reductoras) y aquellos obtenidos mediante técnicas de biología molecular, se realizará un modelo de la posible actividad de los microorganismos anaerobios en este ambiente volcánico.



**Figura 2.11.** Esquema de los procedimientos de enriquecimiento y aislamiento realizados con las muestras de sedimentos de Copahue

## II.4. PROCEDIMIENTOS DE ENRIQUECIMIENTO

En esta sección se describen los enriquecimientos para la obtención de consorcios de microorganismos sulfato-reductores a pH neutro y ácido, a partir de las muestras ambientales.

### II.4.1. Consorcios de MSR a pH neutro

Para la búsqueda de consorcios de MSR a pH neutro, se colocó una cierta cantidad de cada muestra (aproximadamente 2 g) en frascos tipo penicilina (10 mL) que contenían medio de cultivo selectivo Postgate B, con pH fijado en 7 (Anexo II), que había sido previamente esterilizado. Este medio es selectivo para MSR debido a que contiene sulfato (utilizado como aceptor final de los electrones) y ácido tioglicólico y ascórbico que mantienen el potencial redox del medio de cultivo en un valor negativo. Como indicador del crecimiento microbiano buscado, se utilizó Fe(II) que, en presencia de sulfuros, precipitará dando un sólido de color negro. Los frascos fueron cerrados con tapas de goma y virolas metálicas y se incubaron a temperaturas cercanas a su lugar de origen durante al menos 20 días (tabla 2.4). Las muestras provenientes de Las

Maquinitas y Baño 9 tenían una temperatura de 90°C y 84°C respectivamente, pero fueron cultivadas a la mayor temperatura disponible (65°C). Cada enriquecimiento se realizó por triplicado. Periódicamente se extrajeron muestras para realizar observaciones en un microscopio óptico y tinciones con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol). Estas últimas tinciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Anexo IV).

**Tabla 2.4.** Condiciones de cultivo de las muestras de Copahue. \*PgB: Postgate B

Muestra	T origen (°C)	T de cultivo (°C)	Medio de cultivo	pH origen	pH de cultivo	Fuente de carbono y energía
LMa1	74	65	PgB*	4	7	Lactato
LMa2	38	40	PgB	3	7	Lactato
LMi	90	65	PgB	5	7	Lactato
AL1	41	40	PgB	2	7	Lactato
AL2	77	65	PgB	2	7	Lactato
B9 Lag	44	40	PgB	2	7	Lactato
B9-1	84	65	PgB	5	7	Lactato
B9-2	57	55	PgB	5	7	Lactato
B9-3	67	65	PgB	5	7	Lactato
SAp	24	30	PgB	3	7	Lactato

#### II.4.1.1. Discusión de los resultados

En la tabla 2.5 se resumen los resultados obtenidos en los enriquecimientos de todas las muestras ensayadas. Se observó un crecimiento positivo (formación de FeS) luego de 20 días de incubación en las muestras provenientes de LMa1, LMa2, AL1, LMi, B9-3 y SAp, a sus respectivas temperaturas (figura 2.12). En todos estos casos también se detectó la presencia de H<sub>2</sub>S y se observaron microorganismos al microscopio. La población microbiana en las muestras LMa2, AL1, LMi y SAp fue muy significativa. En los cultivos LMa2 y AL1 se detectaron principalmente bacilos alargados de baja movilidad, algunos de ellos con una punta redonda y brillante, sugiriendo la formación de esporas. En la muestra SAp predominaron los cocos pequeños y bacilos cortos de baja movilidad (figura 2.13). En los cultivos LMa1 y B9-3 no se observó una gran población de microorganismos a pesar de que se detectó la formación de precipitado.

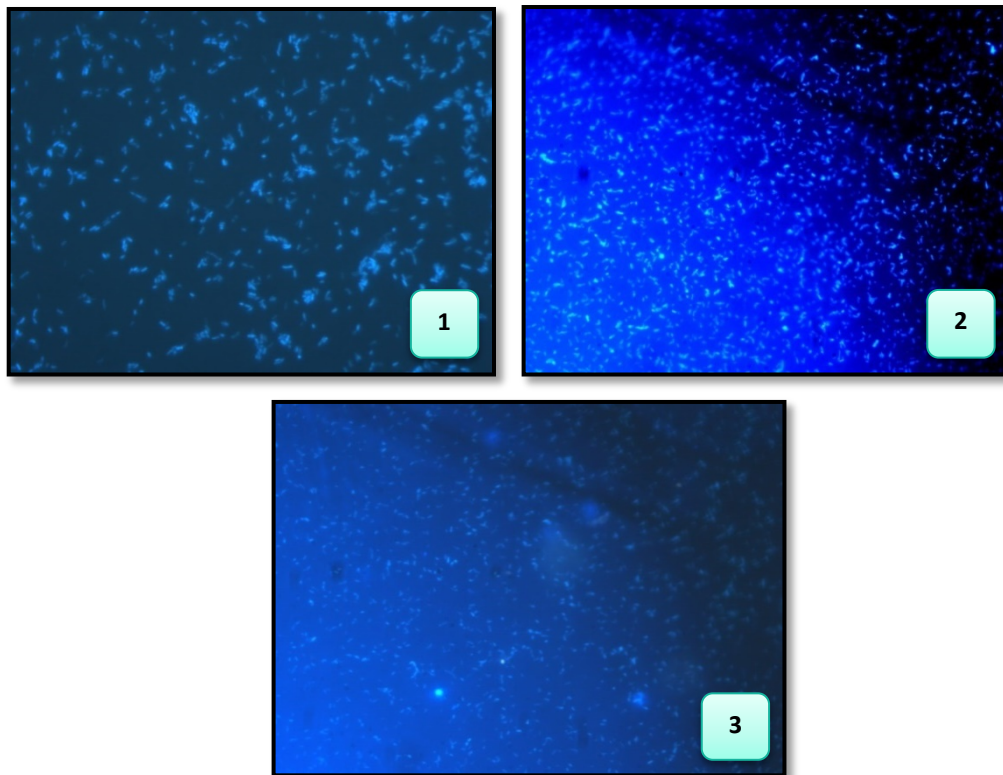


**Tabla 2.5.** Resultados de los cultivos de las muestras de Copahue crecidos en medio Postgate B

Muestra	T origen (°C)	T incubación (°C)	Formación de FeS	Formación H <sub>2</sub> S
LMa1	74	65	++	++
LMa2	38	40	++	++
LMi	90	65	++	++
AL1	41	40	++	++
AL2	77	65	-	-
B9 Lag	44	40	-	-
B9-1	84	65	-	-
B9-2	57	55	-	-
B9-3	67	65	++	+
SAP	24	30	++	++



**Figura 2.12.** Enriquecimientos en medio Postgate B. B9 Lag (1), B9-1 (2), AL2 (3), B9-2 (4), LMa2 (5), AL1 (6)



**Figura 2.13.** Imágenes de las tinciones con DAPI de los enriquecimientos a pH neutro SAp (1), LMa2 (2) y AL1 (3)

Los enriquecimientos con crecimiento positivo (se consideró positivo la presencia de precipitado negro en al menos 2 de los 3 tubos de la misma muestra) se repicaron en el mismo medio de cultivo colocando 1 mL en 9 mL de medio previamente esterilizado. Estos repiques se incubaron 15 días más. Las muestras LMa1 y B9-3 también se repicaron en las mismas condiciones; no obstante, luego de 15 días no lograron crecimiento significativo (no hubo formación de precipitado negro y tampoco se detectaron microorganismos en suspensión). Debido a esto, sólo las muestras LMa2, AL1, LMi y SAp se siguieron repicando. Estos consorcios se consideraron estables luego de tres repiques positivos sucesivos.

#### **II.4.1.2. Cinética de crecimiento de los consorcios MSR a pH neutro**

Se realizaron las cinéticas de crecimiento de consorcios sulfato-reductores a pH neutro a través del seguimiento de la concentración de sulfato remanente. El sulfato

es utilizado como aceptor final de electrones por lo que su desaparición es una medida indirecta del crecimiento microbiano.

Para realizar este estudio se inocularon 2,5 mL de LMa2, AL1, LMi y SAp en sendos frascos conteniendo 22,5 mL de medio de cultivo Postgate B, de pH 7, previamente esterilizado. Los frascos se cerraron herméticamente y se incubaron a la temperatura correspondiente a cada consorcio. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Se obtuvieron muestras periódicamente en las cuales se determinó la concentración de sulfato remanente mediante turbidimetría con cloruro de bario.

Los valores de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) se calcularon a partir de los datos de consumo de sulfato obtenidos para cada cultivo, teniendo en cuenta las siguientes suposiciones válidas para un sistema de cultivo batch (Doran, 1995):

Se define la velocidad volumétrica de formación de biomasa ( $r_x$ ) como:

$$r_x = \mu \cdot X \quad (2.1)$$

donde X es la biomasa y  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento

La velocidad volumétrica de consumo de sustrato ( $r_s$ ), definida para sulfato se define como:

$$r_s = \frac{dS}{dt} \quad (2.2)$$

donde S es la concentración de sulfato

Durante el crecimiento exponencial se cumple que:

$$X = X_0 * e^{\mu \cdot t} \quad (2.3)$$

donde  $X_0$  es la biomasa inicial

El rendimiento en biomasa será:

$$Y_{x/s} = \frac{r_x}{r_s} \quad (2.4)$$

Despejando  $r_s$  de la ecuación 2.4 obtenemos:

$$r_s = \frac{r_x}{Y_{x/s}} \quad (2.5)$$

Remplazando  $r_x$  por la ecuación 2.1 y  $r_s$  por la ecuación 2.2:

$$r_s = \frac{dS}{dt} = \frac{\mu \cdot X}{Y_{x/s}} \quad (2.6)$$

Remplazando X por la ecuación 2.3:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{\mu \cdot x_0 e^{\mu \cdot t}}{Y_{x/s}} \quad (2.7)$$

Se integra la ecuación 2.7 entre  $t=0$  y  $t$  ( $S_0$  y  $S$ ). En crecimiento exponencial se cumple que  $Y_{x/s}$  y  $\mu$  son constantes, siendo  $\mu$  el máximo posible ( $\mu_{\text{máx}}$ ). La biomasa a tiempo inicial también es un valor constante por lo que todos estos términos pueden salir de la integral quedando:

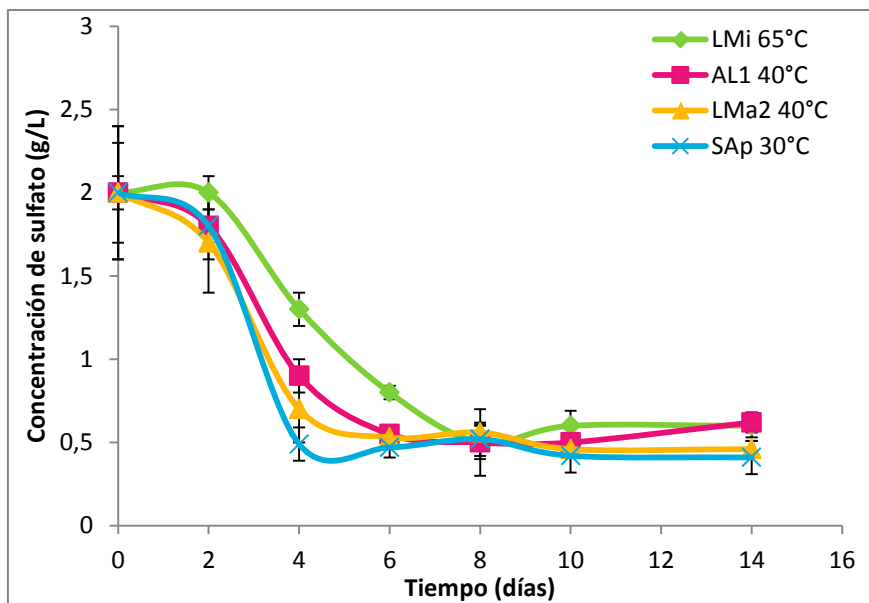
$$\int_{S_0}^S dS = \frac{\mu m \cdot x_0}{Y_{x/s}} \int_0^t e^{\mu m \cdot t} dt \quad (2.8)$$

$$S - S_0 = \frac{x_0}{Y_{x/s}} (e^{\mu m \cdot t} - 1) \quad (2.9)$$

La ecuación 2.9 puede resolverse realizando un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas, donde se toman dos pares de valores de concentración de sulfato (g/L) y tiempo (días) en la fase exponencial y las incógnitas son  $a = \frac{x_0}{Y_{x/s}}$  y  $\mu_{\text{máx}}$ . En este trabajo se utilizó el programa Maple para resolver los sistemas de ecuaciones para cada comunidad y calcular el valor de  $\mu_{\text{máx}}$ .

#### **II.4.1.2.1. Discusión de los resultados**

Las cinéticas de disminución de ion sulfato para los consorcios LMa2, AL1, LMi y SAp, se muestran en la figura 2.14.



**Figura 2.14.** Cinéticas de disminución de ion sulfato para los consorcios de MSR a pH neutro SAp (30°C), AL1 (40°C), LMa2 (40°C) y LMi (65°C)

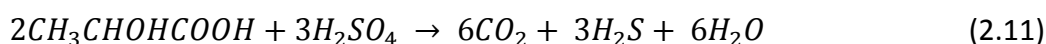
Las cuatro muestras provenientes de la zona geotermal de Copahue contienen consorcios microbianos con capacidad sulfato-reductora en las temperaturas cercanas a su lugar de origen, aunque a valores de pH cercanos a la neutralidad. En todos los casos se observó un consumo de sulfato del 80% luego de 8 días.

El medio Postgate B es selectivo para este tipo de microorganismos con sulfato como único aceptor final de los electrones y lactato como fuente de carbono y energía, agregado como limitante (siendo su consumo total lo que detiene la reducción de sulfato que se observa en la figura). El lactato, en condiciones anaeróbicas, puede ser oxidado completa a CO<sub>2</sub> o incompletamente tal cual muestran las ecuaciones 2.10 y 2.11. En la oxidación incompleta se genera también ácido acético.

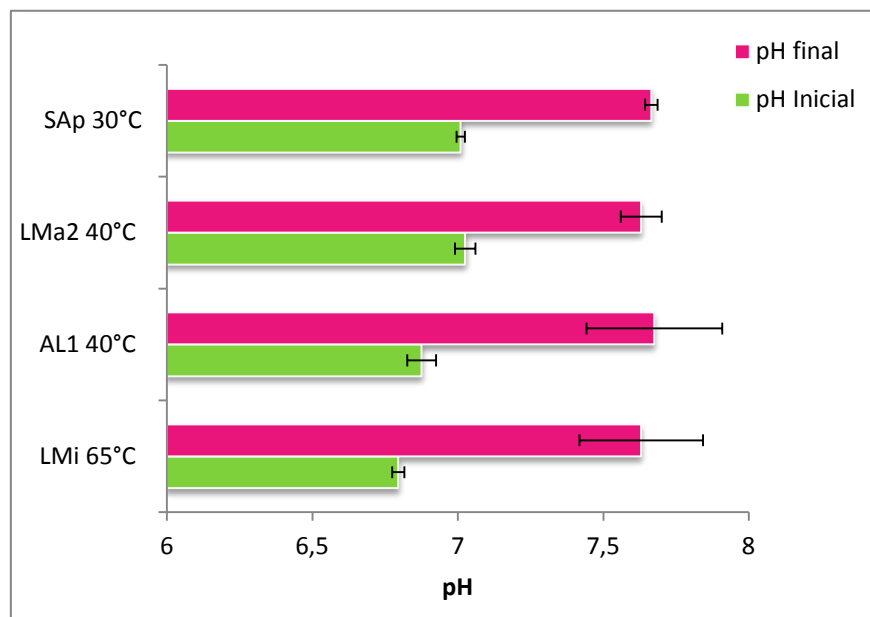
*Incompleta*



*Completa*



En los 4 casos analizados, la cantidad de sulfato consumida fue aproximadamente 15 mM mientras que la cantidad de lactato total (y consumida) en el medio Postgate B fue 31 mM. Esta relación coincide bastante bien con la estequiometría de una oxidación incompleta (ecuación 2.10), sugiriendo que esto es lo que ocurre en todos estos enriquecimientos.



**Figura 2.15.** Valores iniciales y finales de pH en los cultivos de las comunidades neutrófilas SAp (30°C), AL1 (40°C), LMa2 (40°C) y LMi (65°C)

La figura 2.15 muestra los valores de pH inicial y final para cada cultivo. En todos los casos se observó un aumento de aproximadamente una unidad. El aumento de pH se justifica por el proceso de oxidación que convierte un ácido fuerte ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) en dos ácidos débiles ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  y  $\text{H}_2\text{S}$ ).

En la tabla 2.6 se muestran los valores de  $\mu_{\text{máx}}$  calculados a partir de los datos de la figura 2.14, y el tiempo de duplicación calculado con la siguiente ecuación (2.12):

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu_m} \quad (2.12)$$

**Tabla 2.6.** Velocidades específicas de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) y tiempo de duplicación ( $t_d$ ) para las comunidades neutrófilas

	<b>SAP</b>	<b>LMA2</b>	<b>AL1</b>	<b>LMi</b>
$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,039	0,021	0,021	0,020
$t_d$ (h)	18	33	33	35

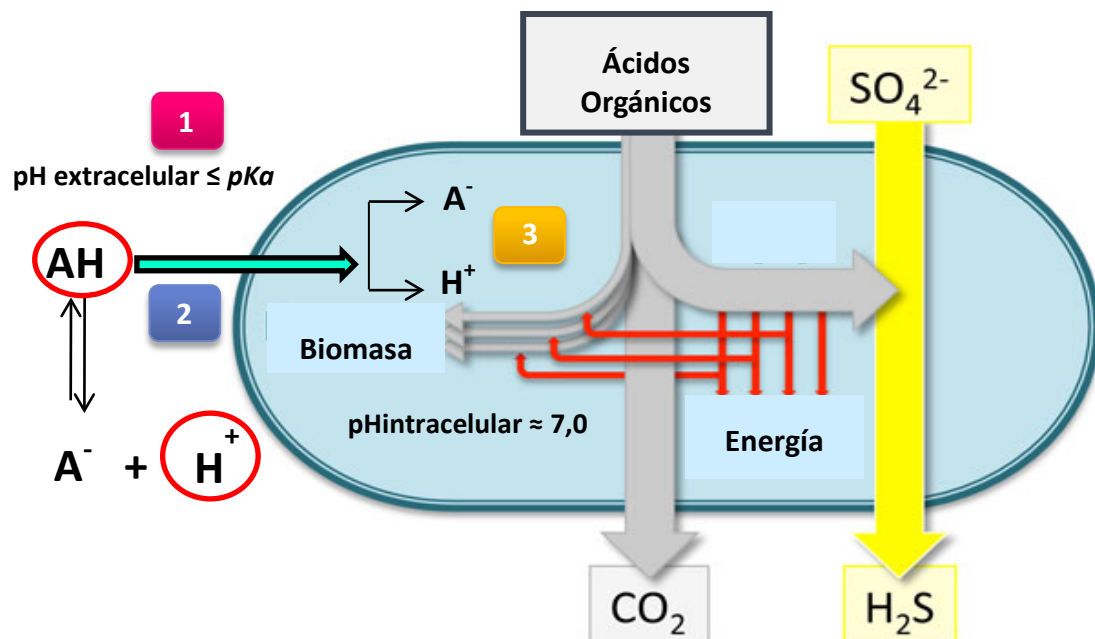
Los cultivos de microorganismos anaeróbicos son de desarrollo lento tal cual puede verse reflejado en los valores de tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de la tabla 2.6. Los valores de  $\mu_{\text{máx}}$  y  $t_d$  calculados para los cultivos SAP, LMA2, AL1 y LMi coinciden, aproximadamente, con aquellos reportados en la bibliografía para microorganismos anaerobios, en general, y para MSR, en particular.

#### **II.4.2. Consorcios acidófilos de MSR**

Uno de los objetivos más importantes de este trabajo de tesis es la obtención de microorganismos y/o consorcios de MSR con potencialidad de ser aplicados en biorremediación de metales en ambientes ácidos.

Los ácidos orgánicos son inhibitorios a bajos valores de pH para la mayoría de los microorganismos. Su toxicidad depende de las constantes de disociación ácidas, debido a que diferentes concentraciones de las formas ácidas (no disociadas) estarán presentes a diferentes valores de pH. Por ejemplo, el valor de pKa del ácido láctico, sustrato utilizado normalmente en los medios para aislar MSR, es 3,08 ( $K_a = 8,3 \times 10^{-4}$ ), lo que significa que a pH 3,0 aproximadamente el 50% del ácido láctico se encontrará en su forma no disociada (figura 2.16, paso 1). El ácido no disociado puede difundir al interior del citoplasma y una vez dentro disociarse debido al pH neutro intracelular (figura 2.16, paso 2 y 3) produciendo de esta manera la lisis celular (Sánchez-Andrea y col., 2014). La razón por la cual existen pocos MSR acidófilos aislados está principalmente relacionada con las técnicas que se han utilizado para realizar los enriquecimientos y aislamientos, donde las cuestiones mencionadas anteriormente no han sido tenidas en cuenta. Otros factores importantes lo son el hecho de que a bajos pH el sulfuro de hidrógeno existe en su forma no disociada ( $\text{H}_2\text{S}$ ), el cual es mucho más

tóxico que la forma disociada ( $S^{-2}$ ), y que el ácido acético (subproducto usual en la oxidación incompleta de la fuente de carbono y energía en algunas especies de MSR), resulta tóxico a valores bajos de pH por la misma razón que el ácido láctico (Johnson, 2012). En los ambientes naturales donde normalmente se encuentran los MSR, el ácido acético puede ser metabolizado por otros microorganismos anaerobios (por ejemplo, los metanógenos) que coexisten en el mismo ambiente (Sánchez-Andrea y col., 2014).



**Figura 2.16.** Esquema de la disociación de los ácidos orgánicos fuera y dentro de la célula

Debido a las dificultades mencionadas anteriormente, se introdujeron ciertas modificaciones en las técnicas de cultivo utilizadas, descritas más abajo.

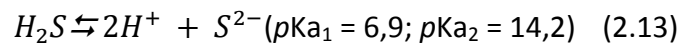
Estos enriquecimientos se hicieron exclusivamente para aquellas muestras que presentaban menor pH y/o menores valores de Eh. Las muestras utilizadas fueron LMa2, LMi, B9 Lag, B9-2, B9-3, AL1 y AL2.

Las muestras fueron homogeneizadas por agitación y colocadas en frascos Schott estériles de 50 mL. Luego se agregó el medio de cultivo de pH 3,0, sobre el cual se había hecho burbujear N<sub>2</sub> previamente para desplazar el O<sub>2</sub> presente (Johnson y col.,



2009). El medio utilizado (Anexo II) contiene glicerol en lugar de lactato como fuente alternativa de carbono y energía, por las razones explicadas previamente.

A diferencia del medio Postgate B este medio contiene el catión Zn(II) para visualizar el crecimiento. Este cambio es necesario porque FeS precipita a pH mayores a los de este medio mientras que ZnS precipita a valores de pH moderadamente ácidos (pH  $\geq 3,5$ ). Este comportamiento se justifica por la diferencia en sus productos de solubilidad:  $8 \times 10^{-19}$  y  $2 \times 10^{-25}$  para FeS y ZnS, respectivamente. En medios con valores menores de pH desplazan los equilibrios de disociación de H<sub>2</sub>S (integrados en la ecuación siguiente) hacia la izquierda, disminuyendo la concentración de sulfuro y dificultando alcanzar el producto de solubilidad de sulfuros menos insolubles como FeS.



En estos medios con Zn(II), el crecimiento positivo se detecta también con la aparición de un precipitado, pero en este caso blanco (ZnS).

En el primer enriquecimiento se utilizó una importante cantidad de muestra (50% v/v). En este caso, los frascos fueron colocados en jarras de anaerobiosis y se incubaron a 30°C. El uso de las jarras de anaerobiosis se hizo necesario ya que los ácidos tioglicólico y ascórbico (que se agregan para asegurar anaerobiosis en los frascos) resultan inhibitorios a pH ácido por razones similares a la del ácido láctico.

Luego de un mes de incubación, se discontinuaron los cultivos y se midieron las concentraciones de glicerol (utilizando un método colorimétrico-enzimático: TG Color Wiener Lab), de ion sulfato (utilizando el método turbidimétrico ya descrito) y de Zn(II) mediante EAA. También se realizaron observaciones en el microscopio y tinciones con DAPI (Anexos I y IV).

#### **II.4.2.1. Discusión de los resultados**

Las figuras 2.17 y 2.18 muestran los resultados luego de un mes de incubación.

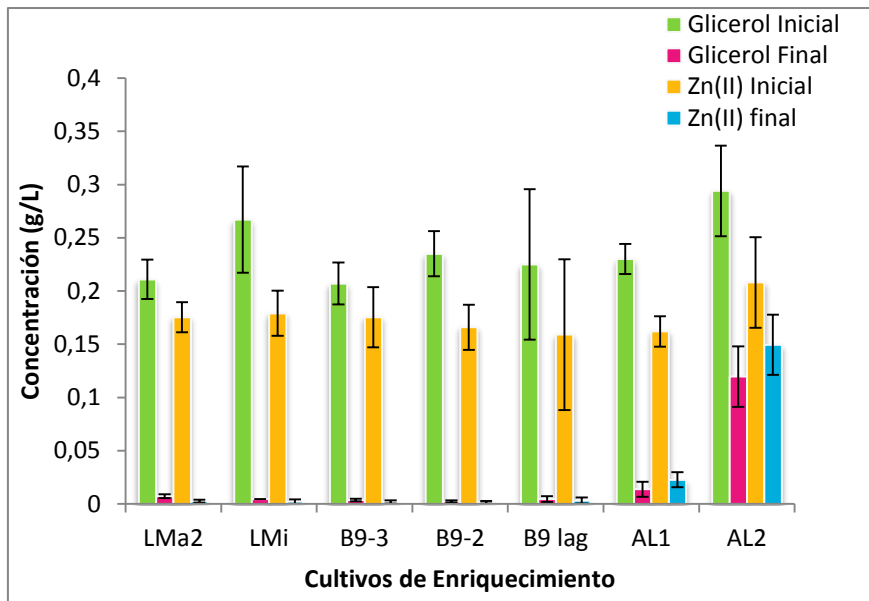


Figura 2.17. Concentraciones de Zn(II) y glicerol, al inicio y luego de un mes de incubación para los enriquecimientos acidófilos (pH 3,0)

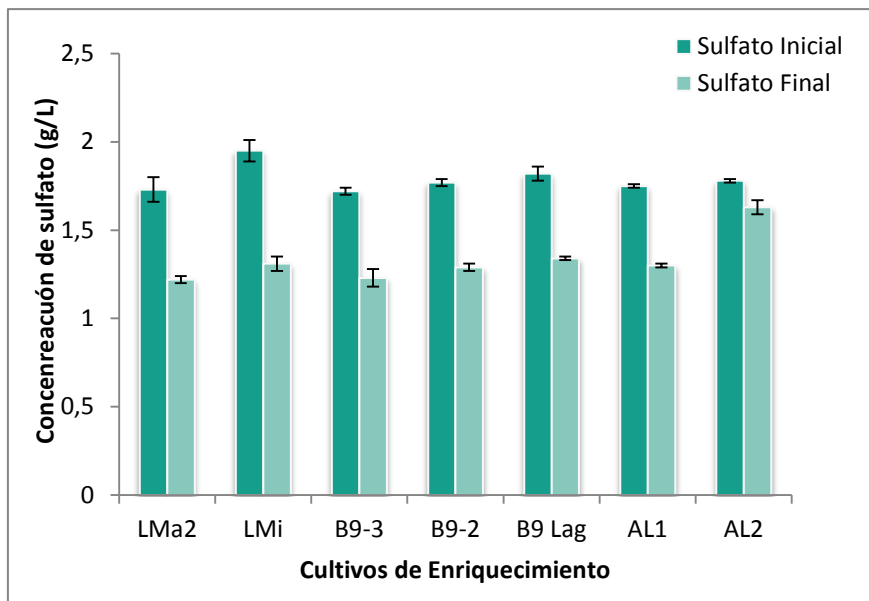


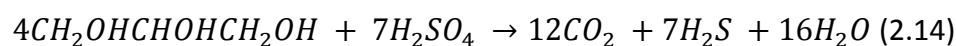
Figura 2.18. Concentración de sulfato iniciales y luego de un mes de incubación para los enriquecimientos acidófilos (pH 3,0)

Se observó un consumo completo de glicerol (reactivo limitante) en todos los enriquecimientos anaerobios, con excepción de AL2. En todos los otros enriquecimientos, se constató una disminución de aproximadamente 0,5 g/L en sulfato

(ver tabla 2.7), seguramente por su reducción a sulfuro, tal cual fue confirmado por la detección de olor típico del H<sub>2</sub>S y por la aparición de ZnS junto con la disminución de la concentración de Zn(II) en solución. Esto sugiere la existencia de comunidades de MSR acidófilos en estas muestras. La muestra AL2, en cambio, no mostró un descenso significativo en las concentraciones de Zn(II) y sulfato y tampoco se detectó la presencia de H<sub>2</sub>S, lo que impide confirmar la presencia de MSR capaces de desarrollarse en estas condiciones.

La biooxidación completa e incompleta de glicerol a expensas de la reducción de sulfato a sulfuro de hidrogeno pueden representarse mediante las ecuaciones 2.14 y 2.15 (Johnson y col., 2009).

*Completa*



*Incompleta*



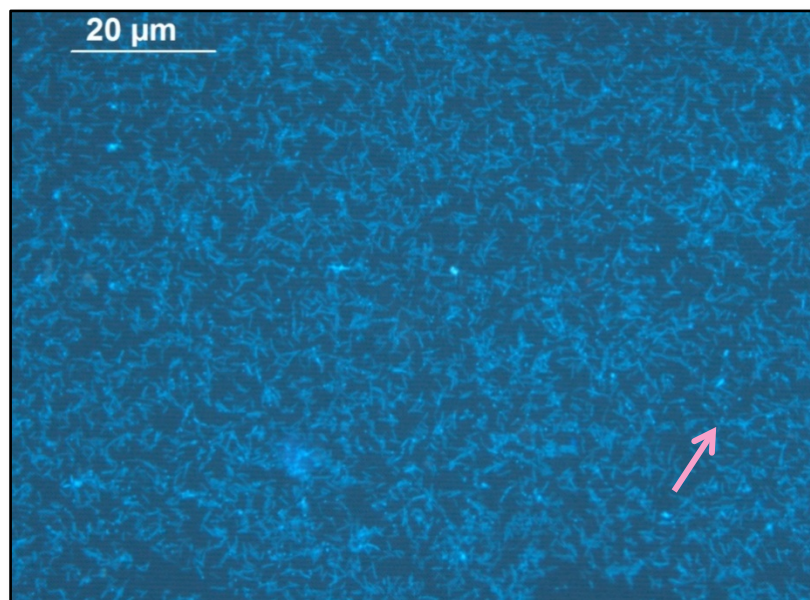
**Tabla 2.7.** Sulfato consumido en los enriquecimientos para MSR acidófilos

	<b>LMa2</b>	<b>LMI</b>	<b>B9-3</b>	<b>B9-2</b>	<b>B9 Lag</b>	<b>AL1</b>	<b>AL2</b>
<b>Sulfato consumido (g/L)</b>	0,51	0,64	0,49	0,48	0,48	0,45	0,15

Los cálculos estequiométricos en este caso muestran que el glicerol fue oxidado completamente a CO<sub>2</sub> a expensas de la reducción de sulfato en los cultivos LMa2, LMI, B93, B92, B9 Lag y AL1. En general, los cultivos mostraron un aumento de 2-3 unidades de pH (datos no mostrados) que es consecuente con el proceso de reducción de sulfato que indican las ecuaciones anteriores. Durante el crecimiento se consumieron aproximadamente 6,6 mM de sulfato. Considerando que aun al pH inicial, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> está prácticamente disociado en forma completa, el proceso debería haber consumido 13,2 mM de protones que justifican el incremento de pH observado. La neutralización observada en los cultivos de MSR acidófilos es usualmente mayor que para los

neutrófilos, ya que en la oxidación completa de glicerol (que ocurre durante el crecimiento de los acidófilos) se consumen 3,5 moles de protones por mol de sustrato mientras que en la oxidación incompleta de lactato (que tiene lugar durante el crecimiento de los neutrófilos) se consume sólo 1 mol de protones por mol de sustrato. Además, en este último caso se genera parcialmente ácido acético que es menos débil que  $H_2S$ .

La figura 2.19 muestra una imagen representativa de estos enriquecimientos previa tinción con DAPI. Las células tienen forma de bacilos alargados con baja movilidad y en algunos casos con esporas terminales, con excepción del cultivo AL2. Este tipo de células fueron identificadas en otros enriquecimientos de MSR acidófilos a partir de muestras de sedimentos de drenajes ácidos de mina (Mynydd Parys, Gales y Huelva, España) y áreas geotermales como la isla Montserrat en West Inidies (Falagán y col., 2014; Johnson y col., 2009; Kimura y col., 2006; Rowe y col., 2007). Entre otras morfologías encontradas, se destacan los cocos pequeños con mayor movilidad y estructuras brillantes y redondeadas que probablemente sean esporas totalmente formadas.



**Figura 2.19.** Imagen de un enriquecimiento acidófilo teñido con DAPI (objetivo 40X).

## **II.5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR**

La diversidad y ecología microbiana del área geotermal del volcán Copahue ha sido estudiada en los últimos años. Sin embargo, no existen hasta el momento estudios sobre los sedimentos anaeróbicos de este ambiente extremo. En esta sección se analizará la diversidad de los sedimentos anaerobios del volcán Copahue y de los consorcios a pH neutro y ácido de MSR que se describieron antes en este capítulo. En todos los casos se utilizarán las mismas técnicas de biología molecular.

### ***II.5.1. Sedimentos anaerobios del volcán Copahue***

#### ***II.5.1.1. Metodología***

El análisis de la diversidad microbiana de las muestras de sedimentos se realizó a través de la técnica T-RFLP (Anexo III) y de la clonación y secuenciación del gen de ARNr 16S. La técnica de T-RFLP permite estimar la diversidad en términos de cuántos microorganismos la componen, ya que cada fragmento terminal de restricción representa presumiblemente un microorganismo; con la clonación y secuenciación se pueden identificar los microorganismos presentes.

Se realizó la extracción de ADN de todas las muestras de sedimentos utilizando el kit Ultra – Clean™ Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, USA) según las especificaciones del fabricante. Luego se amplificó el gen 16S ARNr utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos para bacterias (27F Cy5-marcado y 1387R sin marcar) y arqueas (20F Cy5 marcado y 915R sin marcar) para el posterior análisis por T-RFLP. Los productos de PCR fueron purificados y luego digeridos con las enzimas de restricción HaeIII, AluI y CfoI. El tamaño de los fragmentos terminales de restricción (T-RFs) obtenidos fue determinado utilizando una electroforesis capilar (Beckman Coulter 8000 Capillary System) y comparando la movilidad de cada T-RF con la movilidad de fragmentos estándares. El área relativa de cada T-RF (que está directamente relacionada con la intensidad de la fluorescencia) al área total de los picos, fue utilizada para determinar la abundancia relativa y la

identidad de cada microorganismo (Hallberg y col., 2006). En el Anexo III pueden encontrarse más detalles sobre los protocolos.

Se consideró que cada T-RF correspondía a un microorganismo individual si se encontraba con la misma abundancia relativa en las restricciones realizadas con las tres enzimas. Para asignar una identidad a cada T-RF se los comparó frente a una base de datos que contenía los T-RFs de microorganismos previamente encontrados en ambientes ácidos -Bangor University database of acidophilic bacteria and archaea, Bangor Acidophile Research Team (BART), Gales.

Para lograr una identificación completa de los microorganismos presentes en las muestras de sedimentos, se realizó una biblioteca del gen 16S ARNr de las muestras AL1 y LMi. Como se explicará en la sección de resultados y discusión, las bibliotecas se realizaron sólo para bacterias y sólo en algunas muestras. Para realizar las bibliotecas, el ADN previamente extraído de las muestras AL1 y LMi se amplificó utilizando cebadores universales para bacterias 27F y 1387R. Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit UltraClean® PCR Clean-Up Kit (MO BIO Laboratories, Inc, United States) y se clonaron con el kit pGEM-T Easy Vector System (Promega, USA). Los plásmidos resultantes se transformaron en bacterias *Escherichia coli* DH5α las cuales fueron previamente tratadas para debilitar su membrana y permitir la entrada del plásmido. Se seleccionaron los clones positivos (entre 80 y 90 clones) y los mismos fueron sometidos a un análisis de restricción utilizando las enzimas MspI y CfoI. Los fragmentos de restricción de cada clon se separaron en un gel de agarosa 2% m/v utilizando un voltaje de 70 mV durante dos horas. Comparando los fragmentos de restricción con marcadores de peso molecular 1 Kb y 100 pb (Plus DNA Ladder, Invitrogen), se pudo establecer un patrón de restricción para cada uno de los clones con cada enzima. En el Anexo III pueden encontrarse más detalles sobre los protocolos utilizados.

Al menos un plásmido de cada patrón de restricción fue purificado utilizando el kit Concert Rapid miniprep system (Life Technologies) y secuenciado. Las secuencias fueron ensambladas utilizando los programas preGap y Gap 4 (Staden Package) y luego comparadas con la base de datos pública del NCBI. Se construyó un árbol filogenético

utilizando el software MEGA empleando diferentes filtros. Se realizó el análisis por T-RFLP de cada uno de los clones secuenciados, con la enzima HaeIII. De esta manera se pueden comparar los fragmentos terminales de restricción de los clones, con los obtenidos en el análisis directo de la muestra ambiental y asignarle una identidad a cada uno de los picos. Para el análisis y la descripción de los microorganismos se utilizó además la herramienta Classifier que se encuentra en Ribosomal Database Project (RDP) (Wang y col., 2007). El análisis de rarefacción de las bibliotecas AL1 y LMi fue realizado con el software aRarefraction 1.3 (Steven Holland, Stratigraphy Lab, University of Georgia).

A continuación se analizarán los resultados obtenidos de las T-RFLP de bacterias y arqueas. Luego se discutirán los resultados obtenidos a partir de las bibliotecas de ARNr 16S de bacterias de las muestras AL1 y LMi.

#### ***II.5.1.2. T-RFLP arqueas y bacterias - Resultados y Discusión***

Las figuras 2.20 A y B muestran los perfiles de T-RFLP de arqueas obtenidos con la enzima HaeIII para los sedimentos de los pozos termales de Copahue. Los perfiles con las otras enzimas (Alu1 y CfoI) no se muestran debido a que no se logró buena resolución entre los picos, pero se tuvieron en cuenta en el momento del análisis de los resultados.

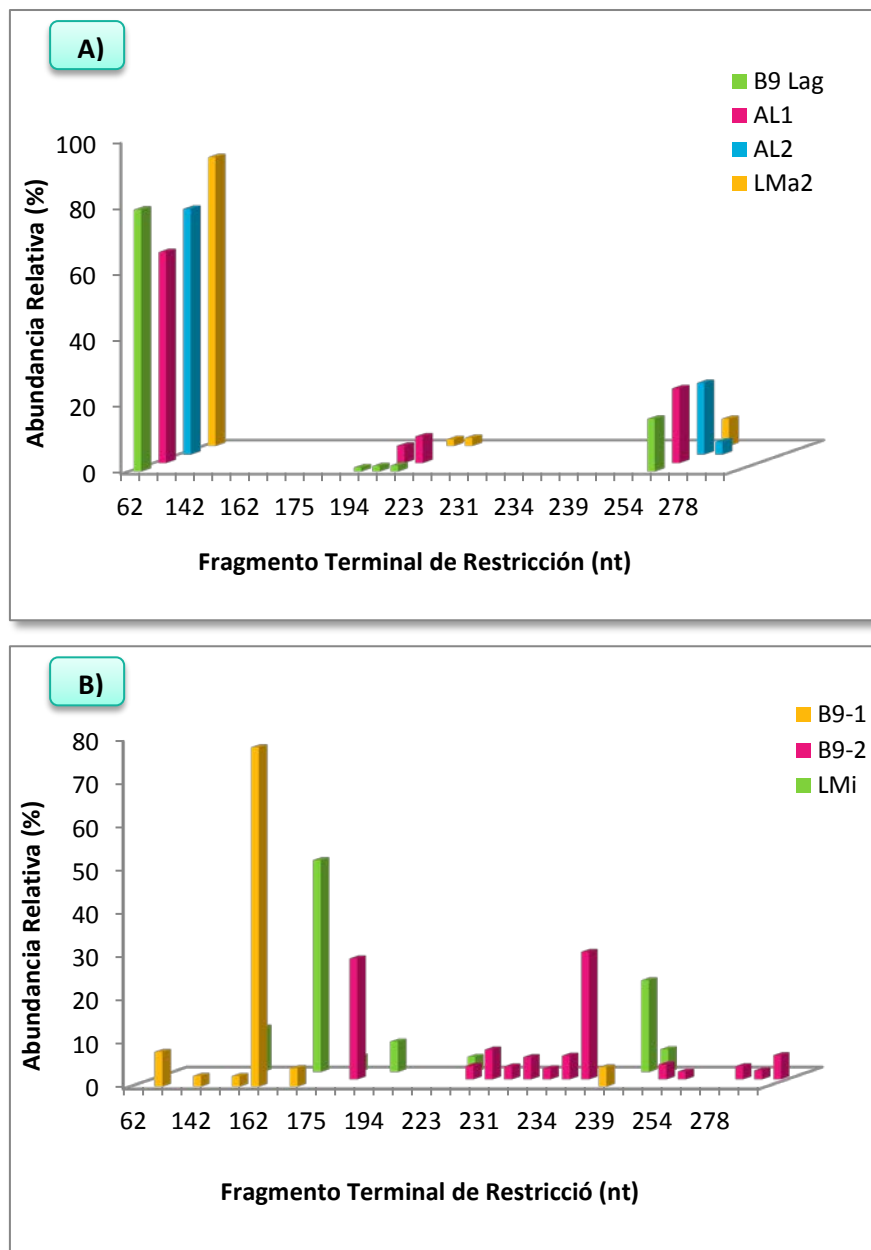
Las muestras de B9-3 y LMa1 no resultaron positivas en la amplificación por PCR con los cebadores específicos para arqueas. Aunque la metodología utilizada aquí no pudo detectarlas, no es posible descartar completamente la presencia de arqueas en estas muestras.

El análisis por T-RFLP de los genes 16S ARNr de arqueas de las muestras B9 Lag, AL1, AL2 y LMa2 (figura 2.20 A) reveló que, existe un perfil similar para las cuatro muestras para aquellos fragmentos terminales de restricción con mayor abundancia relativa en las muestras ( $62\pm 2$  y  $269\pm 2$  nucleótidos). Estas muestras tenían similitudes en el rango de pH aunque presentaban diferencias en la temperatura indicando que

estas arqueas parecen estar presentes en ambientes con un rango bastante amplio de temperatura.

El T-RF (62±2 nucleótidos obtenido con HaeIII), de mayor abundancia relativa en las cuatro muestras -entre 63% en la muestra AL1 y 87% en la muestra LMa2-, fue identificado en la base de datos como perteneciente al género *Thermoplasma*. Bajo condiciones de anaerobiosis las especies de este género -*Thermoplasma acidophilum* y *Thermoplasma volcanicum*- son capaces de reducir azufre elemental produciendo H<sub>2</sub>S utilizando compuestos orgánicos como fuente de energía y no realizan la reducción desasimilatoria de sulfato (Segeber y col., 1988). Estas especies han sido aisladas de pilas de restos de carbón (*T. acidophilum*) y de diversas zonas volcánicas (*T. volcanicum*). En este último caso los parámetros fisicoquímicos como la temperatura y pH son similares a aquellos encontrados en las muestras B9 Lag, AL1, AL2 y LMa2 (Segeber y col., 1988). La presencia de cristales de azufre elemental en la zona de las termas de Copahue, podría favorecer el crecimiento de especies del género *Thermoplasma*. En un estudio similar realizado por nuestro grupo (Urbieta y col., 2014 a) sobre la columna de agua de la muestra B9 Lag se detectaron secuencias de ARNr 16S pertenecientes a arqueas con similitud de secuencia cercana al orden *Thermoplasmatales*. El T-RF correspondiente a 269±2 nucleótidos con HaeIII tiene 8% de abundancia relativa en la muestra LMa2 y 22% en la muestra AL1. El mismo no pudo ser identificado en la base de datos utilizada. Lo mismo sucedió con aquellos T-RFs de la muestra AL1 correspondientes a 211±2 y 214±2 nucleótidos obtenidos con HaeIII (figura 2.20 A).





**Figura 2.20.** Perfiles de T-RFLP de arqueas obtenidos con la enzima HaeIII a partir de las muestras de sedimentos del volcán Copahue

La figura 2.20 B muestra los perfiles de restricción de los genes de ARNr 16S obtenidos con los cebadores específicos para arqueas en las muestras B9-1, B9-2 y LMi. Comparando las muestras B9-1 y LMi se observa un perfil similar debido a que contienen los mismos fragmentos terminales de restricción, con algunas diferencias en la abundancia relativa. El T-RF correspondiente a  $163 \pm 2$  nucleótidos –78% de abundancia relativa en la muestra B9-1 y 49% en LMi- no pudo ser identificado en la

base de datos utilizada. En un estudio previo realizado por nuestro grupo sobre pozos termales de Copahue, se detectaron secuencias de ARNr 16S que se ubican en ramas separadas y distintivas (OTUs) de especies cultivadas del género *Sulfolobus* y, en algunos casos, de clones de arqueas no cultivables (Urbietta y col., 2014 a). Esto indica la presencia de algunas especies de arqueas autóctonas de este ambiente volcánico y no presentes en otros lugares.

El T-RF correspondiente a  $238 \pm 2$  nucleótidos –4% de abundancia relativa en la muestra B9-1 y 26% en LMi- fue identificado en la base de datos como perteneciente al género *Metallosphaera*. Las cinco especies descritas de este género son acidófilos, aerobios obligados y tienen la capacidad de crecer en condiciones heterótrofas, mixótrofas y quimiolitautótrofas utilizando una gran variedad de compuestos reducidos de S, Fe(II), compuestos orgánicos complejos, azúcares y aminoácidos. Las temperaturas óptimas de crecimiento se encuentran entre los 65 y 80°C (Wheaton y col., 2015), y esta podría ser la razón por la cual se encuentra en mayor abundancia relativa en la muestra LMi donde la temperatura era más alta.

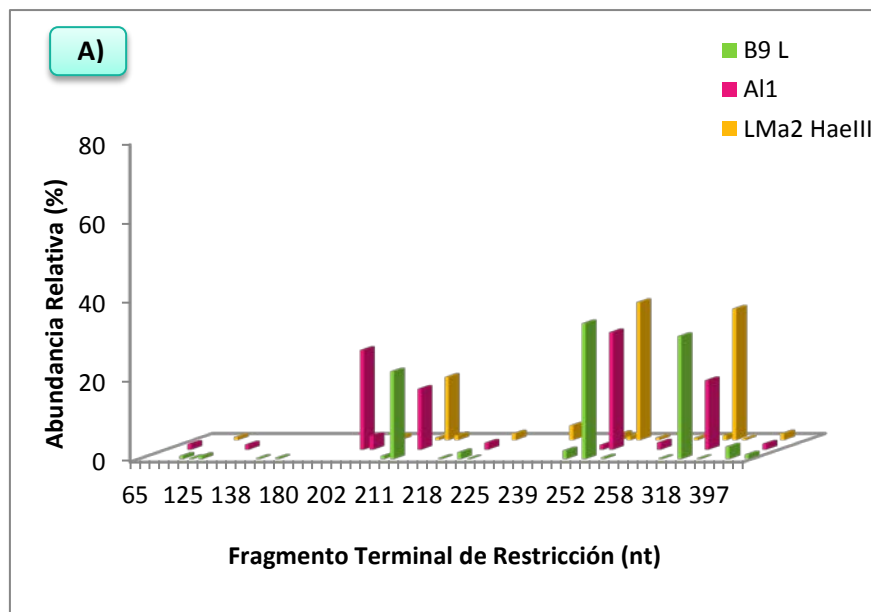
Con una abundancia relativa de 7%, el T-RF correspondiente a  $193 \pm 2$  nucleótidos que se observa en la muestra LMi, fue identificado como *Acidianus*. Este género pertenece a la familia *Sulfolobaceae* al igual que *Sulfolobus* y *Metallosphaera*. Una de las principales diferencias de las especies del género *Acidianus* respecto de los demás miembros de su familia es la capacidad de crecer en condiciones de anaerobiosis y hasta una temperatura de 90°C. Una nueva especie de este género, *Acidianus copahuensis*, fue aislada de la zona geotermal de Copahue por nuestro grupo y ya ha sido aplicada en procesos de biolixiviación de minerales (Giaveno y col., 2013; Urbietta y col., 2014 b).

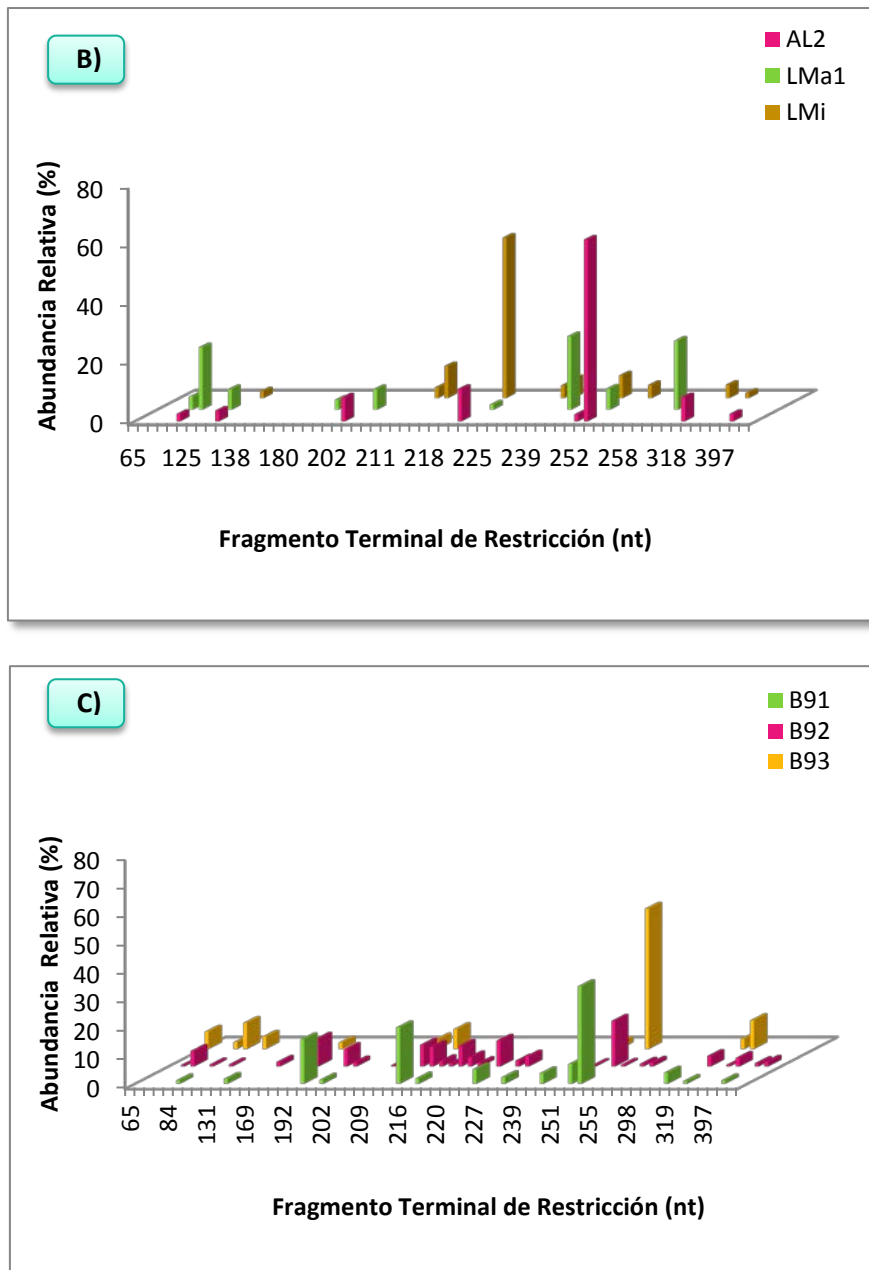
Los géneros de arqueas termófilas descritos anteriormente (*Sulfolobus*, *Metallosphaera* y *Acidianus*) han sido utilizados en procesos de biolixiviación/biooxidación bajo condiciones de acidez extrema y elevada temperatura (Batty y Rorke, 2006; Neale y col., 2009; Logan y col., 2007). La presencia de los géneros *Sulfolobus* y *Metallosphaera* (que no se desarrollan en anaerobiosis) en las muestras de sedimentos de Copahue puede deberse al arrastre de parte de la columna

de agua en el proceso de toma de muestra. En cambio, el género *Acidianus* puede crecer en anaerobiosis y hace factible que estos microorganismos se desarrollen en los sedimentos anaerobios de las áreas estudiadas.

En la muestra B9-2 (figura 2.20 B) tanto los T-RFs con mayor abundancia relativa -28% para 187±2 nucleótidos y 29% para 235±2 nucleótidos- como los de menor abundancia relativa, no pudieron ser asignados a ningún microorganismo de la base de datos utilizada. Nuevamente es posible que esto se deba a que son especies únicas y autóctonas de este ambiente volcánico aunque no se tiene certeza suficiente con esta metodología.

Las figuras 2.21 A, B y C muestran los perfiles de T-RFLP de bacterias obtenidos con la enzima HaeIII para los sedimentos de los pozos termales de Copahue. Los perfiles con las otras enzimas (Alu1 y CfoI) no se muestran pero se tuvieron en cuenta en el momento del análisis de los resultados.





**Figura 2.21.** Perfiles de T-RFLP de bacterias obtenidos con la enzima HaeIII. **A)** B9Lag, AL1 y LMa2. **B)** B9-1, B9-2, B9-3. **C)** AL2, LMa1, LMi

El análisis por T-RFLP de los genes de ARNr 16S de bacterias que se amplificaron en las muestras LMa2, AL1 y B9 Lag (figura 2.21 A) reveló un perfil similar, con los mismos fragmentos terminales de restricción y aproximadamente la misma composición relativa. Esto es probablemente una consecuencia de que los parámetros fisicoquímicos en las tres muestras eran similares. Cada uno de los T-RFs representa entre 25 y 35% del total de la comunidad, determinado por el área relativa de cada T-

RF. En la misma figura puede verse que la muestra AL1 presenta algunos T-RF con menor abundancia relativa y diferentes a los de las otras dos muestras. En la tabla 2.8 se muestran los tamaños de cada T-RF representados en la figura 2.21 A y los porcentajes de abundancia relativa de cada uno.

**Tabla 2.8.** Fragmentos terminales de restricción para algunas muestras de la figura 2.20 A, B y C

	AL1	LMa2	B9 Lag	LMi	B9-3	B9-2	AL2
T-RF±2 nt (Abundancia relativa)				131 (2%)	131 (4%)		
	202 (25%)						
	204 (3,4%)	204 (0,9%)					204 (8%)
	212 (15%)	212 (16%)	212 (22%)	212 (11%)	212 (7%)	212 (7%)	
				214 (11%)			
	221 (1,7%)	221 (1,6%)	221 (1,6%)	221 (54%)			221 (11%)
		232 (3,7%)	232 (3,7%)	232 (4%)			
	253 (29%)	253 (35%)	253 (34%)	253 (7%)	253 (49%)	253 (16%)	253 (62%)
				255 (4%)			
	319 (17%)	319 (33%)	319 (31%)	319 (4%)	319 (10%)	319 (3%)	319 (8%)

Las muestras B9-3 y LMi (figuras 2.21, B y C) también muestran similares patrones de T-RFs aunque con menor diversidad y una composición cuantitativa variable. En la muestra LMi, el T-RF correspondiente a 221±2 nucleótidos (nt) representa el 54% del total de la comunidad mientras que el T-RF correspondiente a 214±2 nucleótidos representa el 11%. En la tabla 2.8 se muestran los tamaños de cada T-RF representados en las figuras 2.21, B y C, y los porcentajes de abundancia relativa de cada uno.

No fue posible asignar una identidad específica a los TRFs de bacterias al compararlos con aquellos presentes en la base de datos (Bangor University database of acidophilic bacteria and archaea). Probablemente esto se deba a que la base está

compuesta principalmente por microorganismos aislados en drenajes ácidos de minas (DAM) y no de ambientes volcánicos (Hallberg y col., 2006; Johnson y col., unpublished; Rowe y col., 2007). Debido a esto, la identidad de la mayoría de las bacterias tuvo que ser confirmada por clonación y secuenciación del gen 16S rARN. No se incluyeron a las arqueas, ya que la mayoría de las localizadas en estas áreas había sido descrito en trabajos previos.

### ***II.5.1.3. Bibliotecas del gen 16S rARN de bacterias - Resultados y Discusión***

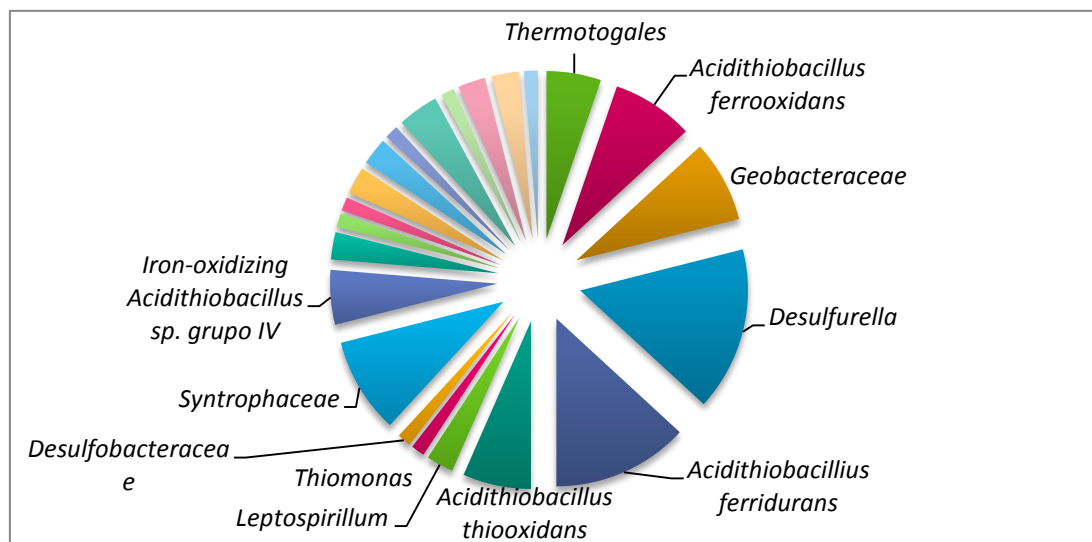
Para confirmar la identidad de las bacterias presentes en las muestras de sedimentos y asignar una identidad a los fragmentos terminales de restricción (T-RF), se realizaron bibliotecas del gen ARNr 16S de bacterias exclusivamente de las muestras AL1 y LMi. La muestra AL1 se seleccionó debido a que presentaba varios T-RFs en común con las demás pero además otros exclusivos que la diferenciaban de las otras muestras (figura 2.21 A). LMi se seleccionó por tener las características fisicoquímicas más extremas; además presentaba algunos T-RFs en común con la muestra B9-3 (figuras 2.21, B y C). Esas mismas muestras fueron las que permitieron obtener las comunidades acidófilas y neutrófilas de MSR, tal cual se describió en la sección II.4.2. De esta manera, esas muestras en particular son estudiadas en profundidad al ser abordadas simultáneamente por los enfoques molecular y fisiológico.

#### ***II.5.1.3.1. Muestra AL1***

La figura 2.22 muestra la composición filogenética en la biblioteca de los genes de ARNr 16S de bacterias de la muestra de sedimentos AL1. La figura 2.23 muestra el árbol filogenético obtenido con el programa MEGA aplicando Maximum-Likelihood como método estadístico y el modelo de Jukes-Cantor. La tabla 2.9 muestra los clones de bacterias ordenados filogenéticamente según la herramienta Classifier de Ribosomal Database Project (RDP). Esta herramienta on line permite la clasificación de las secuencias de ARNr 16S en grupos filogenéticos (desde filo hasta género) utilizando

un algoritmo diferente a los de BLAST y MEGA. Además, permite aplicar valores de corte al análisis, según el porcentaje de confianza de la clasificación.

Los resultados para la muestra AL1 (figuras 2.22 y 2.23 y tabla 2.9) revelaron la presencia de varios microorganismos involucrados en el ciclo del azufre y del hierro pertenecientes a las clases *Beta-*, *Delta-* y *Gammaproteobacteria*. Los miembros de la clase *Gammaproteobacteria* fueron agrupados por la herramienta RDP Classifier con un 100% de confianza dentro del género *Acidithiobacillus*. Comparando la similitud de las secuencias de ARNr 16S de estos clones con la base de datos BLAST encontramos que los mismos se encuentran estrechamente relacionados con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferriphilus*, *Acidithiobacillus ferridurans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*, presentando una similitud de secuencia entre 98 y 99 % (tabla 2.9). Estos resultados explican la posición de los clones AL1 J20, f42, O53, W80 y g16 en el árbol filogenético de la figura 2.22. Los microorganismos pertenecientes al género *Acidithiobacillus* y a las especies indicadas arriba, son acidófilos y capaces de oxidar hierro(II) –con excepción de *At. thiooxidans*- y compuestos reducidos de azufre. Las diferencias entre las tres primeras especies son mínimas y pueden observarse en los trabajos de Falagán y Johnson (2016) y Hedrich y Johnson (2013).



**Figura 2.22.** Composición filogenética en la biblioteca de genes ARNr 16S de bacterias en la muestra de sedimento AL1

Doce clones de los 26 agrupados en la clase *Deltaproteobacteria*, fueron clasificados con un 100% de confianza por la herramienta RDP Classifier dentro del género *Desulfurella* y presentan una similitud de secuencia del 98% con *Desulfurella acetivorans* (BLAST). Los clones se agruparon en un OTU distintivo dentro del árbol filogenético (figura 2.22). El género *Desulfurella* incluye bacterias reductoras de azufre ácido-tolerantes encontradas en varios ambientes anaerobios con características ácidas así como también en reactores de remediación de drenajes ácidos de mina (Kaksonen y col., 2006). En un estudio similar Sánchez-Andrea y col (2011) identificaron secuencias de clones que se encontraron dentro del género *Desulfurella* en sedimentos anaeróbicos del Rio Tinto, España, donde se concluye que el papel de estas bacterias en los sedimentos anaerobios es la de llevar a cabo la reducción del sulfato junto con otras bacterias de los géneros *Desulfosporosinus*, *Thermodesulfobium* y *Syntrophobacter*.

Las secuencias restantes agrupadas dentro de la clase *Deltaproteobacteria* estaban relacionadas, aunque en forma lejana, con las familias *Syntrophaceae*, *Desulfobacteraceae* y *Geobacteraceae*. Estas secuencias fueron clasificadas con porcentajes de confianza muy bajos con la herramienta RDP Classifier y la secuencia más cercana en el BLAST resultó un clon no cultivable encontrado en el Rio Tinto (Sánchez-Andrea y col., 2011) (tabla 2.9). Estos datos también explican la posición de los clones I19, K18 y T70 en un OTU distintivo en el árbol filogenético (figura 2.22). Las dos primeras familias comprenden microorganismos anaerobios estrictos que utilizan el anión sulfato o tiosulfato como aceptor de electrones, con excepción de los géneros *Syntrophus* y *Smithella* que oxidan la fuente de carbono y energía incompletamente a acetato y utilizan crotonato como aceptor de electrones.

Por otro lado, las especies que pertenecen a la familia *Geobacteraceae* pueden utilizar Fe(III) y S elemental como aceptores de electrones, acoplado a la oxidación completa o fermentación de compuestos orgánicos simples (Garrity y col., 2005).

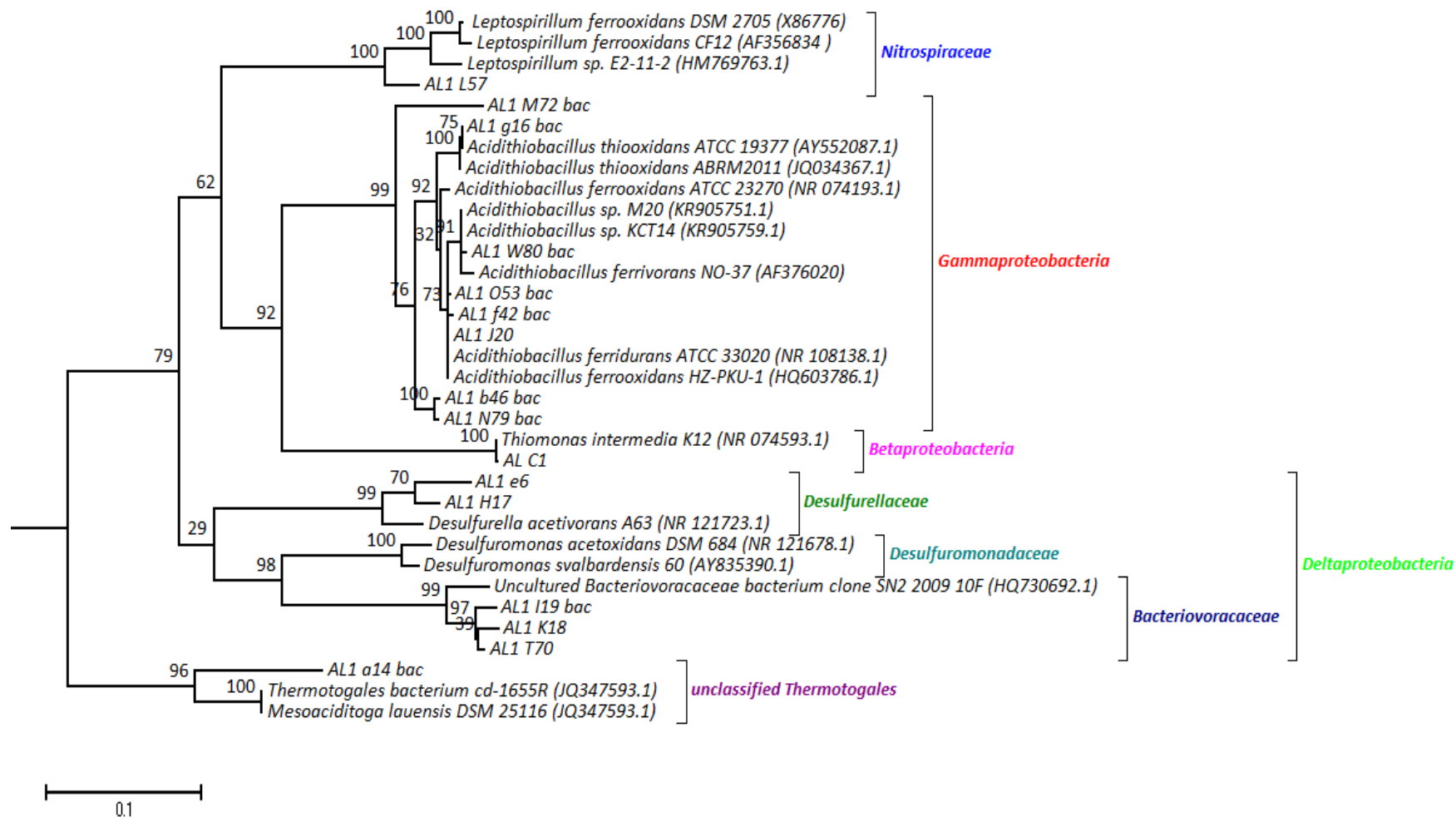
Un clon fue asignado con un 100% de confianza dentro del género *Thiomonas* de la clase *Betaproteobacteria*. El mismo mostró alto porcentaje de similitud (99%) con *Thiomonas intermedia* ATCC 15466 cuando se lo comparó con la base de datos BLAST



(tabla 2.9 y figura 2.23). Estas bacterias son consideradas acidófilas moderadas y crecen aeróbicamente oxidando compuestos de azufre o As(III) (Hallberg, 2010). Las *Thiomonas* fueron encontradas en un estudio previo realizado sobre las columnas de agua de los mismos pozos termales de Copahue (Urbietta y col., 2014a). La explicación de su presencia en esta biblioteca en baja proporción, se debe seguramente a la metodología de muestreo que arrastró parte de la columna de agua.

Además de las especies de *Acidithiobacillus* asociadas al ciclo del hierro, indicadas más arriba, se encontraron secuencias que se asociaron al género *Leptospirillum*. Las especies del género *Leptospirillum* son acidófilas (pH < 4,0) y aerobias obligadas y han sido aisladas fundamentalmente en DAM y en ambientes donde la concentración de Fe(III) es elevada. Estas células crecen sólo en forma quimiolitotrofa y obtienen la energía de la oxidación de Fe(II) pero no utilizan compuestos de azufre (Donati y Sand, 2007).

Cuatro clones encontrados en la biblioteca no pudieron ser asignados a ningún grupo filogenético; fueron clasificados con un porcentaje de 35% como *Thermotogales* utilizando la herramienta RDP Classifier y ubicando al clon a\_14 en un OTU distintivo dentro del árbol filogenético (tabla 2.9 y figura 2.23). Las bacterias que pertenecen a este orden son generalmente termófilos extremos que presentan temperaturas de crecimiento alrededor de los 80°C. Las secuencias del gen de ARNr 16S presentaron una similitud de secuencia del 89% con *Mesoaciditoga lauensis*. Este microorganismo fue aislado a partir de sedimentos de una zona geotermal y, a diferencia de los miembros del orden *Thermotogales*, posee temperaturas de crecimiento moderadas (Reysenbach y col., 2013).



**Figura 2.23.** Árbol filogenético obtenido para la muestra de sedimento AL1. Los porcentajes en los nodos indican el peso de esta topología sobre 500 réplicas (*bootstrap*). Las llaves de la derecha engloban filo. La barra indica 0,1 de divergencia filogenética (número de mutaciones fijas por nucleótido). *Alicyclobacillus tolerans* NR114517.1 fue utilizado como referencia (no se muestra).

**Tabla 2.9.** Clasificación filogenética de los clones de bacteria encontrados en la muestra de sedimento AL1 analizados según RDP. Se muestran la secuencia más cercana según BLAST y la longitud en nucleótidos de los T-RFs de los clones y los encontrados para la muestra ambiental con la enzima HaeIII (figura 3.A).

Clasificación filogenética según RDP	Nombre del Clon	T-RFs de los clones (HaeIII)	N° clones (%)	Secuencia más cercana BLAST	N° de acceso	Similitud (%)	T-RFs de la muestra ambiental AL1 (HaeIII)
<i>Thermotogales</i> (35%)	AL1-a14	319	4 (5)	<i>Mesoaciditoga lauensis</i>	NR_125611.1	89	
<i>Acidithiobacillus</i> (100%)	AL1-b46	253	6 (8)	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	CP001219.1	97	
<i>Geobacteraceae</i> (23%)	AL1-l19	201, 253	6 (8)	<i>Uncultured Bacteriovoraceae bacterium clone SN2</i>	NR_043213.1	94	
<i>Desulfurella</i> (100%)	AL1-d64	211	12 (16)	<i>Desulfurella acetivorans</i>	NR_121723.1	98	
<i>Acidithiobacillus</i> (100%)	AL1-J20	253	10 (13)	<i>Acidithiobacillus ferridurans</i>	NR_108138.1	98	78, 131, 202,
<i>Acidithiobacillus</i> (100%)	AL1-g16	202	5 (7)	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> strain ABRM 2011	JQ034367.1	99	212, 221, 253, 268, 319, 403
<i>Leptospirillum</i> (100%)	AL1-L57	204	2 (3)	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	NR_074963.1	98	
<i>Thiomonas</i> (100%)	AL1-c1	-	1 (1)	<i>Thiomonas intermedia</i> K12	NR_074593.1	99	
<i>Desulfobacteraceae</i> (38%)	AL1-K18	-	1 (1)	<i>Uncultured Bacteriovoraceae bacterium clone SN2</i>	HQ730692.1	95	
<i>Syntrophaceae</i> (22%)	AL1-T70	-	7 (9)	<i>Uncultured Bacteriovoraceae bacterium clone SN2</i>	HQ730692.1	95	
<i>Acidithiobacillus</i> (100%)	AL1-w80	-	4 (5)	<i>Acidithiobacillus ferriphilus</i> M20	GU167983.1	99	

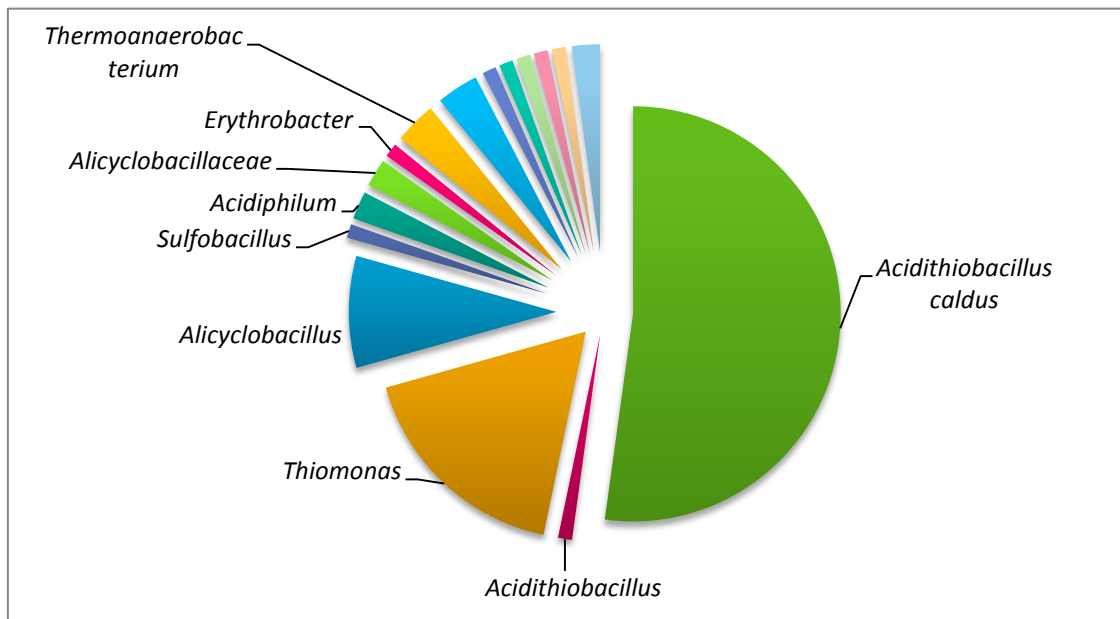
En la tabla 2.9 se muestra la longitud de los fragmentos terminales de restricción (T-RF) obtenidos con la enzima HaeIII (tercer columna) para los clones de la biblioteca de ARNr 16S y en la última columna los correspondientes a la muestra ambiental (figura 2.20 A). Combinando los resultados se le puede asignar una identidad a los T-RFs obtenidos en las muestras ambientales AL1, LMa2 y B9 Lag. Se toma un error de  $\pm 2$  nucleótidos para asignar una identidad a los T-RF. La longitud de los T-RF de los clones identificados como *Acidithiobacillus ferrooxidans/ferridurans* (253 nt), *Thermotogales* (319) y *Desulfurella acetivorans* (211) fue similar a aquellos que presentaron mayor abundancia en las muestras AL1, LMa2 y B9 Lag (Figura 2.20 A). Si bien los métodos basados en PCR no son cuantitativos, estos resultados son compatibles a los encontrados en la figura 2.20 A en donde se observan las mismas especies dominantes.

#### II.5.1.3.2. Muestra LMi

En la figura 2.24 se muestra la composición filogenética de la biblioteca de los genes de ARNr 16S de bacterias de la muestra de sedimentos LMi. La figura 2.25 muestra el árbol filogenético obtenido con el programa MEGA aplicando Maximum-Likelihood como método estadístico y el modelo de Jukes-Cantor. La tabla 2.10 muestra los clones de bacterias ordenados filogenéticamente según la herramienta Classifier de Ribosomal Database Project (RDP).

El análisis para la muestra LMi reveló la presencia de varios microorganismos mesófilos, termo-tolerantes y acidófilos involucrados en el ciclo del azufre y del hierro. Aunque los métodos basados en PCR no son cuantitativos se puede estimar que el 72% de los clones se clasificaron en el filo *Proteobacterias* y el 15% en el filo *Firmicutes* (con un 100% de confianza utilizando la herramienta RDP Classifier). Los clones clasificados en el filo *Proteobacterias* se dividieron en *Alfa-*, *Beta-* y *Gamma- Proteobacterias* (figura 2.24 y 2.25). Los clones de la clase *Gammaproteobacteria* fueron agrupados dentro del género *Acidithiobacillus* (tabla 2.10). Comparando la similitud de las secuencias de ARNr 16S de estos clones con la base de datos BLAST encontramos que los mismos se encuentran relacionados muy cercanamente con *Acidithiobacillus caldus*

(99% de similitud de secuencia), por lo que los clones se ubican en el mismo OTU que especies cultivadas de *At. caldus* (similar a *At. thiooxidans* aunque con temperatura óptima de crecimiento cercana a 45 °C). Estos microorganismos pueden crecer autotrófica y mixotróficamente, oxidando diferentes compuestos de S –pero no Fe(II). Han sido aislados en otros sitios geotermales y en DAM (Donati y Sand, 2007).



**Figura 2.24.** Composición filogenética en la biblioteca de genes ARNr 16S de bacterias en la muestra de sedimento AL1. Los valores entre paréntesis indican los porcentajes de confianza obtenidos con la herramienta RDP Classifier

Un clon perteneciente a la clase *Gammaproteobacteria* no pudo agruparse en ningún género, a pesar de presentar el mismo patrón de restricción con las enzimas *MspI* y *CfoI* que los clones agrupados con un 100% de confianza. Su porcentaje de confianza en el género *Acidithiobacillus* (*At.*) utilizando la herramienta RDP Classifier fue muy bajo (76%) y la similitud de secuencia utilizando la herramienta BLAST con *At. caldus* fue 90% (tabla 2.10).

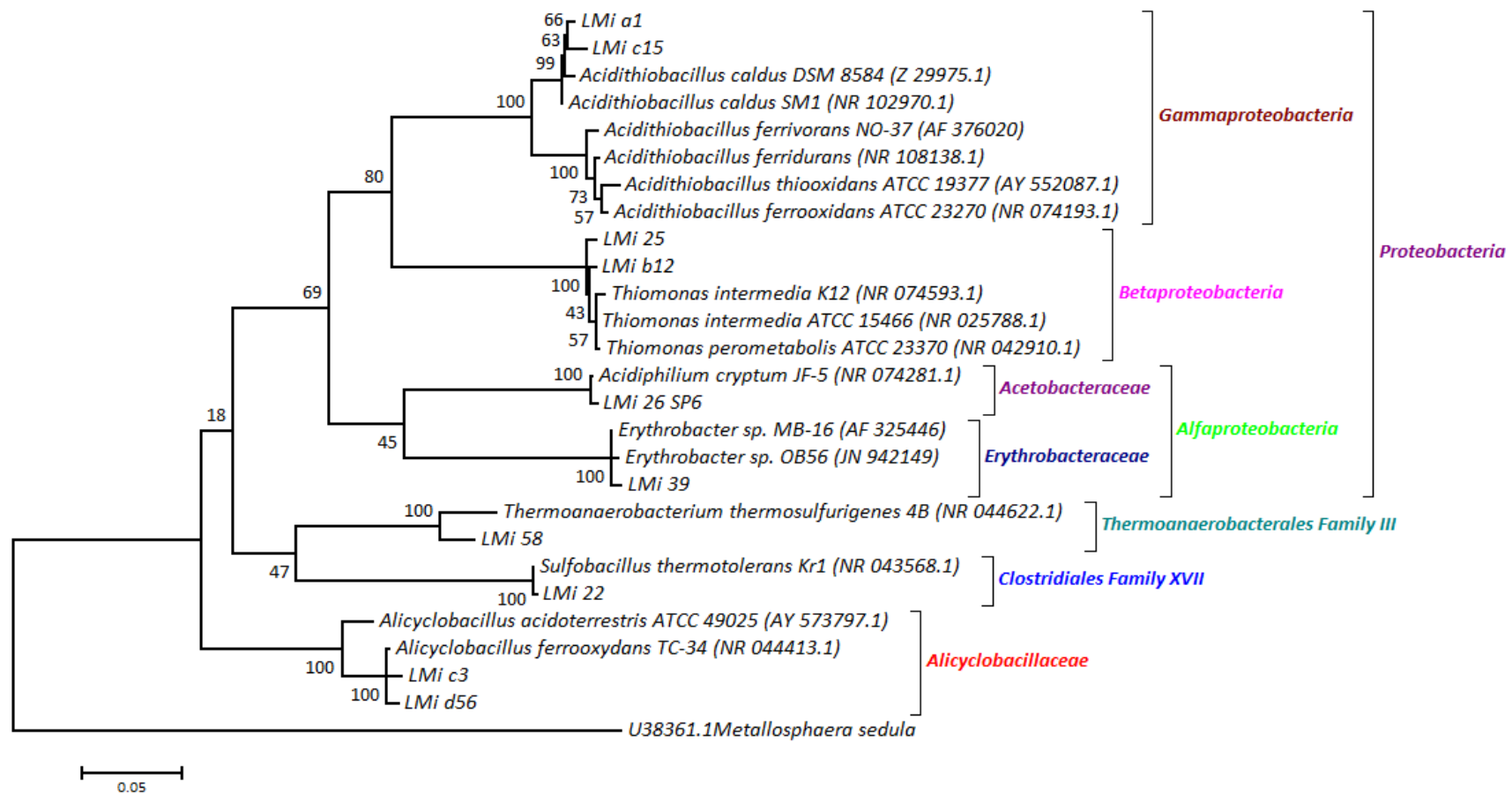
Varios clones fueron agrupados dentro del género *Thiomonas* (clase *Betaproteobacteria*) y sus secuencias del gen de ARNr 16S presentaron un 99% de similitud de secuencia con *Thiomonas intermedia* (tabla 2.10). En el árbol filogenético se observa que estos clones se agruparon en el mismo OTU que especies cultivables de

*Thiomonas* (figura 2.25). Estos microorganismos también fueron encontrados en la muestra AL1.

Los clones pertenecientes al filo *Firmicutes* (15%) se clasificaron dentro de los géneros *Alicyclobacillus* y *Sulfobacillus* (*Sb.*). Las secuencias de ARNr 16S presentaron porcentajes de similitud de 99% con *Alicyclobacillus tolerans* y *Sb. thermotolerans* (tabla 2.10). Estos resultados coinciden con el árbol filogenético de la figura 2.24, donde los clones mencionados se agrupan en el mismo OTU que *Alicyclobacillus ferrooxydans* TC-34 y *Sulfobacillus thermotolerans* Kr1. Con algunas diferencias entre especies, en general, los miembros del género *Sulfobacillus* son bacterias Gram-positivas y acidófilas capaces de obtener energía a partir de la oxidación de Fe(II), S y/o minerales sulfurados, en presencia de extracto de levadura. También son capaces de crecer heterotróficamente utilizando diferentes compuestos orgánicos. Las especies *Sb. benefaciens* y *Sb. thermotolerans* son capaces de formar endoesporas lo que contribuye a su resistencia a altas temperaturas y a las bajas concentraciones de oxígeno (Bogdanova y col., 2006; Dopson y Johnson, 2012). *Sb. benefaciens* es también capaz de crecer en condiciones de anaerobiosis usando Fe(III) como aceptor final de los electrones (Johnson y col., 2008). Estos microorganismos han sido encontrados en pozos termales de elevada temperatura de ambientes volcánicos ricos en hierro y azufre, en lagunas ácidas asociadas a explotaciones mineras y en plantas piloto de procesos de biolixiviación (Arroyo y col., 2015; Falagán y col., 2014; Johnson y col., 2003; Norris y col., 2015). Los microorganismos del género *Alicyclobacillus* pueden utilizar una mayor variedad de sustratos orgánicos y presentan mejor crecimiento bajo condiciones mixotróficas. Al igual que los miembros del género *Sulfobacillus*, pueden formar endoesporas y crecer en anaerobiosis reduciendo Fe(III) (Karavaiko y col., 2005; Lu y col., 2010).

Otros géneros como *Acidiphilium*, *Erythrobacter* (*Alfaproteobacteria*) y *Thermoanaerobacterium* (*Firmicutes*) fueron representados por un solo clon (figura 2.24 y tabla 2.10). Las similitudes de secuencia encontradas con la herramienta BLAST fueron 99% para *Acidiphilium cryptum* y *Erythrobacter vulgaris*, y 93% para *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* (figura 2.24). Las especies del género *Acidiphilium* no son capaces de oxidar Fe(II) pero utilizan Fe(III) como aceptor final de

los electrones en ambientes donde existen limitaciones de oxígeno (Coupland y Johnson, 2008). Estas bacterias fueron encontradas recientemente en una variedad de ambientes ácidos desarrollándose en conjunto con *At. ferrooxidans*, en los drenajes ácidos de mina de Turquía (Aytar y col., 2014) y en lagunas de la Franja Pirítica Ibérica en España (Falagán y col., 2014). Los miembros del género *Erythrobacter*, en cambio, no son comunes de ambientes ácidos o volcánicos y la mayoría de ellos fueron aislados en sedimentos marinos. Este género incluye bacterias aerobias estrictas que contienen bacterioclorofila a (BChl) y por lo tanto son capaces de realizar la fotosíntesis anoxigénica (Ivanova y col., 2005). Algunas especies son capaces de oxidar Mn(II) (Anderson y col., 2009; Francis y col., 2001; Yaakop y col., 2015).



**Figura 2.25.** Árbol filogenético obtenido para la muestra de sedimento LMi. Los porcentajes en los nodos indican el peso de esta topología sobre 500 réplicas (*bootstrap*). Las llaves de la derecha engloban filo, clase y familia. La barra indica 0,05 de divergencia filogenética (número de mutaciones fijas por nucleótido). *Metallosphaera sedula* se utilizó como referencia.



**Tabla 2.10.** Clasificación filogenética de los clones de bacteria encontrados en la muestra de sedimento LMi analizados según RDP. Se muestran la secuencia más cercana según BLAST y la longitud en nucleótidos de los T-RFs de los clones y los encontrados para la muestra ambiental con la enzima HaeIII (figura 3.1 A y B).

Clasificación filogenética según RDP	Nombre del Clon	T-RFs de los clones (HaeIII)	N° clones (%)	Secuencia más cercana BLAST	Similitud (%)	T-RFs de la muestra ambiental AL1 (HaeIII)
<i>Acidithiobacillus</i> (100%)	LMi_a63	221/321	48 (51)	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	99	
<i>Thiomonas</i> (100%)	LMi_b12	214	16 (17)	<i>Thiomonas intermedia</i>	99	
<i>Alicyclobacillus</i> (100%)	LMi_c3	246	6 (8)	<i>Alicyclobacillus ferrooxydans</i>	99	
<i>Acidithiobacillus</i> (76%)	LMi_g54	253	1 (1)	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	90	
<i>Sulfobacillus</i> (100%)	LMi_J22	131	1 (1)	<i>Sulfobacillus thermotolerans</i>	99	131, 212, 214, 221, 232, 252, 255, 319, 321
<i>Acidiphilium</i> (100%)	LMi_e26		2 (2)	<i>Acidiphilium cryptum</i>	99	
<i>Alicyclobacillaceae</i> (44%)	LMi_f34		2 (2)	<i>Alicyclobacillus ferrooxydans</i>	88	
<i>Erythrobacter</i> (100%)	LMi_h39		1 (1)	<i>Erythrobacter vulgaris</i>	99	
<i>Thermohydrogenium</i> (85)	LMi_I 58		3 (3)	<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes</i>	93	

La tabla 2.10 muestra la longitud de los fragmentos terminales de restricción (T-RF) obtenidos con la enzima HaeIII para los clones de la biblioteca de ARNr 16S (tercer columna) y en la última columna los correspondientes a la muestra ambiental LMi (Figura 2.21 B). Con esta información es posible asignar una identidad a algunos de los T-RFs obtenidos en las muestras ambientales LMi, B9-3 y B9-2, B9-1, LMa1 y AL2. Se toma un error de  $\pm 2$  nucleótidos para asignar una identidad a los T-RFs. En la muestra LMi, el T-RF correspondiente a 221 nucleótidos (nt) representa el 54% del total de la comunidad y coincide con los T-RFs encontrados para los clones identificados como *Acidithiobacillus caldus*. Esta información coincide con la que se muestra en la figura 2.24, en donde *At. caldus* representa la mayoría de los clones secuenciados. Este T-RF también está presente en la muestra AL1, AL2, LMa1, LMa2, B9-2 y B9 Lag pero en menor abundancia relativa (figuras 2.21 A y B). La longitud de los T-RFs de los clones identificados como *Sulfobacillus* (131 nt), *Acidiphilium* (232 nt) y *At. ferrooxidans* (252 nt) fue similar a aquellos que presentaron menor abundancia relativa en la muestra LMi. Estos mismos fragmentos se encontraron en los perfiles de T-RFLP de las demás muestras con algunas diferencias en cuanto a su abundancia relativa. Por ejemplo, *At. ferrooxidans* estaba presente en una elevada abundancia relativa (entre el 50-60%) en las muestras AL2 y B9-3, seguido de un 30-35% en las muestras AL1, LMa2, LMi y B9Lag. En el caso de la muestra LMi, el clon identificado con 252 nt se clasificó dentro del género *Acidithiobacillus* con solo un 76%, lo que impide indicar su especie. En las muestras restantes se encontró aun en menor proporción (figuras 2.21 A y B). Por otro lado, *Acidiphilium* sólo pudo ser detectado en la muestra LMi y *Sulfobacillus* sp. se encontró en baja abundancia relativa en las muestras LMi, B9-3, LMa1 y AL2.

Los clones asignados como *Thiomonas* mostraron un valor de T-RF (214) similar al obtenido en la muestra original LMi, representando 11% de la abundancia relativa. Si bien los métodos basados en PCR no son cuantitativos, los resultados son compatibles a los encontrados en la figura 2.24 en donde se observan las mismas especies dominantes. Sin embargo, algunos clones no tuvieron una correlación con ningún T-RF en la muestra ambiental y corresponden a aquellos asignados en los géneros *Alicyclobacillus*, *Erythrobacter* y *Thermoanaerobacterium*.

Los resultados obtenidos anteriormente (T-RFLP y clonación y secuenciación del gen ARNr 16S) demuestran la importancia de la complementación de ambas metodologías en la identificación de microorganismos en comunidades complejas como las encontradas en los sedimentos anaerobios del volcán Copahue.

## **II.5.2. Consorcios de MSR**

### **II.5.2.1. Metodología**

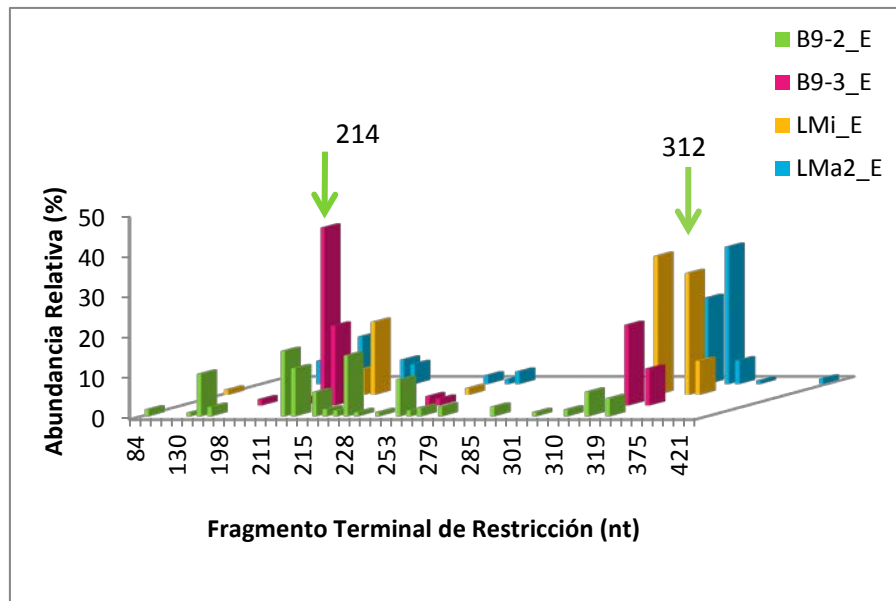
Del mismo modo que para las muestras ambientales, se emplearon la técnica de T-RFLP y la clonación y secuenciación del gen de ARNr 16S para el análisis de la diversidad microbiana de los consorcios de MSR acidófilos. Los consorcios de MSR a pH neutro sólo se analizaron a través de la clonación y secuenciación del gen de ARNr 16S, ya que no se tuvo acceso a la técnica de T-RFLP cuando se lograron aislar estos consorcios.

La extracción de ADN de todas las muestras de enriquecimientos que habían presentado actividad sulfato-reductora positiva se realizó mediante el kit Ultra – Clean™ Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, USA). Luego se amplificó el gen 16S rARN mediante PCR con cebadores específicos para bacterias (27F Cy5-marcado y 1387R sin marcar) y arqueas (20F Cy5 marcado y 915R sin marcar). Los productos de PCR fueron purificados y luego digeridos con la enzima de restricción HaeIII. El tamaño de los fragmentos terminales de restricción (T-RFs) obtenidos y la asignación de una identidad a cada uno fue determinado de la misma manera que en la sección II.5.1.1.

Se realizó además la clonación y secuenciación del gen de ARNr 16S, para lo cual el ADN previamente extraído de las muestras se amplificó utilizando los primers universales para bacterias 27F y 1387R y arqueas 20F y 915R. Las bibliotecas del gen de ARNr 16S se realizaron como se describió en la sección II.5.1.1. Las secuencias de los genes de ARNr 16S de los clones obtenidos fueron ensambladas utilizando los programas preGap y Gap 4 (Staden Package) y luego comparadas con la base de datos pública del NCBI. Se construyó un árbol filogenético utilizando el software MEGA empleando diferentes filtros.

### II.5.2.2. Consorcios acidófilos de MSR. Resultados y discusión

La figura 2.26 muestra los perfiles de T-RFLP obtenidos para los consorcios acidófilos de MSR con los cebadores específicos para bacterias. Las amplificaciones realizadas con cebadores de arqueas no resultaron positivas. Quizás se deba a que las arqueas con capacidad sulfato reductoras encontradas hasta el momento crecen a una temperatura superior a las ensayadas en estos enriquecimientos.



**Figura 2.26.**Perfiles de T-RFLP de las comunidades acidófilas de MSR obtenidas en las muestras de Copahue

En todos los enriquecimientos analizados se observó la presencia de dos T-RF con alta abundancia relativa, correspondientes a  $212 \pm 2$  y  $311 \pm 2$  nucleótidos. Los mismos fueron identificados en la *base de datos de BART* y corresponden a "*Desulfobacillus acidavidus* (CL4). Esta bacteria fue aislada e identificada previamente por Rowe y col., (2007) en sedimentos de una mina de cobre abandonada en Huelva, España. En ese trabajo el aislado CL4 presento 91% de similitud de secuencia de ARNr 16S con *Desulfitobacterium hafniense* utilizando herramienta BLAST. Debido a este bajo porcentaje de similitud, es que los autores consideran que este aislado podría pertenecer a un nuevo género que se propone como "*Desulfobacillus (Dsb.)*" y así será mencionado a lo largo de este trabajo. Sin embargo, este nuevo género de bacterias

sulfato-reductoras aún no ha sido establecido como tal, y es por esto que a las bacterias aisladas que presentan similitud de secuencia con la cepa CL4 se los denomina "*Peptococcaceae bacterium*", ya que si se utiliza por ejemplo la herramienta RDP Classifier las secuencias se agrupan con un 100% de confianza dentro de la familia *Peptococcaceae* que pertenece al filo *Firmicutes*, pero los porcentajes de confianza dentro de la clasificación de género son mucho menores. En varios sedimentos anaerobios pertenecientes a drenajes ácidos de mina se han identificado y aislado bacterias que presentan 99% de similitud de secuencia de ARNr 16S con *Dsb. acidavidus* CL4, pero no se han reportado aun en ambientes volcánicos como la zona geotermal de Copahue (Falagán y col., 2014; Sánchez-Andrea y col., 2012; Sánchez-Andrea y col., 2013).

En el enriquecimiento B9-2 se observan otros T-RFs con baja abundancia relativa (4, 9 y 15 %). Los mismos corresponden a *Thermotogales like-bacterium* (319±2 nucleótidos), *At. ferrooxidans* (253±2 nucleótidos) y *At. caldus* (223±2 nucleótidos). Todos estos T-RFs fueron identificados utilizando las técnicas vistas en las secciones II.5.1.3.1 y II.5.1.3.2. En los enriquecimientos LMi y LMa2 también se identificó el T-RF de 319±2 nucleótidos. En la muestra LMi original el T-RF correspondiente a 319±2 nucleótidos se detectó en baja cantidad (figura 2.21 B) y en mayor cantidad en el correspondiente enriquecimiento anaerobio (figura 2.26). Esto último podría indicar que el crecimiento de este microorganismo es favorecido en condiciones de anaerobiosis estricta, como la vigente en los cultivos de enriquecimiento.

Debido a que todos los enriquecimientos presentaban aproximadamente la misma composición microbiana, los resultados de ahora en adelante se referirán a un único consorcio (LMa2).

En algunos repiques en el mismo medio con glicerol y a pH 3, las condiciones no fueron completamente anaeróbicas. En estos cultivos se detectó disminución de glicerol y precipitación de ZnS pero no se observó un incremento de los valores de pH. Debido a que en las muestras originales se detectó la presencia de microorganismos hierro/azufre oxidantes (sección II.5.1.3), es posible que las pequeñas cantidades de O<sub>2</sub>

y CO<sub>2</sub> disponibles y los restos de S de los sedimentos podrían favorecer el desarrollo de los mismos; la generación de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por oxidación de S evitaría la suba del pH.

En función de comprobar la eventual presencia de microorganismos azufre oxidantes, se repicaron estos cultivos, por duplicado, en un medio mínimo a pH 3,0 y con 1,0 % p/v de S elemental. Posteriormente fueron incubados en agitación a 30°C. Luego de una semana el pH de los cultivos descendió a valores entre 1,11 y 1,57 confirmando la oxidación del S. Estos cultivos también fueron sometidos a un análisis molecular.

La figura 2.27 muestra el árbol filogenético obtenido con el algoritmo Maximum Likelihood para el cultivo que se mantuvo bajo condiciones anaeróbicas (identificados con números, por ejemplo, clon 3.1) y los cultivos aerobios sobre S. Se observa que los OTUs del primero están distribuidos en sólo tres filos con amplio predominio de *Firmicutes*. Dentro de este filo, 37% de los clones secuenciados presentó 99% de similitud de secuencia del gen ARNr 16S con *Dsb. acidavidus* (Peptococcaceae bacterium CL4) y fueron agrupados dentro del mismo OTU. Este microorganismo también fue detectado por T-RFLP (figura 2.26) y se considera que es el principal responsable de la actividad sulfato-reductora del consorcio.

Un porcentaje menor de clones (clon 3.9 y 3.10) presentó 99 % de similitud de secuencia con *Alicyclobacillus tolerans*, lo que explica la posición de los clones en el árbol filogenético. Los clones 1.4 y 2.1 presentaron 91% de similitud de secuencia con *Mesoaciditoga lauensis* – clasificándose con 37% de confianza dentro del orden *Thermotogales* con la herramienta RDP Classifier- y conformando un OTU distintivo en el árbol filogenético (figura 2.27).

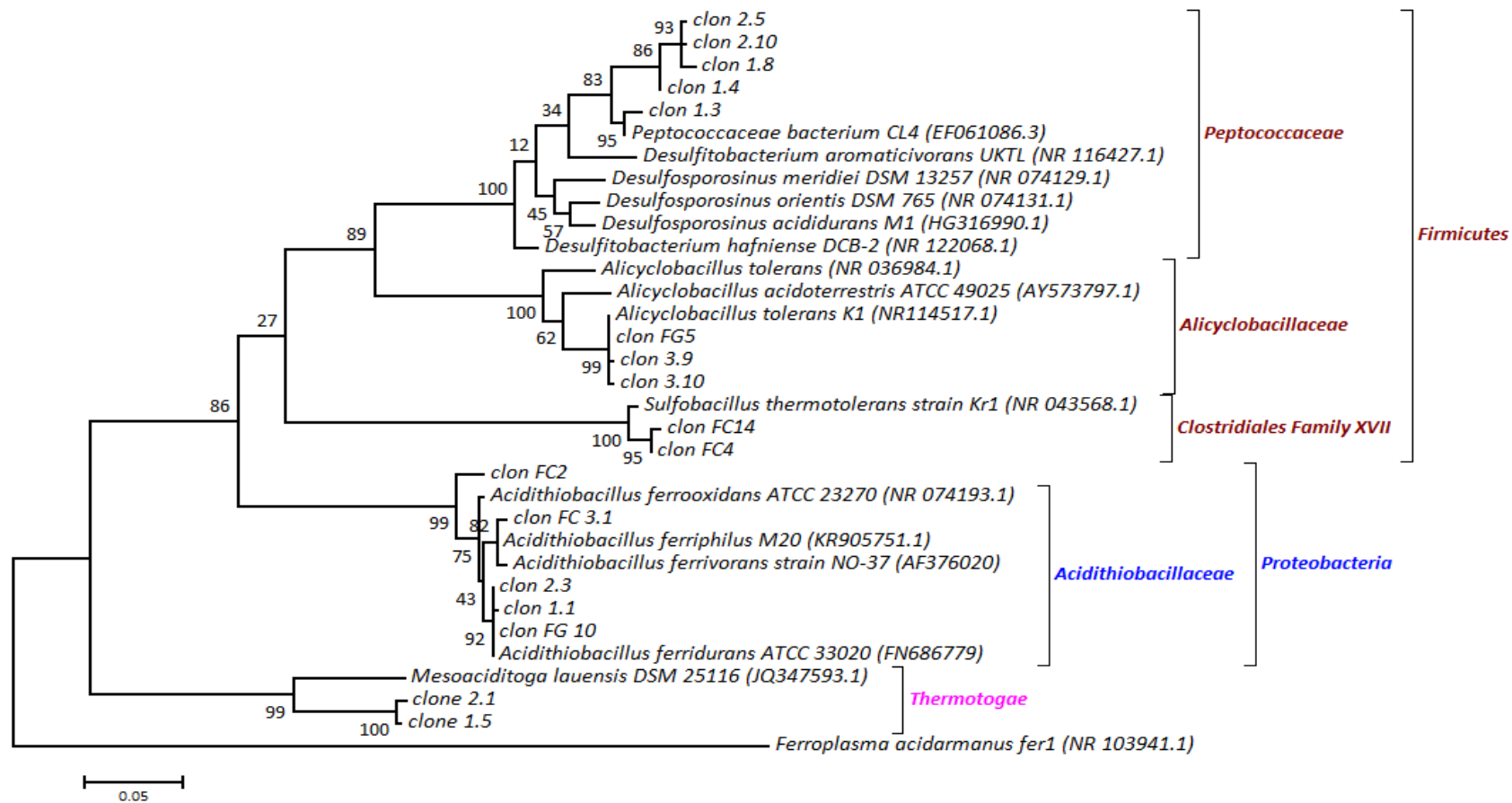
Otros clones (2.3 y 1.1) se ubicaron dentro del mismo OTU que varias especies del género *Acidithiobacillus*, en particular de *At. ferridurans*, también detectado en las muestras originales de sedimentos. Estas secuencias detectadas en Copahue son semejantes a otras obtenidas principalmente en ambientes ácidos de temperaturas moderadas y, en particular, en drenajes ácidos de mina (DAM) (Johnson y Hallberg, 2003; Hallberg y col., 2005; Hedrich y Johnson, 2013).

Los clones obtenidos a partir de los cultivos aeróbicos se agruparon con un 100% de confianza utilizando la herramienta RDP Classifier dentro del género *Alicyclobacillus* (FG10), *Sulfobacillus* (FC14 y FC4) y *Acidithiobacillus* (FG10 y FC3.1). En el árbol filogenético (figura 2.27) se puede observar que todos los clones se ubican en el mismo OTU que especies cultivadas de los géneros correspondientes: *Alicyclobacillus tolerans*, *Sulfobacillus thermotolerans*, *At. ferridurans* y *At. ferriphilus*. La presencia de estos microorganismos se debe a que todos ellos estaban presentes en las muestras originales y a que, en principio, son capaces de desarrollarse y/o resistir condiciones de anaerobiosis. De hecho, los géneros *Sulfobacillus* y *Alicyclobacillus* son capaces de crecer en anaerobiosis utilizando Fe(III) como aceptor de los electrones (Johnson y col., 2008; Karavaiko y col., 2005; Lu y col., 2010). *At. ferridurans* es un quimiolitótrofo obligado, acidófilo y mesófilo, que se ha encontrado en DAM y en ambientes volcánicos y que es capaz de desarrollarse en condiciones de anaerobiosis utilizando Fe(III) como aceptor de electrones y S, H<sub>2</sub> y S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup> como dadores de electrones (Falagán y Johnson, 2016; Hedrich y Johnson, 2013).

**Tabla 2.11.** Clasificación filogenética de los clones de bacteria encontrados en la muestra de enriquecimiento analizados según RDP. Se muestra la secuencia más cercana según BLAST.

<b>Clasificación Filogenética a nivel de género RDP (%)</b>	<b>Nombre Clon</b>	<b>Secuencia más cercana (BLAST)</b>	<b>N° de acceso</b>	<b>Similitud (%)</b>
<i>Peptococcaceae (100%)</i>	Clon 2.10	<i>Peptococcaceae bacterium CL4</i>	EF061086.3	99
<i>Peptococcaceae (100%)</i>	Clon 1.8	<i>Peptococcaceae bacterium CL4</i>	EF061086.3	99
<i>Peptococcaceae (86%)</i>	Clon 1.3	<i>Peptococcaceae bacterium CL4</i>	EF061086.3	99
<i>Alicyclobacillus (100%)</i>	Clon 3.9	<i>Alicyclobacillus tolerans</i>	NR114203.1	99
<i>Alicyclobacillus (100%)</i>	Clon 3.10	<i>Alicyclobacillus tolerans</i>	NR114517.1	99
<i>Acidithiobacillus (100%)</i>	Clon 2.3	<i>Acidithiobacillus ferridurans ATCC 33020</i>	FN686779	99
<i>Acidithiobacillus (100%)</i>	Clon 1.1	<i>Acidithiobacillus ferridurans ATCC 33020</i>	FN686779	99
<i>Thermotogales (39%)</i>	Clon 2.1	<i>Mesoaciditoga lauensis</i>	NR125611.1	91
<i>Thermotogales (37%)</i>	Clon 1.5	<i>Mesoaciditoga lauensis</i>	NR125611.1	91
<i>Alicyclobacillus (100%)</i>	Clon FG_5	<i>Alicyclobacillus tolerans</i>	NR114517.1	99
<i>Acidithiobacillus (100%)</i>	Clon FG_10	<i>Acidithiobacillus ferridurans ATCC 33020</i>	FN686779	99
<i>Sulfobacillus (100%)</i>	Clon FC_14	<i>Sulfobacillus thermotolerans</i>	JX966410.1	99
<i>Sulfobacillus (100%)</i>	Clon FC_4	<i>Sulfobacillus thermotolerans</i>	JX966410.1	98
<i>Acidithiobacillus (100%)</i>	Clon FC_3.1	<i>Acidithiobacillus ferriphilus M20</i>	KR905751.1	99





**Figura 2.27.** Árbol filogenético obtenido para el enriquecimiento E1 y los cultivos aerobios a partir de E1. Los porcentajes en los nodos indican el peso de esta topología sobre 500 réplicas (*bootstrap*). Las llaves de la derecha engloban filo, clase y familia. La barra indica 0,05 de divergencia filogenética (número de mutaciones fijas por nucleótido). *Ferropasma acidarmanus* NR103941.1 se utilizó como referencia

### II.5.2.3. Consorcios de MSR a pH neutro. Resultados y discusión

Los consorcios de MSR a pH neutro obtenidos en la sección II.4.1 (LMi, LMa2, AL1 y SAp), fueron analizados utilizando la técnica de clonación y secuenciación del gen de ARNr 16S.

La tabla 2.12 muestra los clones de bacterias de los consorcios obtenidos a pH neutro ordenados filogenéticamente según la herramienta Classifier de Ribosomal Database Project (RDP). Las amplificaciones con los cebadores de arqueas no resultaron positivos. La figura 2.28 muestra el árbol filogenético obtenido con el programa MEGA aplicando Maximum-Likelihood como método estadístico y el modelo de Jukes-Cantor. Los enriquecimientos AL1 y LMa2 presentaron la misma composición de bacterias. La mayoría de los clones se agruparon con 100% de confianza dentro del género *Desulfotomaculum* y se ubican dentro del mismo OTU que especies cultivadas (figura 2.28). Los miembros de este género, fueron aislados de una gran variedad de ambientes como volcánicos, reactores anaerobios, vertederos de desechos y recientemente se han reportado en sedimentos anaerobios ácidos. La mayoría de las especies aisladas hasta el momento se desarrollan a valores de pH elevados (6-8) y a temperaturas entre 40 y 60°C (Haouari y col., 2008; Jabari y col., 2013; Kaksonen y col., 2006 b; Krishnamurthi y col., 2013; Plugge y col., 2002; Sánchez-Andrea y col., 2013; Watanabe y col., 2013).

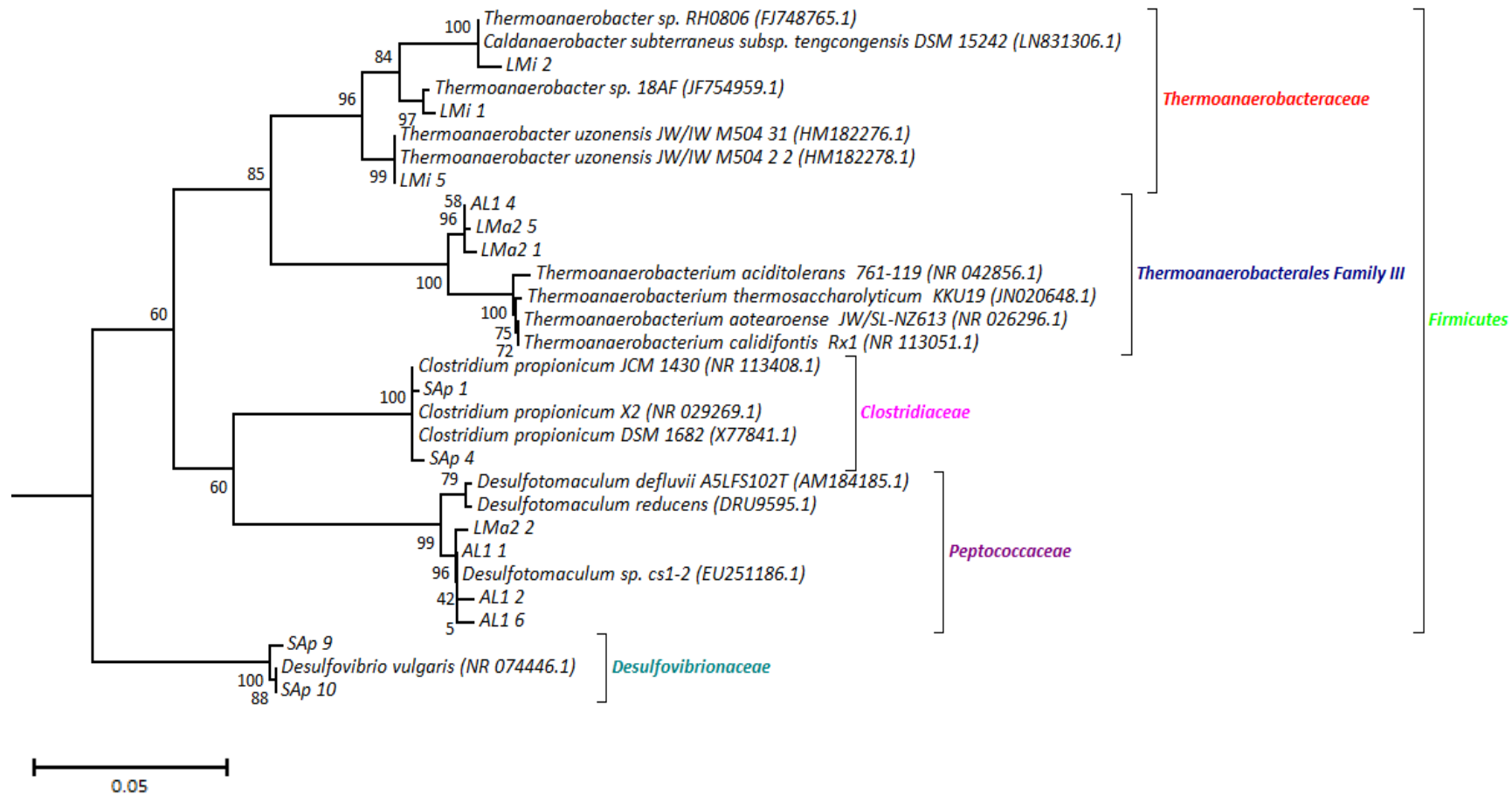
Las secuencias restantes de los consorcios AL1 y LMa2 sólo pudieron ser clasificadas con un 72% de confianza dentro del género *Thermoanaerobacterium* y los porcentajes de similitud de secuencia de ARNr 16S se ubicaron alrededor del 94% con especies cultivables de este género como *Thermoanaerobacterium aotearoense* y *Thermoanaerobacterium aciditolerans*. Este bajo porcentaje de similitud explica la posición de los clones en el árbol filogenético, ubicándose en un OTU distintivo por lo que podría tratarse de una nueva especie dentro del género *Thermoanaerobacterium*. Las especies mencionadas fueron aisladas previamente de ambientes geotermales ácidos y son anaerobios obligados, acidófilos moderados (pH óptimo 5,2 y 5,7) y termófilos (temperatura óptima 55 y 60°C) que pueden fermentar tanto azúcares simples como complejos, extracto de levadura y algunos polímeros. No utilizan ácidos

orgánicos como dadores de electrones. Pueden reducir  $S_2O_3^{2-}$  a S elemental (*Thermoanaerobacterium aciditolerans*, además, reduce  $SO_3^{2-}$  a  $S^{2-}$ ) pero no reducen  $SO_4^{2-}$  (Kublanov y col., 2007; Liu y col., 1996).

Los parámetros fisicoquímicos determinados in situ para las muestras AL1 y LMa2 fueron similares (ver tabla 2.1) y además fueron cultivadas en las mismas condiciones (pH 7,0 y temperatura de 40°C), por lo que es de esperar un consorcio similar y con un comportamiento semejante en la reducción de sulfatos (sección II.4.1). Por otro lado, según las características de los microorganismos encontrados se puede concluir que el microorganismo responsable de la reducción de sulfato está relacionado con el género *Desulfotomaculum*; aquellos relacionados con *Thermoanaerobacterium* podrían encontrarse en menor proporción debido a que las condiciones de cultivo no son las óptimas para este tipo de microorganismo.

El enriquecimiento LMi en cambio, presentó una composición de bacterias diferente a AL1 y LMa2. La muestra a partir de la cual se realizó el enriquecimiento presentaba una temperatura mayor que las otras (ver tabla 2.1) y, consecuentemente, también la temperatura de cultivo fue diferente, con lo cual es consecuente la obtención de una comunidad microbiana diferente. Algunos clones se agruparon dentro del género *Caldanaerobacter* con 100% de confianza, mientras que sólo uno lo hizo dentro del género *Thermoanaerobacter*. Los clones fueron agrupados en el mismo OTU que *Caldanaerobacter subterraneus* DSM 13054 y otros en el mismo que *Thermoanerobacter uzonensis* JW/IW\_M504\_2\_2 (figura 2.28).

El enriquecimiento realizado a 30°C a partir de la muestra SAp presento también una composición de bacterias diferentes a los enriquecimientos posteriores. Algunos clones se agruparon con 100% de confianza dentro del género *Desulfovibrio* y fueron agrupados en el mismo OTU que *Desulfovibrio vulgaris*. El resto de los clones encontrados se agrupó en el mismo OTU que especies del género *Clostridium*. Las especies del género *Desulfovibrio* son los MSR más estudiados y tienen la capacidad de desarrollarse a 30°C en cultivos puros utilizando lactato o piruvato como fuente de carbono y energía (López-Pérez y col., 2014; Price y col., 2014; Postgate y Campbell, 1966).



**Figura 2.28.**Árbol filogenético obtenido para los enriquecimientos a pH neutro. Los porcentajes en los nodos indican el peso de esta topología sobre 500 réplicas (*bootstrap*). Las llaves de la derecha engloban filo y familia. La barra indica 0,05 de divergencia filogenética (número de mutaciones fijas por nucleótido). *Metallosphaera sedula* U38361.1 se utilizó como referencia (no se muestra)

**Tabla 2.12.** Clasificación filogenética de los clones de bacteria encontrados en los enriquecimientos AL1, LMa2, LMi y SAP analizados según RDP. Además se muestran la secuencia más cercana según BLAST.

<b>Clasificación Filogenética a nivel de género/familia RDP (%)</b>	<b>Nombre Clon</b>	<b>Secuencia más cercana (BLAST)</b>	<b>N° de acceso</b>	<b>Similitud (%)</b>
<i>Desulfotomaculum</i> (100%)	AL1_1	<i>Desulfotomaculum reducens</i>	DRU95951	99
<i>Desulfotomaculum</i> (100%)	AL1_2	<i>Desulfotomaculum reducens</i>	DRU95951	99
<i>Thermoanaerobacterium</i> (72%)	AL1_4	<i>Thermoanaerobacterium aotearoense</i>	NR_026296.1	94
<i>Desulfotomaculum</i> (100%)	AL1_6	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	AY742958.1	94
<i>Thermoanaerobacterium</i> (72%)	LMa2_1	<i>Thermoanaerobacterium aotearoense</i>	NR_026296.1	94
<i>Desulfotomaculum</i> (100%)	LMa2_2	<i>Desulfotomaculum reducens</i>	DRU95951	97
<i>Thermoanaerobacterium</i> (72%)	LMa2_5	<i>Thermoanaerobacterium aciditolerans</i>	NR_042856.1	94
<i>Caldanaerobacter</i> (100%)	LMi_1	<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	JF754959.1	98
<i>Caldanaerobacter</i> (100%)	LMi_2	<i>Caldanaerobacter subterraneus</i> DSM 13054	NR_117593.1	98
<i>Thermoanaerobacter</i> (100%)	LMi_5	<i>Thermoanaerobacter uzonensis</i> JW/IW_M504_2_2	HM182278.1	99
<i>Lachnospiraceae</i> (100%)	SAP_1	<i>[Clostridium] propionicum</i> X2	NR_029269.1	99
<i>Lachnospiraceae</i> (100%)	SAP_4	<i>[Clostridium] propionicum</i> X2	NR_029269.1	99
<i>Desulfovibrio</i> (100%)	SAP_9	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	NR_074446.1	98
<i>Desulfovibrio</i> (100%)	SAP_10	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	NR_074446.1	98

**II.6. POSIBLES MODELOS GEOMICROBIOLOGICOS**

A partir de los resultados sobre la biodiversidad encontrada en los sedimentos, es posible sugerir modelos geomicrobiológicos en torno a los ciclos de S, Fe y C en los pozos analizados; se consideró AL1 como representativo de sectores de temperatura moderada y LMi como representativo de los de mayor temperatura. Como criterio se adoptó que especies cercanas son aquellas con 90% de similitud a nivel de género obtenida con la herramienta RDP. Algunos de los microorganismos detectados molecularmente se encuentran por fuera del rango establecido, por lo que no se puede obtener gran información de los metabolismos a partir de ellos.

En una primera aproximación se observa que en ambas muestras existe una mayor cantidad de microorganismos capaces de metabolizar S que Fe -teniendo en cuenta aquellos microorganismos que pueden realizar ambos metabolismos-, tanto en las zonas aeróbicas como anaeróbicas. Esto se relaciona directamente con el elevado contenido de S de este ambiente en sus distintos estados de oxidación. En las muestras de temperatura elevada existe predominio de arqueas termófilas (Urbieta, 2013).

En el esquema de la figura 2.29 se muestran los ciclos del S (color rosa), Fe (color naranja) y C (color verde) en la muestra AL1.

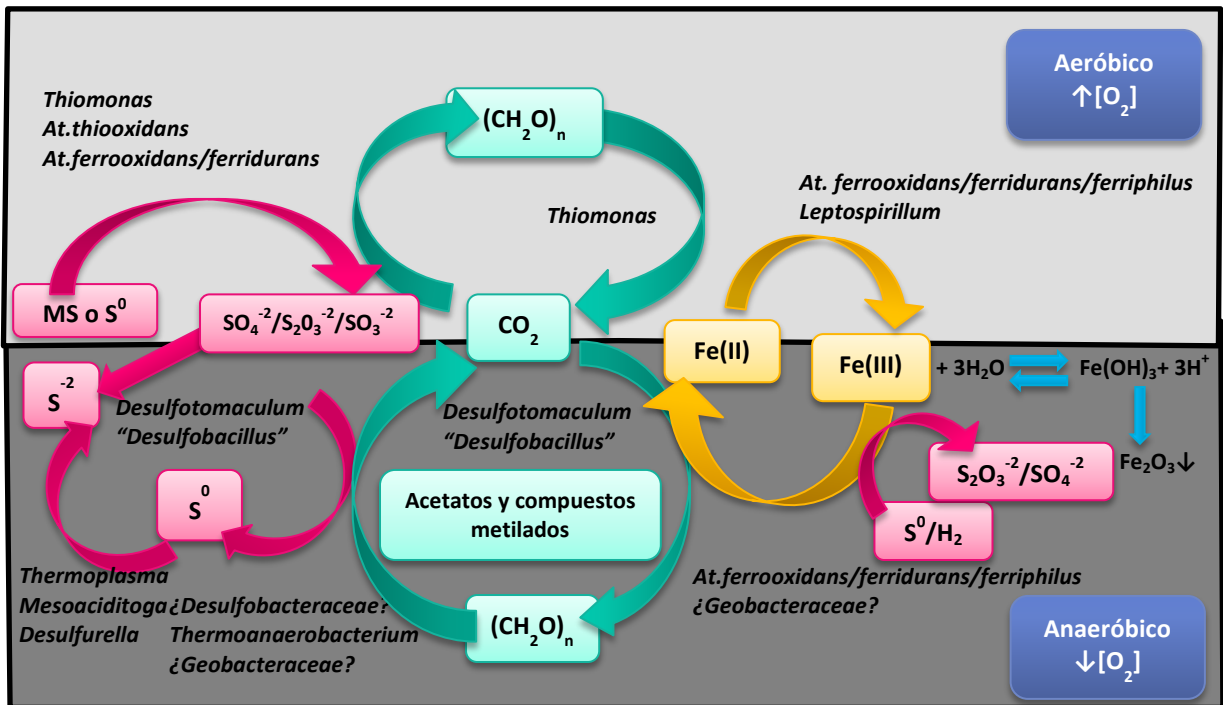


Figura 2.29. Ciclos geomicrobiológicos del S, Fe y C en la muestra AL1 (40°C)

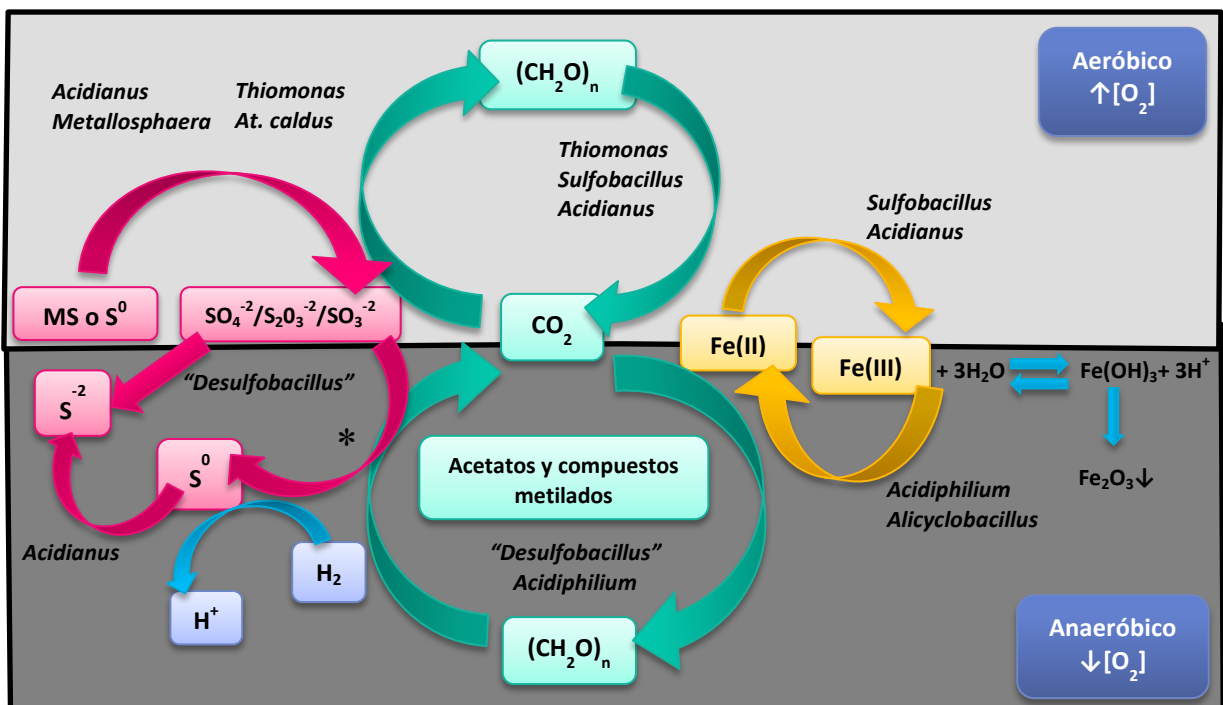


Figura 2.30. Ciclos geomicrobiológicos del S, Fe y C en la muestra LMi (90°C)

\* *Thermoanaerobacter*

Se observa que, en condiciones anóxicas, la reducción de  $SO_4^{-2}$  a  $S^{-2}$  en la muestra AL1 es llevada a cabo exclusivamente por MSR como *Desulfotomaculum* y *Desulfobacillus*, obtenidos en enriquecimientos a partir de esta muestra. Si bien los

miembros de la familia *Desulfobacteraceae* son capaces de realizar el mismo metabolismo, se obtuvieron en muy bajo porcentaje de clones en RDP. En la muestra LMi este metabolismo es realizado exclusivamente por *Desulfobacillus* ya que la formación de esporas le permite sobrevivir en un ambiente de elevada temperatura. No se encontraron clones relacionados a la familia *Desulfobacteraceae* probablemente debido a la elevada temperatura de esta muestra. El sulfuro generado precipita con los metales presentes, principalmente Fe(II) como se discutió en la sección II.3.2. Otras formas oxidadas de S (como  $S_2O_3^{-2}$  y  $SO_3^{-2}$ ) que podrían estar presentes en la muestra AL1, son reducidas a S exclusivamente por los microorganismos del género *Thermoanaerobacterium* obtenidos en los enriquecimientos neutrófilos AL1 y LMa2 (Shang y col., 2013). En la muestra LMi los compuestos de S oxidados son reducidos a  $S^0$  por *Thermoanaerobacter* (Lee y col., 2007) Todos estos microorganismos son heterótrofos por lo que contribuyen al ciclo del C.

En la muestra AL1, S es reducido a  $S^{-2}$  por bacterias anaerobias estrictas del género *Mesoaciditoga* y arqueas anaerobias facultativas del género *Thermoplasma*. Algunos clones se agruparon con bajos porcentajes con la herramienta RDP dentro de la familia *Geobacteraceae*. Si bien los microorganismos pertenecientes a esta familia, como *Desulfuromonas*, son capaces de reducir el  $S^0$  a  $S^{-2}$  en condiciones de anaerobiosis, sus metabolismos no pueden ser asegurados (Holmes y col., 2002; An y Picardal, 2015). En la muestra LMi, en cambio, este metabolismo sea probablemente llevado a cabo casi exclusivamente por arqueas termófilas del género *Acidianus*. La fuente de energía de las arqueas que respiran S puede ser  $H_2$ , pero frecuentemente utilizan glucosa y pequeños péptidos. Las bacterias por lo general son heterótrofas y utilizan compuestos orgánicos simples como etanol, lactato y acetato, por lo que también contribuyen al ciclo del C (Ehrlich, 2002 a).

En la columna de agua de la muestra AL1, donde la concentración de  $O_2$  es mayor, se encuentran los microorganismos capaces de oxidar los compuestos reducidos de S a  $SO_4^{-2}$  y que pertenecen al género *Thiomonas* y a las especies *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans/ferridurans*. En la muestra LMi, a diferencia de AL1, se encontraron clones con un alto porcentaje en RDP con *Acidithiobacillus caldus* el cual es capaz de realizar la oxidación de S a mayores



temperaturas. Los mismos representan el 52% de los clones en la muestra LMi por lo que se puede sugerir que estas bacterias junto con las arqueas de los géneros *Acidianus* y *Metallosphaera* –que representan el 7 y 29% de abundancia según los resultados de T-RFLP-, realizan la oxidación de S en condiciones aeróbicas. Todas las especies que oxidan S aeróbicamente son autótrofas por lo que realizan la fijación del CO<sub>2</sub> para formar biomasa. Las especies de los géneros *Thiomonas* y *Acidianus* tienen también la capacidad de crecer en forma heterótrofa. Ambos metabolismos contribuyen al ciclo del C.

En la figura 2.29 y 2.30 se encuentra representado en color naranja el ciclo del Fe en la muestra AL1 y LMi respectivamente. Como ya se ha anticipado una menor diversidad de microorganismos participan en este ciclo en ambas muestras y lo hacen tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. En la muestra AL1 los microorganismos que reducen el Fe(III) a Fe(II) en condiciones de anaerobiosis completa o facultativa son las especies *Acidithiobacillus ferrooxidans/ferridurans/ferriphilus* y obtienen energía a partir de la oxidación de S<sup>0</sup> a S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-2</sup> o SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>. También pueden utilizar H<sub>2</sub> como fuente de energía, aunque este tipo de metabolismo podría estar inhibido por el elevado contenido de S del ambiente. Por otro lado, estos microorganismos son autótrofos por lo que también fijan el CO<sub>2</sub> en condiciones de anaerobiosis (Ohmura y col., 2002; Hedrich y Johnson 2013; Falagán y Johnson, 2014). Los microorganismos que pertenecen a la familia *Geobacteraceae* como *Desulfouromonas* y *Geobacter* también son capaces de utilizar el Fe(III) como aceptor de electrones en la respiración anaeróbica. No obstante, sus metabolismos no pueden ser asegurados por la razón expuesta anteriormente para el caso del ciclo del S.

La oxidación del Fe(II) a Fe(III) en la zona aerobia en la muestra AL1 es llevada a cabo por especies los géneros *Leptospirillum* y *Acidithiobacillus* que a su vez son autótrofos y contribuyen al ciclo del C.

Hay aún menos microorganismos participando del ciclo del Fe en la muestra LMi. En condiciones de anaerobiosis el Fe(III) es reducido a Fe(II) por bacterias del género *Acidiphilium* y *Alicyclobacillus*, ya que una sola especie del género *Sulfobacillus* fue reportada con capacidad de crecer en condiciones de anaerobiosis. La oxidación de

Fe(II), en cambio, es llevada a cabo por especies de los géneros *Acidianus* y *Sulfobacillus* (Giaveno y col., 2013; Bogdanova y col., 2006).

## II.7. CONCLUSIONES FINALES DEL CAPITULO

- Se detectó actividad sulfato reductora en muestras provenientes de diferentes zonas del campo geotermal de Caviahue-Copahue: Las Maquinas, Agua del Limón, Las Maquinitas, Baño 9 y Salto del Agrio
- Se obtuvieron consorcios de MSR a pH neutro y a distintas temperaturas (30, 40 y 65 °C) que oxidan lactato en forma incompleta generando ácido acético como producto secundario
- Se obtuvieron consorcios de MSR capaces de reducir sulfato con glicerol como dador de electrones, bajo condiciones ácidas (pH 3). Estos MSR oxidan glicerol de manera completa
- En los consorcios de MSR a pH neutro obtenidos a 40°C, el principal microorganismo sulfato reductor pertenece al género *Desulfotomaculum*; lo acompañan especies del género *Thermoanaerobacterium* que no reducen sulfato. En los consorcios obtenidos a 30°C, especies del género *Desulfovibrio* son las responsables de la reducción de sulfato acompañado por especies del género *Clostridium*
- En los consorcios de MSR acidófilos obtenidos, el principal microorganismo sulfato reductor es *Desulfobacillus acidavidus*
- En los consorcios acidófilos también se detectaron oxidantes del azufre y del hierro como *Acidithiobacillus ferridurans/ferriphilus*, *Sulfobacillus thermotolerans* y *Alicyclobacillus tolerans*
- Se propusieron modelos microgeoquímicos para los ciclos del S, Fe y C para los sedimentos de temperatura moderada y para los de alta temperatura

# Capítulo III

---

**Aislamiento y caracterización de  
microorganismos sulfato-reductores**



## *CONTENIDO*

### **III.1. INTRODUCCIÓN**

### **III.2. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS SULFATO-REDUCTORES**

- III.2.1. Técnica de la doble capa
- III.2.2. Metodología
- III.2.3. Resultados y discusión

### **III.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS**

- III.3.1. Metodología
- III.3.2. Resultados y discusión

### **III.4. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS NUEVAS ESPECIES**

- III.4.1. Caracterización morfológica
- III.4.2. Estequiometría de crecimiento
- III.4.3. Influencia del pH
- III.4.4. Influencia de la temperatura
- III.4.5. Influencia de las fuentes de carbono

### **III.5. SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DE LAS NUEVAS ESPECIES**

### **III.6. CONCLUSIONES FINALES DEL CAPÍTULO**



---

**CAPÍTULO III: Aislamiento y caracterización de microorganismos sulfato-reductores****III.1. INTRODUCCIÓN**

Uno de los objetivos más importantes de este trabajo de tesis es la obtención de microorganismos y/o consorcios de microorganismos sulfato-reductores con potencialidad de ser aplicados en biorremediación de metales en condiciones de acidez. Si bien los consorcios microbianos son más efectivos para el tratamiento de contaminaciones en general, la obtención de microorganismos puros, y especialmente si se trata de potenciales especies nuevas, permite estudiarlos con mayor profundidad para conocer las características metabólicas que definen las posibilidades de usarlos en procesos biotecnológicos de interés. Los estudios fisiológicos de microorganismos se llevan a cabo usualmente en cultivos puros donde existen menos variables que puedan interferir en el análisis.

En el capítulo anterior se obtuvieron consorcios acidófilos a partir de las muestras de Copahue y se detectó, por técnicas de biología molecular, que las mismas contenían predominantemente a la bacteria *Desulfobacillus acidavidus* CL4. Este capítulo describe las experiencias destinadas a aislar dicho microorganismo. En segundo lugar, a partir de las muestras ambientales a dos temperaturas diferentes (30 y 40°C) se intentaron aislar MSR a bajos valores de pH, para poder completar la información obtenida mediante las bibliotecas realizadas en el capítulo II. Los microorganismos aislados fueron caracterizados a nivel fisiológico analizando su crecimiento en diferentes condiciones de pH y temperatura y con diferentes compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía.

### III.2. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS SULFATO-REDUCTORES

En la sección II.4.2 del capítulo II se nombraron las principales dificultades para el aislamiento de MSR acidófilos, que obligan a la introducción de ciertas modificaciones en las técnicas de cultivo utilizadas; estas modificaciones se describirán más abajo.

#### III.2.1. Técnica de la doble capa

El agar, comúnmente utilizado como gelificante en los medios sólidos, se hidroliza en condiciones ácidas. Para evitar este proceso durante la preparación de los medios sólidos acidificados, es necesario esterilizar por separado las soluciones de agar y del medio de cultivo; las mismas se mezclan luego a una temperatura de entre 45-50°C. Durante la incubación de los medios sólidos acidificados y gelificados con agar se produce hidrólisis de los polisacáridos que lo conforman. Este proceso produce la pérdida de rigidez del medio sólido y también la acumulación de monosacáridos que resultan inhibidores del crecimiento bacteriano en condiciones ácidas (Johnson, 1995). Para solucionar el problema de la toxicidad de los compuestos orgánicos a bajo pH se han propuesto varias alternativas que incluyen el uso de silicagel, geles de poliacrilamida y agarosa. Sen y Johnson (1999) utilizaron agarosa para desarrollar un medio sólido para aislar MSR a bajos valores de pH (pH 3,5). En este caso, un microorganismo acidófilo y heterótrofo (*Acidocella* PFBC) se utiliza para remover los compuestos orgánicos de bajo peso molecular producidos por la hidrólisis ácida de la agarosa y aquellos generados por la oxidación incompleta de las fuentes de carbono y energía por los MSR (Kimura, 2005). Esta metodología es conocida como técnica de la doble capa (*overlay*). El microorganismo heterótrofo se coloca con la agarosa y el medio de cultivo en una capa fina (*underlayer*). Una vez solidificado, se agrega en la parte superior una capa más gruesa de medio de cultivo donde se siembran los microorganismos de interés (*overlay*). Utilizando este medio se han aislado exitosamente MSR acidófilos a partir de muestras de diferentes ambientes (campos geotermales y drenajes ácidos de mina) y de un biorreactor operando en condiciones ácidas (pH 2,2-2,4) (Ñancuqueo y Johnson, 2012).



### III.2.2. Metodología de aislamiento de MSR

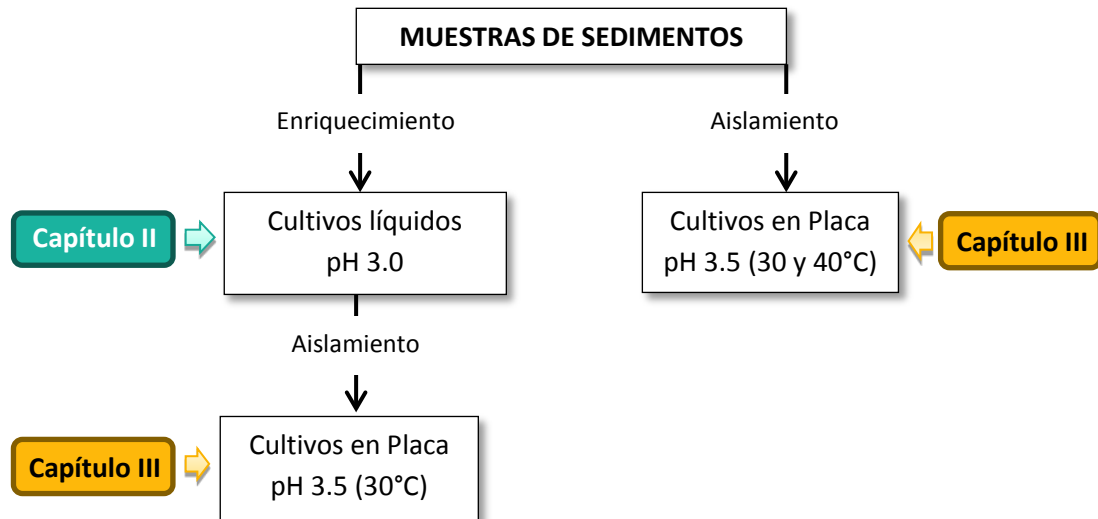
Se intentó aislar MSR en medio sólido a partir de los enriquecimientos obtenidos en la sección II.4.2 del capítulo II y también directamente desde las muestras de sedimentos (sin previo enriquecimiento).

En el caso de las muestras de sedimentos recogidas (sección II.3.1), las mismas fueron homogeneizadas y directamente sembradas en las placas conteniendo el medio de cultivo overlay, utilizando *Acidocella* PFBC como microorganismo heterótrofo. Este medio de cultivo contiene glicerol como fuente de carbono y energía, sulfato como aceptor final de los electrones y un pH de 3,5 (para más detalles, ver Anexo II). Las placas se incubaron anaeróbicamente a 30° y 40°C durante 30 días. La obtención de colonias se realizó mediante sucesivos repiques utilizando el mismo medio de cultivo, a partir de aquellas placas con crecimiento positivo.

Para aislar microorganismos de los enriquecimientos, una porción de los mismos fue sembrada en el mismo medio overlay utilizado para las muestras ambientales. Se utilizaron los enriquecimientos *B9-3*, *LMi* y *LMa2*. Estas placas se incubaron a 30°C (idéntica temperatura a la que se habían realizado los enriquecimientos) durante 15 días. Para obtener colonias aisladas se siguió el mismo procedimiento descrito para los sedimentos.

Todas las colonias aisladas fueron transferidas a un frasco conteniendo 3 mL del mismo medio de cultivo (pH 3,5) y se incubaron en anaerobiosis hasta que se observó la aparición de precipitado blanco de ZnS.

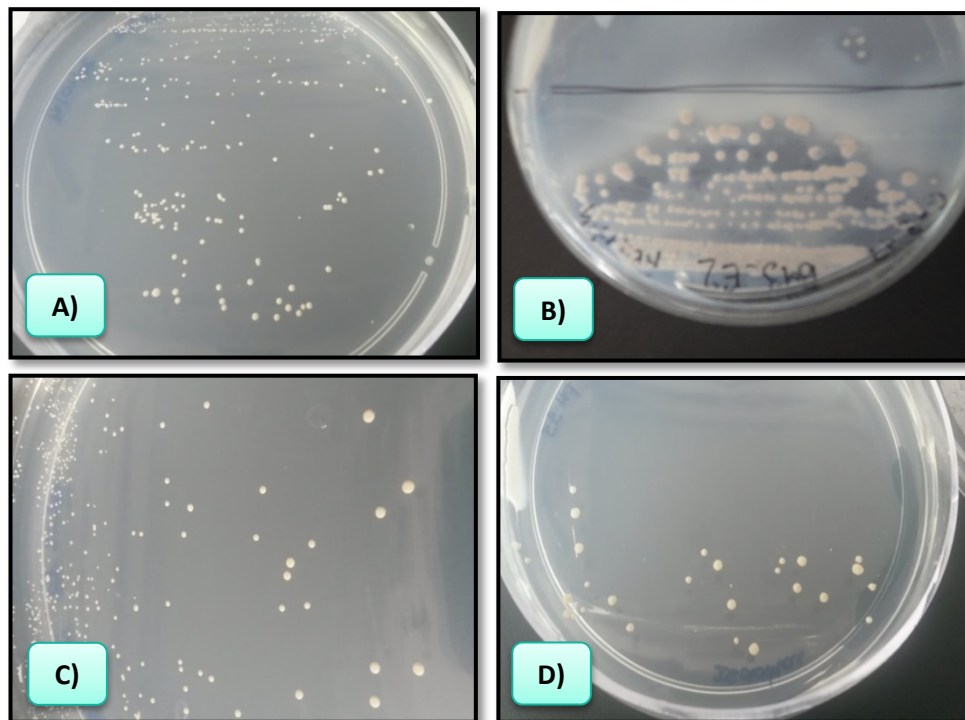
El procedimiento de enriquecimiento y aislamiento se resume en la figura siguiente.



**Figura 3.1.** Esquema de los procedimientos de enriquecimiento y aislamiento realizados con las muestras de sedimentos de Copahue.

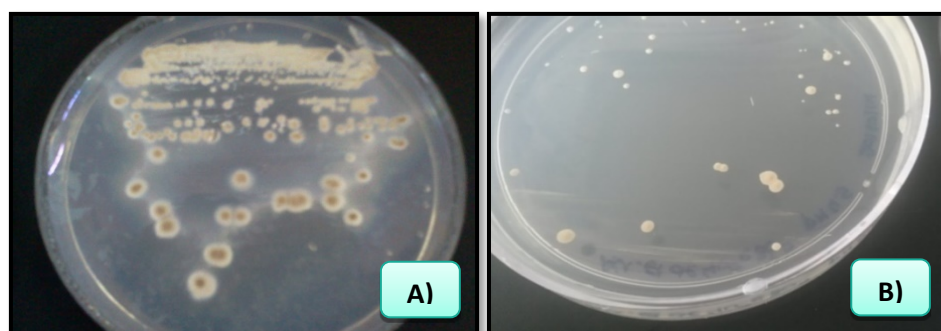
### III.2.3. Resultados y discusión

Luego de realizar varios repiques en medio sólido a partir de los enriquecimientos y de las muestras ambientales, se pudieron aislar colonias a 30°C (tabla 3.1). En este caso las colonias presentan características típicas descritas para MSR acidófilos (figura 3.2). El color blanco y la dureza característica se deben a la formación de ZnS y delatan el crecimiento microbiano. Al microscopio, estos microorganismos tenían forma de bacilo alargado con esporas terminales. La temperatura de crecimiento y las características morfológicas observadas para estos aislados coinciden con lo descrito para *Desulfobacillus acidavidus* CL4. Como ya se ha mencionado, entre las características fisiológicas de esta bacteria se pueden mencionar su capacidad de crecer en condiciones acidófilas (pH 3,6) a 30°C (Johnson y col., 2009). Su crecimiento a temperaturas mayores a 30°C aún no ha sido reportado. A diferencia de otras bacterias sulfato-reductoras acidófilas -por ejemplo *Desulfosporosinus acididurans* y *Desulfosporosinus acidiphilus* (Alazard y col., 2010; Sánchez-Andrea y col., 2014)-, *Dsb. acidavidus* CL4 oxida completamente el glicerol a CO<sub>2</sub> a expensas de la reducción de sulfato a sulfuro.



**Figura 3.2.** Imágenes de colonias obtenidas a partir de los enriquecimientos a 30°C. **A)** LMi, **B)** B9 3, **C)** LMa2, **D)** LMi

Se lograron obtener colonias aisladas a partir de las muestras ambientales luego de varios repiques en el mismo medio sólido, a 40°C (tabla 3.1). Las colonias se identifican con el nombre de la muestra ambiental de la cual provienen seguidas de una letra y un número que las identifica como colonia aislada. El color blanco y la dureza característica, por formación de ZnS, se observan para la colonia *LMa1\_f1* (figura 3.3 B). Las colonias obtenidas de la muestra AL1 (denominada *AL1\_e1*) no presentaban la morfología típica para MSR acidófilos (figura 3.3 A). Del mismo modo, las colonias de la muestra *LMa2* (denominada *LMa2\_c1*) presentaban una textura blanca/amarillenta y cremosa (no se muestran imágenes), indicando que se trata de un MSR diferente al obtenido para *LMa1* y en los enriquecimientos a 30°C. Más adelante en el texto, se analizarán estas diferencias.



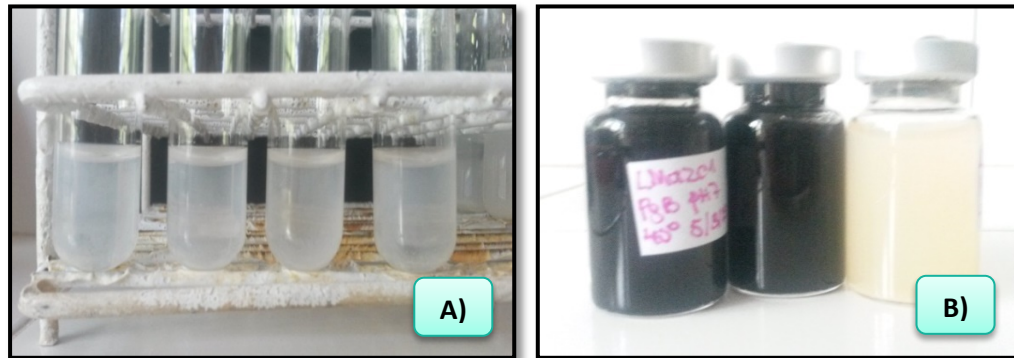
**Figura 3.3.** Imágenes de colonias de MSR obtenidas a partir de las muestras ambientales a 40 °C. Se observa una morfología diferente en la placa **A. A) AL1\_e1, B) LMa1\_f1**

**Tabla 3.1.** Colonias de MSR aisladas de las muestras de sedimentos de Copahue a 30°C y 40°C.

Lugar	Muestra	pH	T origen (°C)	T incubación °C	Colonia aislada (Nombre)
Las Máquinas	LMa1	4	74	30	--
				40	<i>LMa1_f1</i> y <i>LMa1_c1</i>
Las Máquinas	LMa2	3	38	30	<i>LMa2_E2</i>
				40	<i>LMa2_c1</i>
Las Maquinitas	LMi	5	90	30	<i>LMi_h1</i>
				40	--
Agua del Limón	AL1	2	41	30	--
				40	<i>AL1_e1</i>
Agua del Limón	AL2	2	77	30/40	--
Baño 9	B9 lag	2	44	30/40	--
Baño 9	B9 1	5	84	30/40	--
Baño 9	B9 2	5	57	30/40	--
Baño 9	B9 3	5	67	30	<i>B9-3_E2</i>
				40	--
				30/40	--
Salto del Agrio	SAp	3	24	30/40	--

Todas las colonias obtenidas fueron transferidas a medio líquido de pH 3,5 y se incubaron en anaerobiosis a la temperatura correspondiente, obteniéndose crecimiento en casi todos los casos detectado por la aparición de precipitado blanco. El único aislado que no fue capaz de desarrollarse en medio líquido a pH 3,5 fue *LMa2\_c1*

aunque se desarrolló con bajo rendimiento en biomasa, a pH 5,5. Finalmente se observó crecimiento adecuado en medio Postgate B a pH 7 (figura 3.4 B). Posteriormente, se lo mantuvo en este medio para realizar los ensayos posteriores de caracterización fisiológica.



**Figura 3.4.** Crecimiento de los aislados, **A)** AL1\_e1, **B)** LMa2\_c1

### III.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS

#### III.3.1. Metodología

Los microorganismos obtenidos a partir de las colonias aisladas en las placas inoculadas con las muestras ambientales y con los enriquecimientos, se analizaron mediante T-RFLP y se identificaron mediante la secuenciación del gen 16S rARN y posterior análisis de las mismas con la base de datos BLAST y la herramienta RDP Classifier.

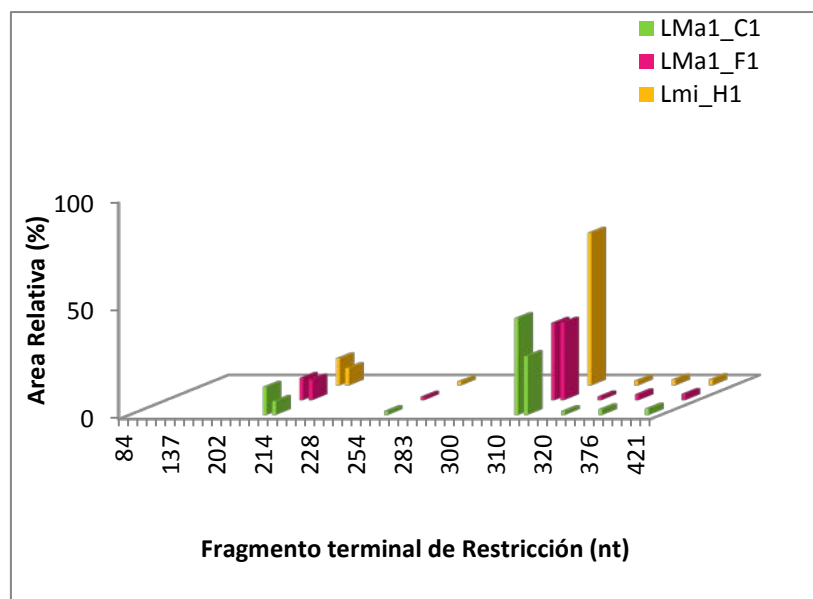
Para realizar el análisis por T-RFLP y la posterior secuenciación del gen ARNr 16S se realizó la extracción de ADN de las colonias obtenidas. Para ello, cada colonia aislada se resuspendió en 20  $\mu$ l de buffer de lisis (0,05 M NaOH y 0,25% SDS) y se mantuvo a 90°C durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido luego de centrifugar, conteniendo el ADN bacteriano, se utilizó como molde para la reacción de PCR. El análisis por T-RFLP se realizó de la misma manera que en el capítulo II pero utilizando

solo la enzima HaeIII debido a que se trata de un microorganismo puro. Más detalles sobre los protocolos utilizados pueden encontrarse en el Anexo III.

Las secuencias del gen de ARNr 16S obtenidas fueron ensambladas utilizando el programa preGap y Gap4 y comparadas con la base de datos BLAST para confirmar la identidad de las mismas. Se construyeron árboles filogenéticos utilizando el programa MEGA.

### III.3.2. Resultados y discusión

La figura 3.5 muestra los fragmentos terminales de restricción que se obtuvieron con la enzima HaeIII del ADN de las colonias crecidas a 30°C, a partir de la muestra original y de los enriquecimientos acidófilos.

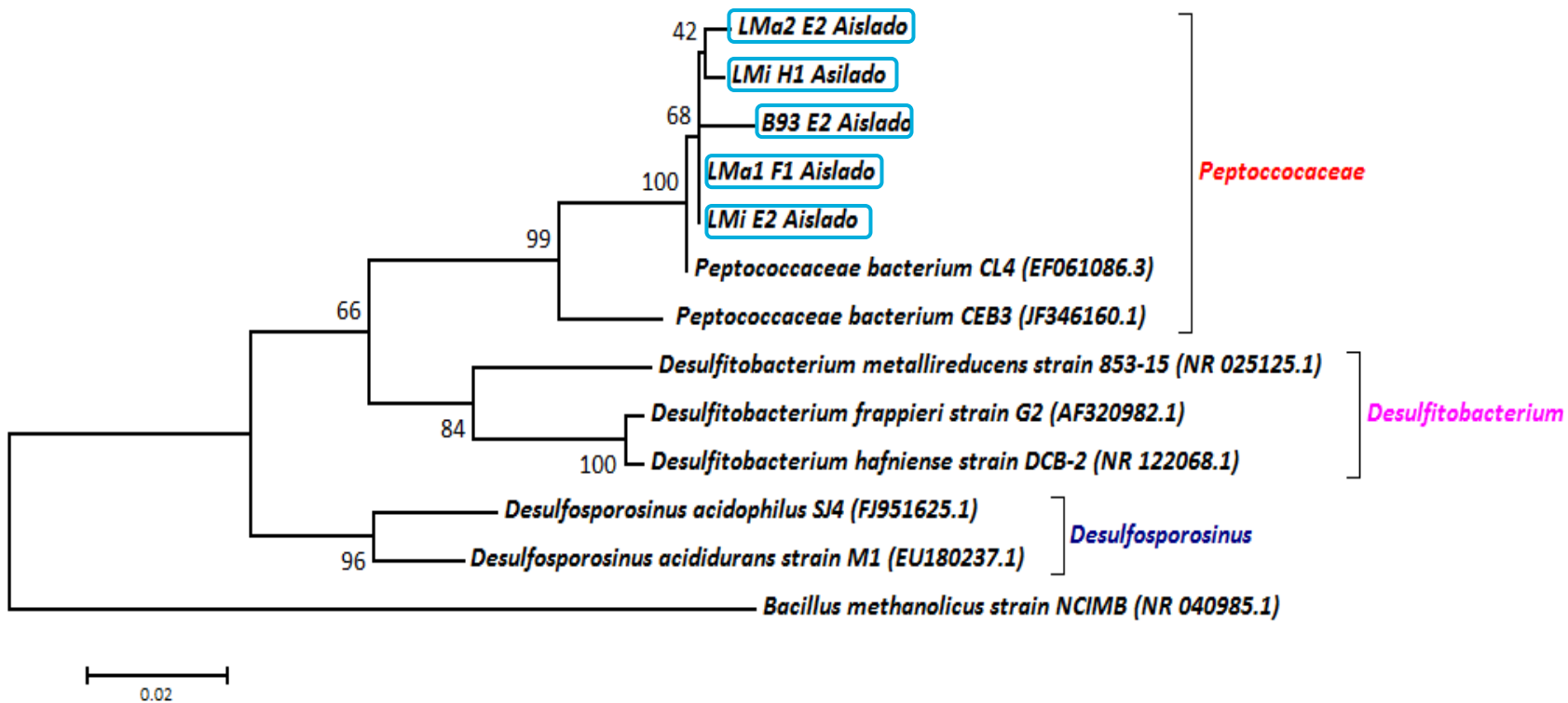


**Figura 3.5.** Perfiles de T-RFLP obtenidos con la enzima Hae III para los aislados a 30°C. Los picos 214 y 312 corresponden a *Dsb. acidavidus* (CL4).

Los fragmentos terminales de restricción que se obtuvieron para todos los aislados a 30°C coincidieron con *Desulfobacillus (Dsb.) acidavidus* CL4. *Dsb. acidavidus* tiene dos copias diferentes del gen de ARNr 16S, que se corresponden con los dos fragmentos terminales de restricción obtenidos ( $212 \pm 2$  y  $311 \pm 2$ ). El fragmento

primario es el que se encuentra en mayor abundancia relativa, respecto al segundo y por lo tanto es el que se encuentra en mayor número de copias en el gen de ARNr 16S (311±2 nt). El fragmento secundario aparece en menor abundancia relativa (212±2 nt) y en consecuencia en menor número de copias en el gen. En la figura 3.5 se observa que la abundancia relativa de los fragmentos 311±2 nucleótidos es aproximadamente el 100% por lo que se puede asegurar que las colonias se encuentran puras. Los picos en menor cantidad que aparecen, se deben a errores o mutaciones de la PCR y no son considerados en el análisis. Las secuencias del gen ARNr 16S de todas las colonias presentaron 99% de similitud de secuencia con *Dsb. acidavidus* CL4 cuando se las comparó con la base de datos pública BLAST. El análisis utilizando la herramienta RDP Classifier agrupó a todas las secuencias con 100% de confianza dentro de la clase *Peptococaceae*. Los resultados mencionados explican la posición de las colonias dentro del mismo OTU que *Dsb. acidavidus* CL4 (EF042590) (figura 3.6).

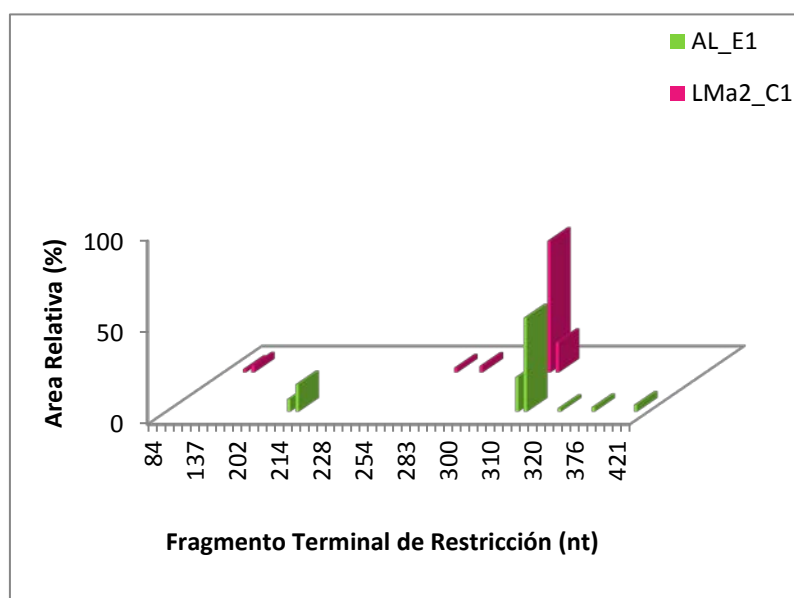
Los resultados del aislamiento complementan la información encontrada en los enriquecimientos acidófilos descritos en el capítulo II y también aquella obtenida de las bibliotecas de ARNr 16S.



**Figura 3.6.** Árbol filogenético obtenido para los aislados a 30°C. Los porcentajes en los nodos indican el peso de esta topología sobre 500 réplicas (*bootstrap*). Las llaves de la derecha engloban especie. La barra indica 0,02 de divergencia filogenética (número de mutaciones fijas por nucleótido). *Bacillus methanolicus* se utilizó como referencia.



La figura 3.7 muestra los fragmentos terminales de restricción que se obtuvieron con la enzima HaeIII de las dos colonias obtenidas a 40°C a partir de la siembra directa de la muestra original de Copahue (tabla 3.2).



**Figura 3.7.** Perfil de T-RFLP obtenido con la enzima Hae III para los aislados *LMa2\_c1* y *AL1\_e1*.

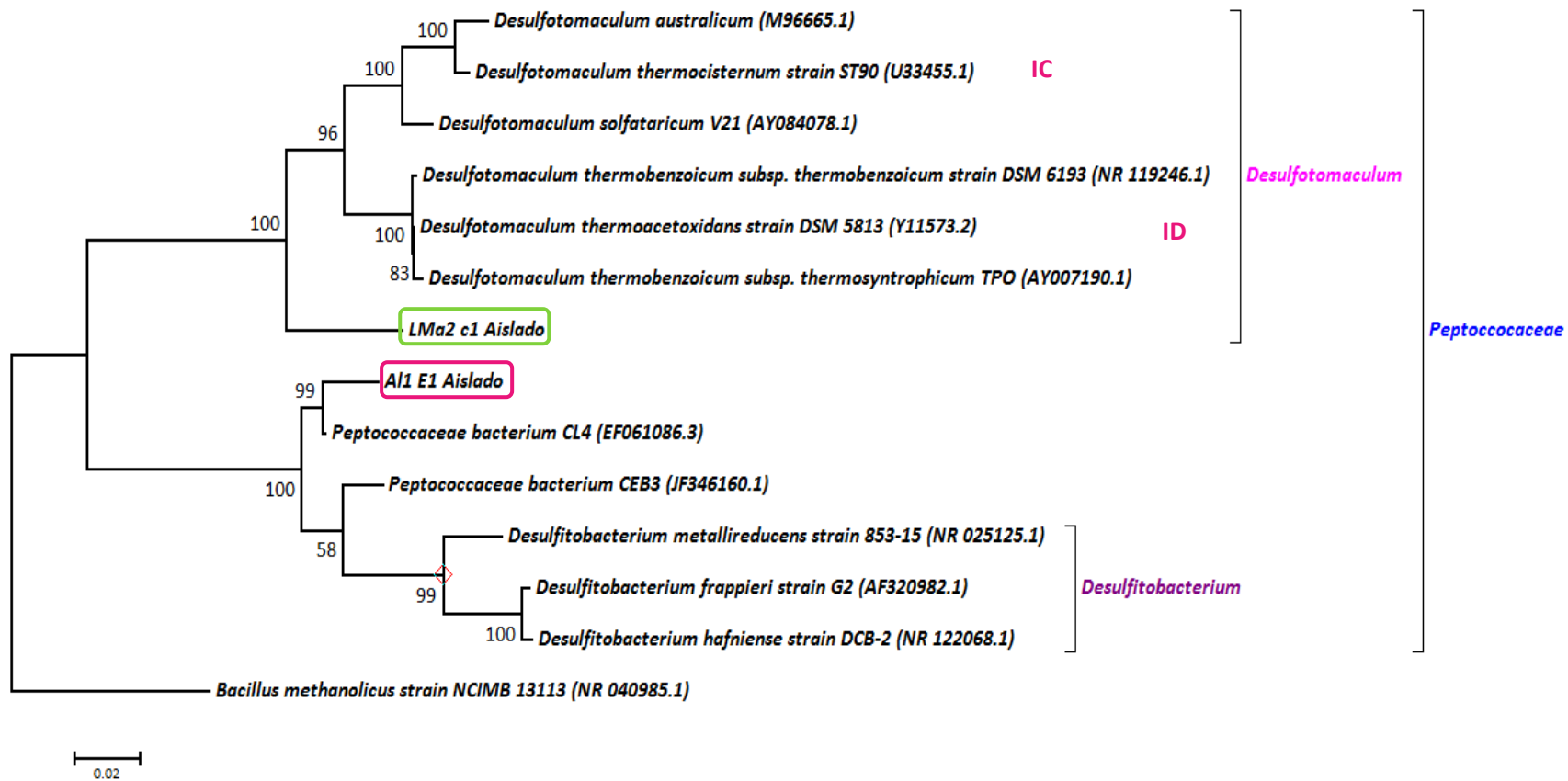
**Tabla 3.2.** Análisis por T-RFLP de las colonias aisladas de muestra original a 40° C. La longitud del T-RF fue obtenida con la enzima HaeIII

Aislado	T cultivo (°C)	MO/E	% similitud (BLAST)	Longitud del T-RF (nt)	Microorganismo cultivado más cercano BLAST
<i>LMa2_c1</i>	40	MO	94	113, 283, 308	<i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i> subsp. <i>thermosyntrophicum</i>
<i>AL1_e1</i>	40	MO	96	214, 312	<i>Dsb. acidavidus</i> CL4

Los fragmentos terminales de restricción que se obtuvieron para el aislado *AL1\_e1* a 40°C (212±2 y 311±2) coincidieron con aquellos ya reportados en la base de datos *Desulfobacillus (Dsb.) acidavidus* CL4. Sin embargo, el análisis de la secuencia del

gen de ARNr 16S mostró una similitud de sólo 96% con *Dsb. acidavidus* CL4 y su posición dentro del árbol filogenético de la figura 3.8 sugiere que el aislado *AL1\_e1* sería una nueva especie dentro del mismo género. Este resultado había sido sugerido por la distinta morfología que las colonias de *AL1\_e1* presentaron a las dos temperaturas. De hecho, no existen reportes de crecimiento de *Dsb. acidavidus* CL4 a temperaturas mayores a 30°C (Johnson y col., 2009).

En la figura 3.7 se muestran los fragmentos terminales de restricción con la enzima HaeIII para el aislado *LMa2\_c1*, siendo el de 307±2 nucleótidos el de mayor abundancia relativa. Este perfil no se corresponde con ningún microorganismo en la base de datos utilizada. La secuencia del gen de ARNr 16S mostró una similitud del 94% con la especie *Desulfotomaculum thermobenzoicum* subsp. *thermosyntrophicum*, analizada a través de la base de datos BLAST. Estos resultados sugieren que el aislado *LMa2\_c1* sería también una nueva especie dentro del mismo género y explican su ubicación en el árbol filogenético de la figura 3.8. A diferencia de *Dsb. acidavidus* CL4, existe un gran número de bacterias clasificadas dentro del género *Desulfotomaculum*, cada una con diferentes características metabólicas. No obstante, la mayoría de esas especies no fue aislada de muestras con características ácidas (Sánchez-Andrea y col., 2013), por lo que esto hace especialmente interesante su caracterización.



**Figura 3.8.** Árbol filogenético obtenido para los aislados a 40°C. Los porcentajes en los nodos indican el peso de esta topología sobre 500 réplicas (*bootstrap*). Las llaves de la derecha engloban especie y familia. La barra indica 0,02 de divergencia filogenética (número de mutaciones fijas por nucleótido). *Bacillus methanolicus* se utilizó como referencia.

Al igual que lo obtenido para las colonias a 30°C se puede confirmar que los aislados a 40°C se encuentran puros ya que se observan como máximo dos fragmentos terminales de restricción con elevada abundancia relativa, correspondientes a los fragmentos primarios y secundarios. Esta información complementa lo obtenido en el capítulo II a través de la biblioteca de ARNr 16S.

Basándose en el análisis de las secuencias de ARNr 16S, Stackebrandt y col. (1997) designaron diferentes subclústers (Ia- Ie), para el género *Desulfotomaculum*. La ubicación del aislado *LMa2\_c1* es cercana al cluster I pero no es posible asignarle un subclúster siendo seguramente una especie diferente a las reportadas hasta el momento (figura 3.8).

Los resultados expuestos anteriormente sobre el análisis de las secuencias de ARNr 16S indican que los microorganismos aislados a 40°C presentan un alto potencial de ser nuevas especies. Es por esto que las mismas fueron depositadas en el Leibniz Institute DSMZ- German Collection of Microorganisms and Cell Cultures y se encuentran en período de aprobación. Los nombres propuestos son: "*Desulfotomaculum copahuensis*" y "*Desulfobacillus copahuensis*". Para completar la identificación, se estudiaron sus características morfológicas y fisiológicas que se detallan en las secciones siguientes.

### III.4. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LOS AISLADOS

#### III.4.1. Caracterización morfológica

##### III.4.1.1. Metodología

Las características morfológicas de las nuevas especies de *Desulfobacillus* y *Desulfotomaculum* se estudiaron a través de distintas técnicas microscópicas:

- Observación al *microscopio óptico con contraste de fase*
- Tinción de Gram
- Observación al *microscopio electrónico de barrido (SEM)*
- Tinción negativa y observación al *microscopio electrónico de transmisión (TEM)*
- Cortes ultrafinos y observación de la ultraestructura celular al microscopio electrónico de transmisión (*TEM*)

Para la observación en el microscopio óptico con contraste de fases, una pequeña alícuota del cultivo en fase exponencial fue colocada en cámara de Petroff-Hausser y observada en un microscopio óptico Nikon (Photolab) con un aumento de 40X.

Para la coloración Gram se utilizó el kit Gram Britania (Laboratorios Britania) y como control se utilizó una cepa de *Escherichia coli* (Gram (-)) (ver Anexo III).

Para la observación en el microscopio electrónico de barrido (SEM), las muestras fijadas y deshidratadas fueron remitidas al Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis del LIMF-FI-UNLP donde se realizó el secado por el punto crítico, metalizado y la observación por SEM en alto vacío utilizando un equipo FEI ESEM Quanta 200. En el Anexo III se pueden encontrar más detalles del protocolo.

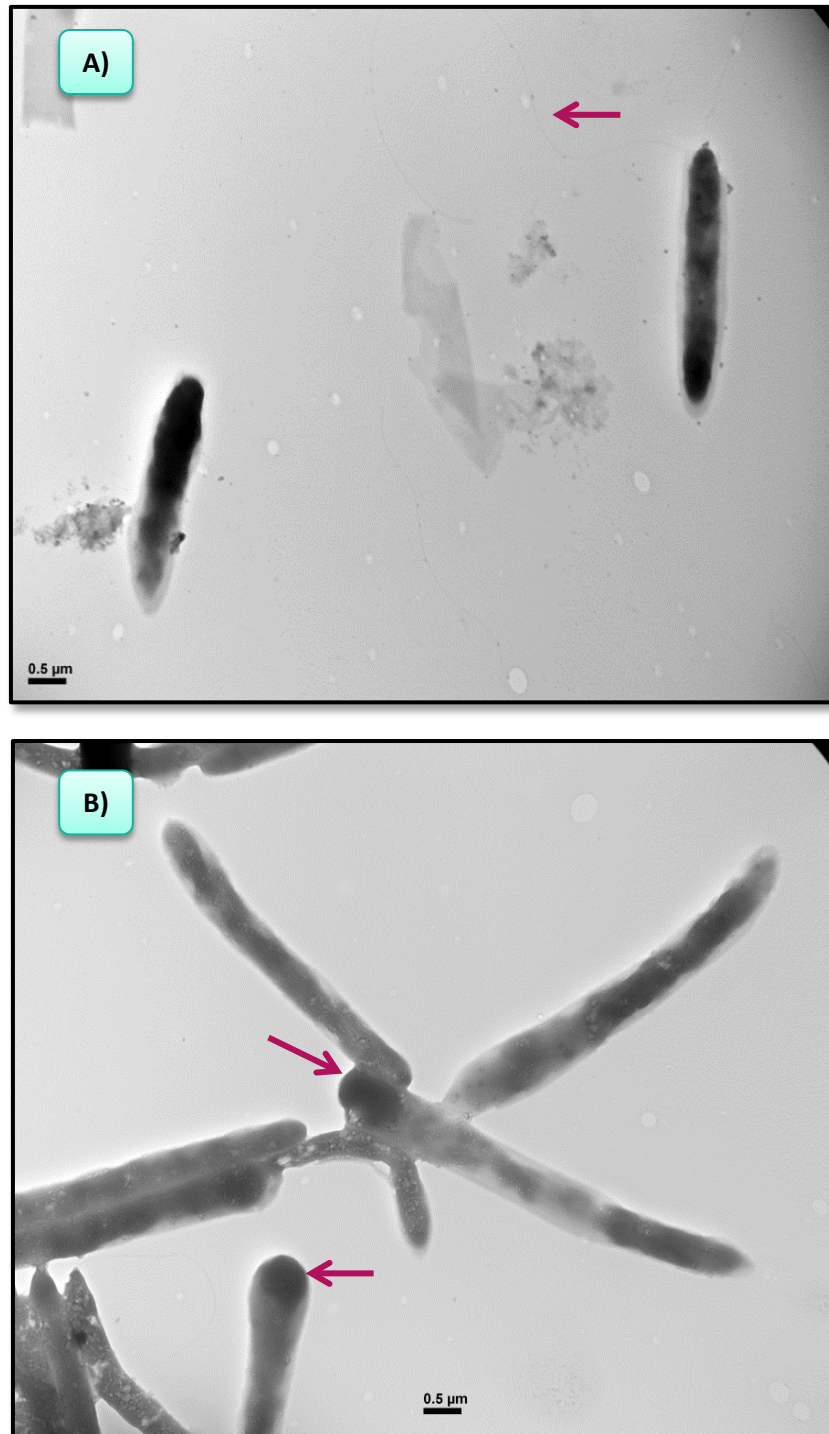
Para la observación por microscopía electrónica de transmisión (TEM), tanto por tinción negativa como por cortes ultrafinos, las muestras fijadas fueron remitidas al Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Veterinaria (UNLP) donde las observaciones se hicieron con un equipo JEM 1200EX II, Jeol. Para más detalles del protocolo ver el Anexo III.

### III.4.1.2. Resultados y discusión

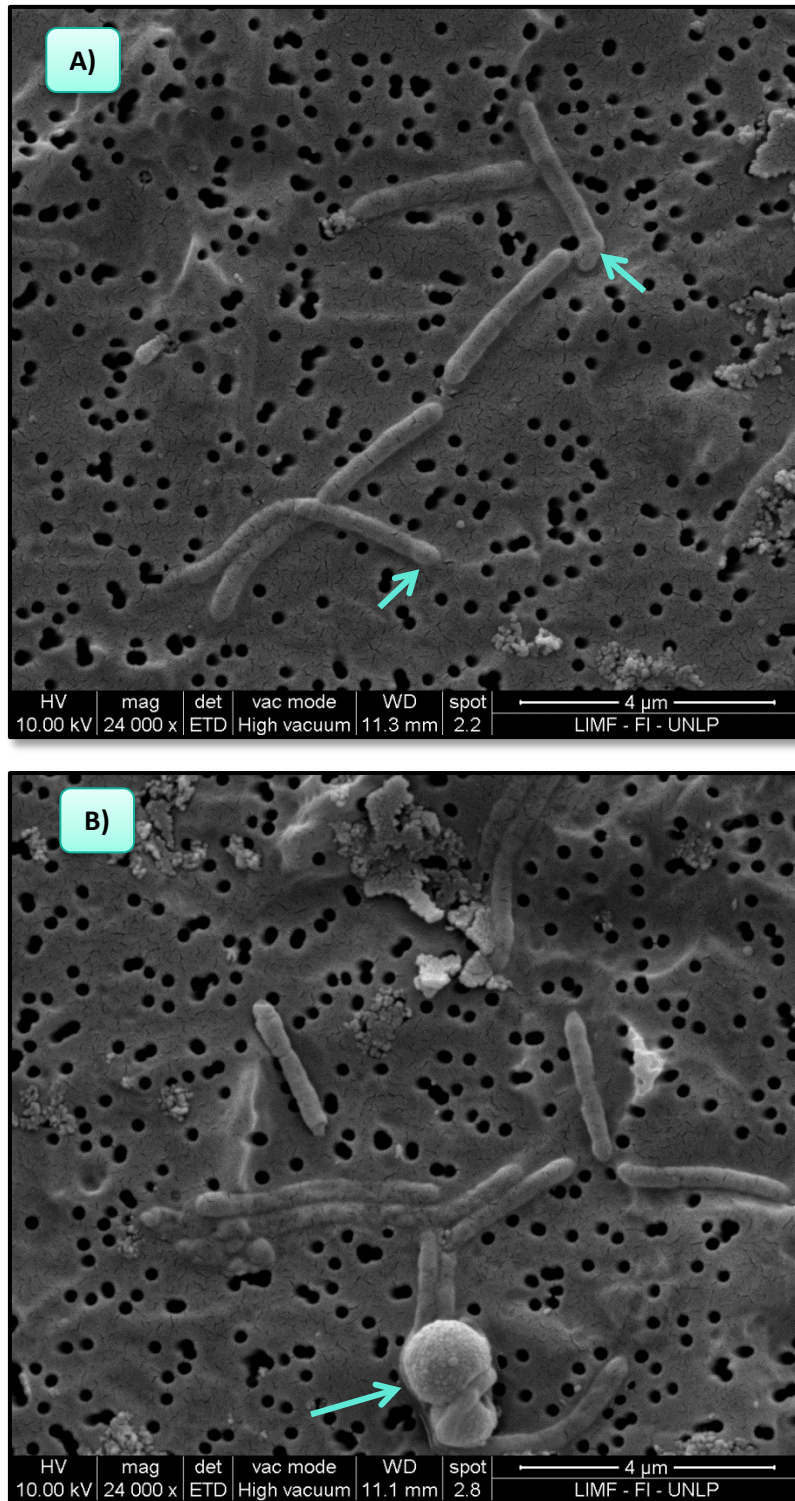
Al microscopio óptico con contraste de fase, las células de la nueva especie de *Desulfobacillus* se observan como bacilos alargados y con muy poco movimiento. Se detectaron esporas en posición terminal (Madigan y col., 2004). La población final en un cultivo crecido, obtenida por recuento en cámara de Petroff-Hausser, es  $1,5-2,0 \times 10^8$  células/mL. La tinción de Gram resultó color rosado/rojizo indicando que se trata de una especie Gram-negativa.

Para la especie de *Desulfotomaculum*, en el microscopio óptico de contraste de fase, se detectaron células con forma de bacilos alargados, algunas unidas de a pares y con muy baja movilidad. Se observó la presencia de esporas centrales. Las células esporuladas representaban sólo una parte pequeña del cultivo; aun en menor cantidad se observaron esporas totalmente formadas. La población bacteriana en los cultivos crecidos fue de aproximadamente  $1,0 \times 10^8$  células/mL. La tinción con reactivo de Gram fue de color violeta indicando que esta especie es Gram-positiva.

Las figuras 3.9 A y B muestran las imágenes de tinción negativa de la nueva especie de *Desulfobacillus* tomadas con el microscopio electrónico de transmisión mientras que las figuras 3.10 A y B muestran las obtenidas con el microscopio electrónico de barrido.



**Figura 3.9.** Imágenes de células de la nueva especie de *Desulfobacillus*, observada con TEM (aumento de 20000X, escala 0,5 µm). Las flechas indican la presencia de flagelos (imagen A) y de esporas terminales como zonas más electrondensas (imagen B)



**Figura 3.10.** Imágenes de un cultivo de la nueva especie de *Desulfobacillus*, observada con SEM (aumento de 24000X). Las flechas indican la presencia de esporas (imagen A) y de precipitados de ZnS detectados con EDAX (imagen B)



En las imágenes de tinción negativa observadas con TEM se aprecia la presencia de flagelos y de endosporas terminales. El flagelo se ubica en posición polar (ubicado en un extremo de la célula). El tipo de disposición flagelar se utiliza a menudo como criterio de clasificación de bacterias (Madigan y col., 2004). La presencia de un solo flagelo hace que las células presenten baja movilidad. Las endosporas han sido reportadas en géneros de bacterias sulfato-reductoras como *Desulfosporosinus* y *Desulfotomaculum* (Alazard y col., 2010; Haouari y col., 2008; Sánchez-Andrea y col., 2014). También ha sido observada en *Dsb. acidavidus* CL4 (Johnson y col., 2009).

En las imágenes en SEM también pueden observarse las esporas terminales. Las dimensiones de las células determinadas con este equipo son 3  $\mu\text{m}$  de largo y 0,4  $\mu\text{m}$  de ancho, cuando no se encuentran en proceso de esporulación, y de una longitud algo mayor al esporular. En la figura 3.10 B se observan precipitados de ZnS que se forman en las condiciones de cultivo detalladas. El espectro de estos precipitados determinado por EDAX puede verse en la figura 3.11 (la señal de S se superpone parcialmente con la de Au usado para el metalizado).

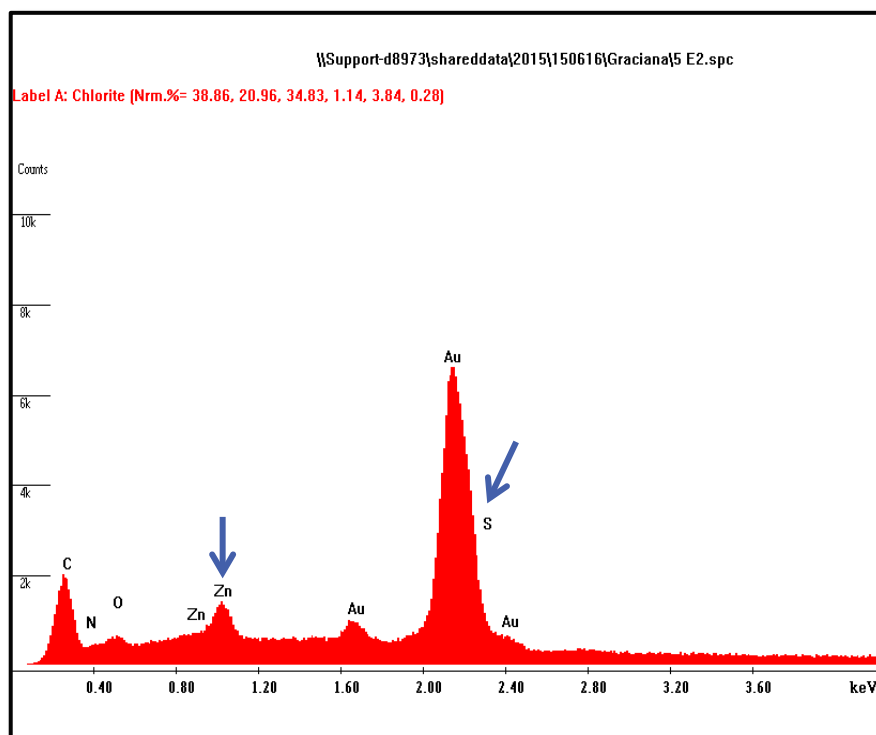
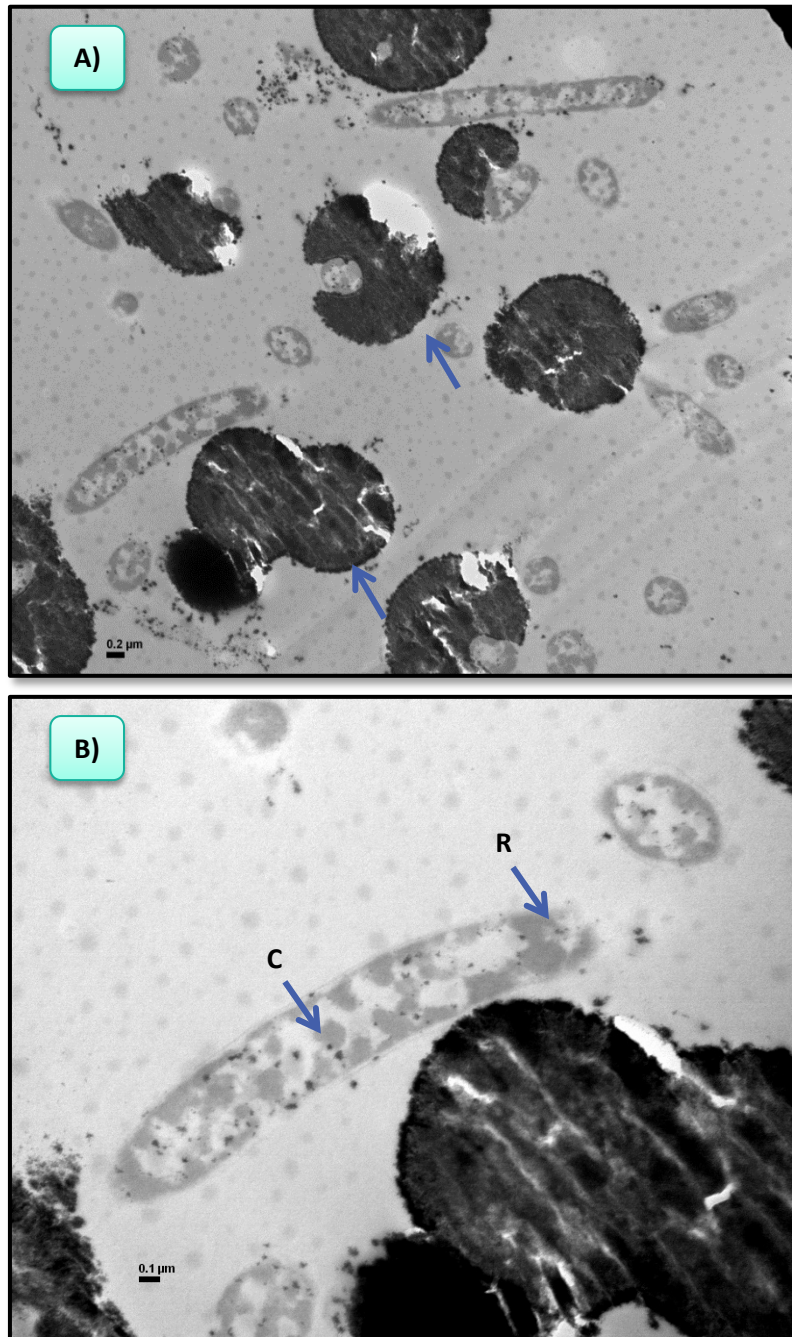


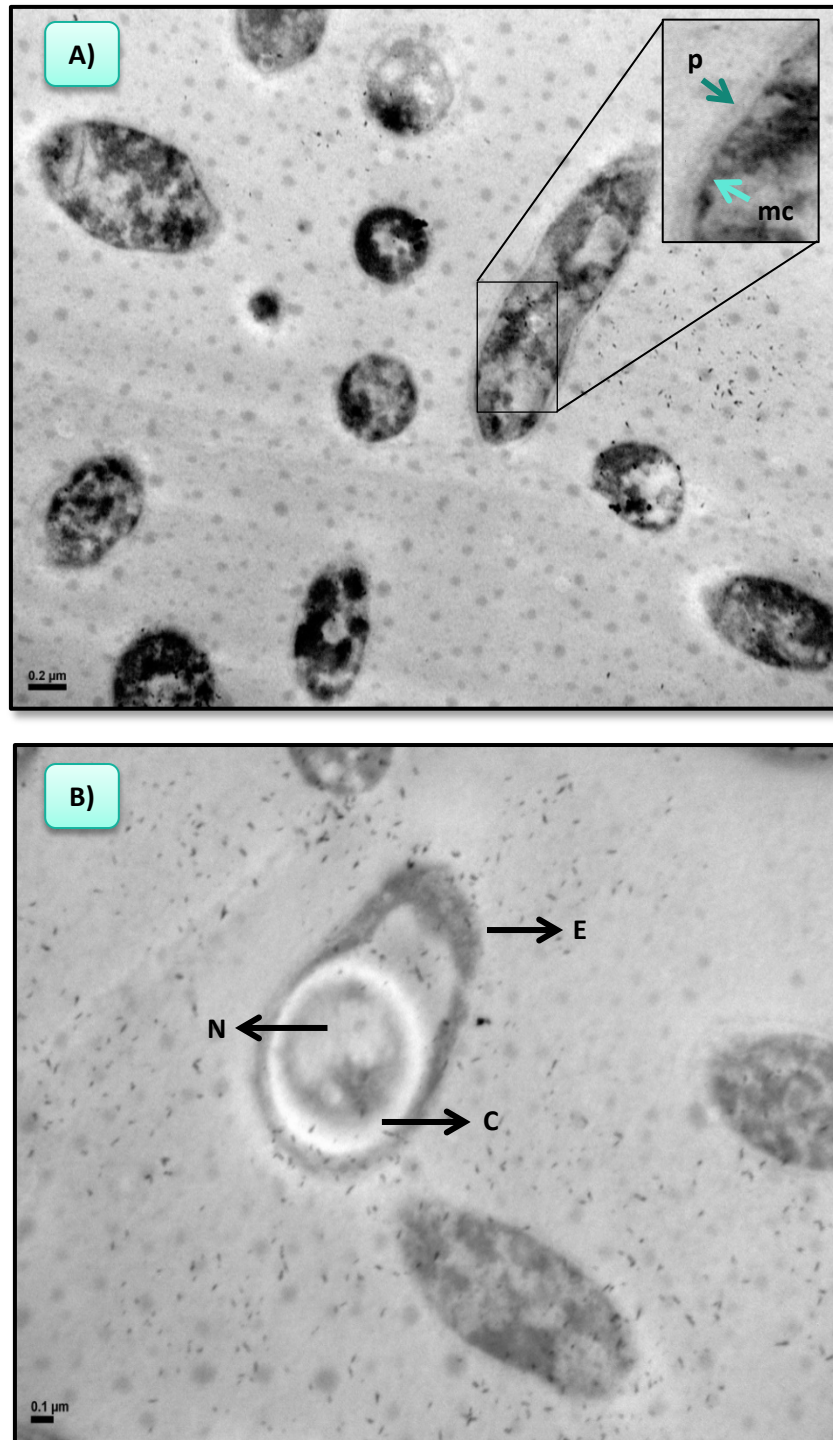
Figura 3.11. Espectro EDAX del precipitado en los cultivos

Las figuras 3.12 A y B y 3.13 A y B muestran las imágenes de los cortes ultrafinos en el cultivo de la especie nueva de *Desulfobacillus*, obtenidas con el microscopio electrónico de transmisión.



**Figura 3.12.** Imágenes TEM de cortes ultrafinos de cultivos de la especie nueva de *Desulfobacillus*. **A)** Precipitados de ZnS (escala 0,2 μm; aumento 25000 X). **B)** Imagen ampliada de A) (escala 0,1 μm; aumento 60000 X). Con flechas se señala el precipitado de ZnS, R: ribosomas, C: citoplasma.

En la figura 3.12 A pueden verse zonas con diferentes electrodensidades (las más densas son las más oscuras) dentro del citoplasma. En general, en los cortes ultrafinos observados con microscopia electrónica de transmisión el citoplasma se observa más electrondenso debido a la presencia de ribosomas. En la imagen se observan precipitados de ZnS independientes de las células pero también algunas células se ubican rodeando a la partícula de precipitado. Este comportamiento ha sido descrito en otras especies de bacterias sulfato-reductoras como por ejemplo *Desulfosporosinus acididurans* (Sánchez-Andrea y col., 2014).



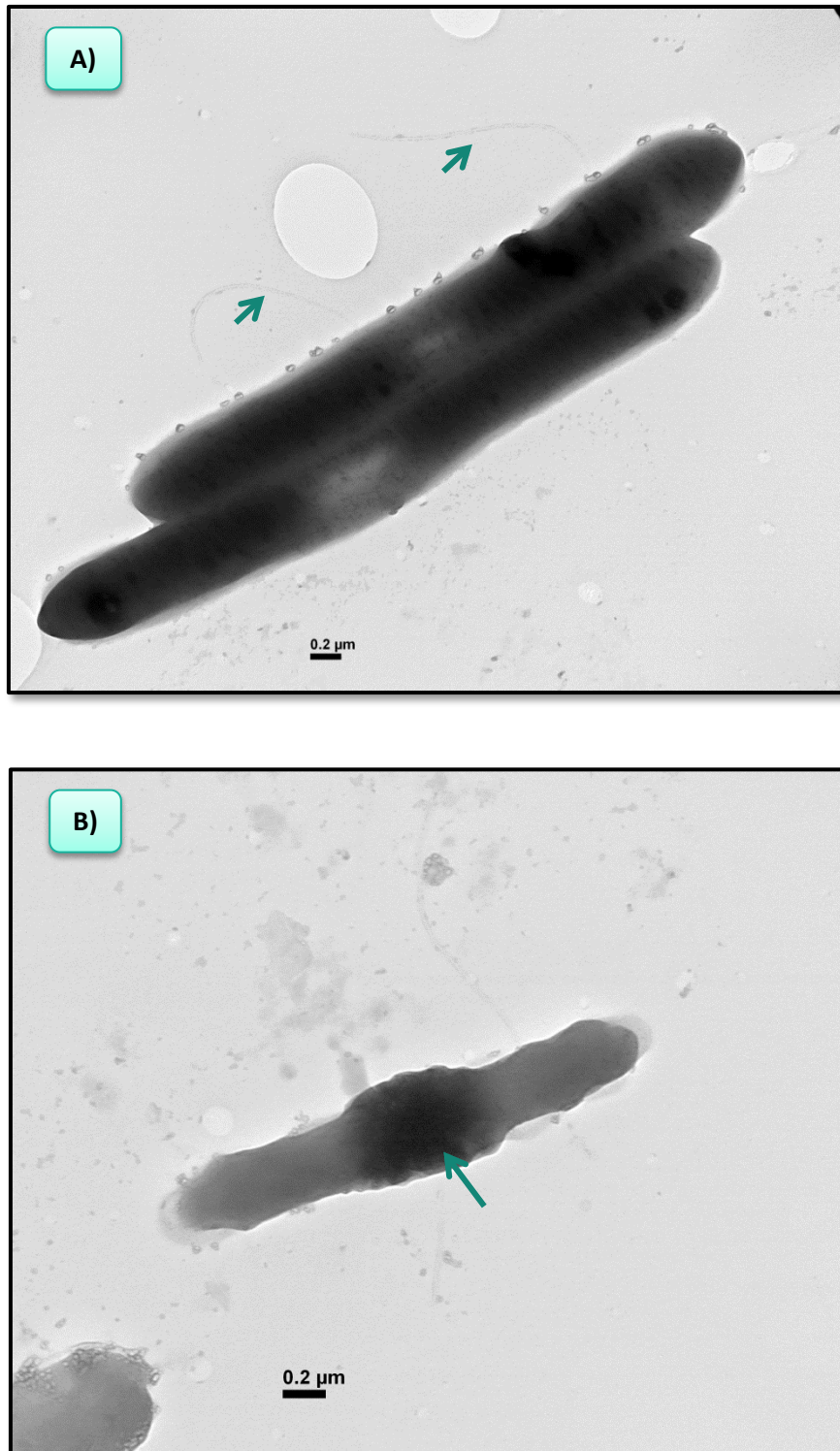
**Figura 3.13.** Imágenes TEM de cortes ultrafinos de un cultivo de la nueva especie de *Desulfobacillus*. **A)** Se observa la membrana citoplasmática (mc) y la capa de peptidoglicano (p) (escala 0,2 µm; aumento 50000 X). **B)** Corte transversal de una espora (escala 0,1 µm; aumento 60000 X). E: exosporio, C: córtex, N: núcleo.

La presencia de la pared celular, puede observarse con mayor detalle en la figura 3.13 A en donde con flechas se señalan la membrana citoplasmática (mc) y la pared celular (p). En muchas bacterias sulfato-reductoras de la familia *Peptococaceae* se ha observado que resultan Gram-negativas en la tinción, pero al observar los cortes ultrafinos por TEM se detecta la presencia de la pared celular de peptidoglicano, por lo que resultan finalmente Gram-positivas (Alazard y col., 2010; Plugge y col., 2002).

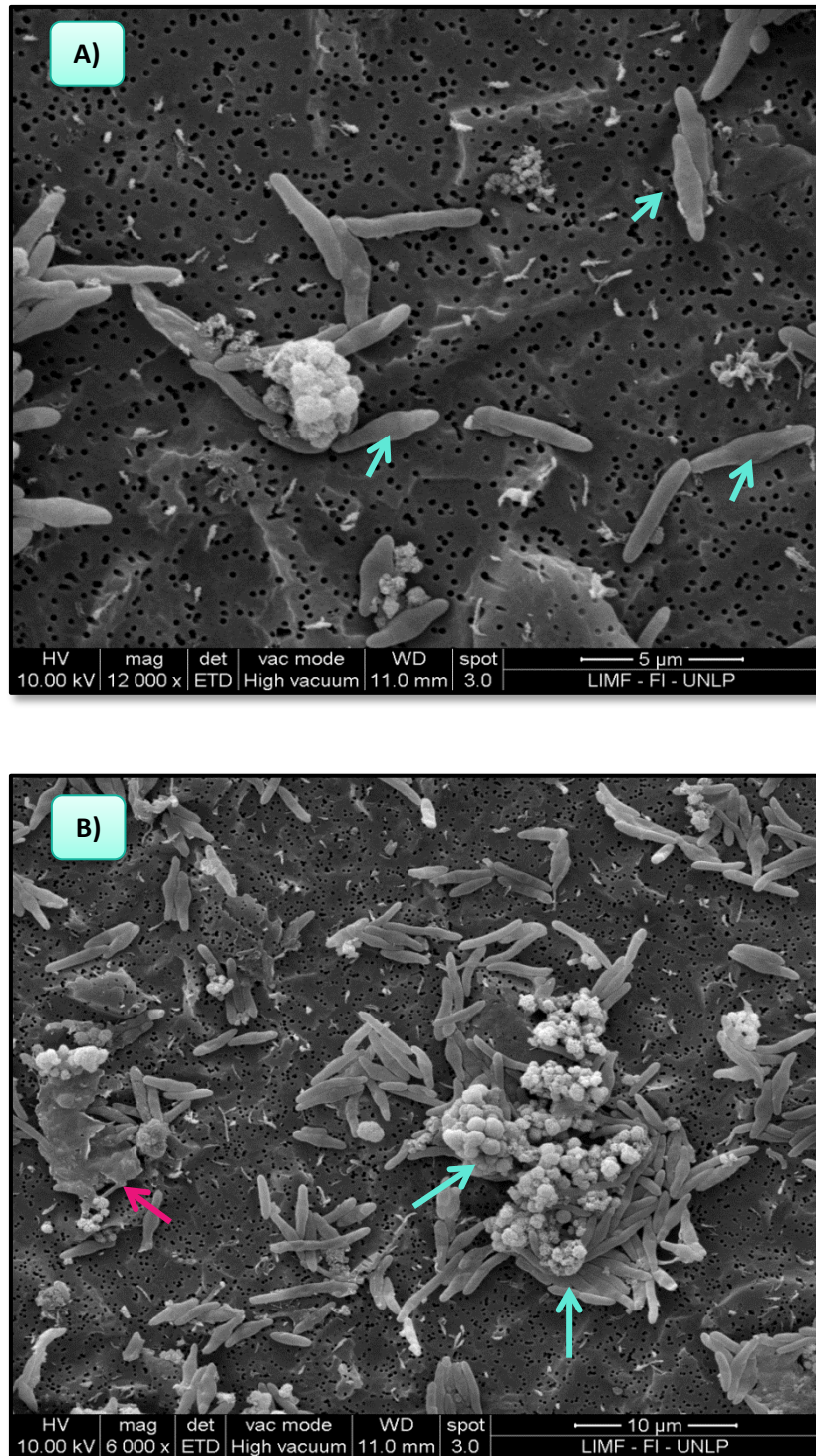
En la figura 3.13 B puede observarse la estructura de las esporas de las células de esta nueva especie. La capa más externa es el exosporio (E), una fina cubierta de naturaleza proteica. Por debajo de ésta se encuentra la cubierta de la spora, que no llega a visualizarse en la figura 3.13 B. Por debajo se localiza el córtex (C), que no es más que una capa de peptidoglicano. Internamente, se presenta el núcleo de la spora (N) que contiene la pared celular normal, la membrana citoplasmática, el citoplasma, etc. (Madigan y col., 2004).

Desde una perspectiva filogenética, la capacidad para producir endoesporas esta específicamente asociada a un sublinaje particular de bacterias Gram-positivas. No obstante, las fisiologías de las bacterias formadoras de esporas son muy diversas e incluyen anaerobios, aerobios, fototrofos y quimiolitótrofos (Madigan y col., 2004).

En las siguientes figuras se muestran las imágenes obtenidas con TEM (figuras 3.14 A y B) y SEM (figuras 3.15 A y B) de la nueva especie de *Desulfotomaculum*.



**Figura 3.14.** Imágenes de células de la nueva especie de *Desulfotomaculum*, obtenidas con TEM. **A)** Las flechas señalan flagelos (aumento 40000X). **B)** La flecha indica la espora central (zonas más electrondensas, aumento 40000X)



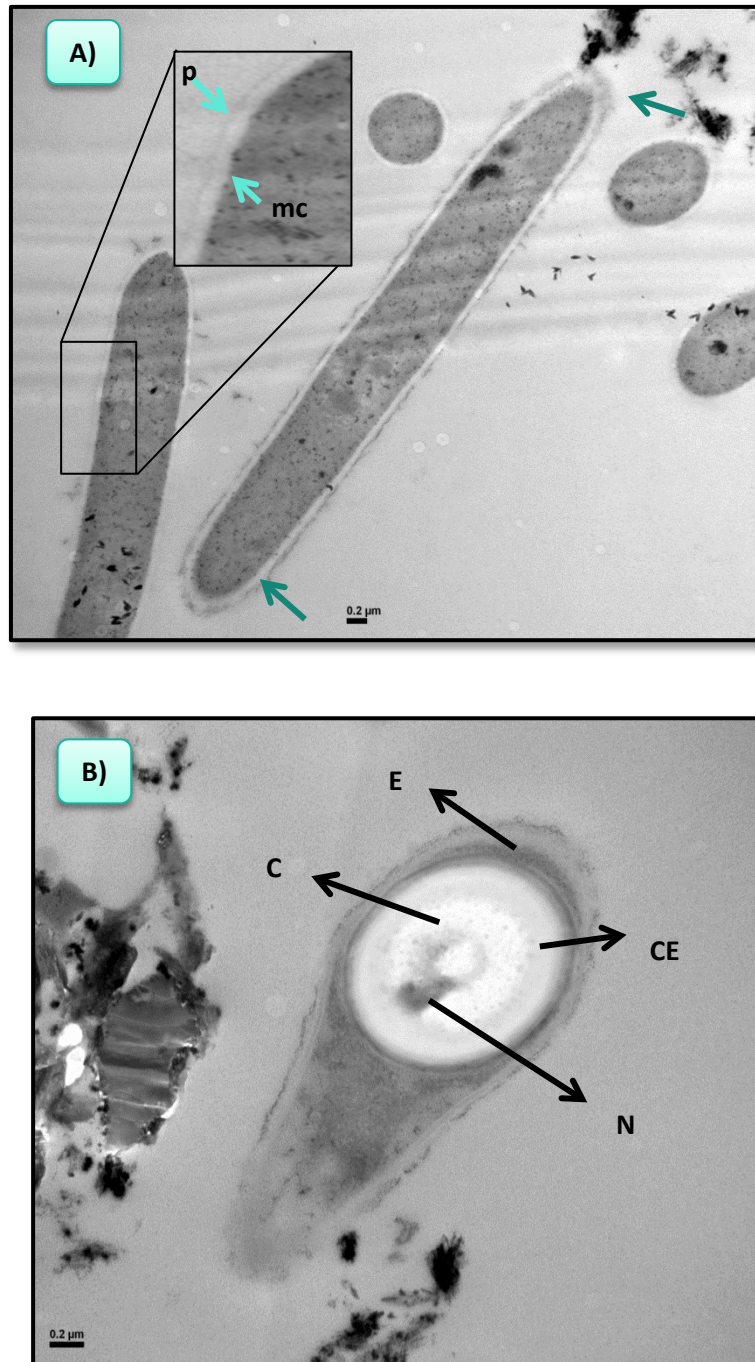
**Figura 3.15.** Imágenes de un cultivo de la nueva especie de *Desulfotomaculum*, obtenidas con SEM. **A)** Las flechas señalan las esporas (aumento 12000X). **B)** Las flechas verdes indican precipitados de FeS y las rosas el exopolisacárido EPS (aumento 6000X)

En las imágenes TEM se aprecia la presencia de un flagelo en posición polar (responsable de la escasa movilidad observada) y de esporas centrales. En las imágenes SEM se observan también esporas centrales (flechas verdes). Las células presentaban en promedio 4  $\mu\text{m}$  de largo y 0,8  $\mu\text{m}$  de ancho, cuando no se encuentran en proceso de esporulación, y un poco menos al esporular. La formación de esporas centrales produce un cambio morfológico importante que se observa con el microscopio óptico de contraste de fases. *Desulfotomaculum thermobenzoicum* subsp. *thermosyntrophicum*, con el cual esta especie comparte un 94% de similitud de secuencia del ADNr 16S, posee aproximadamente las mismas características morfológicas pero sólo posee esporas en posición central (Plugge y col., 2002).

El precipitado de FeS señalado en la figura 3.15 B fue caracterizado por EDAX. Las células tienden a formar cúmulos alrededor del precipitado; la adhesión parece estar mediada por exopolisacáridos (EPS) que también se observan en la figura. La adhesión de MSR mediada por EPS ha sido observada en diversos procesos en los cuales participan estos microorganismos (Braissant y col., 2007; Baumgartner y col., 2006).

Las figuras 3.16 A y B muestran las imágenes TEM de los cortes ultrafinos de un cultivo de la esta especie de *Desulfotomaculum*.





**Figura 3.16.** Imágenes TEM de cortes ultrafinos de un cultivo de la nueva especie de *Desulfotomaculum*. **A)** Se observan la membrana citoplasmática (mc) y la capa de peptidoglicano (p). Las flechas indican precipitados en la membrana citoplasmática (escala 0,2 μm; aumento 50000 X). **B)** Corte transversal de una espora formada (escala 0,2 μm; aumento 30000 X). E: exosporio, CE: cubierta de la espore, C: córtex, N: núcleo.

La presencia de la pared celular puede observarse con mayor detalle en la ampliación de la figura 3.16 A en donde con flechas se señalan la membrana citoplasmática (mc) y la pared celular (p), confirmando el resultado obtenido mediante tinción de Gram. En general, las bacterias sulfato-reductoras formadoras de esporas son en su mayoría Gram-positivas. No obstante, otras especies de *Desulfotomaculum* dieron negativas en la tinción de Gram: *Desulfotomaculum solfataricum*, *Desulfotomaculum thermobenzoicum* subsp. *thermosyntrophicum* y *Desulfotomaculum australicum* (Plugge y col., 2002; Goorissen y col., 2003; Love y col., 1993). Lo mismo sucedió con la nueva especie de *Desulfobacillus*, por lo que quizás corresponda a una limitación de la técnica de tinción de Gram para algunos microorganismos.

En la figura 3.16 B puede observarse la estructura de las esporas de estas células que es, en principio, semejante a la observada para la especie de *Desulfobacillus*. Se observa la capa más externa de exosporio (E) y debajo de ésta se encuentra la cubierta de la spora. También se localizan el córtex (C) e internamente el núcleo de la spora (N).

### **III.4.2. Estequiometría de crecimiento**

#### **III.4.2.1. Metodología**

En función de determinar si la nueva especie de *Desulfobacillus* oxida glicerol completamente a CO<sub>2</sub> o incompletamente a ácido acético, se tomaron colonias crecidas en las placas overlay y se las colocó en frascos con 5 mL de medio conteniendo sales basales, elementos traza y diferentes concentraciones de glicerol y Zn(II), a pH 4.5 (tabla 3.3). El experimento se realizó por cuadruplicado y se utilizó un frasco extra de cada condición para las medidas iniciales. Los frascos fueron incubados en jarras de anaerobiosis a 40°C durante 15 días.

Tabla 3.3. Sistemas utilizados en la experiencia

Sistema A	Sistema B	Sistema C
0,28 g/L glicerol	0,46 g/L glicerol	1,01 g/L glicerol
0,26 g/L de ZnSO <sub>4</sub>	0,39 g/L de ZnSO <sub>4</sub>	0,91 g/L de ZnSO <sub>4</sub>

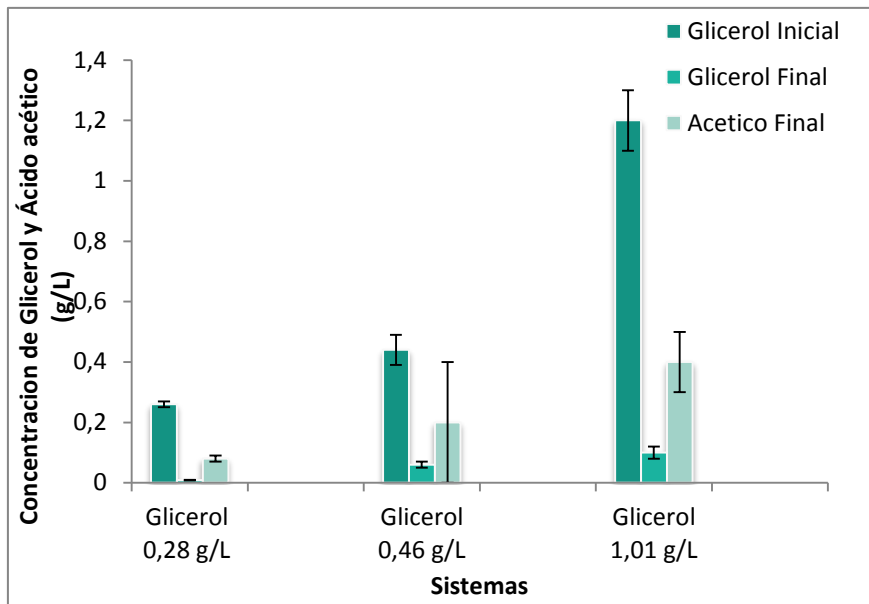
Para determinar si la nueva especie de *Desulfotomaculum* oxida el lactato completamente a CO<sub>2</sub> o incompletamente a ácido acético, se colocó 1 mL de un cultivo crecido en 9 mL de medio Postgate B, con lactato como fuente de carbono y energía, previamente esterilizado y cerrado con tapa de goma y virola metálica. Los cultivos fueron incubados durante 20 días a 40°C. Se prepararon los controles estériles correspondientes conteniendo solo medio de cultivo. Los sistemas se realizaron por quintuplicado y se utilizó un frasco para realizar las medidas iniciales.

En ambos casos en cada uno de los sistemas se midió la concentración de sulfato remanente por turbidimetría y se realizaron recuentos en cámara de Petroff-Hauser con un aumento de 40X. La concentración de ácido acético fue determinada por cromatografía líquida de alta resolución HPLC, comparando el área relativa obtenida con una curva patrón.

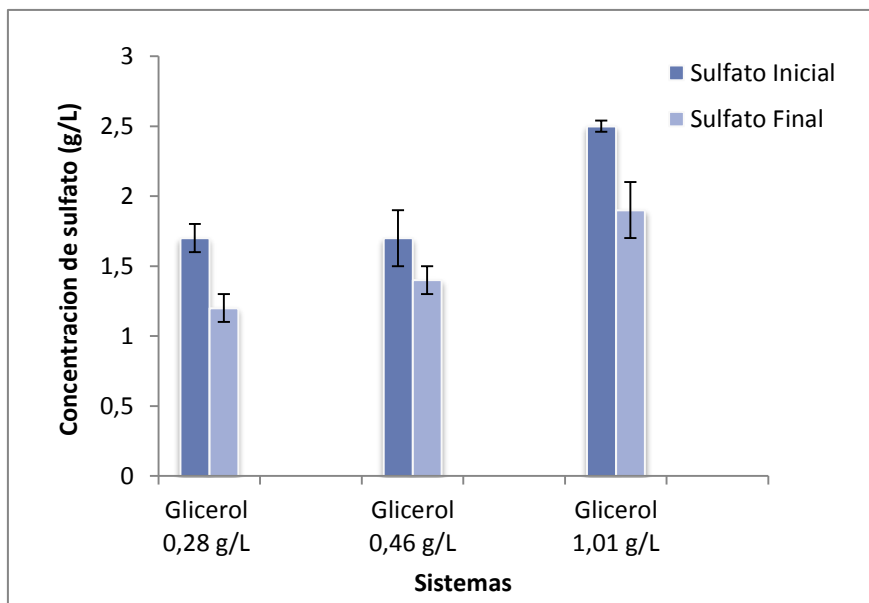
Para el caso particular de la nueva especie de *Desulfobacillus*, las medidas de glicerol se realizaron utilizando el método colorimétrico-enzimático TG Color Wiener Lab, y la concentración de Zn(II) se determinó por espectrofotometría de absorción atómica. Para la especie de *Desulfotomaculum* la concentración de lactato se determinó por HPLC utilizando patrones de 100, 250 y 500 mg/L. Más detalles de los protocolos pueden encontrarse en el Anexo I.

#### III.4.2.2. Resultados y discusión

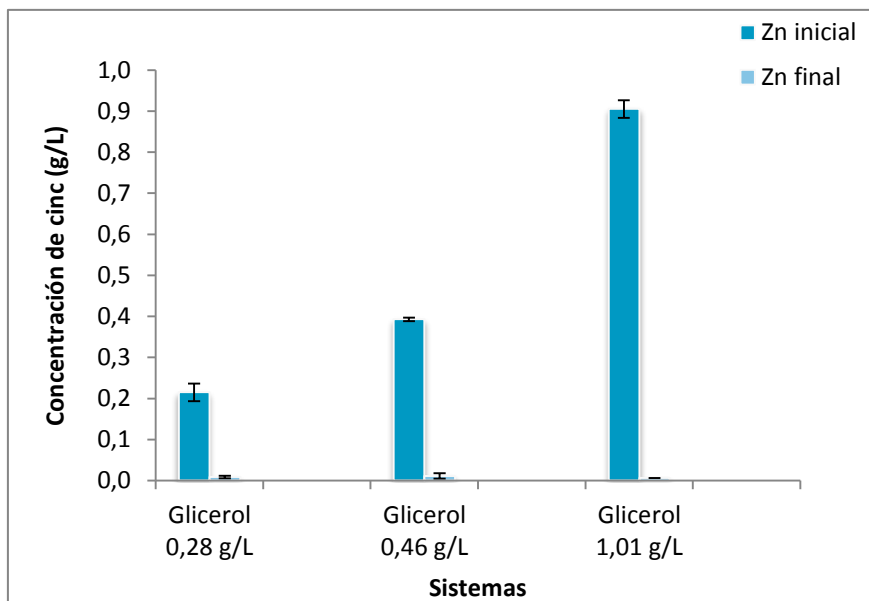
Las figuras 3.17-3.19 muestran las concentraciones iniciales y finales (luego de 15 días) de glicerol, ácido acético, sulfato y Zn(II) para la especie de *Desulfobacillus* obtenida en cultivos con distintas concentraciones iniciales de glicerol (0,28, 0,46 y 1,01 g/L).



**Figura 3.17.** Concentraciones iniciales y finales de glicerol y ácido acético, en cultivos de la nueva especie de *Desulfobacillus*



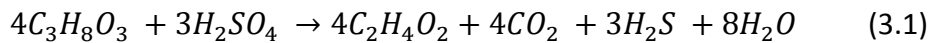
**Figura 3.18.** Concentraciones iniciales y finales de sulfato, en cultivos de la nueva especie de *Desulfobacillus*



**Figura 3.19.** Concentraciones iniciales y finales de Zn(II), en cultivos de la nueva especie de *Desulfobacillus*

Se observa que la desaparición prácticamente completa de glicerol, incluso a la mayor concentración ensayada, es acompañada por la disminución de la concentración de sulfato, la aparición de ácido acético y la desaparición completa de Zn(II). Estos resultados indican, a nivel cualitativo, una oxidación incompleta de glicerol a expensas de la reducción de sulfato; el sulfato reducido es convertido mayoritariamente en sulfuro que precipita con Zn(II). La población microbiana final alcanzada fue de  $1,60-2,33 \times 10^8$  células/mL. Se tuvieron en cuenta tanto las bacterias como aquellas esporas que ya se encontraban formadas. El pH final de los cultivos fue aproximadamente una unidad por encima del valor inicial en todos los sistemas. Por otro lado, la exposición de los cultivos al oxígeno durante un corto período de tiempo (por ejemplo la manipulación de los cultivos al momento de realizar los repiques), no resultaron en la pérdida de viabilidad de los mismos.

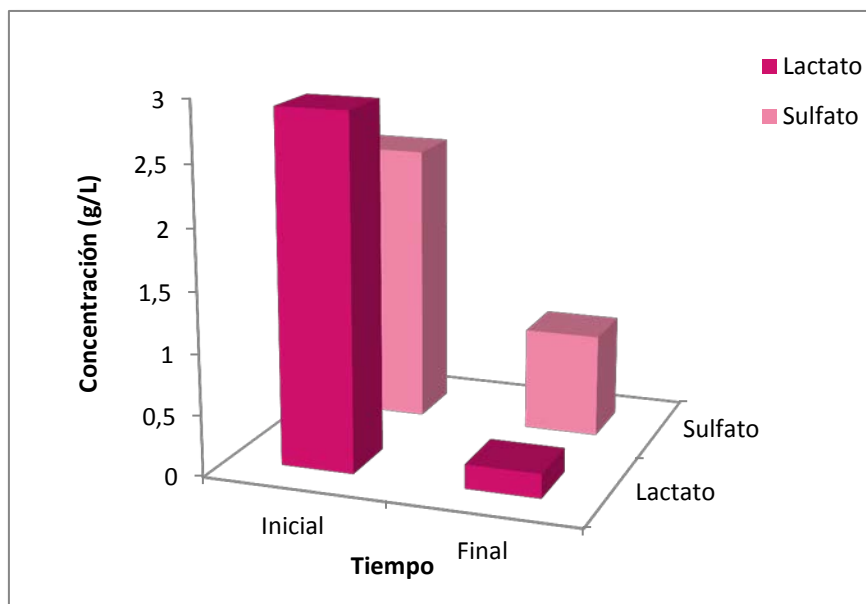
Teniendo en cuenta los datos del sistema B, correspondiente a 0,46 g/L de glicerol (5 mM) y 0,39 g/L de  $ZnSO_4$  (6 mM) se puede observar que la estequiometría de la reacción es la siguiente: 4,13 mmoles de glicerol oxidados/L; 4,06 mmoles de sulfato reducido/L y 3,33 mmoles de ácido acético/L producidos (figuras 3.17, 3.18 y 3.19). Los datos pueden ajustarse a la siguiente ecuación:



Confirmando que esta especie produce cantidades equimolares de ácido acético a partir de la oxidación del glicerol, por lo que puede clasificarse como “oxidante incompleto”. Este comportamiento es similar a otros MSR acidófilos como *Desulfosporosinus acidiphilus* y *Desulfosporosinus acididurans* (Sánchez-Andrea y col., 2014; Alazard y col., 2010). Otros MSR que han sido reportados en zonas geotermales pero que crecen a valores de pH más elevados (7,0-7,5), como por ejemplo *Desulfotomaculum hydrothermale* y *Desulfotomaculum thermosubterraneum*, también tienen la capacidad de oxidar las fuentes de carbono y energía incompletamente a ácido acético (Kaksonen y col., 2006; Haouari y col., 2008). En cambio, *Dsb. acidavidus* CL4, muy cercano filogenéticamente a esta especie, es capaz de oxidar completamente el glicerol a CO<sub>2</sub> (Johnson y col., 2009).

Algunos MSR que oxidan completamente la fuente de carbono (FCE), suelen excretar ácido acético antes de oxidarlo a CO<sub>2</sub>. Esto es debido a que la velocidad de formación de acetil-CoA es mayor que la velocidad de oxidación de la FCE. El exceso de acetil-CoA es convertido a ácido acético y excretado (Widdel y col., 1992), acumulándose en pequeñas cantidades en el medio de cultivo. Para decidir si la descrita es la situación de esta nueva especie de *Desulfobacillus*, se estudió su capacidad de utilizar ácido acético como FCE. Para ello, se tomaron colonias en placas overlay, conteniendo medio de cultivo descrito anteriormente, y se las colocó en placas con medio de cultivo (no overlay, debido a que *Acidocella* PFBC utilizaría el acético agregado como FCE) que contenía solamente ácido acético 6mM como FCE y 0,002% de extracto de levadura a pH 4,5. Las placas fueron incubadas a 40°C en condiciones anaeróbicas durante aproximadamente 20 días. El ensayo fue realizado por triplicado. Luego de transcurrido ese tiempo, las placas fueron removidas y observadas para constatar la formación de colonias. No se detectaron colonias en las placas conteniendo ácido acético como fuente de carbono y energía, confirmando que esta especie no puede oxidar ácido acético y que la oxidación de glicerol es incompleta. Estos resultados confirman la ecuación de oxidación de glicerol descrita anteriormente.

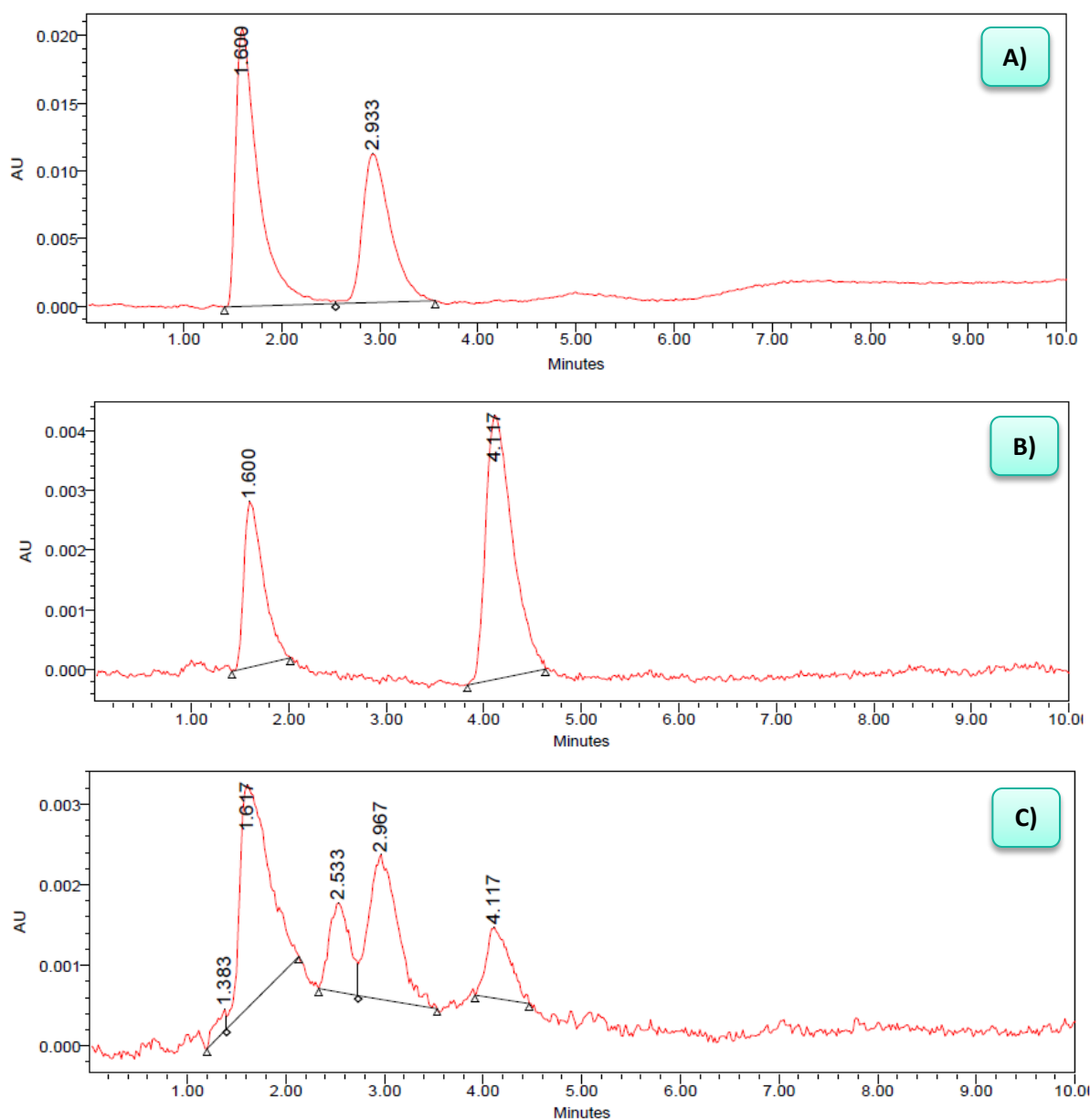
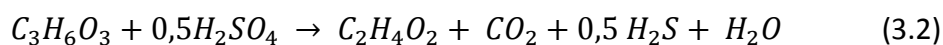
La figura 3.20 muestra las concentraciones iniciales y finales (luego de 20 días) de lactato y sulfato para el cultivo de la nueva especie de *Desulfotomaculum*. La población microbiana final fue  $1,02-1,07 \times 10^8$  células/mL en los cultivos.



**Figura 3.26.** Concentraciones de lactato y sulfato iniciales y luego de 20 días de incubación en cultivos puros de la nueva especie de *Desulfotomaculum*

Se observa que la desaparición de lactato se correlaciona con la del sulfato, indicando crecimiento microbiano. El análisis cuantitativo de los resultados obtenidos muestra que 30 mmoles de ácido láctico fueron oxidados por cada 15 mmoles de sulfato reducidos. La figura 3.21 muestra los cromatogramas para patrones de lactato y de ácido acético cuyos tiempos de retención son 2,9 y 4,1 minutos respectivamente, y para el cultivo de la especie de *Desulfotomaculum* luego de 20 días de incubación. Se detectó la presencia de ácido acético en los cultivos de la nueva especie de *Desulfotomaculum*, que se produce por la oxidación incompleta de lactato. Existe otro pico relevante con un tiempo de retención de 2,5 minutos y que podría corresponder a otro producto del metabolismo que no pudo ser identificado.

Teniendo en cuenta los datos cuantitativos y la presencia de ácido acético la ecuación que corresponde a la estequiometría es la siguiente:



**Figura 3.21.** Cromatogramas obtenidos en HPLC para determinar ácidos orgánicos. **A)** Patrón 500 mg/L de ácido láctico, **B)** Patrón de 200 mg/L de ácido acético, **C)** Cultivo con lactato como FCE.

En definitiva, estos ensayos demuestran que esta especie de *Desulfotomaculum* es un “oxidante incompleto”. Este comportamiento también fue reportado en otras especies de *Desulfotomaculum*, *D. thermobeinzoicum* subsp. *thermosyntrophicum* y *D.*



*thermocisternum* (Plugge y col., 2002; Nilsen y col., 1996), que están relacionadas filogenéticamente con la especie reportada en este trabajo. *Desulfotomaculum intricatum*, en cambio, no oxida lactato a expensas de la reducción de sulfato (Watanabe y col., 2013).

### **III.4.3. Influencia del pH**

#### **III.4.3.1. Metodología**

Para estudiar el efecto del pH en la nueva especie de *Desulfobacillus*, se utilizó el medio aSRB (Anexo II) utilizando glicerol como fuente de carbono y energía y a diferentes valores de pH: 2,5, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 y 7,0. A diferencia del medio original, se ajustó una concentración menor de Zn(II) (1 mM) en el cultivo de pH 7 debido a que en concentraciones mayores se observa la precipitación de especies básicas de Zn(II). Ocho ml de este medio se inocularon con 2 mL de un cultivo conteniendo  $1 \times 10^8$  células/mL (pH 4,5). Los frascos fueron incubados durante 20 días a 40°C en jarras de anaerobiosis.

La influencia del pH en el crecimiento la nueva especie de *Desulfotomaculum* se estudió en medio Postgate B (Anexo II), ajustado a diferentes valores de pH 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 y 7,0; este último fue utilizado como control de crecimiento. El ensayo se realizó inoculando 1 mL de cultivo crecido en medio Postgate B, de pH 7,0, en 9 mL de medio al pH requerido. Los cultivos fueron incubados durante 20 días a 40°C.

En ambos ensayos todos los sistemas se realizaron por quintuplicado. Se contó con controles abióticos y, además, un frasco en cada condición que se discontinuó al inicio del experimento para determinar las concentraciones iniciales.

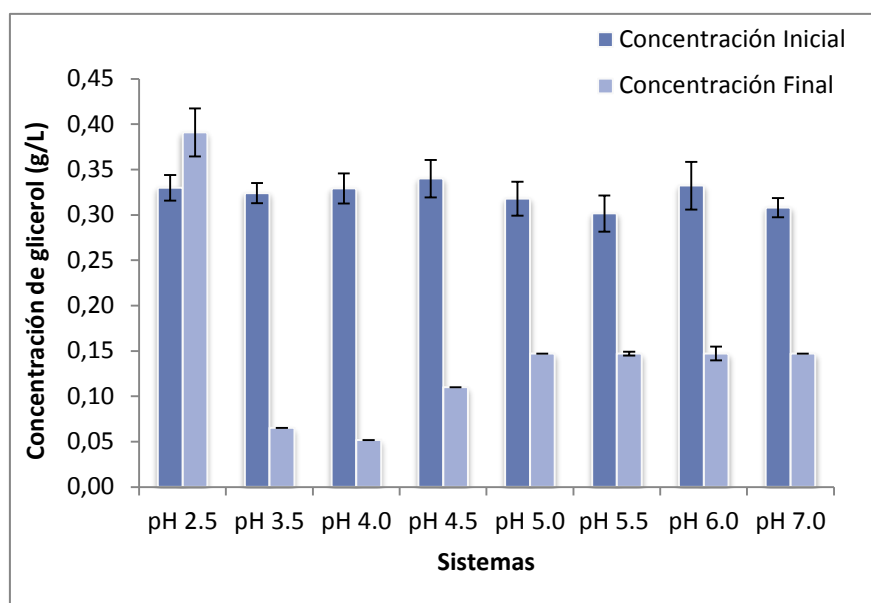
Al final de la experiencia se determinó la concentración de glicerol con un kit enzimático colorimétrico, para la especie de *Desulfobacillus* y se midió la concentración de sulfato remanente por turbidimetría en los cultivos de la especie de *Desulfotomaculum*. Para ambas especies se hicieron recuentos de células en un microscopio óptico con contraste de fases.

Para la especie de *Desulfotomaculum*, en aquellos valores de pH en los cuales se observó desarrollo, se realizó una cinética de crecimiento. Para ello 2,5 mL de los cultivos crecidos a los diferentes valores de pH se colocaron en 22,5 mL del medio de cultivo Postgate B al pH correspondiente. Los frascos fueron incubados a 40°C y se tomaron muestras a diferentes tiempos para medir la concentración de sulfato remanente por turbidimetría. Las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) para cada valor de pH se calcularon utilizando la misma ecuación indicada en el capítulo 2 (sección II.4.1.2).

En el caso de la especie de *Desulfobacillus* debido a que estos ensayos se realizaron en jarras de anaerobiosis, no fue posible obtener las cinéticas de crecimiento.

#### **III.4.3.2. Resultados y discusión**

La figura 3.22 muestra las concentraciones iniciales y finales (luego de 20 días) de glicerol para los cultivos de la especie de *Desulfobacillus*, con diferentes valores iniciales de pH. En la tabla 3.4 se indica si hubo o no formación de ZnS observada cualitativamente en el sistema respecto de la observada en el cultivo de referencia que es el de pH 4,5 (++: similar al control; +: menor al control; -: sin formación de precipitado).



**Figura 3.22.** Concentraciones iniciales y finales de glicerol en los cultivos de la nueva especie de *Desulfobacillus* a diferentes valores iniciales de pH.

**Tabla 3.4.** Precipitación de ZnS en los cultivos de la nueva especie de *Desulfobacillus* a diferentes valores iniciales de pH

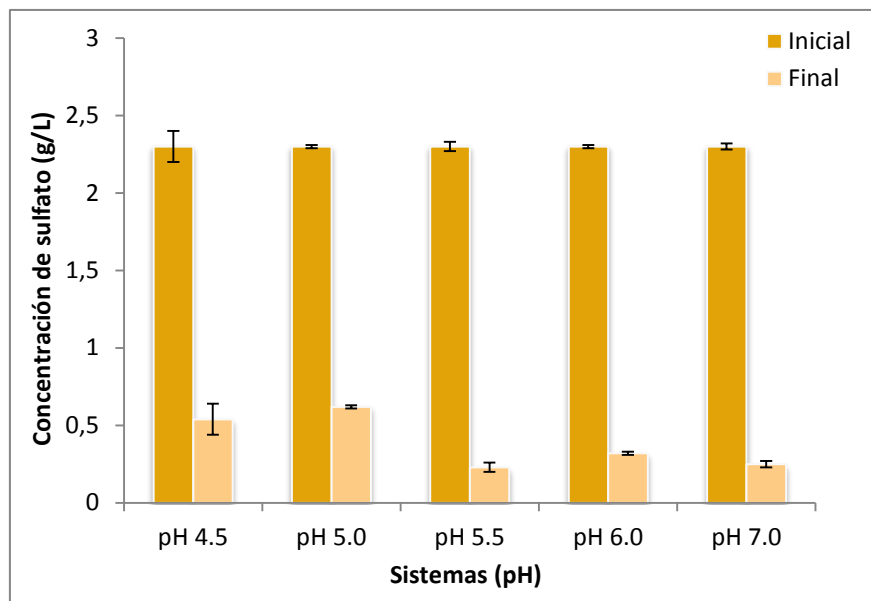
Sistema (pH)	Formación de ZnS
2,5	--
3,5	++
4,0	++
4,5	++
5,0	+
5,5	+
6,0	+
7,0	+

De acuerdo al consumo de glicerol y a la aparición o no de precipitado, se puede comprobar que esta especie de *Desulfobacillus* no fue capaz de desarrollarse a valores de pH menores a 3,5, al menos, después de 20 días de incubación. En el rango de pH entre 3,5 y 4,5 se observa una disminución de aproximadamente 85 % del glicerol inicial. En todos los casos se detectó la aparición de gran cantidad de precipitado de ZnS.

En el rango de pH entre 5,0 y 7,0 el consumo de glicerol es 56 % del inicial lo que es bastante menor que el observado para los cultivos a valores de pH más ácidos. La precipitación de Zn(II) fue consecuentemente menos abundante.

Los resultados indican que esta especie de *Desulfobacillus* es capaz de crecer y reducir sulfato con glicerol como dador de electrones, dentro de un amplio rango de pH (desde 3,5 hasta 7,0 y tal vez mayores) con un valor óptimo entre 3,5 y 4,5, lo que lo define como un acidófilo moderado (Norris y Johnson, 1998). *Desulfobacillus acidavidus* CL4 presenta un comportamiento semejante: crece en un amplio rango de pH (3,5-6,0) pero con pH óptimo de 5,0 (Johnson y col., 2009). Esta nueva especie parece tolerar mejor la acidez y crece en un rango más amplio de pH.

La figura 3.23 muestra las concentraciones de sulfato iniciales y a los 20 días de incubación, en los medios con diferentes valores de pH para la nueva especie de *Desulfotomaculum*.



**Figura 3.23.** Concentración de sulfato inicial y luego de 20 días de incubación para cultivos de la especie de *Desulfotomaculum* a diferentes valores iniciales de pH

En los cultivos con pH inicial 4,5 y 5,0, los porcentajes de reducción de sulfato fueron 78 y 74%, respectivamente mientras que a pH mayores, el mismo fue 91%. En la

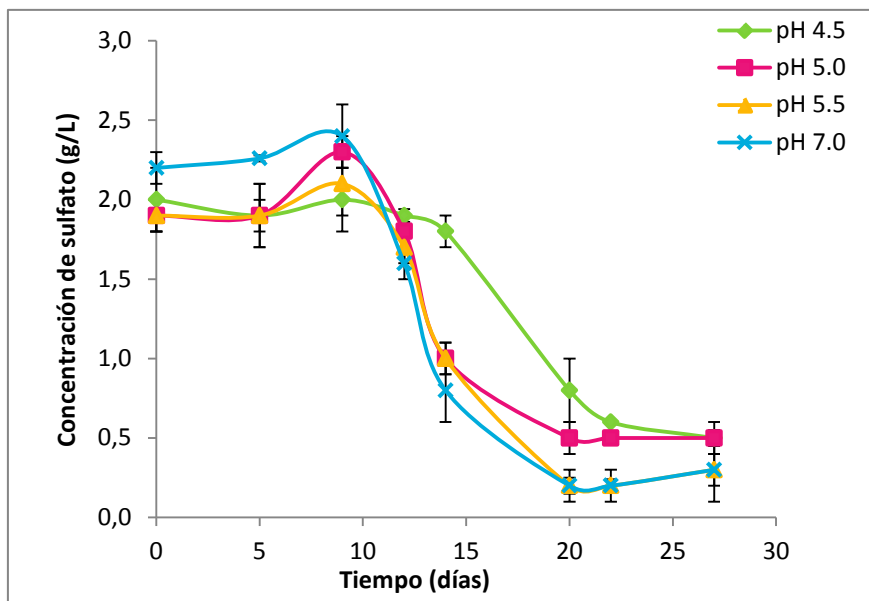
figura 3.24 se muestran las fotografías de los cultivos con valores iniciales de pH de 4,5 (A), 5,0 (B) y 7,0 (C).



**Figura 3.24.** Fotografías de los cultivos a diferentes valores iniciales de pH. El frasco de la derecha en cada fotografía es el control sin inocular. **A)** pH 4,5; **B)** pH 5,0; **C)** pH 7,0.

En los cultivos a menores pH, las poblaciones bacterianas finales fueron menores:  $8,0-8,2 \times 10^7$  células/mL. En estos casos, las células son más pequeñas que en los cultivos a mayores valores de pH y la mayoría se encontraban con esporas terminales o sub-terminales. La aparición de esporas es consecuencia del estrés debido al cambio de pH, ya que cuando estos cultivos fueron re-sembrados en medios frescos al mismo pH la producción de esporas fue menor. Los cultivos con valores de pH inicial de 5,5, 6,0 y 7,0 presentaron poblaciones microbianas finales de  $1,02 \times 10^8$  células/mL, correlacionado con la mayor reducción de sulfato en esos cultivos.

La figura 3.25 muestra las curvas de crecimiento para los cultivos con diferentes valores iniciales de pH. En la tabla 3.5 se muestran los valores de  $\mu_{\text{máx}}$  calculados para cada cultivo.



**Figura 3.25.** Curvas de crecimiento para los cultivos de la nueva especie de *Desulfotomaculum* a distintos valores iniciales de pH

**Tabla 3.5.** Valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$  en los cultivos con distintos valores iniciales de pH

	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 7,0
$\mu_{m\acute{a}x}(h^{-1})$	0,009	0,014	0,014	0,017

Las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) para esta especie de *Desulfotomaculum* se corresponden con las reportadas para otros microorganismos de metabolismo semejante. La velocidad específica de crecimiento aumenta a medida que el cultivo tiene un pH inicial más alto, aunque es apenas ligeramente mayor para el cultivo de pH 7,0 que para los cultivos con pH 5,0 y 5,5. No obstante, la cantidad residual de sulfato es menor para estos dos últimos cultivos.

Los resultados descriptos indican que esta especie de *Desulfotomaculum* es capaz de desarrollarse en un rango de pH entre 4,5 y 7,0 y su crecimiento óptimo se produce a un pH cercano a 7,0. Estos valores son habituales para las especies de este género y son pocas las que logran desarrollarse a valores de pH menores a 5. Plugge y col (2002) han reportado que *Desulfotomaculum thermobeinzoicum* subsp. *thermosyntrophicum* tiene un pH óptimo de crecimiento entre 7,0 y 7,5, y su velocidad específica de crecimiento es  $0,015 h^{-1}$  con piruvato como FCE. *Desulfotomaculum*

*solfataricum* presenta una velocidad específica de crecimiento de  $0,017 \text{ h}^{-1}$  a pH 7,3 y con metanol como FCE (Goorissen y col., 2003). Otra especie del género, *Desulfotomaculum hydrothermale*, aislada de fuentes termales, es capaz de crecer en un rango de pH entre 5,8 y 8,2 (Haouari y col., 2008).

#### **III.4.4. Influencia de la temperatura**

##### **III.4.4.1. Metodología**

El efecto de la temperatura en el crecimiento de la nueva especie de *Desulfobacillus* se realizó a 30°C, 40°C y 45°C. En este caso, se utilizaron las mismas placas overlay que para los aislamientos (Anexo II). Se mantuvo el pH (4,5) y la fuente de carbono y energía (glicerol). Se tomaron colonias de placas overlay que presentaban crecimiento y se las sembró en placas con medio fresco. Las placas fueron colocadas en jarras de anaerobiosis a las temperaturas correspondientes. Cada placa fue realizada por triplicado. Luego de 20 días se determinó la presencia o ausencia de colonias.

Debido a que estos ensayos se realizaron en jarras de anaerobiosis, no fue posible obtener las cinéticas de crecimiento.

Para estudiar el efecto de la temperatura en la nueva especie de *Desulfotomaculum*, se utilizó el medio Postgate B, a pH 7,0 y con lactato de sodio como FCE. Las temperaturas seleccionadas fueron 30, 40 (tomado como control de crecimiento), 45 y 50°C. Se inoculó 1 mL de un cultivo crecido en 9 mL de medio Postgate B previamente esterilizado. Cada sistema se realizó por quintuplicado y se utilizó un frasco para la determinación de las medidas iniciales. Los cultivos se incubaron a la temperatura correspondiente durante 20 días y luego se determinaron las concentraciones finales de sulfato.

Luego de establecer los valores de temperatura en los cuales se observó crecimiento se realizó una cinética de crecimiento en cada condición. Las velocidades

específicas de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para cada temperatura se calcularon como en los ensayos anteriores.

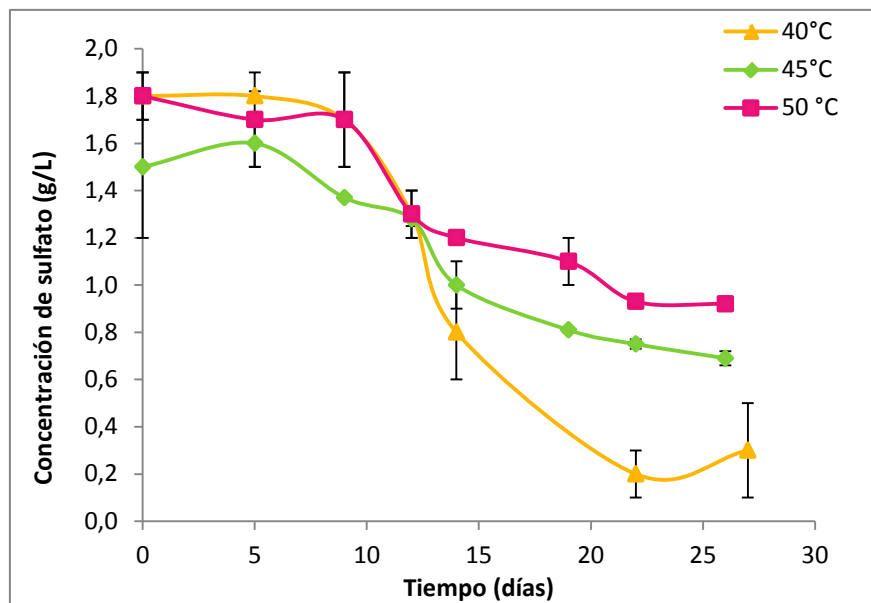
#### **III.4.4.2. Resultados y discusión**

La nueva especie de *Desulfobacillus* creció significativamente a 30 y a 40°C. La cantidad de colonias disminuyó significativamente en las placas inoculadas a 45°C. El crecimiento en placa no es indicativo de la temperatura óptima de crecimiento, ya que intervienen varios factores como, por ejemplo, la deshidratación que puede sufrir el medio a elevadas temperaturas. No obstante, estos resultados sugieren que esta especie presenta un crecimiento óptimo entre 30 y 40°C. *Dsb. acidavidus* CL4 y la mayoría de las especies de bacterias sulfato-reductoras acidófilas, tienen temperaturas óptimas de crecimiento de aproximadamente 30°C (Alazard y col., 2010; Johnson y col., 2009; Sánchez-Andrea y col., 2014).

Para la nueva especie de *Desulfotomaculum* se observó crecimiento microbiano, comprobado por la formación de precipitado y disminución de la concentración de sulfato, a 40, 45 y 50°C. No se observó formación de precipitado en los cultivos ensayados a 30°C.

La figura 3.26 muestra las cinéticas de reducción de sulfato en función del tiempo para las diferentes temperaturas. En la tabla 3.6 se encuentran las velocidades de crecimiento calculadas.





**Figura 3.26.** Curvas de crecimiento para los cultivos de la nueva especie de *Desulfotomaculum* a distintos valores de temperatura

**Tabla 3.6.** Valores de  $\mu_{\text{máx}}$  en los cultivos a distintas temperaturas

	40°C	45°C	50°C
$\mu_{\text{máx}}(\text{h}^{-1})$	0,017	0,007	0,008

Aunque se observó crecimiento, los cultivos a temperaturas mayores a 40°C tienen una velocidad específica mucho menor que a 40°C. Esta temperatura óptima de crecimiento está bastante lejos de los valores reportados para los microorganismos del subcluster Id al cual esta especie se aproxima filogenéticamente. Las especies en este subcluster tienen temperaturas óptimas entre 55 y 68°C (Goorissen y col., 2003; Love y col., 1993; Min y Zinder, 1990; Nilsen y col., 1996; Plugge y col., 2002; Tasaki y col., 1991). En cambio, se acerca más a la temperatura óptima de algunas especies dentro del subcluster Ie, como *D. intricatum* y *D. acetoxidans* (Watanabe y col., 2013; Widdel y Pfenning, 1977).

#### III.4.5. Influencia de las fuentes de carbono

Los MSR pueden utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía, pero con variaciones importantes en rendimientos en biomasa y reducción de sulfato (Cao y col., 2012). Debido a eso, la elección de una fuente de carbono y energía apropiada para la reducción de sulfato por MSR, es esencial para el tratamiento de efluentes conteniendo elevadas concentraciones de sulfato y metales pesados. En esta sección se discuten los resultados de experiencias realizadas con cultivos de las nuevas especies de *Desulfobacillus* y *Desulfotomaculum*, que contienen diferentes fuentes de carbono y de energía.

##### III.4.5.1. Metodología

Para estudiar la oxidación de diferentes fuentes de carbono y energía (FCE) por la nueva especie de *Desulfobacillus*, los ensayos fueron realizados en el medio de cultivo aSRB (Anexo II) manteniendo un valor de pH inicial fijado en 4,5. El medio se preparó utilizando la menor cantidad posible de extracto de levadura, para que el crecimiento esté limitado por la fuente de carbono que se agrega. Además se burbujeo N<sub>2</sub> para remover el O<sub>2</sub> presente y se esterilizó en autoclave. En cada frasco se colocaron 8 mL del medio y 2 mL del inóculo que correspondía a un cultivo de esta especie de *Desulfobacillus* en estado exponencial. Posteriormente, se agregó la cantidad de solución concentrada (1M o 0,1M dependiendo del caso) de fuente de carbono y energía manteniendo la cantidad en c-moles de glicerol (3mM=  $9,03 \times 10^{-3}$  c-moles/L) que contiene el medio original.

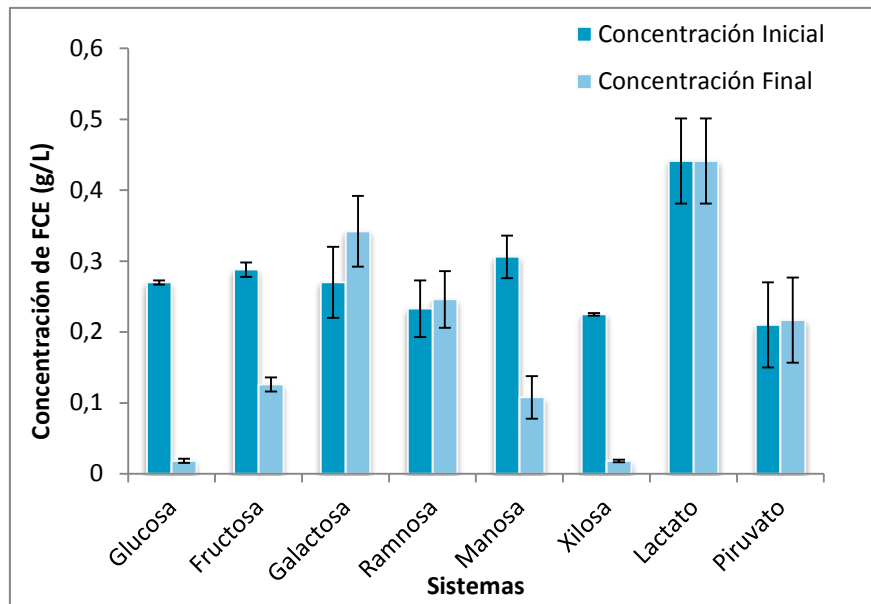
Para estudiar la oxidación de diferentes fuentes de carbono y energía (FCE) por la nueva especie de *Desulfotomaculum*, se inoculó 1 mL de cultivo crecido en 9 mL de medio Postgate B, de pH 7,0, variando la FCE manteniendo la cantidad en carbono mol que hay en el medio con 3,5 g de lactato. Al igual que para la especie de *Desulfobacillus* se utilizó una menor cantidad de extracto de levadura en el medio de cultivo.

Para ambas especies todos los sistemas se realizaron por quintuplicado y se utilizó un frasco para realizar las medidas iniciales que luego no fue incluido en el ensayo. Los frascos se incubaron a 40 °C, en jarras de anaerobiosis para la especie de *Desulfobacillus* y cerradas con tapa de goma y virola metálica para la especie de *Desulfotomaculum*. Las FCE utilizadas fueron azúcares como glucosa, fructosa, galactosa, manosa, xilosa y ramnosa), sales de ácidos orgánicos (piruvato y lactato) y alcoholes (etanol). Todos los sistemas se realizaron por quintuplicado y se utilizó un frasco para realizar las medidas iniciales que luego no fue incluido en el ensayo.

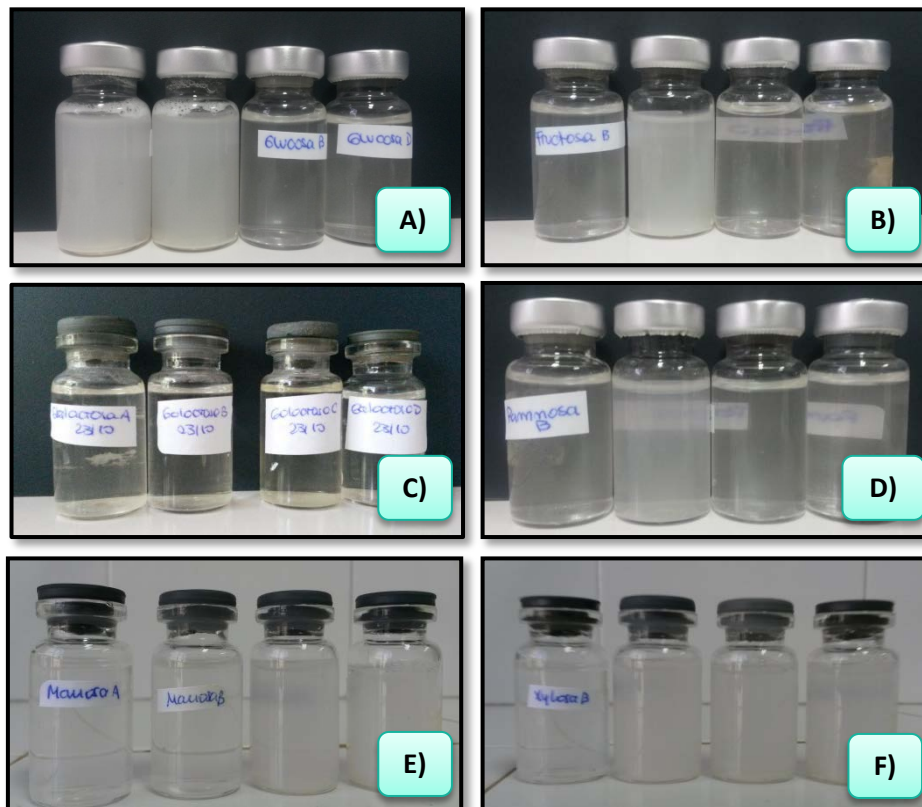
Luego de 20 días de incubación, se midieron las concentraciones de los sustratos (excepto el glicerol) mediante HPLC. Se determinaron las concentraciones de sulfato remanente por turbidimetría, para la especie de *Desulfotomaculum*, y se realizaron recuentos y observaciones al microscopio óptico para observar cambios morfológicos.

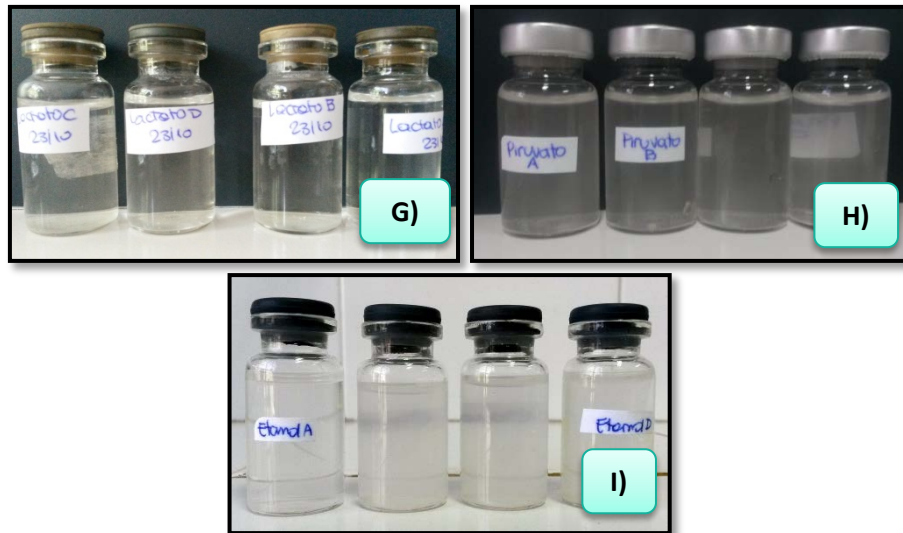
#### **III.4.5.2. Resultados y discusión**

La figura 3.27 muestra las concentraciones iniciales y finales de los diferentes azúcares y ácidos orgánicos ensayados como FCE en la especie de *Desulfobacillus*. La figura 3.28 muestra las fotografías de los sistemas; en ellos puede observarse la formación de precipitado blanco en los cultivos con crecimiento positivo.



**Figura 3.27.** Concentraciones iniciales y finales de la FCE en los cultivos de una nueva especie de *Desulfobacillus*. Por problemas experimentales la concentración de etanol no pudo ser determinada





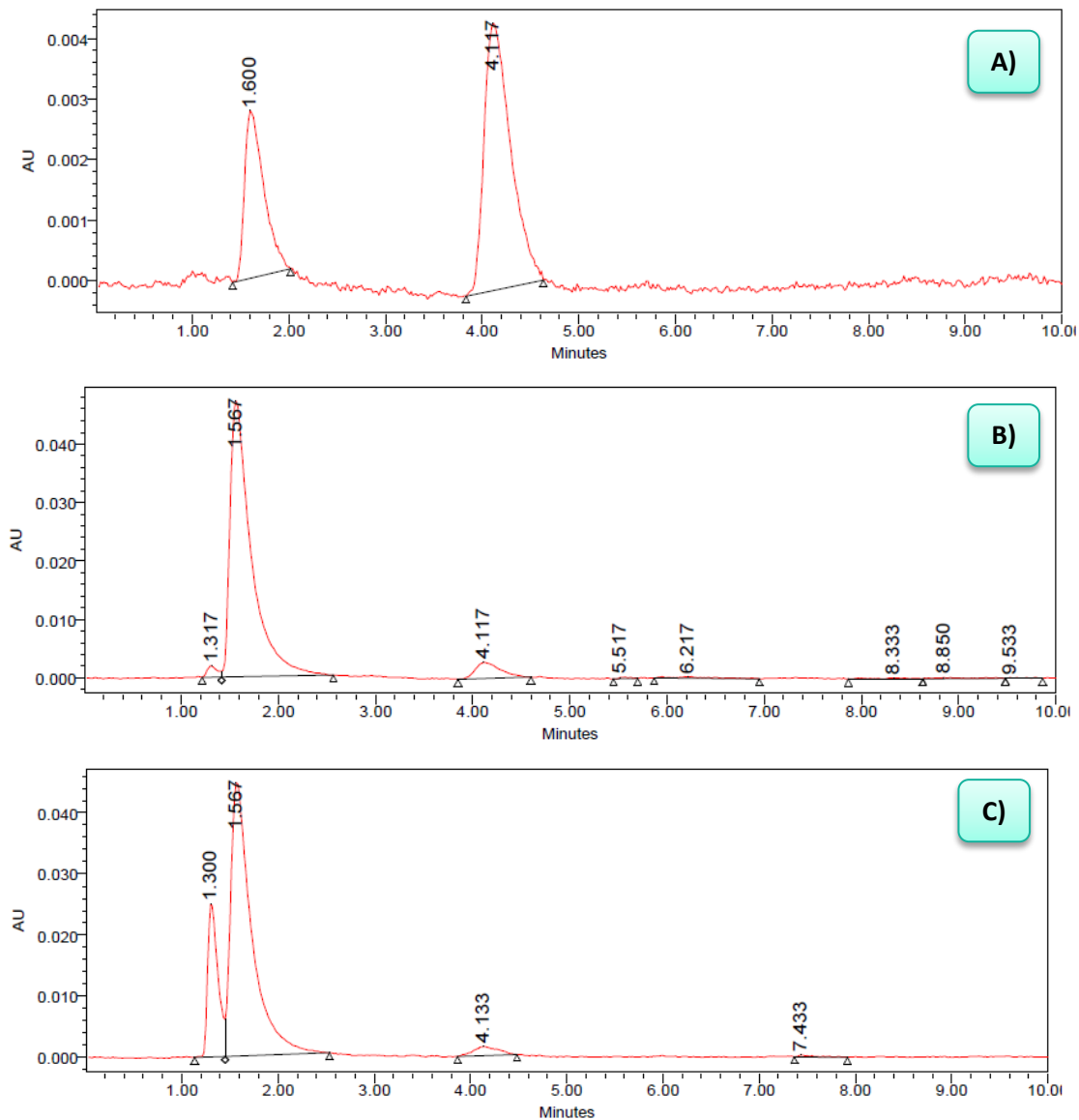
**Figura 3.28.** Fotografías de los cultivos con distintas FCE **A)** Glucosa, **B)** Fructosa, **C)** Galactosa, **D)** Ramnosa, **E)** Manosa, **F)** Xilosa, **G)** Lactato, **H)** Piruvato, **I)** Etanol

Los resultados indican que esta especie de *Desulfobacillus* es capaz de crecer utilizando glucosa, fructosa, manosa, xilosa y etanol como FCE (aun cuando en el último caso no se pudo medir la variación de la concentración de sustrato). De ellos, consumió glucosa y xilosa en mayor medida (las concentraciones finales de estas FCE son del orden de 0,02g/L) lo que se tradujo en mayor precipitación. La población final en estos cultivos es aproximadamente  $1 \times 10^8$  células/mL que es similar al valor obtenido para los cultivos con glicerol. No se observaron cambios significativos en la morfología bacteriana.

En los cultivos con manosa y fructosa, la concentración final de la FCE se ubicó entre 0,11-0,13 g/L y se observó una población microbiana menor al finalizar el crecimiento. En la figura 3.28 I puede observarse la formación de ZnS para los cultivos con etanol como FCE. Además se observó la presencia de bacilos esporulados en una cantidad similar a la observada para manosa y fructosa, indicando que esta especie de *Desulfobacillus* es capaz de crecer utilizando etanol.

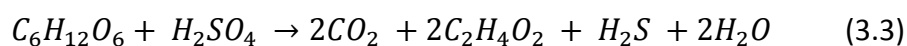
Finalmente, esta especie no fue capaz de crecer utilizando ramnosa, galactosa, lactato y piruvato como FCE.

Para detectar la presencia de ácido acético, que surgiría de la oxidación incompleta de la FCE, se utilizó HPLC con una columna específica para la determinación de ácidos orgánicos y un detector UV. En la figura 3.29 se muestran los cromatogramas obtenidos para un patrón de 200 mg/L de ácido acético y las muestras de glucosa y xilosa.

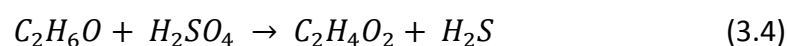


**Figura 3.29.** Cromatogramas obtenidos en HPLC. **A)** Patrón 200 mg/L ácido acético, **B)** Cultivo con glucosa como FCE, **C)** Cultivo con xilosa como FCE

El ácido acético sufre un tiempo de retención de 4,1 minutos (figura 3.29 A). Se comprueba la presencia de un pico similar en los cultivos usando glucosa y xilosa como FCE. La ecuación de oxidación de glucosa a expensas de la reducción de sulfato puede escribirse de la siguiente manera:



En los cultivos con fructosa, manosa y etanol también se detectó ácido acético. La manosa también es un aldehído de 6 carbonos, epímero de la glucosa en el carbono 2, y la fructosa es una cetona de 6 carbonos por lo que la ecuación de oxidación también puede escribirse igual que la reacción 3.2. Por otro lado, la ecuación de oxidación de etanol puede escribirse de la siguiente manera:



En la tabla 3.7 se muestran los valores de pH medidos luego de 20 días en los cultivos con las distintas FCE. Los valores iniciales de pH fueron en todos los casos de alrededor de 4,6.

**Tabla 3.7.** Valores de pH para los cultivos con diferentes azúcares

<i>FCE</i>	<i>pH</i>
Glucosa	4,45 ± 0,07
Fructosa	4,9 ± 0,1
Galactosa	4,4 ± 0,1
Ramnosa	4,5 ± 0,1
Manosa	4,8 ± 0,5
Xilosa	4,6 ± 0,4
Lactato	4,5 ± 0,2
Piruvato	4,4 ± 0,1
Etanol	5,69 ± 0,06

La tabla 3.7 muestra que el pH para los cultivos con glucosa, fructosa, manosa y xilosa es ligeramente superior al valor inicial. Cuando se utiliza etanol como FCE el pH de los cultivos asciende 1 unidad. Estos resultados se condicen con la neutralización que se observa en los cultivos de MSR.

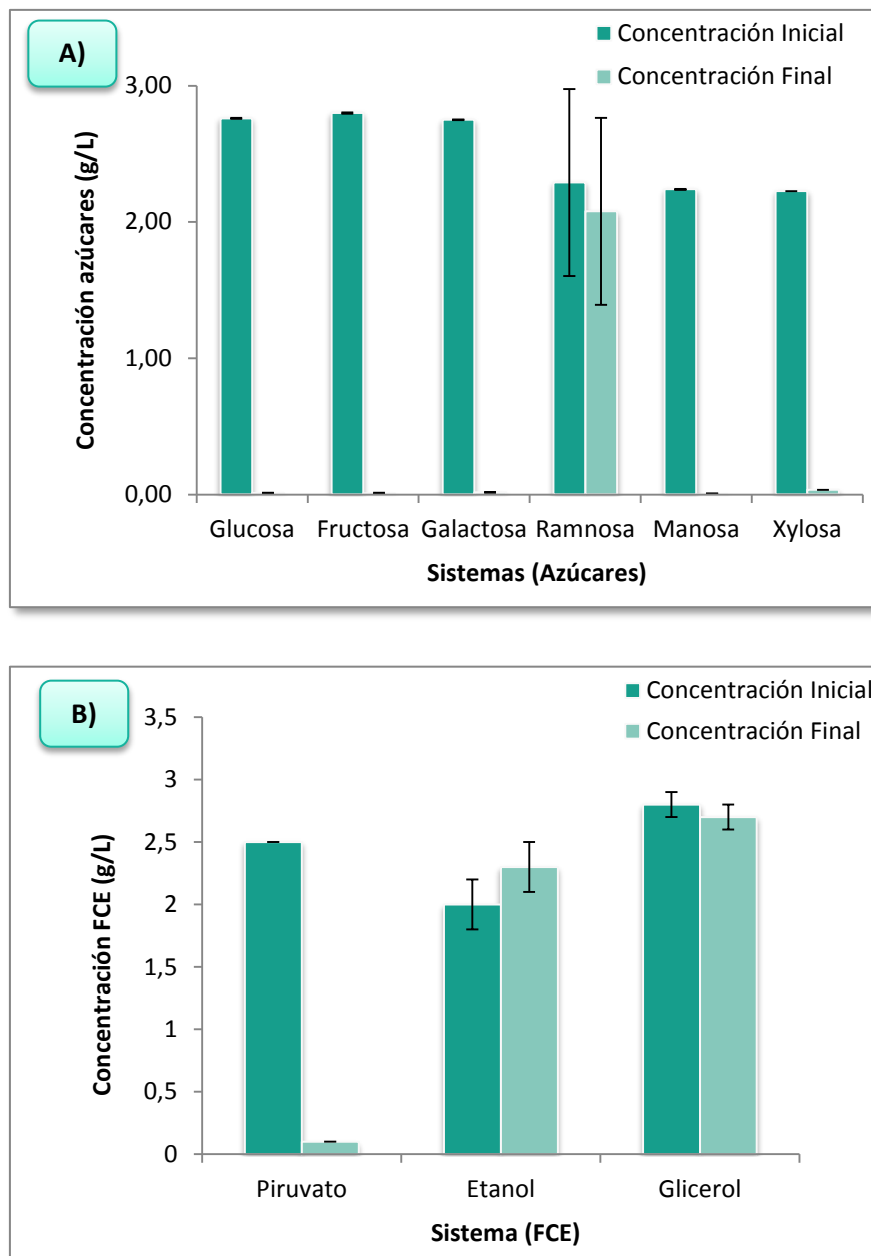
Teniendo en cuenta las ecuaciones 3.1 (sección III.4.2.2), 3.2 y 3.3 y que al pH inicial el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  se encuentra prácticamente dissociado en forma completa, se observa que la neutralización que se produce en los cultivos con etanol es ligeramente mayor que la observada en los que contienen glicerol. Esto se debe a que la oxidación incompleta del etanol consume 2 moles de protones por mol de sustrato, mientras que en la oxidación incompleta del glicerol se consumen 1,5 moles de protones por mol de sustrato. En ambos casos se produce 1 mol de ácido acético por mol de sustrato.

Por otro lado, el ligero aumento en los valores de pH al utilizar azúcares se debe a que, se consumen 2 moles de protones por mol de sustrato al igual que en el etanol pero se generan 2 moles de ácido acético. A pesar de ser un ácido débil, puede contribuir al pequeño aumento en el valor del pH.

En *Desulfosporosinus acididurans*, que también es una bacteria acidófila moderada, se observó que es capaz de crecer utilizando glucosa, xilosa y fructosa (Sánchez-Andrea y col., 2014), mientras que *Desulfosporosinus acidiphilus* sólo utiliza fructosa como FCE (Alazard y col., 2010). El etanol ha sido utilizado en varios reactores anaerobios con bacterias sulfato-reductoras (Dar y col., 2007). *Desulfovibrio desulfuricans* y *Desulfovibrio postgatei* son capaces de oxidar el etanol completamente a  $\text{CO}_2$  (Liamleam y Annachatre, 2007).

Las figuras 3.30 A y B muestran las concentraciones iniciales y finales de las distintas FCE utilizadas con la nueva especie de *Desulfotomaculum*. La concentración inicial de FCE equivale a 0,09 c-moles/L.

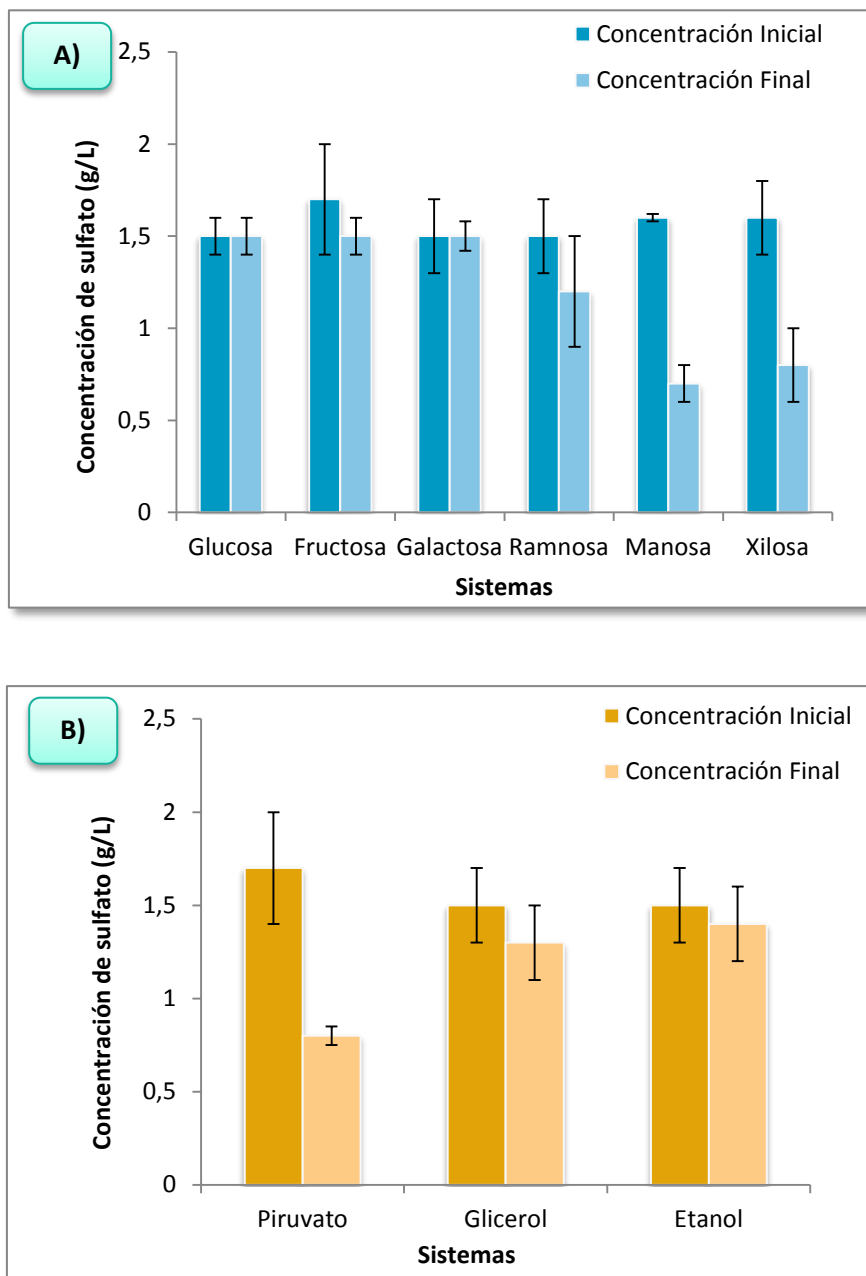




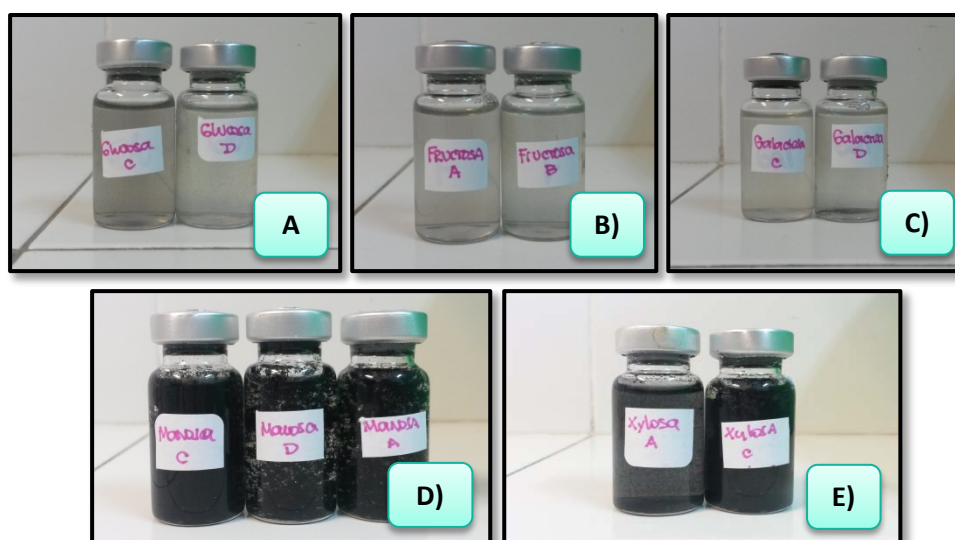
**Figura 3.30.** Concentraciones iniciales y finales del sustrato en cultivos de la nueva especie de *Desulfotomaculum* con distintas FCE. **A)** Azúcares, **B)** Piruvato y alcoholes.

Los resultados indican que esta especie de *Desulfotomaculum* es capaz de crecer utilizando glucosa, fructosa, galactosa, manosa, xilosa y piruvato como FCE. En todos estos casos, el consumo de la FCE fue prácticamente total. Por el contrario, no pudo utilizar ramnosa, etanol y glicerol como FCE (figura 3.32). Aunque no se observaron cambios significativos en la morfología celular respecto de la observada en lactato, en los cultivos con xilosa y manosa se observó la presencia de endoesporas.

Las figura 3.31 A y B muestran las concentraciones iniciales y finales de sulfato en los mismos cultivos y en la figura 3.32 se observan fotografías de los sistemas con azúcares luego de 20 días de incubación. En la tabla 3.8 se indican los valores de pH para los cultivos con las distintas FCE luego de 20 días de incubación.



**Figura 3.31.** Concentraciones iniciales y finales de sulfato en los cultivos de la nueva especie de *Desulfotomaculum* con distintos FCE. **A)** Azúcares, **B)** Piruvato y alcoholes



**Figura 3.32.** Fotografías de los cultivos de la nueva especie de *Desulfotomaculum* con distintas FCE. **A)** Glucosa, **B)** Fructosa, **C)** Galactosa, **D)** Manosa, **E)** Xilosa.

**Tabla 3.8.** Valores finales de pH en los cultivos con diferentes FCE

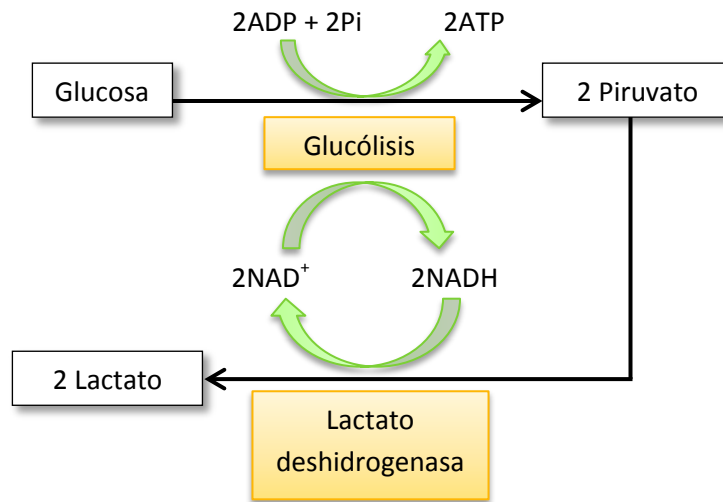
<i>FCE</i>	<i>pH</i>
Glucosa	4,45 ± 0,06
Fructosa	4,26 ± 0,06
Galactosa	4,9 ± 0,4
Ramnosa	7,4 ± 0,3
Manosa	6,81 ± 0,08
Xilosa	6,8 ± 0,5
Piruvato	6,7 ± 0,4
Etanol	7,6 ± 0,2
Glicerol	7,5 ± 0,3

Las figuras 3.31 y 3.32 muestran que en los sistemas conteniendo glucosa, fructosa y galactosa no se produce la reducción de  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{S}^{2-}$  ya que no existe un descenso significativo de la concentración de sulfato y tampoco la formación de precipitado de  $\text{FeS}$ . Estos resultados –y el significativo descenso del pH observado en

estos sistemas (tabla 3.13)- sugieren que estos azúcares podrían ser utilizados a través de un proceso fermentativo.

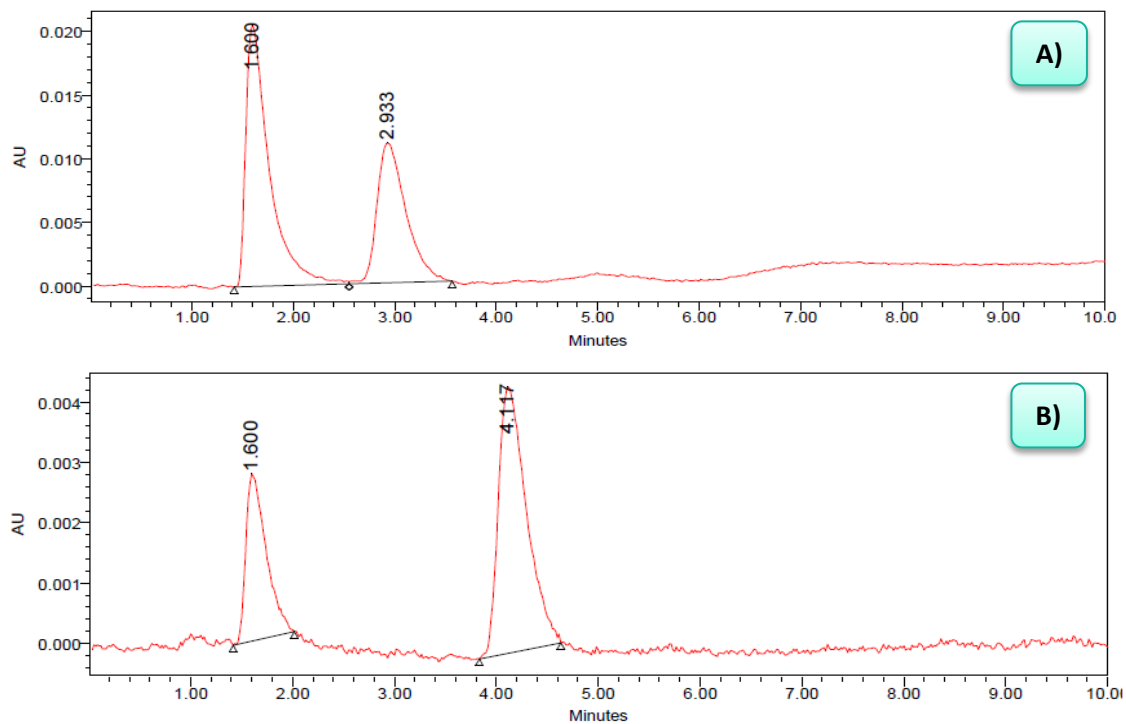
El piruvato, que es producido en la glucólisis a partir de las hexosas, puede seguir tres rutas catabólicas distintas. El piruvato se oxida con pérdida de un grupo carboxílico en forma de  $\text{CO}_2$  y formando ácido acético. Los electrones de las oxidaciones producidas durante la glucólisis pasan, en este caso, al  $\text{SO}_4^{2-}$  que actúa como aceptor final de los electrones. El  $\text{SO}_4^{2-}$  es reducido a  $\text{S}^{2-}$  por lo que produce un descenso de su concentración y la precipitación de algún sulfuro metálico, tal cual se ha observado en el crecimiento de los MSR. El proceso en este caso se conoce como respiración anaeróbica o reacción desasimiladora de  $\text{SO}_4^{2-}$  (ver capítulo I). En la fermentación alcohólica, que se da principalmente en levaduras, el piruvato se reduce a etanol y de esta manera se regenera el poder reductor (Nelson y Cox, 2008).

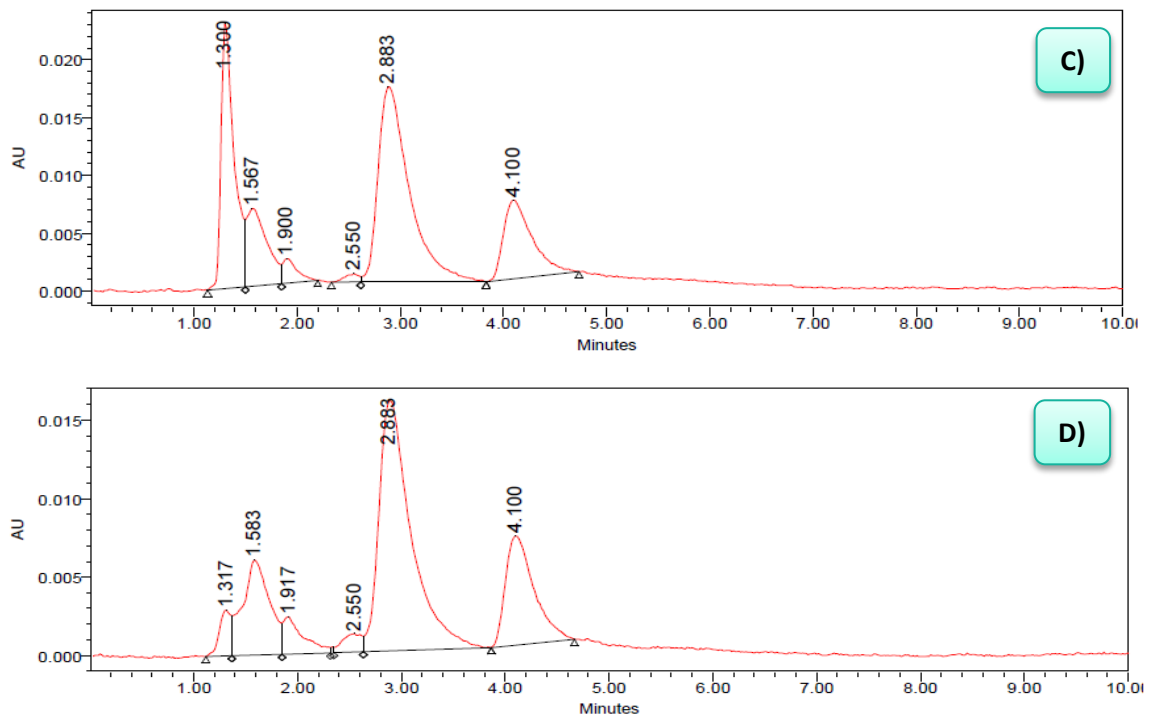
En la fermentación láctica el poder reductor ( $\text{NAD}^+$ ) se regenera a partir del  $\text{NADH}$  a través de la reducción del piruvato a lactato y no en la cadena transportadora de electrones. Por lo que, a diferencia de la reacción desasimiladora de  $\text{SO}_4^{2-}$ , no se observa la disminución de su concentración. La reducción de piruvato a lactato es catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (figura 3.33). En la fermentación heteroláctica se produce, además de ácido láctico, otros productos como el acético, fórmico, etc. Estos ácidos se acumularán en el medio de cultivo y producirán un significativo descenso del pH (Nelson y Cox, 2008).



**Figura 3.33.** Esquema de la fermentación láctica (Nelson y Cox, 2008).

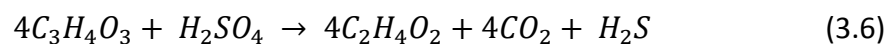
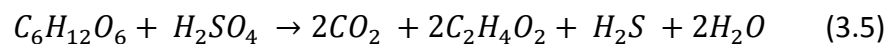
En los cromatogramas mostrados en la figura 3.34 se puede observar la presencia de ácido láctico y acético en los cultivos con glucosa, fructosa y galactosa. Esto confirma el proceso fermentativo descrito anteriormente.





**Figura 3.34.** Cromatogramas obtenidos en HPLC. **A)** Patrón 500 mg/L de ácido láctico, **B)** Patrón de 200 mg/L de ácido acético, **C)** Cultivo con glucosa, **D)** Cultivo con galactosa.

En el caso de los cultivos creciendo con manosa, xilosa y piruvato se observa una disminución significativa de la concentración de sulfato (figura 3.33) y la formación de precipitado de FeS (figura 3.34). Los cromatogramas obtenidos mediante HPLC mostraron en estos casos solo la presencia de ácido acético. Las ecuaciones 3.4 y 3.5 representan la oxidación incompleta de manosa y piruvato a expensas de la reducción de sulfato, respectivamente.



Los valores de pH luego de 20 días de crecimiento para estos dos sustratos se mantienen cercanos a la neutralidad (tabla 3.8). Si bien la reducción de sulfato es un proceso que consume protones, la generación de ácido acético en estos cultivos produce que los valores de pH se mantengan cercanos al inicial. En estos casos no se detectó la formación de ácido láctico mediante HPLC.

Los azúcares son dadores de electrones efectivos que pueden ser degradados fácilmente bajo condiciones anaerobias. No obstante, sólo algunas especies del género *Desulfotomaculum* son capaces de crecer utilizando azúcares como fuente de carbono y energía, tanto en procesos fermentativos como en la respiración anaeróbica (Aullo y col., 2013; Liamleam y Annachhatre, 2007). La única especie que puede utilizar fructosa como FCE en presencia de sulfato como aceptor de electrones es *D. solfataricum*, mientras que otras (*D. nigrificans*, *D. carboxydivorans*, *D. geothermicum* y *D. putei*) tienen además la capacidad de utilizarla en procesos de fermentación, del mismo modo que parece hacerlo la especie que estamos reportando. Por otro lado, las especies más cercanas filogenéticamente a esta especie, como *D. thermobenzoicum* subsp. *thermobenzoicum* y *D. thermobenzoicum* subsp. *thermosyntrophicum*, no tienen la capacidad de utilizar fructosa como FCE y su utilización en procesos de fermentación no ha sido reportado (Kuever y Rainey, 2015).

El piruvato, al igual que el lactato, ha sido ampliamente utilizado en los medios de cultivo para el aislamiento de varias especies de MSR. Dentro del género *Desulfotomaculum*, el piruvato es utilizado en la respiración anaeróbica acoplada a la reducción de sulfato pero también en procesos fermentativos. Algunas de las especies que pueden respirar y fermentar piruvato son *D. thermoacetoxidans*, *D. thermobenzoicum* subsp. *thermobenzoicum*, *D. subterraneum*, *D. nigrificans* y *D. carboxydivorans* (Kuever y Rainey, 2015).

La mayor parte de las especies del género *Desulfotomaculum* son capaces de oxidar el etanol, sin embargo, las más cercanas filogenéticamente a esta especie, *D. thermoacetoxidans* y *D. thermobenzoicum* subsp. *thermosyntrophicum*, no lo utilizan como FCE. Aún muchas menos especies dentro del género parecen utilizar el glicerol (Kuever y Rainey, 2015).

### III.5. SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DE LAS NUEVAS ESPECIES

Debido a que dos de los microorganismos aislados resultaron ser nuevas especies, se decidió realizar la secuenciación del genoma completo de ambos con el fin de obtener mayor información sobre los posibles metabolismos y otras posibles características que puedan estar presentes. Lamentablemente, no se pudo contar a tiempo con el genoma de la especie de *Desulfobacillus*. Debido a ello, sólo se describirán los resultados para el genoma de la especie de *Desulfotomaculum*.

#### III.5.1. Metodología

Para la extracción de ADN genómico de alto peso molecular de los cultivos de las dos nuevas especies, se utilizaron 25 mL de cada cultivo, previamente homogeneizado utilizando un vórtex para despegar las células de los precipitados de sulfuros. Luego los cultivos fueron centrifugados durante unos pocos segundos a 4000 rpm. De esta manera se eliminaron los precipitados quedando las células en el sobrenadante. El sobrenadante se centrifugó 2-4 minutos a 14.000 g para realizar los pellets correspondientes. La operación se realizó por triplicado para cada cultivo. Los pellets fueron utilizados para extraer el ADN genómico con kits comerciales de extracción DNA Easy Blood & Tissue Kit (Qiagen) y Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) siguiendo las instrucciones de cada fabricante. Una vez obtenido el ADN se midió la concentración de ADN utilizando un espectrofotómetro (Nanodrop) y la integridad y tamaño del mismo se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v a 70 mV durante 1 hora. El ADN que no fue degradado debe verse como una banda intensa (dependiendo de la concentración que se haya obtenido y del volumen sembrado en el gel) en la parte superior del gel. Como marcador de peso molecular se utilizó un ladder de 1Kb (Promega). Para la secuenciación del genoma se utilizó un equipo IlluminaMiSeq.

La anotación del genoma fue realizada desde el servidor de Anotación Rápida RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology). En este servidor, la anotación de genomas se hace en base a subsistemas. Un subsistema es una colección de roles funcionales que en conjunto implementan un proceso biológico o un complejo

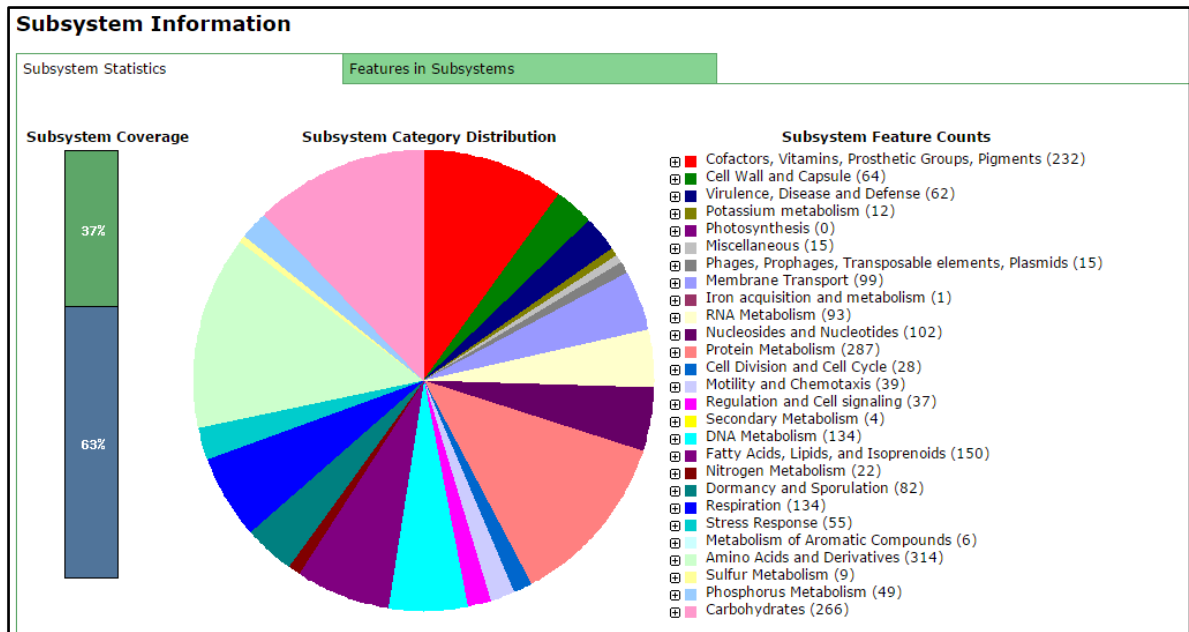


estructural. A su vez estos subsistemas, pueden agruparse en categorías y subcategorías. Las secuencias de los genes de interés en los genomas disponibles de varias especies del género *Desulfotomaculum* (Visser y col., 2013; Visser y col., 2014; Kuever y col., 2014; Spring y col., 2009; Spring y col., 2012), fueron comparadas con el genoma de la especie reportada aquí, en el servidor RAST. Una vez encontradas las secuencias de interés en el genoma, se compararon en el BLASTp para obtener la similitud con las proteínas reportadas en esta base de datos. El análisis bioinformático se realizó en colaboración con los grupos de investigación de los Drs. Goh Kian Mau (Universiti Teknologi, Malasia) y Kok-Gan Chan (University of Malasia, Malasia).

### III.5.2. Resultados y discusión

El kit Promega permitió obtener buenos rendimientos en concentración de ADN e integridad para la especie de *Desulfotomaculum* mientras que el kit Qiagen permitió obtener los mismos resultados para la especie de *Desulfobacillus*. Como se ha anticipado, lamentablemente, no se pudo contar a tiempo con el genoma de la especie de *Desulfobacillus*.

A partir del análisis realizado por el servidor RAST, un total de 4.063 secuencias de ADN codificantes (CDS – *Coding DNA Sequences*-) y 59 ARN estructurales fueron estimados para la especie de *Desulfotomaculum*. La anotación en subsistemas cubrió 361 subsistemas con 1492 (37%) de secuencias codificantes (CDS), donde 50 (3%) CDS fueron clasificadas como proteínas hipotéticas y 1442 CDS (96%) como proteínas no hipotéticas (figura 3.35). El %GC obtenido mediante el análisis del genoma resultó de 57,1. Este valor se encuentra cercano al encontrado para la especie *D. thermocisternum* (56-57%), pero es algo mayor que el encontrado para las especies más cercanas filogenéticamente a la especie en estudio (tabla 3.14). Los valores reportados para *D. thermobenzoicum* subsp. *thermobenzoicum* y *D. thermobenzoicum* subsp. *thermobenzoicum* son 53,7 y 52,8%, respectivamente (Plugge y col., 2002; Nilsen y col., 1996).



**Figura 3.35.** Organización en subsistemas del genoma de la especie en estudio en el servidor RAST

La secuencia del gen ARNr 16S obtenida por pirosecuenciación fue analizada y comparada con aquella obtenida previamente mediante PCR. Se obtuvo 99,9% de similitud entre la secuencia obtenida por PCR y por pirosecuenciación utilizando la herramienta de alineamiento del servidor BLAST. La secuencia de ARNr 16S obtenida por pirosecuenciación presentó 91 y 94% de similitud con *Desulfotomaculum thermobenzoicum* subsp. *thermosyntrophicum* y *Desulfotomaculum thermobenzoicum* subsp. *thermobenzoicum*, respectivamente. Estos resultados confirman la información detallada en la sección III.3.2.

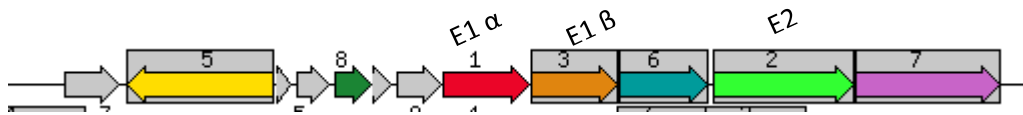
**Tabla 3.14.** Información general obtenida a partir del análisis realizado mediante el servidor RAST, de las secuencias genómicas obtenidas para la nueva especie de *Desulfotomaculum*

<b>Taxonomía</b>	<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptococcaceae; Desulfotomaculum</i>
<b>Tamaño del genoma</b>	3.628.787 pb
<b>% GC</b>	57,1
<b>N° de Contigs</b>	205
<b>N° de Subsistemas</b>	361
<b>N° de CDS</b>	4063
<b>N° de ARNs</b>	59

A continuación se detallan algunos de los genes detectados, ordenados por tipo de metabolismo y función.

### III.5.2.1. Oxidación incompleta de compuestos orgánicos

Como hemos visto en resultados de este mismo capítulo, esta especie bacteriana tiene la capacidad de oxidar el lactato y el piruvato incompletamente a ácido acético y esta oxidación está acoplada con la reducción de sulfato a sulfuro. En el genoma se encontraron genes que podrían codificar enzimas como la L-lactato deshidrogenasa y D-lactato deshidrogenasa, que estarían involucradas en la oxidación del lactato a piruvato. Para la oxidación incompleta del piruvato a acetato vía Acetil-CoA, esta especie posee genes que aparentemente codifican para las subunidades E1 (subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ), E2 y E3 de complejo de la piruvato deshidrogenasa (figura 3.36), y aparentemente 2 copias de una acetil-CoA sintetasa. La subunidad E3 del complejo de la piruvato deshidrogenasa se encuentra, aparentemente, en un operón distinto a los genes de los complejos E1 y E2. Todos los genes mencionados anteriormente presentan un porcentaje de identidad entre 85 y 92% con genes de especies como *D. thermocisternum*, *D. nigrificans*, *D. kuzetsovii* y *D. gibsoniae* (Visser y col., 2013; Visser y col., 2014; Kuever y col., 2014).



**Figura 3.36.** Organización de los genes del complejo de la piruvato deshidrogenasa en la nueva especie de *Desulfotomaculum*

La oxidación completa del acetato a  $\text{CO}_2$  requiere la presencia de las enzimas claves del TCA (ciclo de los ácidos tricarboxílicos). Los genes que codifican posibles enzimas como citrato sintasa, aconitasa e isocitrato deshidrogenasa (tres enzimas claves del ciclo de los TCA) no están presentes en esta especie de *Desulfotomaculum*, lo que coincide con su comportamiento fisiológico.

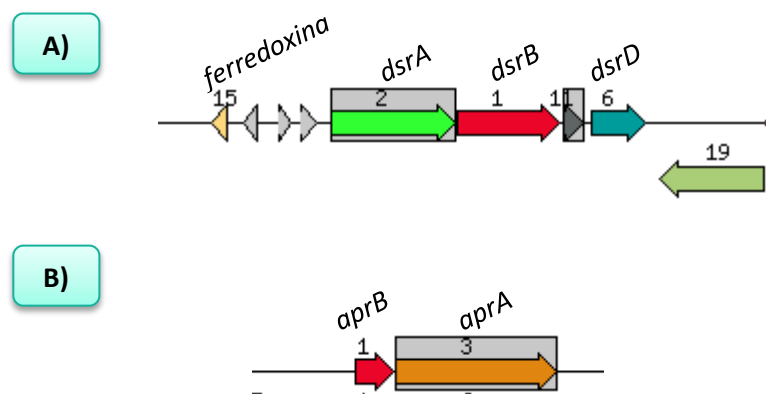
A diferencia de muchos miembros del género *Desulfotomaculum*, esta especie usa varios azúcares como FCE. Los genes que codifican posibles enzimas de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas, como fosfofructoquinasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato mutasa, enolasa y piruvato quinasa, están presentes en su genoma. Los genes encontrados que codifican para estas proteínas presentaron similitudes entre 85 y 89% con las mismas proteínas reportadas en *D. thermocisternum*, *D. nigrificans*, *D. kuzetsovii* y *D. gibsoniae* (Visser y col., 2013; Visser y col., 2014; Kuever y col., 2014).

Las principales enzimas encargadas del metabolismo del etanol y metanol son alcohol deshidrogenasa o una acetaldehído/alcohol deshidrogenasa. En el genoma de esta especie se encontraron genes que podrían codificar para una acetaldehído/alcohol deshidrogenasa, aunque experimentalmente se comprobó que esta bacteria no crece con etanol como FCE.

En el análisis del genoma se encontraron genes que podrían codificar enzimas como fumarato reductasa, fumarato hidratasa, malato deshidrogenasa y piruvato carboxilasa, que podrían estar vinculadas con la oxidación de succinato, fumarato y malato a piruvato. Esto sugiere que estos últimos podrían ser usados como FCE para esta especie de *Desulfotomaculum* aunque aún no fue probado en cultivo.

### III.5.2.2. Reducción de sulfato y conservación de la energía

El genoma de esta bacteria contiene genes que podrían codificar todas las enzimas necesarias para la reducción de sulfato y también las de varios complejos de membranas que participan en el transporte de los electrones desde la membrana a las enzimas citoplasmáticas. Entre otros, se encontraron los genes que podrían codificar: sulfato adeniltransferasa (ATP-sulfurilasa), adenosina-5'-fosfosulfato reductasa – subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ - (APS, genes *aprAB*), y sulfito reductasa desasimilatoria – subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ - (genes *dsrABD*) (figura 3.36). En la base de datos BLASTp se encontró una similitud de aproximadamente 85% con las mismas proteínas reportadas de *D. thermocisternum*, *D. ruminis*, *D. gibsoniae* y *D. kuznetsovii*.



**Figura 3.37.** Organización de los genes *dsrABD* (A) y *aprAB* (B) en la nueva especie de *Desulfotomaculum*

La generación de un gradiente de protones a través de la membrana citoplasmática es el principal mecanismo de generación de energía propuesto para los MSR. El acoplamiento de la reducción de sulfato a sulfuro, que ocurre exclusivamente en el citoplasma, con una cadena de transporte de electrones unida a la membrana, y el transporte de electrones, se encuentra aún bajo estudio. En *D. ruminis* se ha propuesto que una pirofosfatasa unida a la membrana podría utilizar la energía generada de la ruptura del ATP (que se genera en la activación del sulfato por la enzima ATP-sulfurilasa) para translocar los protones y de esta manera generar de energía (Spring y col., 2012). El gen que codificaría para una enzima similar a la

pirofosfatasa de *D.ruminis* se encuentra presente (con 74 % de similitud) en el genoma de la bacteria presentada aquí.

Los transportadores de electrones en los MSR, que llevarían los mismos hacia las enzimas finales AprAB y DsrAB reductasas, se encuentran también bajo estudio. Estos transportadores deben estar presentes en la membrana citoplasmática al igual que la cadena transportadora de electrones en las mitocondrias. Se ha propuesto que dos complejos de membrana QmoABC y DsrMKJOP son los responsables de llevar a cabo esta función. Este transporte se supone que contribuye a la conservación de la energía (Cardoso Pereira y col., 2011).

Las proteínas QmoA y B son solubles, mientras que QmoC es una proteína de fusión que contiene un dominio de citocromo c transmembrana. Debido a que los genes *qmo* normalmente se encuentran adyacentes a los genes *apsAB*, se propone que el complejo Qmo transfiere electrones hacia las enzimas ApsAB y de esta manera contribuyen a la conservación de la energía (Cardoso Pereira y col., 2011). En esta bacteria se encuentran presentes los genes (74% con aquellos reportados en *D. gibsoniae* y *D. ruminis*) que podrían codificar el complejo QmoAB que se supone responsable de donar electrones a la APS reductasa.

En los MSR gram-negativos el transporte de electrones sucede entre el citoplasma y el espacio periplasmático a través del complejo QmoABC. Debido a que las bacterias sulfato-reductoras gram-positivas no tienen espacio periplásmico (como todas las bacterias gram-positivas) la subunidad transmembrana QmoC de este complejo se encuentra ausente. En *D. acetoxidans* el gen *qmoC* es reemplazado por los genes *hdrBC* que codifican para las subunidades solubles del complejo HDR. Es por esto que se sugiere que en los MSR gram-positivos la reducción de sulfato llevada a cabo por la APS reductasa solo ocurre con intermediarios solubles y no participa en la conservación de la energía, como si ocurre en los MSR gram-negativos, ya que tienen la subunidad QmoC (Cardoso Pereira y col., 2011). En el genoma de esta especie de *Desulfotomaculum* se encontraron genes que podrían codificar las subunidades B y C del complejo HDR.

Se puede concluir en esta sección que, si bien el genoma de esta nueva especie de *Desulfotomaculum* se encuentra en estudio reciente, se encontraron genes que podrían codificar las enzimas para las funciones metabólicas que fueron detalladas en su caracterización fisiológica. Entre ellos se encuentran los genes que codifican todas las enzimas de la glucólisis, la fermentación láctica, y los genes relacionados a la reducción de sulfato y conservación de la energía.

### III.6. CONCLUSIONES FINALES DEL CAPÍTULO

- Se obtuvieron MSR aislados a partir de las muestras de sedimentos de los pozos termales de Copahue y de los enriquecimientos obtenidos en el capítulo II.
- En los enriquecimientos de MSR acidófilos se aisló la especie *Dsb. acidavidus* (detectada previamente en las comunidades)
- Entre los MSR aislados a 40°C se encontraron dos potenciales nuevas especies dentro de los géneros *Desulfobacillus* y *Desulfotomaculum*.
- La caracterización fisiológica de la nueva especie de *Desulfobacillus* demostró que la misma es capaz de oxidar incompletamente el glicerol a ácido acético a expensas de la reducción de sulfato, crecer óptimamente en un pH entre 3,5-4,5, a una temperatura de 40°C y utilizar diferentes azúcares y etanol como FCE.
- La nueva especie de *Desulfotomaculum* oxida incompletamente el lactato a ácido acético a expensas de la reducción de sulfato, tiene un pH óptimo de crecimiento de 6,5-7,0 y una temperatura óptima de 40°C. También es capaz de fermentar azúcares y crecer con piruvato a expensas de la reducción de sulfato.
- En el genoma de la nueva especie de *Desulfotomaculum* se encontraron muchos de los genes que codificarían para enzimas responsables de las características metabólicas observadas.





# Capítulo IV

---

**Bioprecipitación de metales pesados en  
condiciones ácidas**



## **CONTENIDO**

### **IV.1. INTRODUCCIÓN**

### **IV.2. METALES UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS**

### **IV.3. BIOPRECIPITACIÓN DE METALES PESADOS A BAJOS pH**

#### IV.3.1. Metodología

#### IV.3.2. Resultados y Discusión

##### IV.3.2.1. Efecto de los metales pesados sobre el crecimiento del consorcio

##### IV.3.2.2. Remoción de metales en solución

### **IV.4. BIOPRECIPITACIÓN EN UN SISTEMA REAL**

#### IV.4.1. Metodología

#### IV.4.2. Resultados y Discusión

##### IV.4.2.1. Efecto del drenaje ácido sobre el crecimiento del consorcio

##### IV.4.2.2. Precipitación de metales del drenaje ácido del pasivo minero Pan de Azúcar

### **IV.5. CONCLUSIONES FINALES DEL CAPÍTULO**



**CAPÍTULO IV: Bioprecipitación de metales pesados en condiciones ácidas****IV.1. INTRODUCCIÓN**

La contaminación con metales pesados por actividades antropogénicas se ha incrementado enormemente en los últimos años. En particular, los efluentes generados por la industria minera metalífera y del carbón, comúnmente denominados drenajes ácidos de mina (DAM), contienen además de altas concentraciones de metales pesados, elevadas cantidades de sulfatos y un valor de pH extremadamente bajo (Hallberg, 2010).

El tratamiento biológico utilizando microorganismos sulfato-reductores (bioprecipitación) ha sido considerado una alternativa atractiva para la eliminación de metales pesados de los efluentes industriales y de los DAM (Chen y col., 2014; Viera y Donati, 2004).

Debido a que las características fisicoquímicas de cada efluente cambian según el lugar y el tipo de industria que lo genere, resulta de suma importancia el desarrollo de nuevos procesos de bioprecipitación que puedan ser aplicados en cada tipo particular de sistema (Ñancuqueo y Johnson, 2012). Precisamente, uno de los objetivos de este trabajo de Tesis es la aplicación de microorganismos sulfato-reductores autóctonos para la bioprecipitación de metales pesados en ambientes ácidos.

En este capítulo se describirá la utilización de los consorcios de microorganismos sulfato-reductores acidófilos obtenidos de la zona geotermal asociada al volcán Copahue (descritos en el Capítulo II) en la bioprecipitación de metales pesados. Finalmente, se aplicarán esos mismos consorcios a muestras de un drenaje real. En todos los casos, se analizará la capacidad de los microorganismos de tolerar diferentes concentraciones de metales y de inmovilizar dichos metales. Finalmente, se evaluarán las ventajas y desventajas de la aplicación de esta metodología en tratamientos de efluentes contaminados con metales pesados.

#### **IV.2. METALES UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS**

Para la evaluación de la capacidad del consorcio en la bioprecipitación se eligieron cuatro metales dentro de los denominados metales pesados: Cr, Cu, Cd y Ni. Los cuatro se producen en distintas actividades productivas, como se mencionará más abajo, y su dispersión produce un serio impacto ambiental.

El cromo es dispersado a través de los efluentes de distintas industrias entre las que se cuentan las del curtido del cuero, la galvanoplastia y el procesamiento de minerales de cromita. En solución acuosa se lo encuentra fundamentalmente como  $\text{Cr}^{3+}$  (pH <3,6),  $\text{Cr}(\text{OH})_4^-$  (pH >11,5),  $\text{CrO}_4^{2-}$  (pH >6,5) y  $\text{CrO}_4\text{H}^-$  y  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  (pH <6,5). El Cr hexavalente es tóxico incluso a muy bajas concentraciones y se encuentra clasificado dentro de los contaminantes primarios debido a su elevada movilidad en suelos y aguas subterráneas. Entre los posibles daños que puede generar a los organismos vivos, incluido el ser humano, se encuentran el cáncer, mutaciones e irritación de ojos, piel y mucosas. En las plantas inhibe la fotosíntesis y el transporte de nutrientes (Chen y col., 2014; Ghosh y col., 2015; Quilntana y col., 2001; Viera y col., 2003). La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda desde 1958 una concentración máxima de 0,05 mg/L de Cr en el agua de consumo (Cervantes y col., 2001; Hashim y col., 2011). El primer paso en la descontaminación de efluentes de Cr(VI) es su reducción a Cr(III) que es menos tóxico y menos soluble. Precisamente los MSR podrían contribuir con el primer paso de reducción tal cual se ha reportado (Chang y Kim, 2007; Kieu y col., 2011; Krishna y Philip, 2005; Pagnanellia y col., 2012; Sahinkaya y col., 2012).

El cobre es usado por la humanidad desde hace miles de años. En la actualidad, a pesar de su competencia con otros metales, el Cu es elegido como el principal conductor de la electricidad en todas las categorías de cableado eléctrico. También se emplea en la arquitectura, en la elaboración de instrumental de medicina y prótesis y como antimicrobiano (Wuana y Okieimen, 2011). La mayoría del Cu es extraído de las minas donde se encuentra mayoritariamente como calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) y en menor medida, como covelita ( $\text{CuS}$ ) y calcocita ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ). Durante el tratamiento de estos minerales de Cu, se generan enormes cantidades de efluentes conteniendo elevadas

cantidades de este metal, produciendo su acumulación en el suelo y en aguas subterráneas (Singh y Gadi, 2009). Si bien el Cu en bajas concentraciones es esencial para los organismos vivos (actúa como cofactor de varias enzimas), puede resultar altamente tóxico a concentraciones elevadas. El Cu causa la enfermedad de Wilson, fallas renales y hepáticas, daño cerebral e incluso la muerte. Es por eso que resulta relevante el tratamiento de estos efluentes antes de su disposición final (Chen y col., 2014; Ghosh y col., 2015). En este caso los MSR podrían ser usados para precipitar Cu de las soluciones acuosas por formación de los sulfuros correspondientes.

El cadmio se encuentra como sulfuro generalmente asociado a la esfalerita; por esta razón, la mayor parte del metal se obtiene como subproducto del refinado del Zn. Hasta hace pocos años, 80% del Cd producido se utilizaba en las baterías recargables de Ni-Cd las que actualmente han sido reemplazadas por baterías de níquel-hidruro y de Li (Wuana y Okieimen, 2011). El Cd es altamente tóxico, carcinogénico y teratógeno aún en muy bajas concentraciones (apenas unos 0,05 mg/L) y tiende a acumularse en el organismo. En los seres humanos produce disfunción renal, daño hepático e hipertensión entre otras afecciones. Debido a esto la remediación de este contaminante del medio ambiente, particularmente en los efluentes industriales, es indispensable (López Pérez y col., 2014; Singh y Gadi, 2009). Los MSR podrían ser usados también en este caso para precipitar Cd como sulfuro.

El níquel es un elemento bastante abundante en la tierra y uno de sus minerales más importantes es la pentlandita  $(\text{Fe,Ni})_9\text{S}_8$ . Es un metal de alto valor utilizado para la producción de acero inoxidable, en aleaciones, en las baterías recargables y como catalizador de hidrogenación. Durante las explotaciones de lateritas, se producen lixiviados con altas concentraciones de Ni y Fe (Bijmans et al., 2009). El Ni es esencial en pequeñas cantidades pero peligroso en altas concentraciones. El Ni puede estar involucrado en la generación de varios tipos de cánceres en diferentes lugares del cuerpo. También en este caso, los MSR podrían removerlo de los efluentes por precipitación del sulfuro correspondiente.

### **IV.3. BIOPRECIPITACIÓN DE METALES PESADOS A BAJOS pH**

Las comunidades con capacidad sulfidogénica a bajos valores de pH cuya descripción se hizo en el capítulo II, se utilizaron en experiencias de bioprecipitación a bajos valores de pH. A continuación se describirá la metodología empleada y los resultados obtenidos.

#### **IV.3.1. Metodología**

El inóculo para las experiencias de bioprecipitación se obtuvo a partir de un consorcio de MSR acidófilo descrito previamente (capítulo II). Se realizó la amplificación del siguiente modo: 10 mL del consorcio de MSR se agregaron a un frasco conteniendo 90 mL de medio de cultivo aSRB (Anexo II) previamente esterilizado y con un pH inicial fijado en 3,0. Antes de la esterilización, se burbujeó N<sub>2</sub> gaseoso a través del medio para remover trazas de O<sub>2</sub> disuelto. El frasco se incubó anaeróbicamente a 30°C. Luego de 15 días (cuando la aparición de precipitado blanco de ZnS confirmó el crecimiento positivo), el cultivo fue utilizado como inóculo en la experiencia de bioprecipitación.

En la experiencia de bioprecipitación se utilizaron frascos de 10 mL con 9 mL de medio aSRB de pH inicial 3,0 y 1 mL de inóculo preparado tal cual se indica más arriba. El medio se preparó sin el agregado de Zn(II) para poder ensayar la precipitación de los otros metales. Luego se agregaron diferentes volúmenes de las soluciones concentradas (1000 mg/L) de los metales pesados de modo de obtener concentraciones finales de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/L, a partir de sulfatos de cada metal. Posteriormente, los frascos fueron colocados en jarras de anaerobiosis e incubados a 30°C durante 30 días. Cada sistema fue preparado por cuadruplicado. Un frasco de cada condición fue discontinuado inmediatamente para determinar las concentraciones de los metales inicialmente, para considerar la posible precipitación con los sulfuros solubles contenidos en el inóculo. Se realizaron controles de crecimiento y controles estériles. Los primeros se realizaron inoculando frascos con medio aSRB en las mismas condiciones que se había realizado el inóculo (es decir, utilizando Zn(II) y a pH 3,0). Los controles estériles (que permitirían determinar la precipitación abiótica y también constatar posibles contaminaciones externas durante



la experiencia) se realizaron con frascos sin inóculo pero con agregado del metal en las diferentes concentraciones estudiadas.

Luego de 30 días (tiempo final del ensayo), los frascos fueron retirados y se tomaron aproximadamente 5 mL de muestra para realizar las determinaciones analíticas correspondientes. Antes de las determinaciones, las muestras fueron filtradas a través de membranas de acetato de celulosa de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro para eliminar precipitados y células. Las concentraciones iniciales y finales de los metales se determinaron por EAA. Las muestras para estas medidas fueron previamente diluidas en ácido nítrico 0,14 N. El glicerol se determinó al comienzo y al final de la experiencia utilizando un método colorimétrico-enzimático (Anexo I). El pH se midió en todos los sistemas al final de la experiencia.

Para analizar la composición de los precipitados y observar los microorganismos, se utilizó microscopia electrónica de barrido (SEM) acoplado a un equipo EDAX. El protocolo para la fijación y observación es el mismo que el utilizado para los aislados del capítulo III (ver anexo IV).

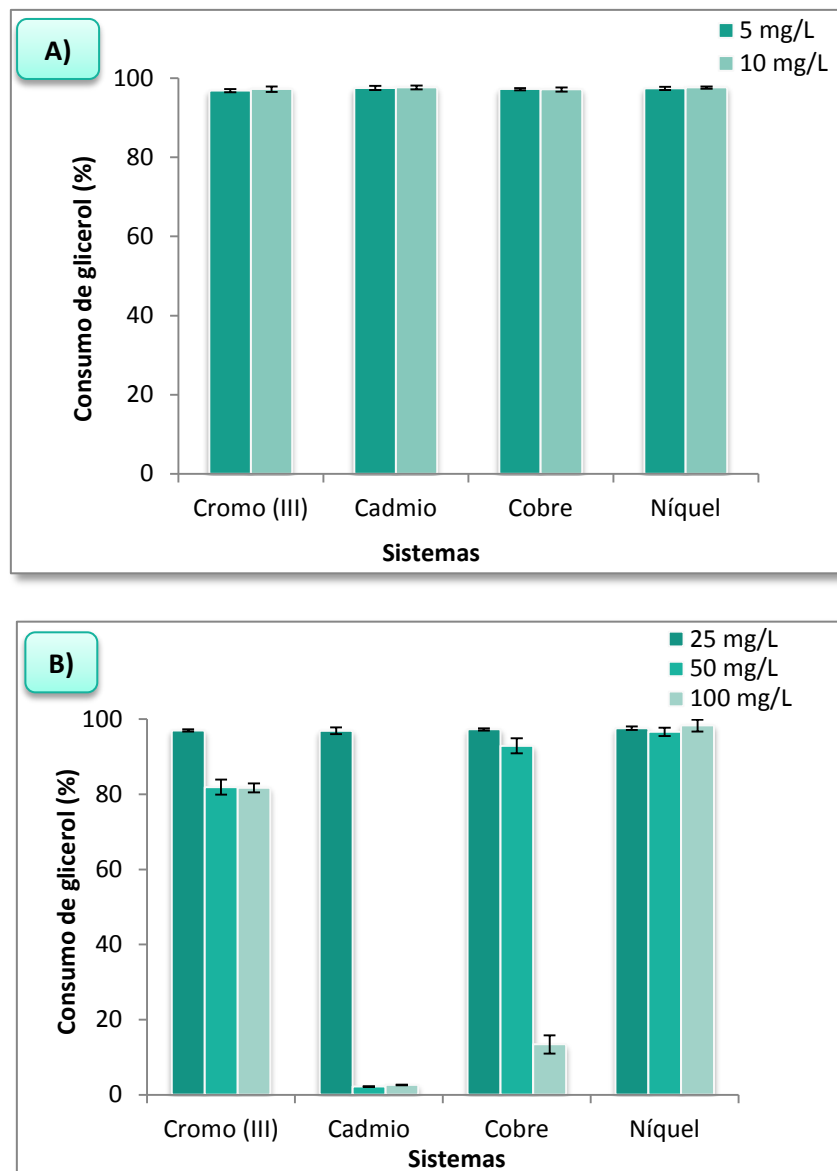
### **IV.3.2. Resultados y Discusión**

#### **IV.3.2.1. Efecto de los metales pesados sobre el crecimiento del consorcio**

La figura 4.1 muestra el consumo de glicerol (%CG) en los cultivos de MSR luego de 30 días de exposición a diferentes concentraciones de metales pesados (Cr(III), Cd(II), Cu(II) y Ni(II)). No se incluyen en el gráfico los porcentajes obtenidos en los sistemas estériles, ya que los mismos fueron inferiores al 3% en todos los casos. El porcentaje de consumo de glicerol (%CG) fue calculado de la siguiente manera:

$$\frac{([G]_{t=0} - [G]_{t=f})}{[G]_{t=0}} \times 100 = \%CG$$

Dónde  $[G]_{t=0}$  es la concentración inicial de glicerol y  $[G]_{t=f}$  es la concentración de glicerol luego de 30 días de cultivo.



**Figura 4.1.** Consumo de glicerol en los cultivos de MSR acidófilos en presencia de metales pesados **A)** 5 y 10 mg/L, **B)** 25, 50 y 100 mg/L.

Como se mencionó anteriormente el glicerol es utilizado por los MSR como fuente de carbono y energía. Bajo condiciones de anaerobiosis, el glicerol puede ser completamente o parcialmente oxidado a  $\text{CO}_2$  o acetato respectivamente. El consumo de glicerol fue prácticamente total en todos los cultivos conteniendo 5 y 25 mg/L de cualquiera de los iones metálicos agregados, indicando que estas concentraciones no son inhibitorias.

El aumento de la concentración de Ni(II) hasta 100 mg/L no modificó el consumo de glicerol de los cultivos, indicando que no produce inhibición en el rango de concentraciones ensayado. En el caso de Cr(III), el aumento de la concentración hasta 100 mg/L, produjo un ligero descenso en el consumo de glicerol (apenas un 20 % a las mayores concentraciones) indicando una baja inhibición sobre el crecimiento de este consorcio de MSR.

Concentraciones de 50 mg/L o más de Cd(II) y de 100 mg/L de Cu(II) redujeron drásticamente el consumo de glicerol y, por ende, el crecimiento del consorcio, indicando una fuerte inhibición.

La baja inhibición del crecimiento de los MSR observada en los ensayos con Cr(III) también ha sido reportada previamente para otras especies de MSR. Cabrera y col. (2006) mostraron que concentraciones bajas de Cr(III), entre 5 y 10 mg/L, pueden incluso estimular el crecimiento en cultivos puros de *Desulfovibrio vulgaris* y *Desulfovibrio* sp.

La baja inhibición provocada por Ni(II) sobre el consorcio ensayado en este trabajo de tesis, también fue observada por Kousi y col. (2011) sobre bacterias sulfato-reductoras en un reactor de lecho fluidizado alimentado con agua sintética a un pH inicial de 3,0-3,5 y utilizando etanol como fuente de carbono. Los autores demostraron que concentraciones de 200 mg/L de Ni(II) no afectaron significativamente la reducción de sulfato y la eficiencia de precipitación. No obstante, algunos MSR se ven fuertemente inhibidos por Ni. En estudios recientes, Junwei y col. (2015) reportaron que 59 mg/L de Ni(II) inhiben completamente el crecimiento de un cultivo mixto de bacterias sulfato-reductoras obtenidas de un sedimento anaeróbico de una planta de tratamiento de China. Previamente, Cabrera y col. (2006) indicaron que concentraciones de Ni(II) mayores a 8,5 mg/L producen completa inhibición del crecimiento en cultivos puros de *Desulfovibrio vulgaris* y *Desulfovibrio* sp. (Cabrera y col., 2006). Más aún, otra bacteria sulfato-reductora neutrófila perteneciente a las  $\delta$ -proteobacterias (*Desulfovibrio desulfuricans*), fue inhibida por concentraciones tan bajas de Ni(II) como 1,8 mg/L (Poulson et al. 1997).

La fuerte inhibición provocada por el Cd(II) sobre el consorcio de MSR es consecuente con la observación general de que este metal es siempre más tóxico que Cr(III), sobre cultivos puros o mixtos de MSR (Cabrera y col., 2006; Utgikar y col., 2002). En cultivos puros de *Desulfovibrio alaskensis*, *Desulfovibrio desulfuricans* y *Desulfococcus multivorans*, se han encontrado concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de Cd(II) de 56 mg/L y 200 mg/L (Lopez Perez y col., 2014; Naz y col., 2005). Hao y col (1994) encontraron que la reducción de sulfato en un consorcio de MSR creciendo en condiciones batch fue fuertemente inhibida por la presencia de 20 mg/L de Cd.

Aunque en nuestros ensayos el Cu(II) inhibió el crecimiento del consorcio de MSR a partir de 100 mg/L, en otros casos reportados la inhibición resultó más significativa. Kimura y col (2006) reportaron una concentración inhibitoria mínima de Cu de 12,7 mg/L en cultivos puros de *Desulfosporosinus acididurans* que es una nueva especie de bacterias sulfato-reductoras gram-positivas capaces de crecer bajo condiciones de anaerobiosis y a bajos valores de pH, utilizando glicerol como fuente de carbono y energía y sulfato como aceptor de electrones (Sánchez-Andrea y col., 2014).

#### IV.3.2.2. Remoción de metales en solución

Las figuras 4.2 y 4.3 A y B muestran los porcentajes de precipitación de los metales pesados (Cr(III), Cd(II), Cu(II) y Ni(II)) al final del ensayo, calculados como:

$$\frac{([M]_{t=0} - [M]_{t=f})}{[M]_{t=0}} \times 100 = \%P$$

donde  $[M]_{t=0}$  es la concentración de metal disuelto en el tiempo inicial en los controles estériles y  $[M]_{t=f}$  es la concentración de metal disuelto luego de 30 días.

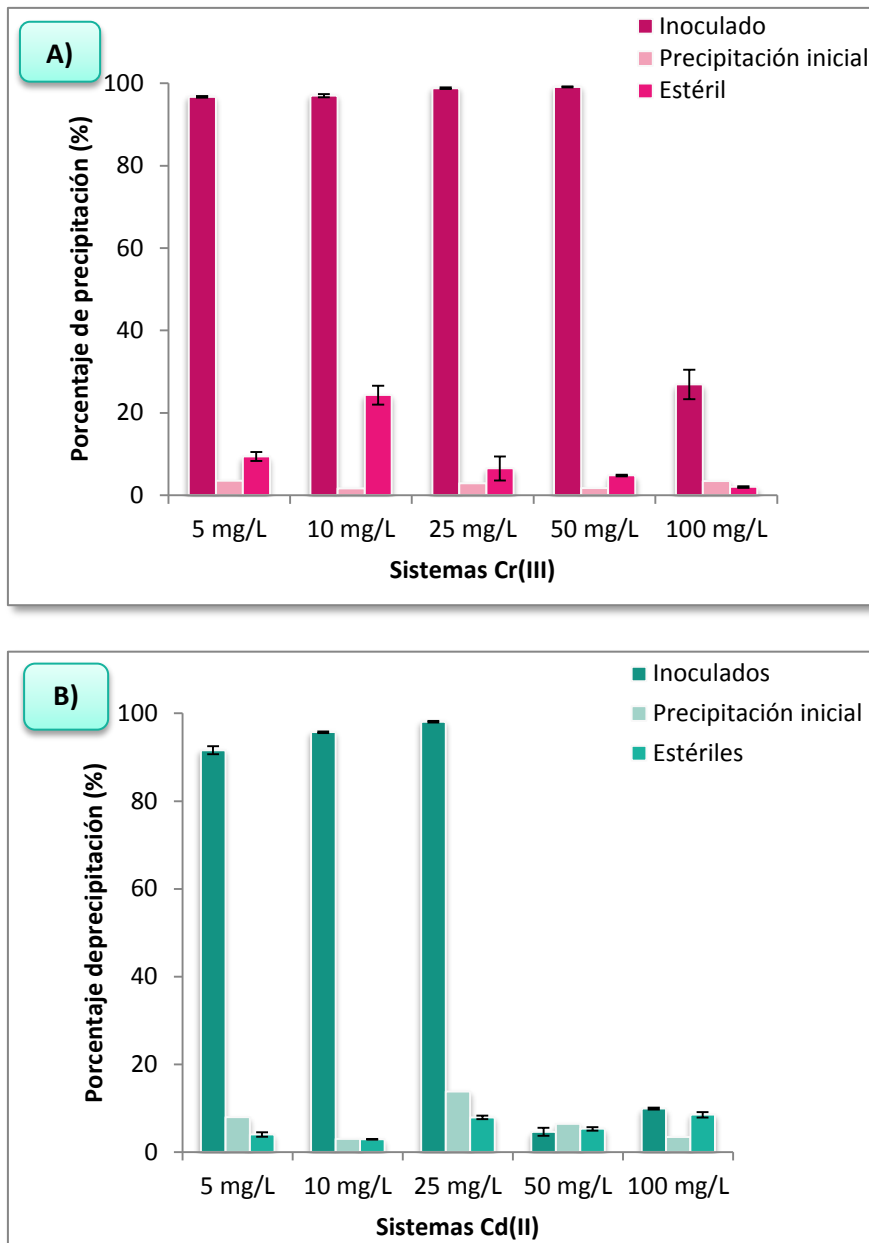
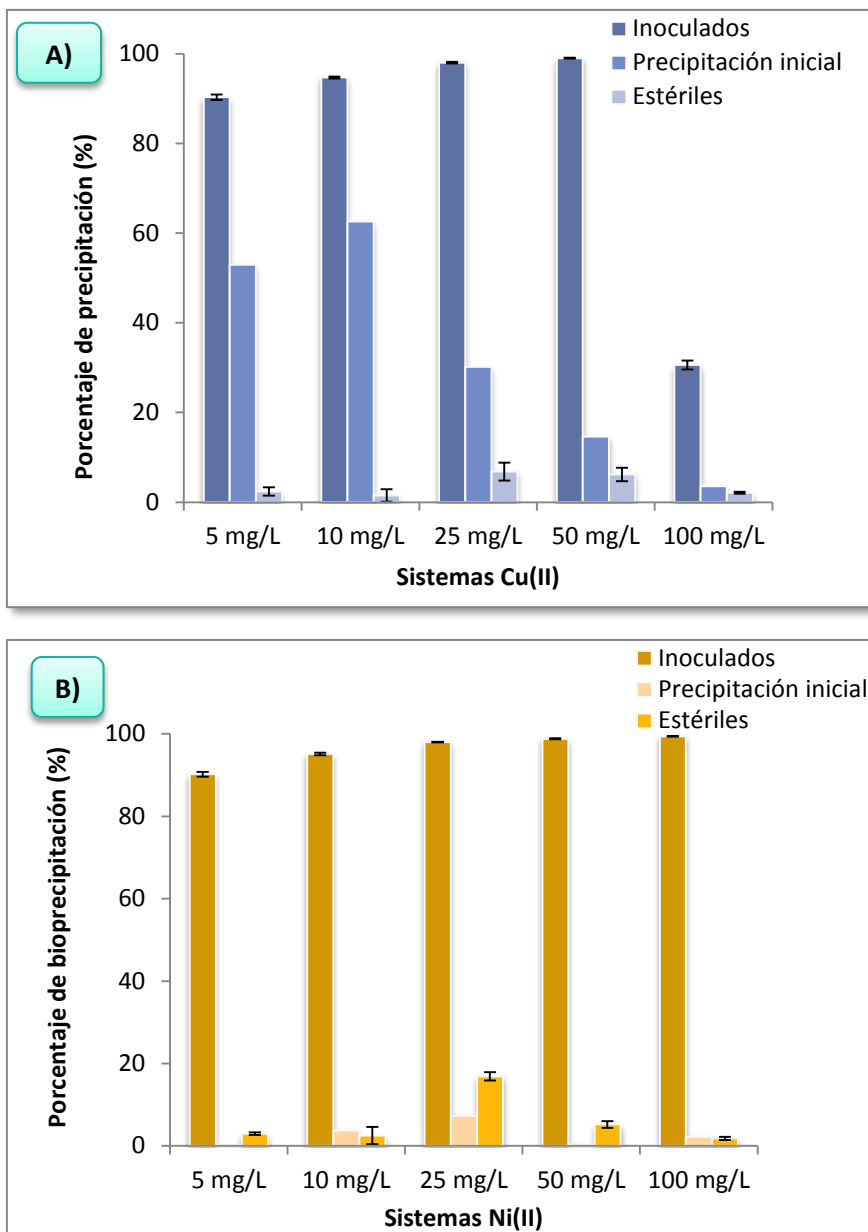


Figura 4.2. Porcentaje de precipitación de A) Cr(III) y B) Cd(II), luego de 30 días en sistemas inoculados y estériles



**Figura 4.3.** Porcentaje de precipitación de **A) Cu(II)** y **B) Ni(II)** luego de 30 días en sistemas inoculados y estériles

La precipitación producida al inocular, debida al sulfuro arrastrado en el inóculo, sólo fue significativa en el caso del Cu(II): aproximadamente 60 % para las concentraciones más bajas y 4 % para las más altas, y esto seguramente responde a la muy baja solubilidad del CuS comparada con los otros sulfuros (ver tabla 4.1). Estos valores permiten estimar que las concentraciones de  $S^{2-}$  en los inóculos son del orden de 0,1 mM.

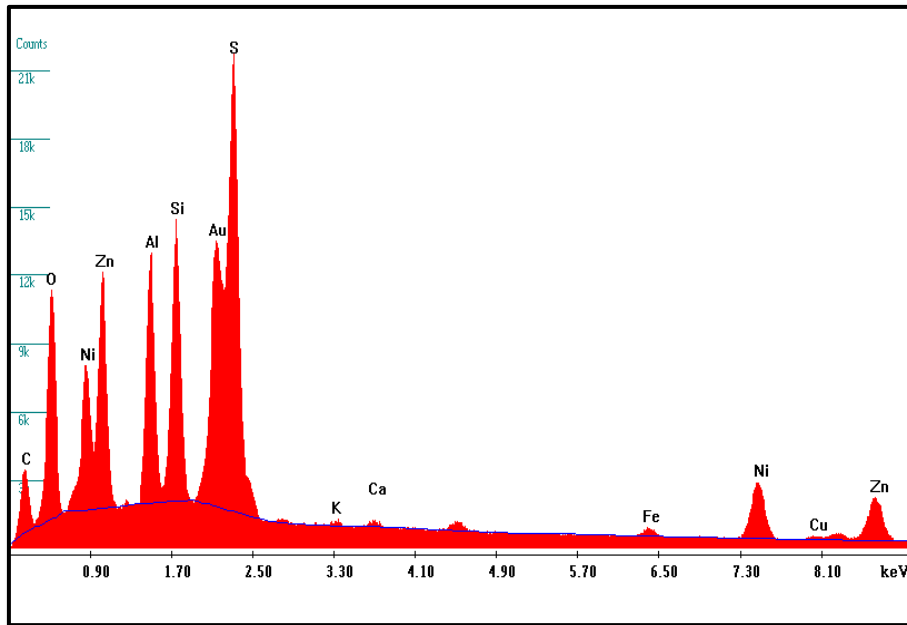
**Tabla 4.1** Valores de constante de producto de solubilidad (Kps) para algunos sulfuros metálicos.

Compuesto	Fórmula	K <sub>ps</sub> (25°C)
Sulfuro de cobre	CuS	$8 \times 10^{-37}$
Sulfuro de níquel	NiS	$4 \times 10^{-20}$
Sulfuro de cadmio	CdS	$1 \times 10^{-27}$
Sulfuro de cromo (III)	Cr <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	*
Sulfuro de cinc	ZnS	$2 \times 10^{-25}$
Sulfuro de hierro (II)	FeS	$8 \times 10^{-19}$

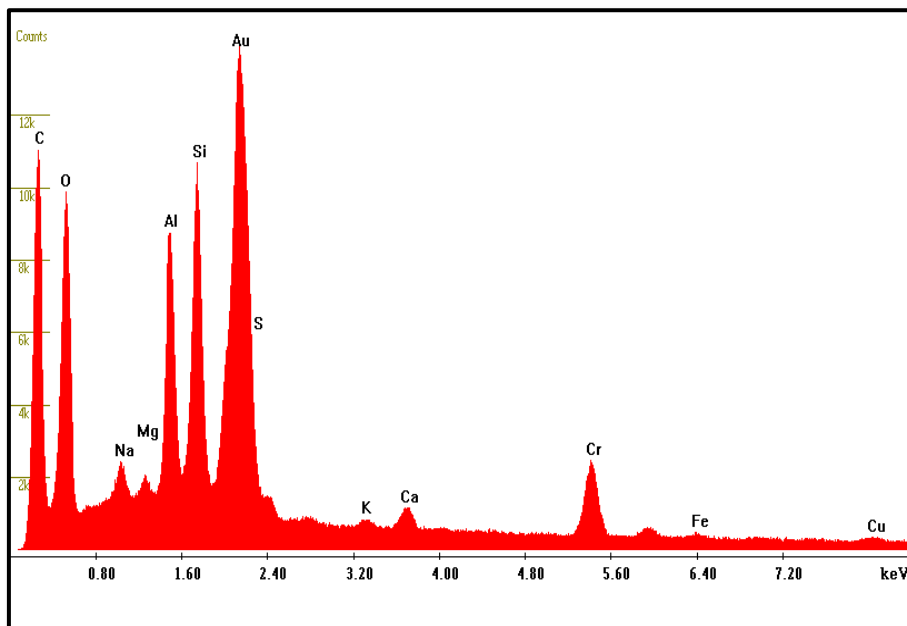
\* En agua se hidroliza y forma precipitados que incluyen sales básicas e hidróxidos

Los valores de precipitación en los estériles son, en general, muy bajos (5-10 % o incluso menores) y no producen un aporte significativo a la remoción del metal de la solución. En cambio, se observaron elevados valores de precipitación en todos los cultivos conteniendo entre 5 y 25 mg/L de cualquiera de los iones metálicos ensayados. Para el caso de Cr(III) y Cu(II), los porcentajes de precipitación fueron elevados para una concentración de 50 mg/L. El Ni(II) precipitó en los sistemas conteniendo 100 mg/L de metal. Estos resultados se condicen con el consumo completo del glicerol observado para la misma concentración de metal y confirman que la remoción de metales se debe a la actividad sulfidogénica de los MSR. La precipitación prácticamente completa de Ni(II) permite estimar que la actividad microbiana generó al menos 2 mM de S<sup>2-</sup>.

Las figuras 4.4, 4.5 y 4.6 muestran espectros del análisis de energía dispersiva de rayos-X (EDAX) de los precipitados encontrados en los sistemas conteniendo Cr(III), Ni(II), Cu(II) y Cd(II). No se observaron diferencias significativas en estos espectros obtenidos para los precipitados de los cultivos con diferentes concentraciones.

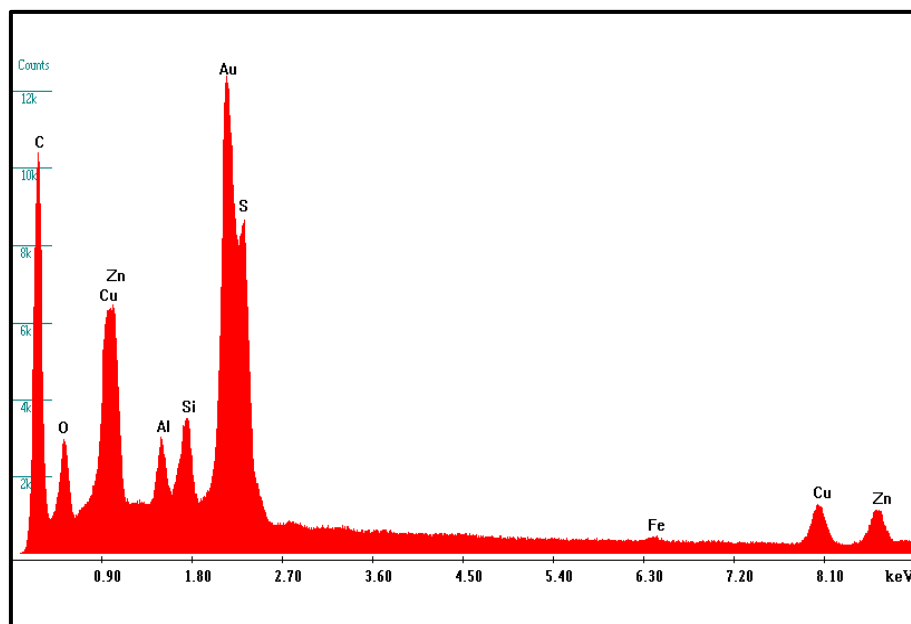


**Figura 4.4.** Espectro EDAX correspondiente al precipitado de los sistemas conteniendo Ni(II)



**Figura 4.5.** Espectro EDAX correspondiente al precipitado de los sistemas conteniendo Cr(III)





**Figura 4.6.** Espectro EDAX correspondiente al precipitado detectado en los sistemas conteniendo Cu(II)

En todos los espectros se observan elementos como C, O, Zn, Al, Si y Au. La presencia de C y O puede deberse a la biomasa retenida. Al y Si probablemente estén contenidos en los sedimentos que pudieran haberse arrastrado de la muestra original. La presencia de Zn seguramente se deba a su arrastre durante la inoculación. La presencia de Au se debe al metalizado de las muestras que es un paso obligado para su observación por SEM en alto vacío (anexo IV). Na, Ca, K y Mg están presentes en el medio de cultivo y pueden haber quedado adsorbidos sobre la biomasa.

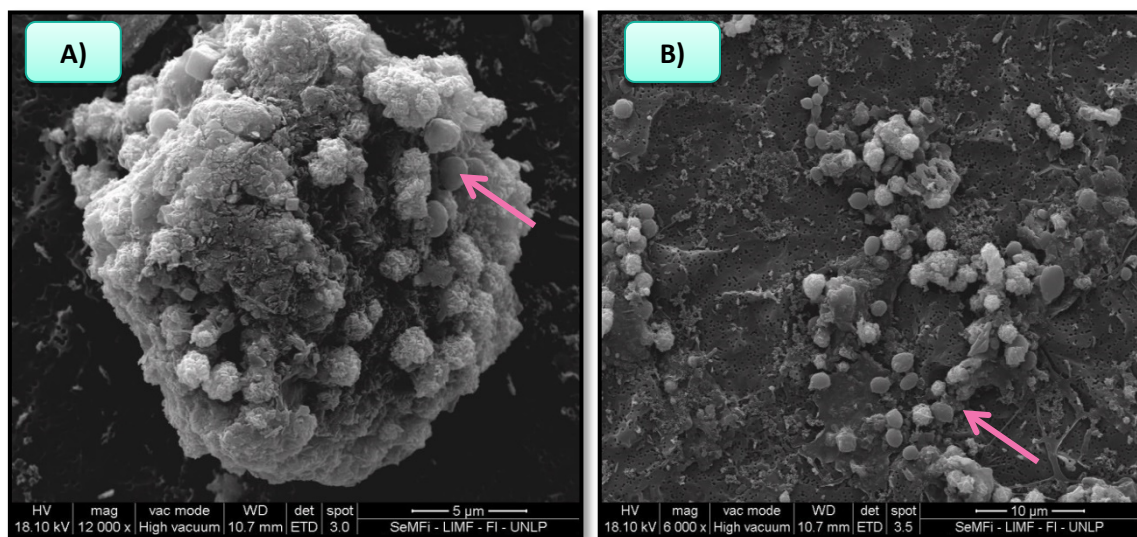
Los precipitados de los sistemas conteniendo Ni y Cu corresponden en su mayoría a los sulfuros correspondientes, ya que estos elementos y también S se encuentran presentes en los espectros (figuras 4.4 y 4.6).

Los espectros EDAX para Cr (figura 4.5) no permiten confirmar la presencia de un sulfuro de cromo(III). En el espectro se ha indicado la señal de S (que podría estar solapado con Au aunque en este caso no se observa el “hombro” correspondiente); no obstante, en el análisis semicuantitativo realizado con el mismo equipo reveló que los elementos mayoritarios son Au, C, O, Al, Si y Cr y no se detecta la presencia de S. Este resultado está vinculado con la química de Cr en agua y no con la ausencia de actividad

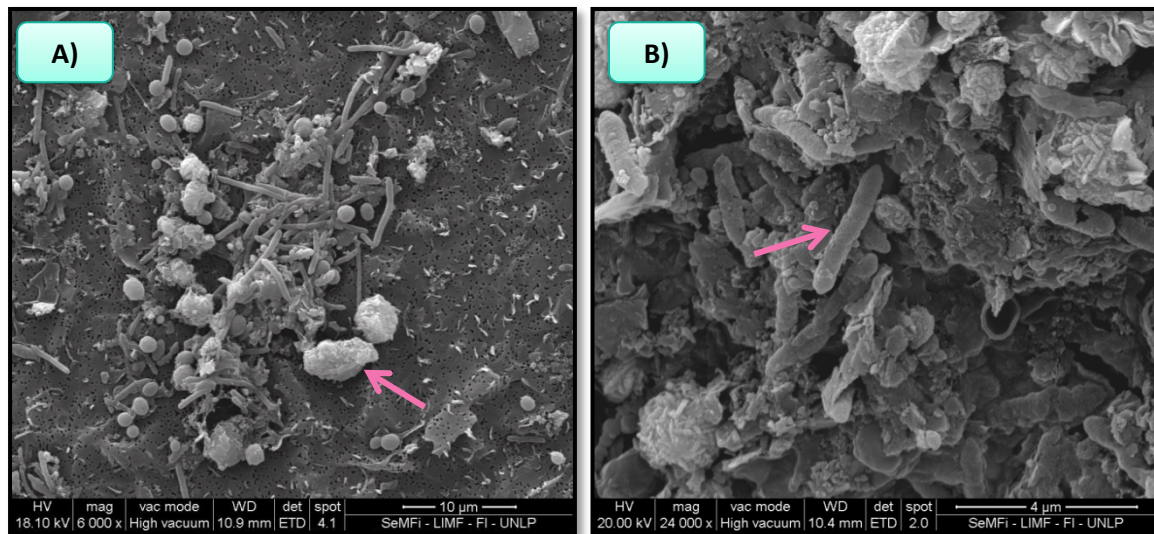
sulfidogénica en los cultivos (en ellos hubo consumo de glicerol y también se detectó presencia de olor característico de  $H_2S$ ). El Cr(III) en agua se hidroliza y forma especies hidroxiladas, que pueden precipitar como sales básicas e hidróxidos; su formación dependerá del pH del medio, por lo que el ascenso de pH en los cultivos podría haber originado la precipitación de dichas especies de Cr(III).

Los espectros de los precipitados en los cultivos con Cd(II) (no incluidos) sugieren la presencia de CdS.

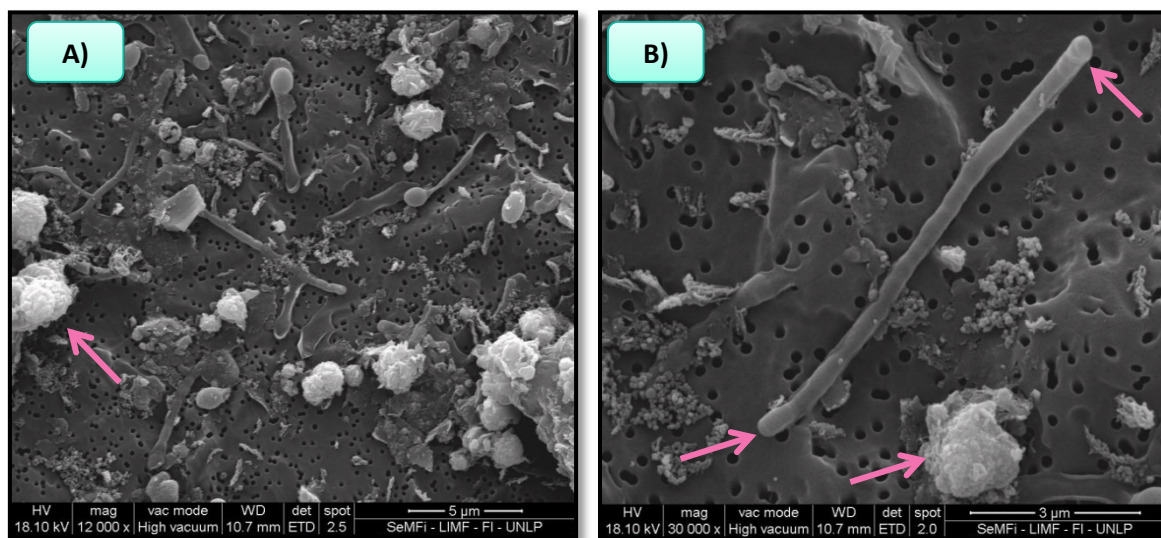
Las figuras 4.7, 4.8 y 4.9 A y B muestran las imágenes SEM de los precipitados en los cultivos con metales.



**Figura 4.7. A)** Partícula de precipitado de NiS (aumento 6000X). **B)** Células en forma de coco que forman parte del enriquecimiento indicadas con flechas (aumento 6000X)



**Figura 4.8. A)** Células en forma de bacilos y cocos sobre el precipitado que contiene Cr(III), indicadas con flechas (aumento 6000X). **B)** Células adheridas al precipitado que contiene Cr(III) (aumento 24000X)



**Figura 4.9. A)** Células con formas de bacilo y de coco sobre precipitados de CuS, indicadas con flechas (aumento 12000X). **B)** Células en el cultivo con Cu(II). Se observan esporas terminales y precipitado de CuS (aumento 30000X).

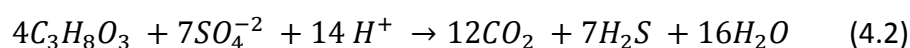
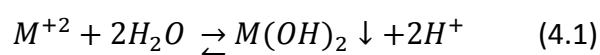
Las células con forma de coco que se observan en las imágenes SEM fueron detectadas en los enriquecimientos acidófilos pero no fueron identificadas. En mayor proporción se encuentran los bacilos alargados que probablemente correspondan a *Dsb. acidavidus*.

En la tabla 4.2 se muestran los valores de pH obtenidos luego de 30 días de incubación para los sistemas inoculados y estériles.

**Tabla 4.2.** Valores de pH en sistemas inoculados y estériles, luego de 30 días de incubación

	5 mg/L	10 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L
<b>Cr Inoculados</b>	8,9 ± 0,3	8,1 ± 0,4	8,5 ± 0,2	6,9 ± 0,3	3,9 ± 0,2
<b>Cr Estériles</b>	3,40 ± 0,01	3,3 ± 0,1	3,22 ± 0,01	3,2 ± 0,1	3,5 ± 0,1
<b>Cd Inoculados</b>	9,0 ± 0,3	8,3 ± 0,2	9,0 ± 0,3	3,5 ± 0,2	3,5 ± 0,2
<b>Cd Estériles</b>	3,3 ± 0,1	3,30 ± 0,01	3,20 ± 0,01	3,7 ± 0,3	3,20 ± 0,01
<b>Cu Inoculados</b>	8,8 ± 0,3	7,7 ± 0,2	9,2 ± 0,3	7,3 ± 0,4	3,1 ± 0,1
<b>Cu Estériles</b>	3,10 ± 0,01	3,31 ± 0,04	3,3 ± 0,1	3,22 ± 0,01	3,7 ± 0,3
<b>Ni Inoculados</b>	9,20 ± 0,07	8,1 ± 0,7	9,3 ± 0,2	7,7 ± 0,1	7,5 ± 0,5
<b>Ni Estériles</b>	3,5 ± 0,1	3,43 ± 0,01	3,4 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,6 ± 0,1

En todos los cultivos en los que no hubo inhibición, se detectó un aumento significativo en los valores de pH, alcanzando valores finales entre 8 y 9. Este aumento obedece a la retrogradación de la hidrólisis del catión metálico (ecuación 4.1) por precipitación de éste, sumada al consumo de protones que ocurre durante el crecimiento de los MSR (ecuación 4.2).

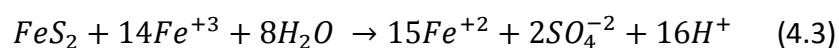


Los resultados obtenidos en esta experiencia muestran que este consorcio acidófilo de MSR puede usarse no sólo para remover cationes metálicos de un efluente ácido sino también para neutralizar parcialmente la acidez del mismo.

#### IV.4. BIOPRECIPITACION EN UN SISTEMA REAL

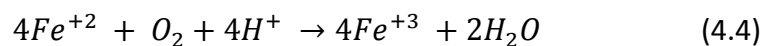
En la sección anterior se demostró la posibilidad de utilizar el consorcio acidófilo de MSR en la remoción de metales en efluentes ácidos permitiendo, además, la neutralización parcial de los mismos. Debido a ello, se decidió aplicar este consorcio a la remediación de un sistema real semejante como es un drenaje ácido de mina (DAM). En particular, se eligió el DAM asociado a la mina abandonada de Pan de Azúcar cuya descripción se hace más abajo. La elección de un DAM obedece tanto a la importancia de la remediación de los mismos por su enorme impacto ambiental como a que usualmente reúnen las condiciones para las cuales esta comunidad de MSR parece ser eficiente: los DAM tienen altas concentraciones de metales pesados y muy bajos valores de pH.

Los DAM son esencialmente causados por la exposición de minerales sulfurados, predominantemente pirita y pirrotita, a oxígeno, agua y microorganismos hierro y/o azufre oxidantes durante la explotación minera de metales y del carbón (Johnson, 2003). En forma general, el proceso comienza con la oxidación química del mineral y continúa debido a la acción de los microorganismos hierro y/o azufre-oxidantes que son los componentes biológicos principales de los DAM (Hallberg, 2010; Simate y Ndlovu, 2014). La biooxidación de los minerales puede seguir dos mecanismos distintos, dependiendo de la solubilidad de los mismos en medio ácido (mecanismo del tiosulfato o mecanismo de los polisulfuros). Los minerales pirita, molibdenita y tungstenita son insolubles en ácidos no oxidantes y, por ende, necesitan un agente oxidante para ser disueltos; estos sulfuros se disuelven por la vía de oxidación mediada por tiosulfato, en donde Fe(III), que está presente en el DAM, es el principal oxidante del sistema (Donati y Sand, 2007). El mismo es capaz de oxidar pirita aun en condiciones anóxicas y a una velocidad mucho mayor que el O<sub>2</sub> (Sánchez-Andrea y col., 2014). Es por esto que en estos sistemas predomina la reacción 4.3:

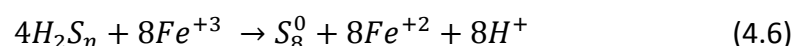
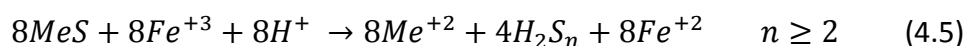


La regeneración de Fe(III) (que es reducido a Fe(II) en la reacción anterior) es el paso que, en esta vía, determina la velocidad de oxidación de los sulfuros. A valores de pH mayores a 4, la oxidación de Fe(II) es principalmente abiótica y, en menor medida,

por microorganismos oxidantes de hierro como *Gallionella ferruginea*. Por debajo de pH 4, la velocidad de oxidación de Fe(II) por O<sub>2</sub> es muy lenta, y solamente los microorganismos hierro oxidantes son capaces de regenerar Fe(III) a una velocidad mensurable y continuar la disolución del mineral. De esta manera el proceso de generación de DAM es acelerado varios órdenes de magnitud a bajos valores de pH debido a la presencia de estos microorganismos (Chockalingam y Subramanian, 2006; Cruz Viggi y col., 2010; Donati y Sand, 2007; Hallberg, 2010; Sánchez-Andrea y col., 2014; Sheoran y col., 2010). La mayoría de estos microorganismos, tanto bacterias como arqueas, fijan CO<sub>2</sub> y crecen quimiolitotróficamente utilizando Fe(II) como fuente de energía (ecuación 4.4). Los mismos pueden ser separados en tres grupos de acuerdo a su temperatura óptima de crecimiento: mesófilos (hasta 40°C), termófilos moderados (entre 40 y 55°C) y termófilos extremos (entre 55 y 80°C). Entre los microorganismos más estudiados se encuentran bacterias, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, y arqueas, en particular, las pertenecientes a los géneros *Acidianus* y *Metallosphaera* (Donati y Sand, 2007).

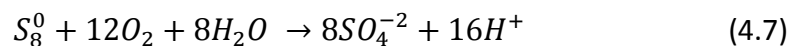


El resto de los minerales sulfurados, tales como esfalerita, galena, arsenopirita, y calcopirita (ZnS, PbS, FeAsS, CuFeS<sub>2</sub>, respectivamente) entre otros, pueden disolverse por acción ácida. En este caso, su disolución puede producirse por una acción individual o combinada de Fe(III) y protones. En este mecanismo se generan en primera instancia polisulfuros (H<sub>2</sub>S<sub>n</sub>), que luego son oxidados por la acción de Fe(III) hasta S en el caso de ausencia de microorganismos azufre oxidante (ecuaciones 4.5 y 4.6) (Donati y Sand, 2007; Sánchez-Andrea y col., 2014).



En este mecanismo de los polisulfuros las uniones químicas entre el metal y el azufre se rompen por la acción de los protones, por lo que la presencia de Fe(III) no es un requerimiento importante. La disolución de estos minerales puede ser catalizada

por la acción de microorganismos hierro oxidantes pero también de microorganismos azufre-oxidantes. En ausencia de Fe(III), estos últimos son capaces de oxidar compuestos intermedios de azufre a ácido sulfúrico, y de esta manera regenerar los protones necesarios para romper los enlaces entre el metal y el azufre en los minerales. Esto incluye la catálisis de la oxidación de S hasta ácido sulfúrico (ecuación 4.7). De esta manera, con la presencia de intermediarios de azufre o de S elemental la disolución de los minerales solubles en ácido, es acelerada también varios órdenes de magnitud por acción microbiana.



Estos microorganismos (bacterias y arqueas), al igual que los hierro-oxidantes descritos anteriormente, son usualmente autótrofos y quimiolitótrofos; oxidan S o compuestos reducidos de azufre para obtener energía (ecuación 4.7). Entre ellos podemos encontrar bacterias mesófilas y termófilas moderadas como *Acidithiobacillus (At.) thiooxidans*, *At. ferrooxidans*, *At. caldus* y *Sulfobacillus thermotolerans*. Además, algunas arqueas termófilas de los géneros *Acidianus* y *Metallosphaera*, además de oxidar el Fe(II), pueden también crecer en presencia de S elemental como fuente de energía (Donati y Sand, 2007).

Los DAM ejercen un fuerte impacto ambiental en las proximidades de las áreas mineras. El mayor impacto se debe a que la acidez del DAM conlleva a un descenso del pH de los cursos de agua receptores y la capacidad de neutralización de la misma se ve significativamente disminuida. Como el pH de los cursos de agua contaminados se mantiene muy bajo, la solubilidad de los metales que provienen del DAM se mantendrá en valores elevados provocando que los mismos se encuentren biodisponibles (Hallberg, 2010). La irrupción del agua ácida de la mina en ríos y lagos provoca una degradación grave de la calidad del agua natural, porque tanto el ácido como los metales pesados disueltos son tóxicos para la vida acuática (Jameson y col., 2010; Madigan y col., 2004). Los DAM también pueden desembocar en ríos que sean origen de fuentes de agua potable para poblaciones cercanas, exponiendo a los consumidores a concentraciones elevadas y tóxicas de metales. En el caso particular de los suelos, la presencia de metales afecta su funcionalidad, la actividad microbiológica

y su fertilidad; eventualmente, esta contaminación puede alcanzar la cadena trófica a partir de la absorción que pueden sufrir por acción de ciertas plantas (Malik, 2004).

El pasivo minero Pan de Azúcar se encuentra ubicado en el noroeste de la República Argentina, en la provincia de Jujuy a 3700 m sobre el nivel del mar (22° 32-22°38 S y 66°01 66°08 O). Los minerales de la mina cuya explotación dio lugar a este pasivo, contienen un elevado contenido de Ag, Zn y Pb. Las actividades de extracción de plomo y plata cesaron en el año 1986 y el sitio fue abandonado sin un cierre correcto de la mina. Este sitio es atravesado por el Río Cincel que desemboca a 25 km de la mina, en el sur de la Laguna de los Pozuelos. La laguna es considerada un Monumento Natural Nacional, Reserva de la Biosfera (UNESCO 1990) y sitio Ramsar (1982) y alberga decenas de especies de aves acuáticas. Las aguas de la Laguna Pozuelos son neutras o ligeramente alcalinas; la generación de DAM que pudieran ser arrastrados por el Río Cincel hasta la laguna, pondría en riesgo todo el ecosistema del lugar por el eventual cambio de pH (Plaza Cazón y col., 2013). La remediación de los DAM generados en el pasivo resulta indispensable para evitar un tremendo impacto ambiental. En esta sección se discutirán las experiencias realizadas en tal sentido con el uso de la comunidad acidófila de MSR.

#### **IV.4.1. Metodología**

El inóculo utilizado en esta experiencia se preparó de la misma manera que el empleado para las experiencias de bioprecipitación con diferentes metales pesados (sección IV.3.1).

El DAM recogido en la planta de procesamiento de la mina Pan de Azúcar tenía un valor de pH de 0,58 y contenidos en metales de 25.050 mg/L de Zn(II), 97.400 mg/L de Fe(III), 1,3 mg/L de Pb(II) y 161 mg/L de Cd(II).

Debido al bajísimo pH y a la enorme cantidad de iones metálicos, es indispensable utilizar un pretratamiento antes de la bioprecipitación con MSR. La acidez extrema de este DAM no sólo inhibiría la acción de los MSR sino que, además, impediría incluso la precipitación de algunos sulfuros más solubles como los de Fe(II) y



Zn(II). Es habitual, y no sólo en casos extremos como este, que la bioprecipitación se use sólo como etapa de remediación final que permite descender los niveles de metales hasta el límite legal.

El tratamiento previo consistió en la dilución del DAM y el agregado de solución de NaOH 10 M como neutralizante y precipitante. Luego del tratamiento se obtuvo un efluente de pH final igual 4,0 (denominado a partir de ahora drenaje pretratado). Este drenaje se filtró primero con papel de filtro banda azul y luego con membrana de nitrocelulosa de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, para eliminar los precipitados formados durante la neutralización. Luego se realizaron distintas diluciones del mismo: 1/2, 1/3, 1/5, 1/10 y 1/15, utilizando agua destilada estéril a pH 4,0. Antes de ser usadas en las experiencias de bioprecipitación todas estas diluciones se sometieron a burbujeo con  $\text{N}_2$  para desplazar el  $\text{O}_2$  presente.

En la tabla 4.4 se detallan las concentraciones aproximadas de Zn(II), Fe(total) y Cd(II) en el drenaje pretratado y en las diluciones posteriores. El Fe total soluble estaba completamente oxidado. La concentración de sulfato en el drenaje pretratado, determinada por el método turbidimétrico, resultó 42.309 mg/L.

**Tabla 4.4** Contenido aproximado de iones metálicos en el drenaje pretratado y en las diluciones posteriores

Metal (mg/L)	Pretratado	1/2	1/3	1/5	1/10	1/15
Zn	2000	1000	666	400	200	133
Fe <sub>total</sub>	700	350	233	140	70	47
Cd	20	10	6,6	4	2	1,3

Para esta experiencia se utilizaron frascos de 10 mL, conteniendo 8,75 mL de drenaje pretratado o de sus respectivas diluciones y 1 mL del cultivo de la comunidad acidófila de MSR. El medio de cultivo (tabla 4.5) se preparó 40 veces más concentrado de lo habitual y sin agregado de Zn(II); de ese modo, sólo fue necesario agregar 250  $\mu\text{L}$  de ese medio para tener la concentración final deseada en todos los frascos

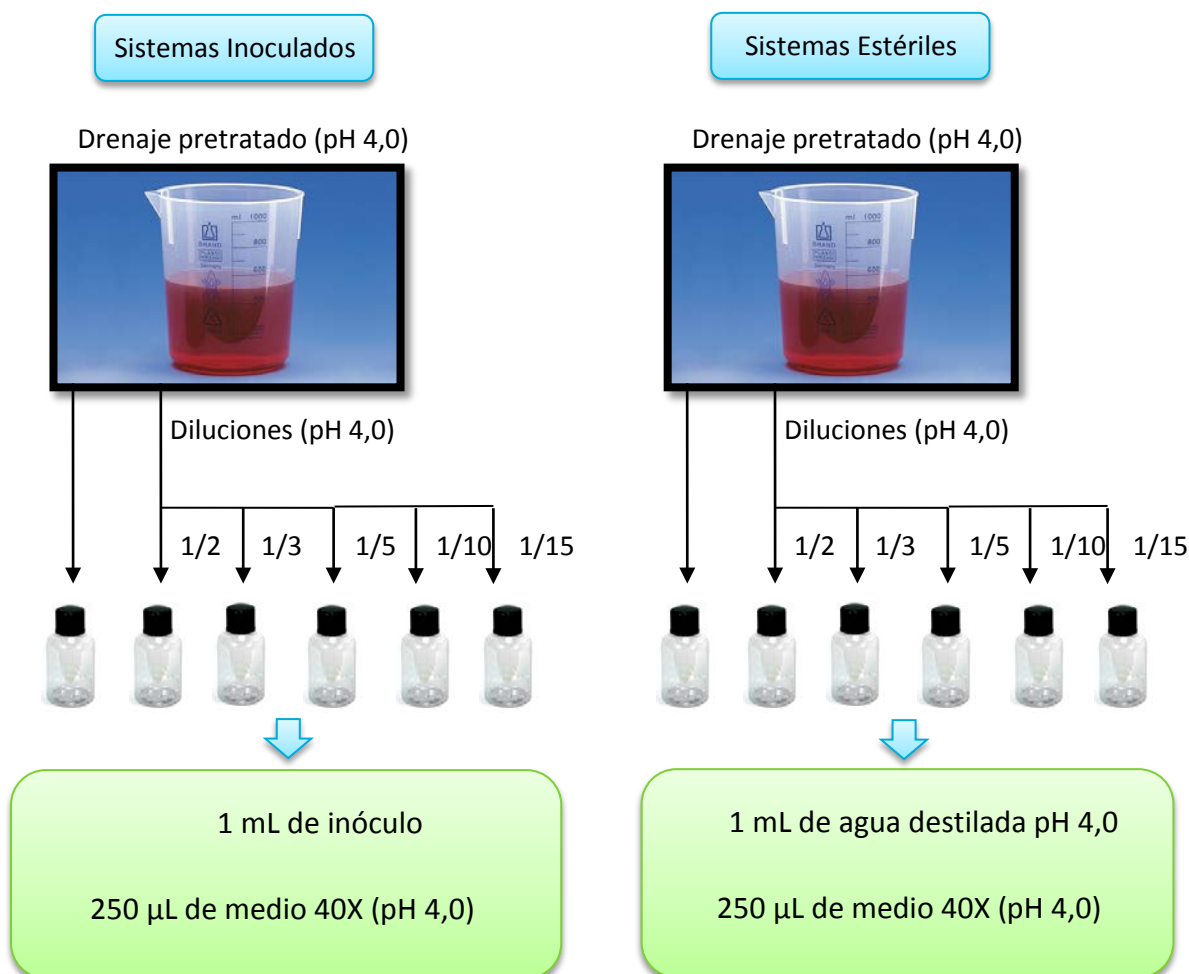
independiente de la dilución del drenaje. Los frascos se incubaron en jarras de anaerobiosis a 30°C durante 30 días. Todos los sistemas fueron preparados por cuadruplicado. Controles preparados de modo semejante al descrito se discontinuaron inmediatamente después de la inoculación para medir las concentraciones iniciales después de la precipitación inicial debido al sulfuro disuelto que contiene el inóculo. El tiempo de cultivo se extendió hasta 30 días considerando que las características extremas del efluente probablemente requerirían un mayor tiempo de aclimatación.

**Tabla 4.5** Medio de cultivo *aSRB* 40X (pH 4,0)

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Sales basales heterotróficas (50X)</b>	800 mL
<b>Elementos traza (1000X)</b>	40 mL
<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	34,8 g
<b>Glicerol 2M (concentración final 6mM)</b>	120 mL
<b>Extracto de levadura</b>	4 g
<b>ZnSO<sub>4</sub> 1M</b>	-
<b>Volumen final</b>	1000 mL

Se realizaron controles de crecimiento del consorcio utilizado y controles estériles y controles de precipitación. Para el primero, se inocularon frascos que no contenían drenaje y a los que se les agregó Zn(II) para constatar el crecimiento. Los controles estériles (que permitirían determinar la precipitación abiótica y también constatar posibles contaminaciones externas durante la experiencia) se realizaron con frascos sin inóculo pero con agregado de drenaje. Para el caso de los controles de precipitación inicial, los frascos se prepararon de la misma manera que los sistemas inoculados, pero se colocaron a una temperatura de 4°C y en condiciones aeróbicas para no permitir el desarrollo de MSR. De esta manera, permitiría comprobar no sólo la posible precipitación por sulfuro presente en el inóculo, sino también si existe algún

otro fenómeno que pueda reducir la concentración de metal en solución. La figura 4.10 muestra un esquema de la experiencia.



**Figura 4.10** Esquema de la experiencia de precipitación de metales pesados del drenaje ácido de la mina Pan de Azúcar.

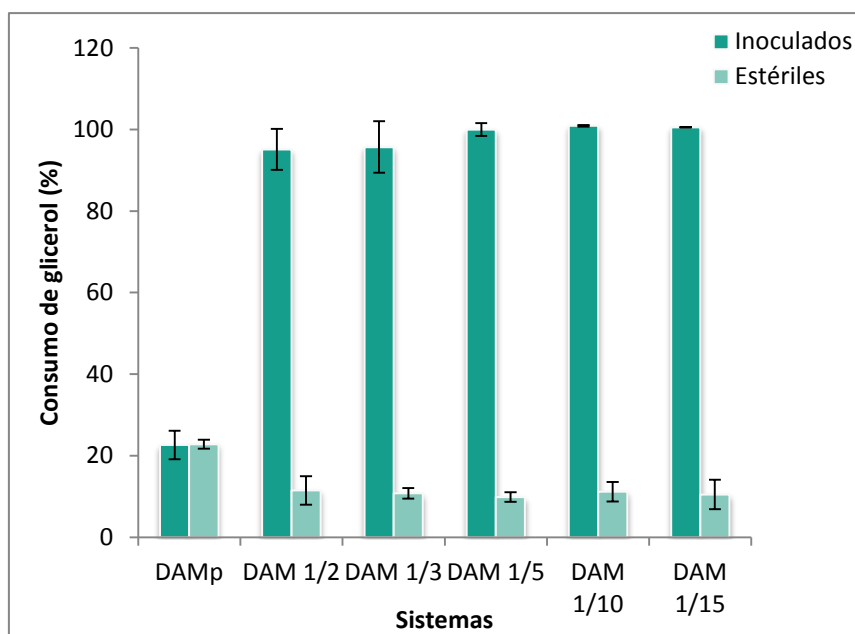
Como se indicó, la experiencia se detuvo a los 30 días y se realizaron todas las determinaciones analíticas luego de una filtración a través de membranas de acetato de celulosa de 0,22 µm de tamaño de poro para eliminar precipitados y células. Las concentraciones iniciales y finales de los metales se determinaron por EAA. En las diluciones mayores sólo se determinaron Fe y Zn, debido a que Cd estaba fuera del límite de detección. Antes de las determinaciones, las muestras fueron diluidas en solución de HNO<sub>3</sub> 0,14 N. La concentración de glicerol se determinó al comienzo y al final de la experiencia utilizando el método colorimétrico-enzimático ya descrito.

También se determinó el pH al inicio y al final de la experiencia. Se realizaron observaciones al microscopio óptico para confirmar la presencia de microorganismos en los sistemas inoculados.

#### IV.4.2. Resultados y Discusión

##### IV.4.2.1. Efecto del drenaje ácido sobre el crecimiento del consorcio

La figura 4.11 muestra el consumo de glicerol (%CG) por el consorcio acidófilo de MSR luego de 30 días de exposición al drenaje del pasivo minero Pan de Azúcar pretratado (pH 4,0) y a sus diferentes diluciones. El porcentaje de consumo de glicerol (%CG) fue calculado tal cual se indicara en la sección anterior.



**Figura 4.11.** Consumo de glicerol en los cultivos realizados con distintas diluciones de DAM pretratado (DAMp) del pasivo minero Pan de Azúcar

Se constató un consumo elevado de glicerol (99%) en todos los sistemas a partir de la dilución 1/2. No se detectaron células en el sistema más concentrado (DAM pretratado); en cambio, se observaron células con forma de bacilo en las diluciones. Las mismas se encontraron en su mayoría esporuladas o con esporas terminales, probablemente debido al estrés provocado por la presencia del drenaje ácido.

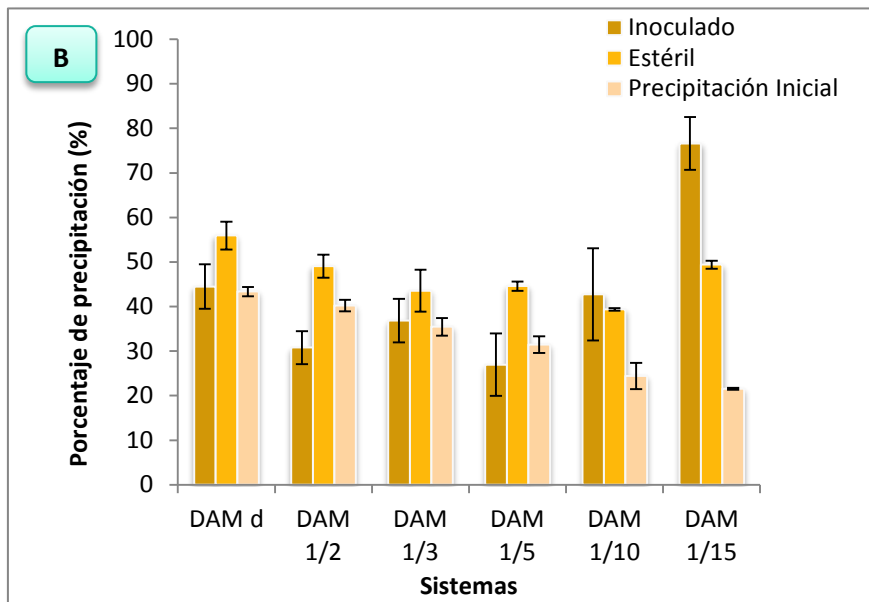
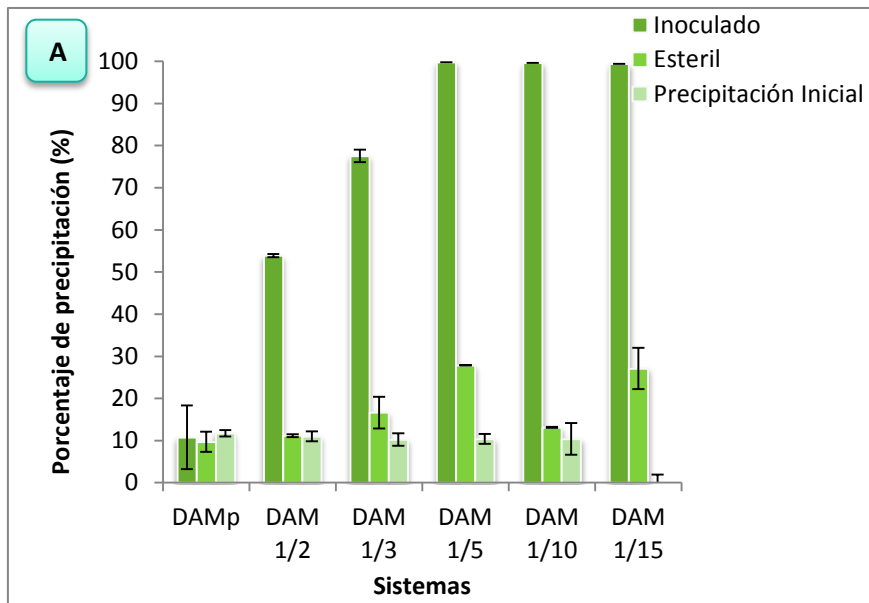
**Tabla 4.6.** Crecimiento del enriquecimiento en diferentes diluciones del drenaje pretratado

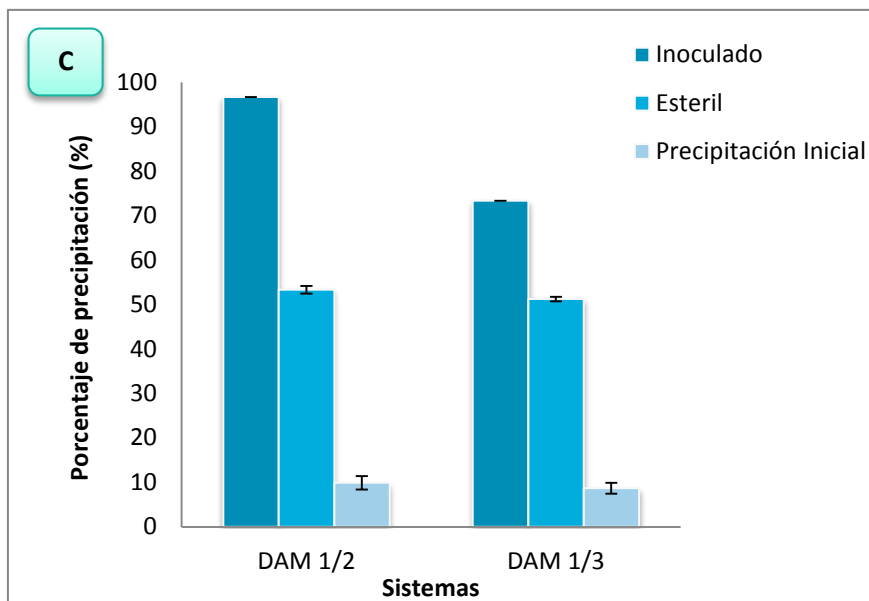
Sistema	Crecimiento
DAMp	-
DAM 1/2	+
DAM 1/3	++
DAM 1/5	++
DAM 1/10	++
DAM 1/15	++

Estos resultados sugieren que diluciones mayores o iguales al 50 % del DAM pretratado, no resultan inhibitorias para el crecimiento del consorcio de MSR. El DAMp contiene Cd(II) (tabla 4.4) en una concentración similar a la que soluciones artificiales producían inhibición en el consorcio (sección IV.3.2.1). Pero además, contiene al menos Fe(II) y Zn(II) en concentraciones muy superiores a las usuales en los medios de cultivo, lo que podría contribuir a la inhibición microbiana. De hecho, se han reportado concentraciones inhibitorias mínimas de 13 y 63 mg/L de Zn(II) para *Desulfovibrio desulfuricans* y *Desulfotomaculum nigrificans*, respectivamente (Radhika y col., 2006; Poulson y col., 1997). En las diluciones sucesivas del DAMp realizadas para este ensayo, las concentraciones de todos los metales bajan y probablemente esto disminuya la inhibición.

**IV.4.2.2. Precipitación de metales en el drenaje ácido del pasivo minero Pan de Azúcar**

Las figuras 4.12 A, B y C muestran los resultados de la precipitación de los metales Zn(II), Fe(II) y Cd(II), respectivamente. Los mismos fueron calculados de la misma manera que en la sección IV.3.2.2.





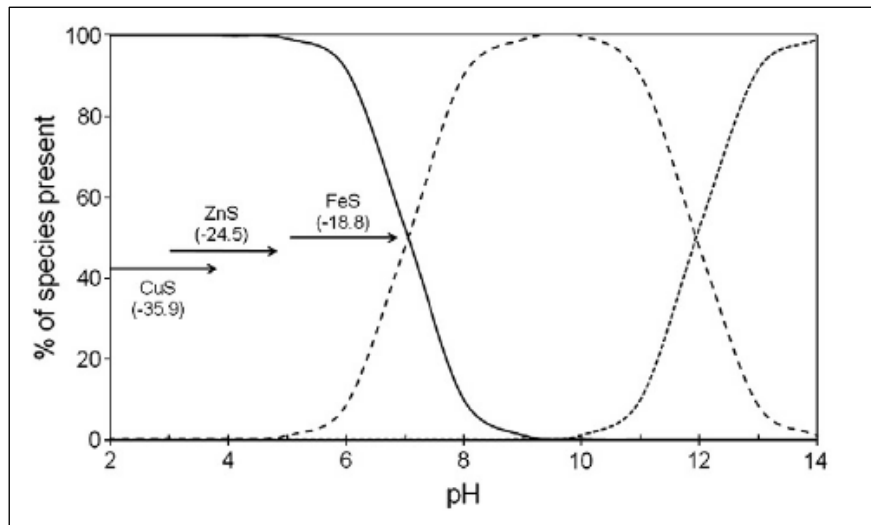
**Figura 4.12.** Porcentaje de precipitación de Zn (A), Fe (B), Cd (C) en distintas diluciones del DAMp en sistemas inoculados y estériles

La precipitación inicial de Zn(II) es muy baja e incluso similar al estéril en la mayoría de los casos. El porcentaje de precipitación de Zn(II) en el sistema DAMp es similar al estéril, por lo que no existe actividad microbiana significativa en este cultivo. Esto se condice con el bajo consumo de glicerol observado en este sistema (figura 4.11).

En cambio, se observaron elevados valores de precipitación de Zn(II) en los sistemas DAM 1/5, 1/10 y 1/15. Aunque existe remoción abiótica de Zn(II) en solución en estos sistemas, es significativamente menor a la que tiene lugar en los cultivos. En los sistemas DAM 1/2 y 1/3 los porcentajes de precipitación de Zn(II) fueron algo menores (54 -77% respectivamente) que en los sistemas más diluidos. Dado que el crecimiento de los MSR no se encuentra inhibido en los sistemas más concentrados con excepción de DAMp (figura 4.11 y tabla 4.6), el menor porcentaje de precipitación de Zn(II) puede deberse a que el sulfuro que se encuentra en solución no es suficiente para precipitar todo el metal que se encuentra en solución. Según la ecuación 4.2, la oxidación de 6 mM de glicerol (presente en el medio de cultivo) generará aproximadamente 10 mM de H<sub>2</sub>S que es sólo suficiente para precipitar

estequiométricamente (sin considerar otros equilibrios y otras precipitaciones) todo el Zn(II) presente hasta la dilución 1/3.

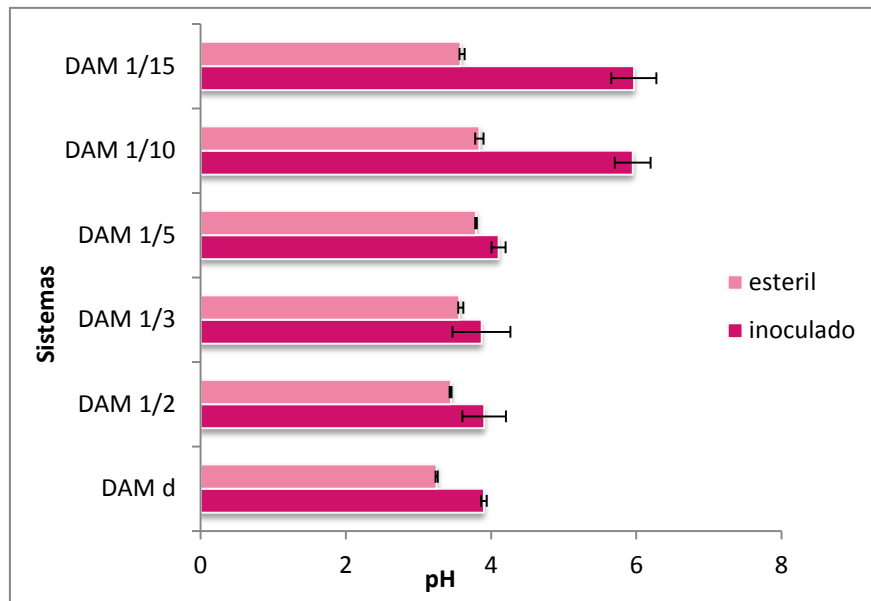
En este análisis debe tenerse presente que la especiación del sulfuro está fuertemente ligada al pH (Figura 4.13) y sólo a elevados pH, la concentración de los sulfuros es significativa. Esto determina que los sulfuros menos insolubles sólo podrán ser precipitados a valores de pH muy elevados.



**Figura 4.13.** Distribución de las diferentes especies de sulfuro de acuerdo al pH (H<sub>2</sub>S: línea continua, HS<sup>-</sup>: línea de rayas; S<sup>2-</sup>: línea de puntos).

La figura 4.14 muestra los valores de pH al final de la experiencia para los cultivos y para los controles estériles.





**Figura 4.14.** Valores finales de pH en sistemas inoculados y estériles en sistemas con distintas diluciones del drenaje.

En las diluciones menores del drenaje los valores de pH se elevan apenas ligeramente en los cultivos respecto de los estériles. Probablemente esto se pueda explicar por la reducción de Fe(III) debido a los sulfuros arrastrados por el inóculo y/o generados durante el crecimiento (sólo válido en las diluciones); la disminución de Fe(III) retrograda la hidrólisis y eleva el pH. En las diluciones mayores la reducción de sulfato produjo un incremento adicional de pH. En estos casos el aumento de pH en los cultivos fue muy superior (2 unidades aproximadamente) respecto de los controles estériles; las razones para el incremento son las descritas arriba aunque es más notable cuanto menores sean las concentraciones de Fe en el sistema.

En la figura 4.14 se muestran los precipitados en los cultivos. Los mismos mostraron diferencias incluso a nivel visual. En las diluciones menores se observa precipitado blanco (ZnS), incluso en aquellas 1/2 y 1/3 que no se muestran en la figura, mientras que en las diluciones mayores se observa precipitado negro (FeS).



**Figura 4.14.** Precipitados formados en los cultivos con diferentes diluciones del DAMp (1/5, 1/10 y 1/15)

Los porcentajes de precipitación de hierro en los cultivos y en los estériles conteniendo DAMp y las diluciones 1/2, 1/3 y 1/5, son muy semejantes. Se observó incluso una importante precipitación inicial. El consumo de glicerol indica actividad sulfidogénica en los cultivos con las distintas diluciones. Los sulfuros formados por esa actividad pueden reducir Fe(III) y, el exceso de sulfuros, eventualmente puede generar FeS; no obstante, Fe(III) está en un gran exceso lo que reducirá drásticamente la concentración de sulfuros y evitando la precipitación. Más aún, en las bajas diluciones el bajo valor de pH impide la formación de precipitados de FeS que es un sulfuro bastante soluble. Esa es la razón por la que el precipitado formado es el de ZnS aunque probablemente también precipitan especies insolubles de Fe(III) justificando el descenso de su concentración en solución. En las diluciones mayores, el pH es suficientemente elevado en los cultivos como para permitir la precipitación de FeS.

En los cultivos con diluciones menores fue posible la determinación de Cd(II) en solución tanto al inicio como al final de la experiencia. En la figura 4.12 C se observa que fue completamente precipitado en los cultivos, seguramente como CdS, lo que es compatible con su mayor insolubilidad respecto de ZnS y FeS.

#### **IV.5. CONCLUSIONES FINALES DEL CAPÍTULO**

- Se observó actividad sulfato-reductora del consorcio acidófilo en presencia de diferentes concentraciones de los metales pesados ensayados. No se observó inhibición por la presencia de Ni(II) hasta 100 mg/L. Cu(II) y Cr(III) provocaron inhibición a 100 mg/L mientras que Cd(II) produjo inhibición a 50 mg/L.
- Durante el crecimiento se produjo una importante precipitación de los metales, como sulfuros para Cu(II), Cd(II) y Ni(II) y como especies básicas para Cr(III), y un ascenso del valor de pH
- Se observó una importante actividad sulfato-reductora del consorcio acidófilo de MSR en un sistema real: el DAM pretratado del pasivo minero Pan de Azúcar y sus diluciones.
- La actividad microbiana permitió precipitar todo el Zn(II) presente en las diluciones 1/5, 1/10 y 1/15, como ZnS.
- El aumento del pH solo fue significativo en las diluciones mayores del DAM y esto permitió también la precipitación de FeS.



# Conclusiones Generales

---



## CONCLUSIONES GENERALES

Los objetivos de este trabajo de Tesis Doctoral se enmarcan dentro del estudio de estrategias de remediación de metales pesados de efluentes producidos por diferentes tipos de actividades humanas. Está ampliamente aceptado que las alternativas biológicas son, en general, menos costosas y producen menor impacto ambiental que las tecnologías tradicionales. Dentro de las estrategias de biorremediación de metales pesados, la bioprecipitación surge como una tecnología incipiente para la cual todavía se requieren desarrollos a nivel básico y aplicado. No obstante, el proceso debe ser mejorado para ampliar su aplicación para el tratamiento de efluentes ácidos de alta carga metálica en los cuales los microorganismos sulfato-reductores se encuentran usualmente inhibidos. Es por eso, que la búsqueda de consorcios acidófilos resultaría en una mejora significativa.

Entre los resultados más relevantes de este trabajo, se destaca la detección de actividad sulfato-reductora en sedimentos de múltiples zonas del campo geotermal Caviahue-Copahue y la obtención de consorcios microbianos tanto bajo condiciones ácidas (pH 3,0) como neutras (pH 7,0). En los consorcios acidófilos, el principal microorganismo responsable de la reducción de sulfato es *Desulfobacillus acidavidus*; en el consorcio también se detectaron microorganismos oxidantes del azufre y del hierro como *Acidithiobacillus ferridurans/ferriphilus*, *Alicyclobacillus tolerans* y *Sulfobacillus thermotolerans*. En los consorcios a pH neutro, los principales microorganismos sulfato reductores son una especie de *Desulfotomaculum*, a 40°C, y *Desulfovibrio vulgaris* a 30°C. La detección e identificación de las arqueas sulfato-reductora fue solo parcialmente exitosa engrosando los estudios necesarios realizar en el futuro próximo.

El conocimiento de la diversidad microbiana en los sedimentos, donde se presentan distintas especies capaces de metabolizar compuestos de azufre y de hierro, tanto aeróbica como anaeróbicamente, permitió proponer modelos microgeoquímicos para los ciclos del S, Fe y C para los sedimentos de temperatura moderada y para los de alta temperatura.

Un resultado relevante de esta Tesis es el aislamiento de dos especies nuevas pertenecientes a los géneros *Desulfotomaculum* y *Desulfobacillus*, ambos de los cultivos a 40°C, propuestas como *Desulfotomaculum copahuensis* y *Desulfobacillus copahuensis*. Estas especies fueron caracterizadas desde el punto de vista fisiológico y morfológico. Las mismas son oxidantes incompletos de la fuente de carbono y energía, son capaces de crecer óptimamente a 40°C y utilizan distintas fuentes de carbono y energía.

*Desulfotomaculum copahuensis* es una de las pocas especies de este género que es capaz de crecer sobre una gran variedad de azúcares. Coincidentemente con otras especies de este género, el pH óptimo para esta especie es pH 7,0 aunque es capaz de crecer a valores de pH de hasta 4,5. Se obtuvo un borrador de su genoma que permitió complementar la información fisiológica. Un análisis más profundo aun pendiente, seguramente permitirá encontrar posibles características metabólicas con potencial aplicación en procesos biotecnológicos de interés.

La nueva especie de *Desulfobacillus* parece resistir mejor las condiciones de acidez que *Desulfobacillus acidavidus* que era la única especie previamente propuesta para este género. Crece en forma óptima en el rango de pH entre 3,5-4,5 y utiliza diferentes azúcares y etanol como fuentes de carbono y energía.

Los consorcios acidófilos fueron capaces de tolerar concentraciones importantes de distintos cationes metálicos: Ni(II), Cd(II), Cu(II) y Cr(III). Simultáneamente se produjo la precipitación de sulfuros en los tres primeros casos y de una especie básica de Cr(III) no identificada completamente. Los consorcios acidófilos también fueron capaces de desarrollar actividad sulfidogénica al ser inoculadas en un sistema real como es el drenaje ácido del pasivo minero de Pan de Azúcar, previamente tratado y diluido; en ese caso, fueron capaces de precipitar todo el cinc presente y también el hierro en las mayores diluciones y, además, lograron neutralizar el drenaje.

Los resultados obtenidos en esta Tesis han permitido corroborar la hipótesis de que en sedimentos anóxicos de bajo pH, existen consorcios de microorganismos sulfato-reductores con capacidad sulfidogénica aún a bajos valores de pH. Esta tesis también ha confirmado la existencia de especies autóctonas de arqueas y bacterias que participan activamente en los ciclos biogeoquímicos. Finalmente, estos consorcios



acidófilos son capaces de lograr precipitación de iones metálicos aún en sistemas de bajo pH en un proceso que podría utilizarse en estrategias de remediación de efluentes industriales con alta carga metálica y frecuentemente ácidos y también, como fue comprobado en estos estudios, en el tratamiento de drenajes ácidos de minas; este tratamiento provoca disminución de la carga metálica y de sulfatos e incremento del pH.

**PERSPECTIVAS FUTURAS GENERADAS POR ESTE TRABAJO DE TESIS**

- Aislar e identificar arqueas sulfato-reductoras en pozos de mayor temperatura de la zona geotermal
- Aislar nuevos consorcios de bacterias sulfato-reductoras acidófilas en otros pozos de ésta y otras zonas termales
- Estudiar aspectos tecnológicos de la remediación de metales usando consorcios acidófilos de microorganismos sulfato-reductores: sistemas continuos, inmovilización de MSR, drenajes con mezcla de metales, etc.

---

**PRODUCCION CIENTIFICA VINCULADA CON ESTE TRABAJO DE TESIS**

A continuación se indican la producción científica vinculada con este trabajo de Tesis. Se incluyeron los artículos y capítulos de libros ya publicados así como aquellos en preparación y también las presentaciones a congresos realizadas en estos años

**Artículos publicados:**

- Urbietta M.S, **Willis Poratti G.**, Segretin A., Gonzalez Toril E., Giaveno A., Donati E. (2015) Copahue geothermal system: a volcanic geothermal environment with rich prokaryotic biodiversity. *Microorganisms* 3, 344-363.
- **Willis Poratti G.**, Hedrich S., Ñancucheo I., Johnson B., Donati E.R. (2013) Microbial diversity in acidic anaerobic sediments from geothermal Cavihue – Copahue system. *Advanced Materials Research* 825, 7-10.

**Artículos en preparación:**

- Enrichment and isolation of acidophilic, heavy metal resistant sulfate-reducing bacteria from an extremely acidic geothermal volcanic area, Copahue, Argentina. *En preparación.*
- Heavy metal removal from acidic pre-treated acid mine drainage by a novel acidophilic sulfate-reducing consortium. *En preparación.*

Además, se prepararán artículos para presentar las nuevas especies para su publicación en *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, y para la presentación de sus “draft” genomas para su publicación en *Genome Announcement*.

**Capítulos de libro:**

- **G. Willis**, E. Donati. Sulfate-reducing microorganisms for chromium immobilization. A incluirse en *Chromium bioremediation* que será publicado por Springer.

- Benitez L., Plaza Cazón J., **Willis Poratti G.**, Donati E. Microbial Generation of Acid Mine Drainage. Its Bioremediation in Buenos Aires, Argentina. Incluido en: Bioremediation in Latin America. Current Research and Perspectives, editado por Polti M., Alvarez A., Springer, 165-178, 2014 (ISBN 978-3-319-05738-5).
- Plaza Cazón J., **Willis Poratti G.**, Medina S., Donati E. Biosorción y Bioprecipitación: dos aportes biológicos para la remediación de metales pesados. Incluido en: Contribuciones Científicas al Segundo Taller Argentino de Ciencias del Ambiente, editado por Sala L.F., Editorial Zeus S.R.L., 2012 (ISBN: 978-950-664-110-8).

**Presentaciones a congresos:**

- “Efecto de la temperatura y el pH en comunidades sulfato-reductoras aisladas del volcán Copahue”. **Graciana Willis Poratti**, Marcela Hipperdinger, Edgardo Donati. 3º Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (SAProBio). 2014.
- “Biorremediación de metales pesados”. **Graciana Willis Poratti**, Ana Belén Segretin, Cecilia Bernardelli, Leonardo Benitez, Josefina Plaza Cazón, Edgardo Donati. V Jornadas de Ciencia y Tecnología. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. 2014.
- “Pasivos ambientales. Relevamiento y tratamiento”. Leonardo Benitez, Josefina Plaza Cazón, **Graciana Willis Poratti**, Edgardo Donati. V Jornadas de Ciencia y Tecnología. V Jornadas de Ciencia y Tecnología. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. 2014.
- “Microbial diversity in extreme anaerobic sediment from geothermal Caviahue-Copahue system, Argentina”. **Graciana Willis Poratti**, Edgardo Donati. X Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE. 2014.
- “Bioprecipitación de metales pesados con comunidades sulfato-reductoras obtenidas de la zona geotermal de Caviahue-Copahue”. **Graciana Willis Poratti**, Alejandra Giaveno, Edgardo Donati. XI Jornadas Argentinas de Tratamiento de Minerales – JATRAMI. 2012.

- “Bioprocesos en la remediación de metales”. Bernadelli Cecilia, Plaza Cazón Josefina, **Willis Poratti Graciana**, Donati Edgardo. II Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (SAPROBIO). 2012.
- “En la búsqueda de extremófilos”. Castro Camila, Medina María Sara, **Willis Poratti Graciana**, Urbieto María Sofía, Donati Edgardo. II Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (SAPROBIO). 2012.



# Anexos

---





## Anexo I: Métodos Analíticos

### I.1. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

#### Principio:

La espectrofotometría de absorción atómica con llama es un método analítico para la determinación cuantitativa de elementos, basado en la absorción luminosa específica por átomos libres en estado fundamental.

Al introducir una solución de un elemento metálico, en forma de niebla (pequeñas gotitas) en el seno de una llama adecuada ocurren los siguientes procesos:

- ✓ Volatilización del solvente.
- ✓ El soluto desolvatado funde.
- ✓ El soluto se volatiliza.
- ✓ El soluto se disocia total o parcialmente para formar un vapor atómico.

Estos átomos libres, que se encuentran en el estado fundamental, pueden pasar al primer estado excitado absorbiendo luz de determinada longitud de onda ( $\lambda$ ), la cual es característica del elemento y del salto energético.

Si la llama es adecuada, las condiciones de la misma hacen que la mayor parte de los átomos que constituyen el vapor atómico se encuentren en el estado fundamental y sean capaces de absorber la radiación característica.

En espectrofotometría de absorción atómica, se utiliza la primera línea de resonancia que es la que conduce al primer estado excitado ya que es la más sensible. Se pueden usar otras menos sensibles cuando el elemento a determinar se encuentra en mayores proporciones.

Cuando un haz de luz monocromático (de longitud de onda correspondiente a la línea de resonancia de un elemento) se hace pasar a través de la llama, la intensidad del haz decrecerá como resultado de la absorción, si es que en el paso de la luz se

encuentran átomos del elemento. La absorción de la luz es proporcional a la concentración de los átomos en la llama, por lo que puede utilizársela como una medida de la concentración del elemento.

Con respecto a las medidas, debe construirse primero la curva de calibración con patrones que contengan cantidades conocidas del elemento a determinar. Luego se regula la lectura del instrumento en 0.00 de absorbancia mientras se nebuliza agua destilada (el solvente o el blanco). A continuación se nebulizan los patrones en orden creciente de concentración y, por último, las muestras. La interpolación de la curva de calibración con los valores de absorbancia correspondiente a las muestras, permite obtener sus valores de concentración. A continuación, se indican las condiciones de operación del equipo para la determinación de cada uno de los metales.

**Cromo:**

Lámpara de Cr de cátodo hueco

Longitud de onda: 357.9nm.

Combustible: acetileno

Oxidante: aire

Corrección de background: si

Corriente de lámpara: 10mA

Ranura: 0.5nm.

**Níquel:**

Lámpara de Ni de cátodo hueco

Longitud de onda: 232.0 nm

Combustible: acetileno

Oxidante: aire

Corrección de background: si

Corriente de lámpara: 12mA

Ranura: 0.2 nm

***Cadmio:***

Lámpara de Cd de cátodo hueco

Longitud de onda: 228.8nm.

Combustible: acetileno

Oxidante: aire

Corrección de background: si

Corriente de lámpara: 8mA

Ranura: 1.0nm.

***Cobre:***

Lámpara de Cu de cátodo hueco

Longitud de onda: 324.8nm.

Combustible: acetileno

Oxidante: aire

Corrección de background: si

Corriente de lámpara: 6mA

Ranura: 0.5nm.

***Cinc:***

Lámpara de Zn de cátodo hueco

Longitud de onda: 213.9nm.

Combustible: acetileno

Oxidante: aire

Corrección de background: si

Corriente de lámpara: 8ma

Ranura: 0.5nm.

***Hierro:***

Parámetros instrumentales:

Lámpara de Fe de cátodo hueco

Longitud de onda: 248.3nm.

Combustible: acetileno

Oxidante: aire

Corrección de background: si

Corriente de lámpara: 10ma

Ranura: 0.5nm.

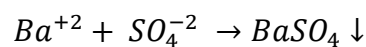
Se utilizó el método analítico que responde a la norma 7950 EPA (absorción atómica, aspiración directa) con un espectrofotómetro Shimadzu AA-6650.

Previamente a la determinación, todas las muestras líquidas fueron filtradas a través de membranas de 0,22 µm de tamaño de poro. En los casos en que fue necesario las muestras fueron diluidas en solución de HNO<sub>3</sub> 0,14 M previamente filtrado.

## **I.2. DETERMINACIÓN DE SULFATO**

### **Principio:**

Esta técnica se basa en la reacción del ion sulfato con el bario en medio ácido, para formar sulfato de bario sólido en forma de cristales de tamaño uniforme. La luz absorbida por la suspensión es medida en un espectrofotómetro y la concentración de sulfato es determinada por comparación de la lectura con respecto a una curva estándar.



### **Preparación de la muestra:**

Antes de la determinación del sulfato remanente en el medio de cultivo, los elementos suspendidos (biomasa y precipitados inorgánicos) fueron separados de la muestra por centrifugación, ya que la presencia de éstos en suspensión interfiere en la medida de la turbidez.

Para la determinación de sulfato se midieron 0,250 ml de la muestra límpida, en el caso de cultivos con baja concentración de sulfato, y 0,125 ml para el resto. Luego se agregaron 0,250 ml de solución reguladora y se completó el volumen de 6,75 ml finales con agua destilada. Posteriormente, se adicionó solución de  $\text{BaCl}_2$ , se agitó vigorosamente durante 30 segundos y se midió en celda de 1 centímetro de camino óptico contra el blanco (agua destilada). La lectura se realizó a 450 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640 (Greenberg et al., 1985).

Composición de solución reguladora para determinación de sulfato

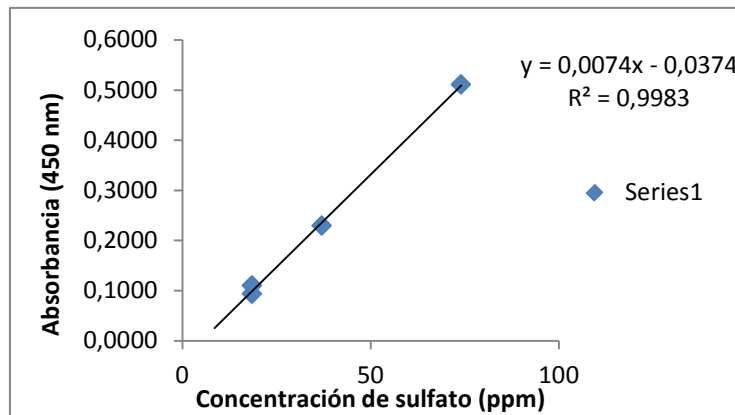
<i>Compuesto</i>	<i>Cantidad</i>
HCl (C)	4,5 ml
Alcohol etílico	15 ml
NaCl	11,25 g
Agua destilada	45 ml

#### **Preparación de la solución patrón de sulfato:**

Para preparar 100 ml de una solución 1000 mg/L de sulfato agregado como  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; para ello se disolvieron 0,148 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (anhidro) en  $\text{H}_2\text{O}$  (d) y se llevó a volumen con agua destilada en un matraz de 100 ml.

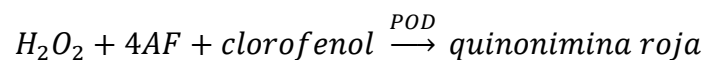
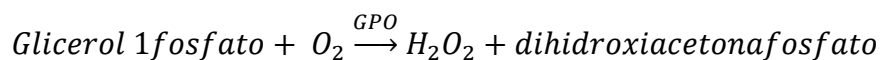
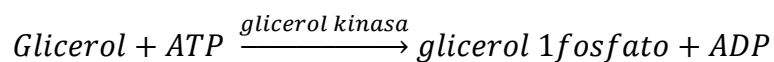
#### **Curva de calibración para la determinación de sulfato:**

Para la preparación de la curva de calibración se mezclaron diferentes volúmenes de una solución stock de 1000 mg/L de sulfato con 0,250 mL de solución reguladora y se completó el volumen de 6,75 mL con agua destilada. Las concentraciones de sulfato usadas para la curva de calibración fueron: 18,75, 37,03 y 74,07 mg/L. En la figura siguiente se muestra una curva de calibración semejante a las usadas.



### I.3. DETERMINACIÓN DE GLICEROL

Para las determinaciones de la concentración de glicerol se utilizó un kit comercial que se basa en una reacción enzimática:

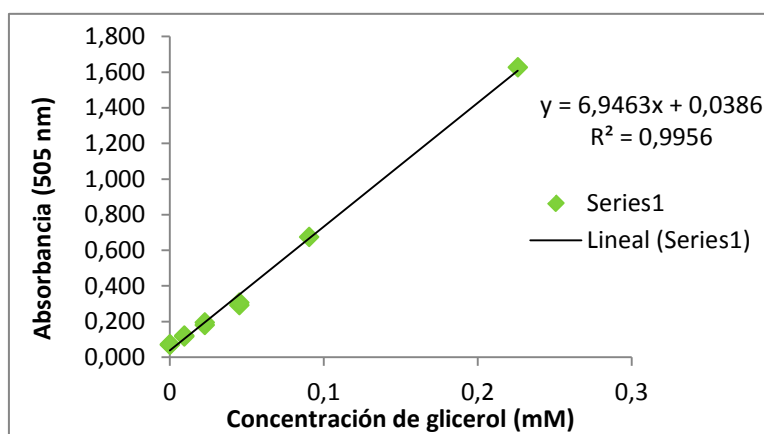


El kit contiene el **Reactivo A** y la solución **Standard**. El Reactivo A está formado por el buffer Good, clorofenol y las enzimas y reactivos necesarios para las reacciones detalladas más arriba.

Para la determinación de glicerol se midieron 5  $\mu\text{l}$  de la muestra límpida para cultivos con alta concentración de glicerol y 25  $\mu\text{l}$  en los otros casos. Luego se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de Reactivo A y se completó el volumen de 250  $\mu\text{l}$  finales con agua destilada. Se incubó durante 25 minutos a temperatura ambiente. Las medidas se realizaron por duplicado en placas de Elisa, en un espectrofotómetro a 505 nm.

**Curva de calibración para la determinación de glicerol:**

Para la preparación de la curva de calibración se mezclaron diferentes volúmenes de una solución stock de 2,26mM de glicerol y 0,226 mM de glicerol, con diferentes volúmenes de solución de Reactivo A y completando con agua destilada un volumen de 250 µl. Las concentraciones de glicerol usadas para la curva de calibración fueron: 0,226, 0,0904, 0,0452, 0,0226 y 0,0094 mM. La siguiente figura muestra una curva de calibración típica.

**I.4. DIGESTIÓN ÁCIDA DE SEDIMENTOS**

Se utilizó para la determinación del contenido de metales en los sedimentos (capítulo II) Este método es una digestión ácida fuerte en donde se disolverán los elementos de acuerdo a su asociación con la matriz sólida; este tratamiento permite disolver los elementos de un modo semejante a lo que ocurre a nivel ambiental.

**Protocolo:**

1. Se realiza la homogeneización completa de la muestra.
2. Se pesan 1-2 g de la muestra que se destinan a la digestión.
3. Se agregan 10 mL de solución de HNO<sub>3</sub> 1:1, se mezcla y se cubre la boca del recipiente con un vidrio de reloj. Se calienta la muestra a 95°C sin hervir durante 10 a 15 minutos. Se enfría la muestra y se agregan 5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado para

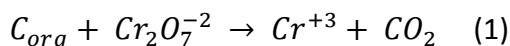
finalmente calentar durante 30 minutos. Se continúa agregando 5 mL de HNO<sub>3</sub> hasta que no se observen vapores marrones, indicando que no existe en la muestra material que pueda seguir oxidándose.

4. Una vez que el paso 3) se ha completado y la muestra se enfría, se agregan 2 mL de agua destilada y 3 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Se continúa agregando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% hasta que no se observe efervescencia de la muestra sin superar los 10 mL.
5. Se calienta la muestra a 95°C durante dos horas, hasta que el volumen se reduzca aproximadamente 5 mL.
6. Se agregan 10 mL de HCl concentrado y se calienta a 95°C durante 15 minutos.
7. Se filtra a través de papel de filtro Whatman N° 41 o similar y se colecta el filtrado en un matraz de 100 mL.
8. Se agregan 2,5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado y 10 mL de HCl concentrado y luego se lleva a volumen con agua destilada. Se mide en el espectrofotómetro de absorción atómica.

Los cálculos se realizan en base a la masa pesada y al porcentaje de humedad determinado previamente en las muestras.

### **I.5. MEDIDA DE CARBONO ORGANICO TOTAL (COT)**

Esta técnica se basa en la reacción de oxidación de la materia orgánica a CO<sub>2</sub> en medio ácido por acción de dicromato (ecuación 1). Generalmente no ocurre la oxidación completa, por lo que en el cálculo final se utiliza un factor de corrección. Se coloca exceso de dicromato, que luego de la reacción es titulado con hierro(II) (agregado como sal de Mohr), en una titulación redox.

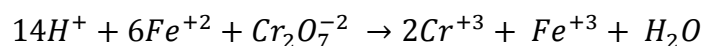


#### **Protocolo:**

1. Se pesan aproximadamente 0,1 g de la muestra y se colocan en un erlenmeyer de 125 mL.
2. Se agregan 10 mL de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 1N. Se agita suavemente



3. Se agregan 20 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (c) bajo campana. Se agita, se mezcla y se deja en reposo durante 30 minutos bajo campana.
4. Se agrega un poco de agua destilada para neutralizar la acidez y se filtra con papel de filtro banda azul. Se lava el papel de filtro con agua.
5. Se lleva a volumen en un matraz de 250 mL.
6. Se titulan 10 mL con solución de al de Mohr, previamente valorada con solución de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 1N, con 2 o 3 gotas de indicador de ferroina. El ferroso reaccionará con el exceso de dicromato que no oxidó la materia orgánica, según la ecuación:



7. Paralelamente debe hacerse un blanco sin muestra.
8. El porcentaje de carbono orgánico total (COT) se calcula con la siguiente fórmula:

$$\%COT = \frac{(B-S) \cdot MsaldeFe^{+2} \cdot 12}{grmuestra \cdot 4000} \times 100 \times 3,9$$

B= mL de solución de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 1N gastados en el blanco

S= mL de solución de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 1N gastados en la muestra

12/4000= miliequivalentes en peso de C en g

M= Normalidad de la sal de Mohr

3,9= factor de corrección

#### **Preparación de la solución de ferroina:**

Se disuelven 1,485 g de o-fenantrolina y 0,693 g de FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O en 100 mL de agua destilada. La concentración de la solución es de 3,3 g/L.

#### **Preparación de la solución de sal de Mohr (Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O):**

La solución se prepara aproximadamente 0,25 N ya que luego será titulada con la solución de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 1N que se utilizará como patrón primario. Se deben tener en

cuenta los equivalentes redox ya que va a participar en una reacción redox. Se pesan entonces 49,0175 g de sal de Mohr y se disuelven en 500 mL de agua acidificada.

La solución puede oxidarse por lo que debe guardarse en la heladera y valorarla cada vez que se utiliza.

#### **Preparación de la solución de $K_2Cr_2O_7$ 1N:**

La sal debe secarse antes en la estufa porque se utiliza como patrón primario. Para preparar 500 mL de solución 1N de  $K_2Cr_2O_7$  se deben pesar 24,517 g de la sal.

### **I.6. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)**

La cromatografía *líquida de alta eficacia o high performance liquid chromatography (HPLC)* es un tipo de cromatografía en columna que permite separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

#### **Principio:**

En la *HPLC isocrática* el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados

sonagua, metanol y acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos.

**Preparación de la muestra:**

Todas las muestras líquidas en las cuales se realizó la determinación de azúcares y ácidos orgánicos fueron filtradas a través de membranas de 0,22 µm de tamaño de poro. En los casos en que fue necesario las muestras fueron diluidas en agua destilada filtrada por membrana de 0,22µm de tamaño de poro.

**Condiciones de corrida para la determinación de ácidos orgánicos:**

Columna Hamilton PRP X 300, detector de arreglo de diodos, medida a 210 nm.

Fase móvil: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH aproximadamente 2.

Flujo: 2 mL/min

**Condiciones de corrida para la determinación de azúcares:**

Columna CarboPack Pa1, detector electroquímico.

Fase móvil: NaOH 0,1 M

## Anexo II: Medios de cultivo

### II.1. MEDIO DE CULTIVO PARA BACTERIAS SULFATO-REDUCTORAS NEUTRÓFILAS

El medio utilizado en este caso es el formulado por J.R. Postgate, denominado Postgate B, que se detalla a continuación:

Composición del medio de cultivo Postgate B

<i>Compuesto</i>	<i>Cantidad (por L)</i>
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,5 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1 g
$\text{CaSO}_4$	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 g
Lactato de Sodio	3,5 g (5 ml al 50%)
Extracto de levadura	1 g
$\text{FeSO}_4$	0,5 g
Ác. Ascórbico	0,1 g
Ác. Tioglicólico	0,1 g
Agua destilada	1 litro
pH	7 – 7,5

### II.2. MEDIO DE CULTIVO PARA BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS ACIDÓFILAS (aSRB)

El medio de cultivo se detalla más abajo: Ese medio debe llevarse a pH y luego se lo burbujea con  $\text{N}_2$  durante 1 hora para desplazar el  $\text{O}_2$  presente. Posteriormente se esteriliza en autoclave a  $120^\circ\text{C}$  durante 20 minutos. La solución de  $\text{FeSO}_4$  es esterilizada por filtración y se agrega una vez que el resto del medio está esterilizado.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad (por L)</b>
HBS (Heterotrophic Basal Salts) 50X	20 mL
TE (Trace Elements) 1000X	1 mL
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,87 g
ZnSO <sub>4</sub> 1M	4 mL (4 mM)
Glicerol 1M	3 mL (3 mM)
Extracto de levadura	0,1 g
FeSO <sub>4</sub> 1M pH 2,0	100 µl (100 µM)
Volumen final	1 L
pH	3,0

### II.3. MEDIO DE CULTIVO OVERLAY PARA BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS ACIDÓFILAS

El medio se detalla más abajo. El mismo se divide en tres botellas. Una de ellas se utiliza para la capa de abajo (*underlay*), que contiene 295 mL de medio de cultivo, y las otras dos para la capa de arriba (*overlay*) que contienen 300 mL de medio de cultivo. Una vez esterilizado el medio, se le agrega a cada botella una solución estéril de agarosa 2%. Se trata de mantener todo en un baño a 55°C que es la temperatura de fusión de la agarosa. En primer lugar se agregan 5 mL de un cultivo crecido de *Acidocella PFBC* (ver medio más abajo) a la botella para el *underlay*. Luego se agregan 40 µl de FeSO<sub>4</sub> 1M, se mezcla y se coloca una fina capa sobre las placas. Una vez solidificado, se le agrega la capa de arriba más gruesa que no contiene *Acidocella PFBC*, donde se realiza la siembra.

<i>Compuesto</i>	<i>Cantidad (por L)</i>
HBS (Heterotrophic Basal Salts) 50X	24 mL
TE (Trace Elements) 1000X	1,2 mL
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,87 g
ZnSO <sub>4</sub> 1M	4,2 mL (4 mM)
Glicerol 1M	2,4 mL (3 mM)
Extracto de levadura	0,24 g
Volumen final	895 mL
pH	3,5

#### II.4. MEDIO DE CULTIVO PARA *ACIDOCELLA* PFBC

Se combinan las sales basales, los elementos traza, extracto de levadura en agua y se autoclava. Luego se adicionan las soluciones de fructosa y FeSO<sub>4</sub> esterilizadas previamente por filtración

<i>Compuesto</i>	<i>Cantidad (por L)</i>
HBS (Heterotrophic Basal Salts) 50X	20mL
TE (Trace Elements) 1000X	1 mL
Fructosa 1M	5 mL
FeSO <sub>4</sub> 1M pH 2.0	0,1mL
Extracto de levadura	0,1 g
Volumen final	1 L
pH	3,5

#### II.5. ELEMENTOS TRAZA (1000 X)

Se ajusta el pH de 800 mL de agua destilada en un valor 2,0 con solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Luego se agregan las sales mencionadas más abajo en el orden en el que se encuentran, permitiendo que cada una se disuelva antes de agregar la siguiente. Luego del agregado de la sal de vanadio (NaVO<sub>3</sub>), se lleva a volumen de 1 litro, se ajusta nuevamente el pH y se autoclava.

<i>Compuesto</i>	<i>Cantidad (g/L en 0,01M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)</i>
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1
Cr <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·15H <sub>2</sub> O	0,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,6
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,5
NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> ·10H <sub>2</sub> O	1
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,1
NaVO <sub>3</sub> (glitro <sup>-1</sup> en 0.01M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0,1

## II.6. SALES BASALES HETEROTROFICAS (50 X)

<i>Compuesto</i>	<i>Cantidad (g/L)</i>
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·10H <sub>2</sub> O	7,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	22,5
KCl	2,5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,7

## II.7. MEDIO DE CULTIVO MAC (50 X)

<i>Compuesto</i>	<i>Cantidad (g/L)</i>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,61
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,54
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7,35
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,36
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (conc)	26,5 mL

Preparar en frasco de 1L que resista calentamiento. No se esteriliza. Las sales no se disolverán hasta no ser calentado a 60°C

## II.8. ELEMENTOS TRAZA 1000X (PARA MEDIO MAC)

<i>Compuesto</i>	<i>Cantidad (g/L)</i>
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,0990
ZnCl <sub>2</sub>	0,0680
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1012
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0310
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0121
Cu Cl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0853

Ajustar pH 2 con HCl

Esterilizar por filtración

*Para preparar MAC 1X diluir 20 mL de MAC 50X en H<sub>2</sub>O destilada y autoclavar.  
Agregar 1 mL de solución de elementos traza en esterilidad.*

## II.9. MEDIO LB

<i>Compuesto</i>	<i>Cantidad (g/L)</i>
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
pH (con NaOH)	7

Para placas en medio sólido, se agrega agar en concentración 1,5% p/v antes de esterilizar. Se enfria a 50°C y se plaquea. Se puede agregar también ampicilina para realizar la clonación. Para 1 L de medio debe agregarse 1 mL de ampicilina 1000 X, para lograr una concentración final de 100 µg/ml.



**II.10. LB con AMP/IPTG/X-GAL**

La concentración final de cada uno de los reactivos es la siguiente:

IPTG 0,5 mM

X-GAL 80  $\mu$ M

Ampicilina 100  $\mu$ g/ml

Se prepara el medio LB, líquido o sólido (se agrega el agar antes de esterilizar), ampicilina, IPTG y X-GAL, según la tabla siguiente.

	<b>250 mL LB</b>	<b>300 mL LB</b>	<b>750 mL LB</b>	<b>1L LB</b>
Agar	3,75 g	4,50 g	11,25 g	15 g
IPTG	1,25 ml	1,5 ml	3,75 ml	5 ml
AMP	200 $\mu$ l	300 $\mu$ l	750 $\mu$ l	1 ml
X-GAL	400 $\mu$ l	480 $\mu$ l	1,2 ml	1,6 ml

Alternativamente, se esparcen 100 $\mu$ l de IPTG 0.1M y 20 $\mu$ l de X-GAL 50mg/ml sobre la superficie de una placa con ampicilina. Se deja 30 minutos a 37°C hasta que se absorba o 1 h aproximadamente a temperatura ambiente.

## Anexo III: Protocolos de Biología Molecular

### III.1. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Cepa de E.coli DH5 $\alpha$  y TOP10

#### Preservación de las cepas:

Para preservar estas cepas, se extrae una cierta cantidad de biomasa a partir de una placa con colonias de estas cepas y se la resuspende en volumen de LB/glicerol 20% que se desee. Luego se guardan -80°C.

#### Preparación de células competentes

1. Se hacen crecer las células receptoras en un medio rico (por ejemplo LB) overnight a 37°C en agitación (150 rpm).
2. Se realiza una dilución 1:100 del cultivo overnight en medio fresco y se continua la incubación
3. Cuando las células han llegado a la mitad de la fase exponencial de crecimiento (aproximadamente DO<sub>600</sub> 0,5-0,6, 2hs), se transfieren 1,5 ml y a un eppendorf. Se usa LB como blanco.
4. Se mezclan plásmido y DNA (ligación, 1 hr de incubación)
5. Se centrifuga 2-3 minutos a 4000 rpm para formar el pellet de células. Se descarta el sobrenadante.
6. Se resuspende en 1 ml de NaCl 10 mM.
7. Se centrifuga 2-3 minutos a 4000 rpm y se descarta el sobrenadante. Se mantiene en hielo.
8. Se resuspende en 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM y se mantiene en hielo durante 20-30 minutos.

9. Se centrifuga 2-3 minutos a 4000 rpm y se descarta el sobrenadante con cuidado. Se mantiene en hielo y se guarda en glicerol 10% estéril a -80°C (100 µl).

### **Preparación de las soluciones:**

Solución de NaCl 10mM: se pesan y disuelven 0,05845 g de NaCl; se lleva a 100 ml con agua destilada. Se esteriliza en autoclave.

Solución de CaCl<sub>2</sub> 100 mM: se pesan y disuelven 0,735 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; se lleva a 50 ml con agua destilada. Se esteriliza en autoclave.

## **III.2. CLONACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES**

### **Ligación:**

1. Para el clonado de DNA de comunidades, se realizan las reacciones de PCR por triplicado con los cebadores que se desea hacer la biblioteca, para cubrir mayor diversidad y tener mayor concentración de DNA.
2. Es conveniente purificar con algún kit de purificación, para eliminar los nucleótidos y primers que pueden haber quedado en la reacción de PCR y que pueden clonarse también.
3. Se preparan tubos de PCR estériles.
4. Se usa el kit Promega p-GEM-T Easy Vector Systems
5. Se debe calcular la cantidad de inserto que hay que poner con la siguiente cuenta, para lo que se necesita conocer la concentración de DNA que se dispone (Nanodrop)

$$\frac{\text{ng vector} \times \text{Kb tamaño inserto}}{\text{Kb tamaño del vector}} \times \text{inserto:vector} = \text{ng inserto}$$

Vector = 50 ng/µl

relación molar inserto:vector = 3:1

Tamaño del vector= 3Kb

Tamaño del inserto (27F y 1387R) = 1.5Kb

6. Se mezclan los reactivos en las relaciones indicadas en la tabla. Si la cantidad de producto de PCR que debe agregarse es la misma para todas las reacciones, se puede hacer una pre-mix y distribuir el volumen en cada tubo y luego agregar el producto de PCR.

7. Se incuba 2 horas a temperatura ambiente u overnight a 4°C.

	<i>Muestra (μL)</i>	<i>Control + (μL)</i>	<i>Control – (μL)</i>
Buffer 2X	5	5	5
Vector	1	1	1
Producto de PCR	1	-	-
Inserto Control	-	2	-
Ligasa DNA T4	1	1	1
Agua dest. esteril	2	2	2

### **Transformación:**

1. Se retira del freezer tantos tubos de células competentes como mezclas de ligación se hayan realizado.
2. Se descongelan las células competentes sobre hielo (aproximadamente 15 minutos).
3. Se centrifuga la ligación y se colocan 5 μl de la misma en tubos eppendorf estériles de 1,5 ml, sobre hielo.
4. Se transfieren 100 μl de células competentes a los tubos con la ligación. Se utiliza el doble de cantidad de células competentes para el control + (200 μl). Se mezcla y se incuba en hielo por 30 minutos.
5. Se entregan pulso de calor por 45-50 segundos en un baño de agua exactamente a 42 °C. No se debe mezclar. Luego se colocan los tubos en hielo por 2 minutos.
6. Se adicionan 900 μl de medio SOC a los tubos con la ligación. Se utilizan 600 μl para el tubo control +. Se incuba por 1,5-2 horas a 37 °C con agitación (aproximadamente 150 rpm) para permitir la recuperación celular.
7. Se plaquean 100 μl de cada tubo de transformación en placas de LB/AMP/IPTG/X-GAL. Se puede plaquear una dilución 1/5 o también volúmenes de 100, 50 y 20 μl. Para el control positivo es recomendable hacer una dilución 1/10 en medio SOC.

8. Se incuba overnight a 37°C.

**Selección de cepas:**

1. Se repican las colonias blancas en medio LB/AMP/IPTG/X-GAL, en placa dividida.
2. repicarse repican en criotubos (con medio sólido inclinado LB/AMP), en el caso de mandar a secuenciar.
3. Se incuba overnight a 37°C.

**Verificación de la presencia del inserto del tamaño correcto:**

Se puede verificar mediante PCR la presencia del inserto del tamaño deseado en los clones positivos mediante colony PCR. Para ello se deben preparar las mix de PCR con cebadores del vector (T7 y SP6) y tomar con un tip estéril un poco de cada colonia. Se deben hacer tantas pre-mix como clones se deseen chequear. La amplificación se realiza con el mismo programa utilizado para el par de cebadores seleccionados.

Luego se corre en un gel de agarosa del porcentaje adecuado (para el caso de los cebadores anteriormente mencionados se debe utilizar un gel de 0,8 %), utilizando un marcador de peso molecular.

También se puede realizar la extracción del plásmido o del ADN total y luego utilizar ese ADN como molde para la PCR mencionada anteriormente.

**Soluciones Requeridas:****IPTG 0.1 M**

Se pesan 1,2 g de IPTG y se disuelven en 50 ml de agua destilada. Se esteriliza por filtración y se almacena a 4°C

**X-GAL (50 mg/ml)**

Se disuelven 100 mg de 5-bromo-4cloro-3indolil- $\beta$ -D-galactosido en 2ml de N, N dimetilformamida. Se cubre con papel aluminio y se almacena a -20°C

**Ampicilina (1000X – 100mg/ml)**

Se disuelven 100 mg de ampicilina en 1ml de agua destilada. Se esteriliza por filtración.

**Medio SOC:** SOB + 20mM  $Mg^{+2}$  + glucosa 20mM. Para 800  $\mu$ l de SOB se agregan 8 $\mu$ l de  $Mg^{+2}$  2M y 8 $\mu$ l de glucosa 2M.

***SOB (para 100 ml):***

2 g triptona

0,5 g extracto de levadura

1 ml de NaCl 1M

0,25 ml de KCl 1M

Se regula el pH en 7 y se esteriliza en autoclave.

Se agrega 1 ml de  $Mg^{+2}$  2M y 1 ml de glucosa 2M esterilizada por filtración.

**Solución de Mg** (para 100 ml). Se esteriliza por filtración

20,33 g de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

24,65 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

### **III.3. EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE ARNr 16S**

Las extracciones de ADN genómico de las muestras se realizaron mediante el kit comercial Ultra – Clean<sup>TM</sup> Soil DNA Isolation Kit (MoBioLaboratories, USA). Los cultivos fueron filtrados en membranas para concentrarlos y trozos de aproximadamente un cuarto de la membrana se introdujeron en las columnas provistas por el kit. El resto del protocolo de extracción se realizó de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante. La concentración del ADN obtenido se determinó por absorción a 260 nm utilizando un espectrofotómetro NanoDrop.

Las amplificaciones del gen ARNr 16S de bacterias y arqueas para la construcción de las bibliotecas genómicas y las reacciones de T-RFLP, se realizaron utilizando los cebadores directos 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') para bacterias y 9F (5'-CCGGTTGATCCYGSCGG-3') para arqueas y el cebador reverso 915R (5'-GTGCTCCCCGCCAATTCCT-3') para arqueas y 1387R para bacterias (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3'). Los números de los cebadores corresponden a las

posiciones del gen ARNr 16S de *Escherichiacoli*. Las condiciones del ciclado de PCR fueron las siguientes:

**Bacterias:**

- ✓ 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos
- ✓ 30 ciclos de: desnaturalización a 95°C por 30 segundos  
Pegado de cebadores a 55°C por 30 segundos  
Extensión a 72°C por 1 minuto 30 segundos
- ✓ 1 ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos

**Arqueas:**

- ✓ 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos
- ✓ 30 ciclos de: desnaturalización a 95°C por 30 segundos  
Pegado de cebadores a 53°C por 30 segundos  
Extensión a 72°C por 1 minuto 30 segundos
- ✓ 1 ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos

Las reacciones de amplificación de PCR se realizaron en 20µL de volumen final, a partir de:

- ✓ 1 µL de solución de ADN,
- ✓ 4 µL de buffer de reacción 5X (PromegaBiotech),
- ✓ 2 µL de solución 25 mM de cada uno de los 4 deoxiribonucleótidos,
- ✓ 2µL de solución 5mM del cebador directo,
- ✓ 2µL de solución 5mM de cebador reverso,
- ✓ 0,2 µL de Taq polimerasa 1 unidad/mL (PromegaBiotech),
- ✓ 0,8 µL de solución 25 mM de MgCl<sub>2</sub>,
- ✓ 0,4 µL de DMSO,
- ✓ cantidad suficiente de agua calidad biología molecular para llegar al volumen final

Las amplificaciones fueron verificadas mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8%. Se sembraron 5µL de cada reacción de PCR y se realizó la electroforesis por 30 minutos a voltaje constante de 90V. El gel fue revelado utilizando bromuro de etidio.

#### **III.4. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE LOS PRODUCTOS DE PCR DE LOS GENES DE ARNr 16S**

En la construcción de las bibliotecas de ARNr 16S de bacteria se seleccionaron los clones positivos (entre 80 y 90 clones) y los mismos fueron sometidos a un análisis de restricción utilizando las enzimas MspI y CfoI. La reacción de digestión se realizó en 10 µl de volumen final, a partir de los siguientes reactivos:

- ✓ 1 µL de buffer de la enzima,
- ✓ 0,5 µL de enzima,
- ✓ 3 µL de producto de PCR,
- ✓ cantidad suficiente de agua de calidad de biología molecular para llegar al volumen final

Se incubó a 37°C durante 1 hora. La misma digestión enzimática se utilizó para el análisis por T-RFLP de los genes de ARNr 16S (sección III.5). Los fragmentos de restricción de cada clon se separaron en un gel de agarosa 2% m/v utilizando un voltaje de 70 mV durante dos horas. El gel fue revelado utilizando bromuro de etidio.

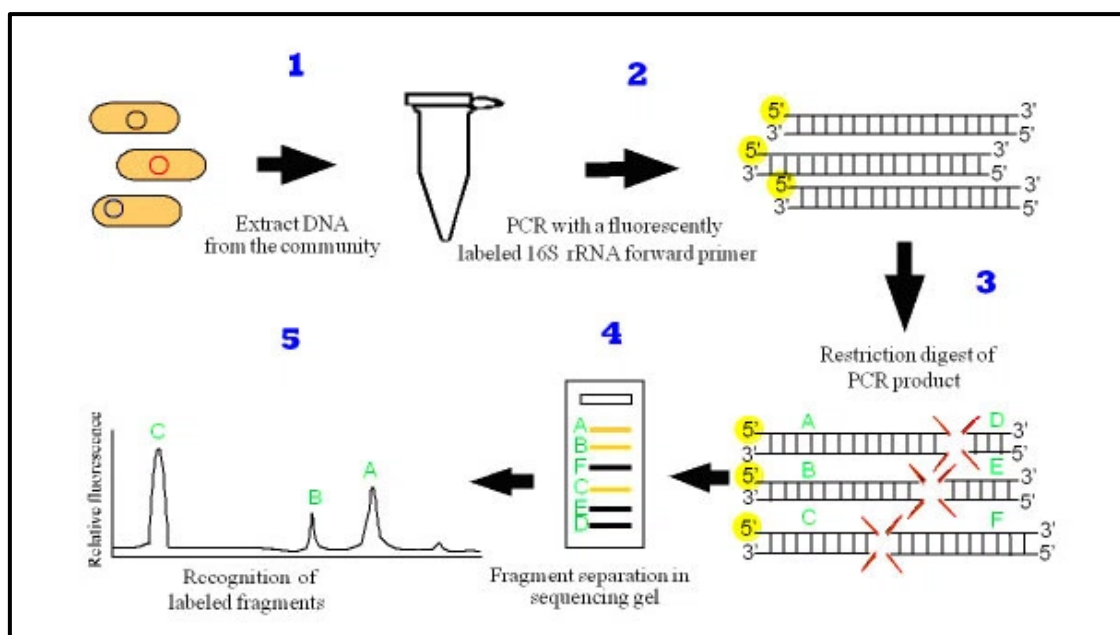
#### **III.5. TERMINAL RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISIM (T-RFLP)**

##### **Fundamento:**

Esta técnica hace posible determinar cualitativamente la diversidad de especies presentes en las comunidades microbianas. Se basa en la digestión de una mezcla de productos de PCR de un gen determinado (por ejemplo el gen de ARNr 16S), utilizando una o varias enzimas de restricción. Los productos de PCR deben amplificarse con cebadores marcados con fluorocromos en el extremo 5'. Luego de la restricción enzimática, la mezcla de fragmentos de restricción es separada utilizando una



electroforesis capilar o en gel de poliacrilamida en un secuenciador de ADN, junto con patrones de nucleótidos. Los tamaños de los fragmentos terminales de restricción son determinados por un detector de fluorescencia acoplado a la electroforesis. De esta manera, sólo los fragmentos terminales (aquellos marcados en el extremo 5') son leídos mientras que los demás son ignorados. Por lo tanto, la T-RFLP es diferente a los análisis ARDRA y RFLP en donde se leen todos los fragmentos de restricción. El resultado es un gráfico en donde el eje X representa el tamaño de los fragmentos terminales de restricción y el eje Y su intensidad de fluorescencia. En la siguiente figura se muestra un resumen de la técnica:



Esquema general de los pasos necesarios para la realización de la técnica de T-RFLP

En los perfiles de T-RFLP cada pico corresponde, presumiblemente, a una variante genética en la muestra original (muestra ambiental, enriquecimiento, etc), ya que cada microorganismo tendrá los sitios de restricción en diferentes posiciones dentro del gen de ARNr 16S. Por otro lado, el área de cada pico corresponde a su abundancia relativa en la muestra original. Sin embargo, las afirmaciones anteriores no son siempre ciertas, debido a que frecuentemente diferentes microorganismos en una comunidad pueden tener el mismo fragmento terminal de restricción para una enzima.

Para solucionar este problema y aumentar la resolución normalmente se utilizan digestiones con al menos tres enzimas, resultando en tres perfiles de T-RFLP resolviendo algunas variantes.

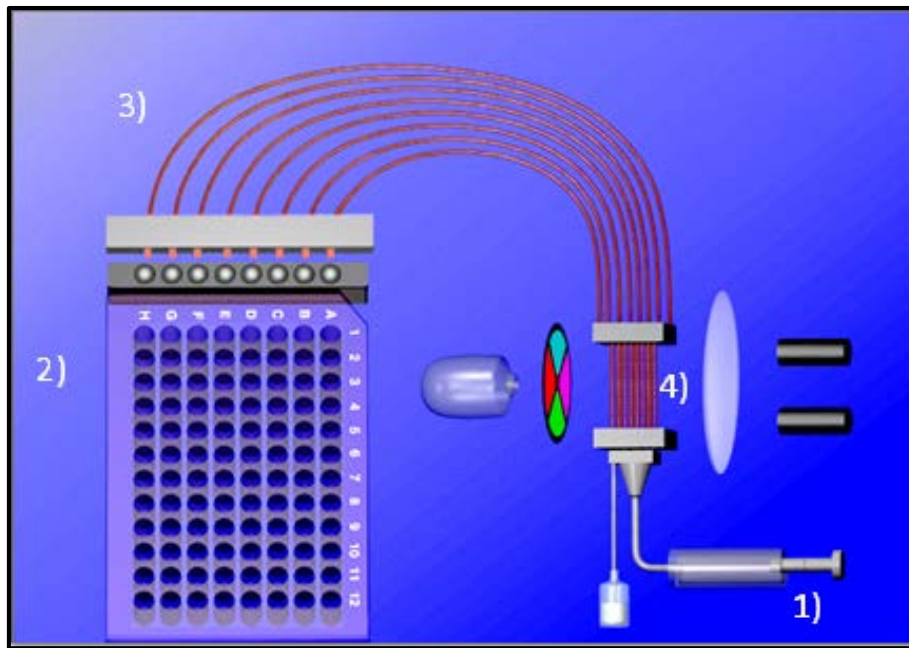
Los análisis que pueden realizarse a partir de los resultados son variados. Los empleados en este trabajo incluyen la comparación de los patrones de restricción entre muestras diferentes y la complementación con una biblioteca genética.

Si una biblioteca de clones se construye paralelamente con el análisis por T-RFLP de la muestra original, los clones pueden ser utilizados para interpretar los perfiles de T-RFLP. Por ejemplo, se realiza la secuenciación del gen de ARNr 16S de cada uno de los clones y en paralelo a cada clon se le realiza el análisis por T-RFLP. De esta manera se puede identificar un pico como un microorganismo genuino dentro de la muestra y analizar su abundancia relativa. Este método ha sido utilizado en este trabajo de Tesis para analizar la diversidad de bacterias de los sedimentos anaerobios del volcán Copahue.

#### **Protocolo:**

1. Para lograr cubrir la totalidad de la diversidad presente en las muestras de sedimentos, se realizaron reacciones de PCR por triplicado, como se detalla en la sección III.3, utilizando los cebadores para arqueas y bacterias marcados en el extremo 5' con Cy5 (Cyanina 5). Luego los productos son colectados en un tubo y purificadas utilizando el kit UltraClean PCR Clean up Kit (MoboLaboratories).
2. Los productos de PCR marcados en los extremos 5' son digeridos con las enzimas de restricción HaeIII, AluI y CfoI. La mezcla de reacción que se utilizó es la detallada en la sección III.4 y se utilizó el buffer correspondiente a cada enzima.
3. Para el análisis por T-RFLP, en este trabajo de tesis se utilizó una electroforesis capilar en un equipo BeckmanCoulter 8000 capillarysystem, UnitedKingdom. Se coloca 1  $\mu$ L de la muestra (digestión enzimática del punto anterior) en la placa que se muestra en la figura. En el mismo pocillo se colocan 29  $\mu$ L de los patrones, los cuales el equipo los lee como estándares. Luego se coloca una gota de aceite (Mineral Oil).

4. En otra placa similar a la anterior se colocan 30  $\mu\text{L}$  del buffer de corrida, tantos pocillos como muestras se tengan en la placa del punto 3.
5. Las muestras son corridas en el equipo de electroforesis capilar, cuya figura se detalla a continuación:



Esquema general del CEQ 8000 (BeckmanCoulter): **1)** Cartucho de gel que contiene el polímero que se utiliza para la separación, **2)** Placa de 96-well que contiene las muestras, **3)** Ocho capilares en donde la muestra y el buffer son cargados automáticamente y la electroforesis capilar es llevada a cabo, **4)** Sistema óptico para la detección de los fragmentos terminales marcados.

Para separar los fragmentos se aplica una diferencia de potencial entre el punto 1 y el 4 y los fragmentos terminales y los estándares son detectados por el sistema óptico de fluorescencia. Luego de finalizado el proceso el equipo arroja un electroferograma que contiene varios picos que corresponde a un fragmento de restricción diferente. También se obtiene un archivo en donde se encuentran los datos de abundancia de cada pico proporcional a la intensidad de la fluorescencia. Con el programa T-RFLP CEQ Data file Analyzer V12 se pueden realizar los cálculos de

abundancia relativa y los gráficos correspondientes que se muestran en los capítulos II y III de este trabajo de Tesis.

## **Anexo IV: Protocolos para microscopía**

### **IV.1. FIJACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)**

1. Se centrifuga 1 mL de cultivo conteniendo aproximadamente  $1 \times 10^8$  células/mL a 8000 g durante 10 minutos.
2. Se agrega 1 mL de glutaraldehído al 2,5% en buffer PBS. Se homogeneiza el pellet con el fijador para que la fijación sea uniforme. Se incuba a 4°C durante 2 horas.
3. Se filtra las muestras a través de membranas GTTP de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Se lava con buffer PBS. Se deja secar.
4. Sobre un trozo de membrana se comienza el proceso de deshidratación.
5. Para ello, se agrega cantidad suficiente de alcohol 20% en PBS de manera de cubrir la membrana. Es importante no dejar al aire para que la muestra no se seque y colapsen las células. Se deja actuar durante 1 hora a temperatura ambiente.
6. Se remueve la solución de alcohol 20% (sin dejar al aire) y se coloca inmediatamente solución de alcohol al 50% en PBS. Se deja actuar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se continúa con el mismo procedimiento con las soluciones 70 y 90%.
7. Luego se almacena a 4°C y se remite al servicio de microscopía electrónica de barrido en donde se realiza el secado por el punto crítico y el metalizado.

En este trabajo de tesis las muestras fueron remitidas al Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis del LIMF-FI-UNLP, en donde se realizó el secado por el punto crítico y el metalizado de las muestras. Se utilizó un equipo FEI ESEM Quanta 200 en el modo alto vacío (presiones menores a  $10^{-6}$  Torr). En el caso de los análisis por EDAX se utilizó un equipo EDAX SDD Apollo 40.

Para observar las muestras en el modo alto vacío las muestras deben ser conductoras o estar recubiertas de una capa conductora. Para el segundo caso, el metalizado puede realizarse con oro o carbono (sputtering). El metalizado con oro es recomendable para obtener buenas imágenes, dado que el mismo se caracteriza por su buena conductividad tanto eléctrica como térmica.

En el *secado por el punto crítico* se conserva la estructura celular original, evitando el colapso o deformación. En el mismo se utiliza CO<sub>2</sub> líquido, con el que se va reemplazando sucesivamente el alcohol absoluto en la muestra que fue colocada dentro de la cámara. Esta cámara presurizada se mantiene a una temperatura de 10°C hasta que el alcohol es reemplazado por el CO<sub>2</sub> líquido.

#### **IV.2. FIJACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)**

1. Se centrifuga 1 mL de cultivo conteniendo aproximadamente  $1 \times 10^8$  células/mL a 8000 g durante 10 minutos. El cultivo debe ser previamente filtrado para eliminar los precipitados. La centrifugación debe repetirse hasta obtener un pellet que no supere los 2 mm<sup>3</sup>. Este volumen es el adecuado para la correcta manipulación y penetración del fijador en toda la estructura y ultraestructura de la célula.
2. Se agregan 500 µL de glutaraldehído al 2% en buffer PBS (solución fijadora). Se incuba a 4°C durante 2 horas.
3. Se elimina el sobrenadante conteniendo la solución fijadora
4. Se lava la muestra con buffer PBS para eliminar el exceso de fijador. Se coloca el buffer muy lentamente tratando de no resuspender las células. Se realizan tres cambios cada 30 minutos a 4°C.

La muestra puede permanecer en el último buffer hasta 7 días a 4°C y es remitida posteriormente al Servicio de Microscopía.

En este trabajo de tesis las muestras fueron remitidas al Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP, en donde se realizó la posfijación con tetróxido de osmio al 1% en solución buffer, la deshidratación, inclusión e infiltración en la resina y los cortes ultrafinos con un ultramicrotomo Supernova, Reichert-Jung. Antes de la observación por MET se realizó la tinción de los cortes utilizando una solución de acetato de uranilo. La observación se realizó con un equipo JEM 1200EX II, Jeol.

Para la **tinción negativa** se utilizó el mismo protocolo, pero las células se observaron en suspensión y no se realizaron los pasos de pos fijación, etc. La suspensión conteniendo las bacterias fue teñida con solución de acetato de uranilo y observada por MET.

### **IV.3. FIJACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y TINCIÓN CON DAPI(4',6'- diamidino-2-fenilindol)**

#### **Fijación:**

1. Se filtra aproximadamente 1 mL de cultivo a través de papel de filtro Whatman para eliminar los precipitados.
2. Se toman volúmenes de 200, 500 y 1000  $\mu\text{L}$  y se colocan en tubos Eppendorf estériles.
3. Se agrega el volumen correspondiente de paraformaldehído (PFA) 40% a cada tubo para que la concentración final sea de aproximadamente 4%. Los volúmenes serán 20, 50 y 100  $\mu\text{L}$  de PFA para 200, 500 y 1000  $\mu\text{L}$  de cultivo.
4. Se agitan los tubos por inversión.
5. Se incuba a 4°C entre 4 y 16 horas
6. Se diluyen las muestras de cultivo con PFA en aproximadamente 15 mL de buffer PBS previamente autoclavado.
7. Se filtra el contenido a través de membranas Millipore GTTP 0,25 de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. Se enjuagan las membranas con buffer PBS y se conservan a -20°C.

#### **Tinción:**

1. Se corta un trozo de la membrana que contiene las células fijadas con PFA.
2. Se coloca en una placa de Petri 5  $\mu\text{L}$  de una solución 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol)
3. Se espera 5 minutos
4. Se toma la membrana con una pinza y se enjuaga entre 30 segundos y 2 minutos con etanol 80%.
5. Luego se enjuaga con agua

6. Se seca en papel de filtro
7. Se coloca una gota de antifading sobre un portaobjetos limpio y se esparce de modo que ocupe el lugar de todas las muestras que se desean observar.
8. Se coloca la membrana sobre el antifading, primero del lado de las células y luego del otro lado. Se elimina el exceso de antifading para que no se mezcle con el aceite de inmersión. Se observa en un microscopio de epifluorescencia. Si las muestras no se van a observar inmediatamente se conservan a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su observación.

#### **IV.4. BUFFER PBS**

La composición del buffer PBS es la siguiente:

- NaCl 130 mM
  - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  3 mM
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM
1. Para 1L de buffer PBS se disuelven:
    - 7,6 g de NaCl
    - 0,468 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
    - 3,58 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
  2. Se lleva a pH 7,2 y se esteriliza en autoclave.



# Bibliografía

---



**BIBLIOGRAFÍA**

- Abioye O.P. (2011) Biological remediation of hydrocarbons and heavy metals contaminated soil. En: S. Pascucci, ed., *Soil Contamination*, 1<sup>st</sup> ed. Rijeka, Croacia: Simone Pascucci, pp. 127-142.
- Alazar D., Joseph M., Battaglia-Brunet F., Cayol J.L., Olliver B. (2010) *Desulfosporosinus acidiphilus* sp. nov.: a moderately acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acid mining drainage sediments. *Extremophiles* 14, 305-312.
- Álvarez G. (1938) Contribución al estudio de las termas de Copahue (Neuquén) en sus aplicaciones dermatológicas. *Boletín de la Asociación Médica Argentina* 4, 222-224.
- Amils R., González-Toril E., Fernández-Remolar D., Gómez F., Aguilera A., Rodríguez N., Malki M., García-Moyano A., Fairén A.G., de la Fuente V., Sanz J.L. (2007) Extreme environments as Mars terrestrial analogs: The Tinto case. *Planetary and Space Science* 55, 370-381.
- An T.T., Picardal F.W. (2015) *Desulfuromonas carbonis* sp.nov., an Fe(III)-S<sup>0</sup>- and Mn(IV)-reducing bacterium isolated from an active coalbed methane gas well. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65, 1686-1693.
- Anderson C.R., Johnson H.A., Caputo N., Davis R.E., Torpey J.W., Tebo B.M. (2009) Mn(II) Oxidation is catalysed by heme peroxidases in *Aurantimonas mangoxydans* Strain SI85-9A1 and *Erythrobacter* sp. Strain SD-21. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 4130-4138.
- APHA, AWWA, WPCF. (1992) *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. 1<sup>st</sup> ed. Madrid: Díaz de Santos.
- Arroyo F., Siering P.L., Hampton J.S., Mc Cartney A., Hurst M.P., Wolfe G.V., Wilson M. (2015) Isolation and characterization of novel iron-oxidizing autotrophic and mixotrophic bacteria from boiling Springs Lake, an oligotrophic, acidic geothermal habitat. *Geomicrobiology Journal* 32, 140-157.
- Atlas R.M., Bartha R. (2002) *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. 4th ed. Madrid: Pearson Education.

- Aüllo T., Ranchou-Peyruse A., Ollivier B., Magot M. (2013) *Desulfotomaculum* spp. and related gram-positive sulfate reducing bacteria in deep subsurface environments. *Frontiers in Microbiology* 4, 1-12.
- Aytar P., Kay C.M., Mutlu M.B., Cabuk A., Johnson D.B. (2014) Diversity of acidophilic prokaryotes at two acid mine drainage sites in Turkey. *Environmental Science Pollution Research* 22, 5995-6003.
- Azabou S., Mechichi T., Patel B., Sayadi S. (2007) Isolation and characterization of a mesophilic heavy-metals-tolerant sulfate-reducing bacterium *Desulfomicrobium* sp. from an enrichment culture using phosphogypsum as a sulfate source. *Journal of Hazardous Materials* 140, 264-270.
- 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.
- Barakat M.A. (2011) New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. *Arabian Journal of Chemistry* 4, 361-377.
- Barton L.L., Hamilton W.A. (2007) Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems. 1<sup>st</sup> ed. New York: Cambridge University Press.
- Batty J.D., Rorke G.V. (2006) Development and commercial demonstration of the BioCOP™ thermophile process. *Hydrometallurgy* 83, 83-89.
- 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.
- Bayrakdar A., Sahinkaya E., Gungor M., Uyanik S., Atasoy A.D. (2009) Performance of sulfidogenic anaerobic baffled reactor (ABR) treating acidic and zinc-containing wastewater. *Bioresource Technology* 100, 4354-4360.
- Bertolino S.M., Melgaco L.A., Quites N.C., Leao V.A. (2013) Performance evaluation of two anaerobic reactors for removing sulphate from industrial effluents. *Advanced and Materials Research* 825, 491-495.
- Bhagat M., Burgess J.E., Antunes A.P.M., Whiteley C.G., Duncan J.R. (2004) Precipitation of mixed metal residues from wastewater utilising biogenic sulphide. *Minerals Engineering* 17, 925-932.

- Bijmans M.F.M., van Helvoort P.J., Dar S.A., Dopson M., Lens P.N.L., Buisman C.J.N. (2009) Selective recovery of nickel over iron from a nickel–iron solution using microbial sulfate reduction in a gas-lift bioreactor. *Water Research* 43, 853-861.
- Biotechnology Advances* 33, 633-647.
- Bogdanova T.I., Tsaplina I.A., Kondrat'eva T.F., Duda V.I., Suzina N.E., Melamud V.S., Tourova T.P., Karavaiko G.I. (2006) *Sulfobacillus thermotolerans* sp. nov., a thermotolerant, chemolithotrophic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1039-1042.
- Braissant O., Decho A.W., Dupraz C., Glunk C., Przekop K.M., Visscher P.T. (2007) Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: Interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology* 5, 401-411.
- Bratty M., Lawrence R.W., Kratochvil D., Marchant P.B. (2006) Applications of biological H<sub>2</sub>S production from elemental sulphur in the treatment of heavy metal pollution including acid rock drainage. *Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Symposium of Acid Rock Drainage (ICARD)*, 271-281.
- Cabrera G., Perez R., Gomez J.M., Abalos A., Cantero D. (2006) Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio* sp. strains. *Journal of Hazardous Materials* 135, 40-46.
- Cao J., Zhang G., Mao Z.S., Li Y., Fang Z., Yang C. (2012) Influence of electron donors on the growth and activity of sulfate-reducing bacteria. *International Journal of Mineral Processing* 106-109, 58-64.
- Cardoso Pereira I.A., Ramos A.R., Grein F., Coimbra Marques M., Marques da Silva S., Santos Venceslau S. (2011) A comparative genomic analysis of energy metabolism in sulfate reducing bacteria and archaea. *Frontiers in Microbiology* 2, 1-22.
- Castro H., Williams N., Ogram A. (2000) Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 31, 1-9.
- Cervantes C., Campos-García J., Devars S., Gutiérrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres-Guzmán J. C., Moreno-Sanchez R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 335-347.

- Chang I.S., Kim B.H. (2007) Effect of sulfate reduction activity on biological treatment of hexavalent chromium [Cr(VI)] contaminated electroplating wastewater under sulfate-rich condition. *Chemosphere* 68, 218-226.
- Chen B-Y., Utgikar V.P., Harmon S.M., Tabak H.H., Bishop D.F., Govind R. (2000) Studies of biosorption of zinc (II) and copper(II) on *Desulfovibrio desulfuricans*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46, 11-18.
- Chen W., Zhang H., Luo D., Chen Y. (2014) Research on treating acid wastewater containing heavy metals by sulfate-reducing bacteria. *Proceedings of the International Conference on Material and Environmental Engineering*, 112-115.
- Chiacchiarini P., Lavalle L., Giaveno A., Donati E. (2009) Acidophilic microorganisms from geothermal Copahue Volcano System: assessment of biotechnological applications. *Advanced Materials Research* 71-73, 87-91.
- Chiacchiarini P., Lavalle L., Giaveno A., Donati E. (2010) First assessment of acidophilic microorganisms from geothermal Copahue-Caviahue system. *Hydrometallurgy* 104, 334-341.
- Chockalingam E., Subramanian S. (2006) Studies on removal of metal ions and sulphate reduction using rice husk and *Desulfotomaculum nigrificans* with reference to remediation of acid mine drainage. *Chemosphere* 62, 699-708.
- Colin V.L., Villegas L.B., Abate C.M. (2012) Indigenous microorganisms as potential bioremediators for environments contaminated with heavy metals. *International Biodeterioration and Biodegradation* 69, 28-37.
- Coupland K., Johnson, D.B. (2008) Evidence that the potential for dissimilatory ferric iron reduction is widespread among acidophilic heterotrophic bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 279, 30-35.
- Cruz Viggì 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.
- Dar S.A., Stams A.J.M., Kuenen J.G., Muyzer G. (2007) Co-existence of physiologically similar sulfate-reducing bacteria in a full-scale sulfidogenic bioreactor fed with a single organic electron donor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 1463-1472.

- Delpino D., Bermúdez A. (1993) La actividad del volcán Copahue durante 1992. Erupción con emisión de azufre piroclástico. Actas del 12° Congreso Geológico Argentino y 2° Congreso de Exploración de Hidrocarburos (Neuquén) 4, 292-301.
- Dias R.L., Ruberto L., Calabro A., Lo Balbo A., Del Panno M.T., Mac Cormack W.P. (2015) Hydrocarbon removal and bacterial community structure in on-site biostimulated biopile systems designed for bioremediation of diesel-contaminated Antarctic soil. *Polar Biology* 38, 677-687.
- Dixit R., Waisullah A., Malaviya D., Pandiyan K., Singh U.B., Sahu A., Shukla R., Singh B.P., Rai J.P., Sharma P.K., Lade H., Paul D. (2015) Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability* 7, 2189-2212.
- Donati E.R., Sand W. (2007) *Microbial processing of metal sulfides*. 1<sup>st</sup> ed. Berlin: Springer.
- Dopson M., Johnson D.B. (2012) Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. *Environmental Microbiology* 14, 1-12.
- Doran P.M. (1995) Reacciones Homogéneas. En: Pauline Doran, ed., *Principios de Ingeniería de los bioprocesos*, 1st ed. Zaragoza, España: ACRBIA, pp. 311-348.
- du Plessis C.A., Slabbert W., Hallberg K.B., Johnson D.B. (2011). Ferredox: A biohydrometallurgical processing concept for limonitic nickel laterites. *Hydrometallurgy* 109, 221-229.
- Efremova M., Izosimova A. (2012) Contamination of agricultural soils with heavy metals. En: C Jakobsson, ed., *Sustainable Agriculture*, 1<sup>st</sup> ed. Uppsala, Sweden: Uppsala University pp. 250-252.
- Ehrlich H.L. (2002 a) Geomicrobiology of Sulfur. En: H.L. Ehrlich, ed., *Geomicrobiology*, 4<sup>th</sup> ed. New York, United States: Marcel Dekker Inc, pp.549-620.
- Enning D., Garrelfs J. (2014) Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: New views of an old problem. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 1226-1236.

- Falagán C., Johnson D.B. (2016) *Acidithiobacillus ferriphilus* sp. nov.: a facultatively anaerobic iron- and sulfur-metabolising extreme acidophile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66, 206-211.
- Falagán C., Sanchez-España J., Johnson D.B (2014) New insights into the biogeochemistry of extremely acidic environments revealed by a combined cultivation-based and culture-independent study of two stratified pit lakes. *FEMS Microbial Ecology* 87, 231-243.
- Farooq U., Kozinski J.A., Khan M.A, Athar M. (2010) Biosorption of heavy metal ions using wheat based biosorbents - A review of the recent literature. *Bioresource Technology* 101, 5043-5053.
- Folguera A., Ramos V., (2000) Control estructural del volcán Copahue (38° S - 71°O): implicancias tectónicas para el arco volcánico cuaternario (36-39° S). *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 55, 229-244.
- Francis C.A., Mark Co E., Tebo B.M (2001) Enzymatic Manganese(II) Oxidation by a Marine  $\alpha$ -Proteobacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4024-4029.
- Fu F., Wang Q. (2011) Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management* 92, 407-418.
- Gadd G. (2004). Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 122, 109-119.
- Gadd G.M. (2010) Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156, 609-643.
- Galán Huertos E., Romero Baena A. (2008) Conferencia: Contaminación de suelos por metales pesados. *Macla* 10, 48-60.
- Ghosh A., Ghosh Dastidar M., Sreekrishnan T.R. (2015) Recent advances in bioremediation of heavy metals and metal complex dyes: Review. *Journal of Environmental Engineering*. [http://dx.doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0000965](http://dx.doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000965).
- Giaveno A., Chiacchiarini P., Cordero C., Lavalle L., Huergo J., Donati E. (2009 a) Oxidative capacity of native strains from Copahue geothermal system in the pretreatment of a gold sulfide ore. *Advanced Materials Research* 71-73, 473-476.



- Giaveno A., Donati E. (2009 b) Bioleaching of a zinc sulfide ore by thermophilic consortia isolated from Copahue volcano. *Advanced Materials Research* 20-21, 79-82.
- Giaveno A., Huergo J., Lavallo L., Sand W., Donati E. (2009 c) Molecular and morphological characterization of cultures from the extreme environmental area of Copahue volcano. *Advanced Materials Research* 71-73, 93-96.
- Giaveno A., Urbieta M.S., González-Toril E., Ulloa J.R., Donati E. (2013) Physiologic versatility and growth flexibility as the main characteristics of a novel thermoacidophilic *Acidianus* strain isolated from Copahue geothermal area in Argentina. *Microbial Ecology* 65, 336-346.
- González Díaz F. (2005) Geomorfología de la región del volcán Copahue y sus adyacencias (centro-oeste del Neuquén). *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 60, 72-87.
- Gonzalez-Silva B.M., Briones-Gallardo R., Razo-Flores E., Celis L.B. (2009) Inhibition of sulfate reduction by iron, cadmium and sulfide in granular sludge. *Journal of Hazardous Materials* 172, 400-407.
- 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.
- Hallberg K.B (2010) New perspectives in acid mine drainage microbiology. *Hydrometallurgy* 104, 448-453.
- Hallberg K.B., Coupland K., Kimura S., Johnson D.B. (2006) Macroscopic streamer growth in acidic, metal-rich mine waters in North Wales consist of novel and remarkably simple bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2022-2030.
- Hao O.J., Huang L., Chen J.M (1994) Effects of metal additions on sulfate reduction activity in wastewaters. *Toxicological and Environmental Chemistry* 46, 197-212.

- Haouari O., Fardeau M-L., Cayol J-L., Casiot C., Elbaz-Poulichet F., Hamdi M., Joseph M., Oliver B. (2008) *Desulfotomaculum hydrothermale* sp. Nov., a thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated from a terrestrial Tunisian hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 2529-2535.
- Haro P.A., Perez J.D., Alvarez A.F., Silva R.A., Alvarez H.M. (2007) Biostimulation treatments of hydrocarbon-contaminated soil in semiarid Patagonia, Argentina. *Society of Petroleum Engineers* 1, 1-6.
- Hashim M.A., Mukhopadhyay S., Sahu J.N., Sengupta B. (2011) Remediation technologies for heavy metal contaminated groundwater. *Journal of Environmental Management* 92, 2355-2388.
- Hedrich S., Johnson D.B. (2013) *Acidithiobacillus ferridurans* sp. nov., an acidophilic iron-, sulfur- and hydrogen-metabolizing chemolithotrophic gammaproteobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 4018-4025.
- Hedrich S., Johnson D.B. (2014) Remediation and selective recovery of metals from acidic mine waters using novel modular bioreactors. *Environmental Science and Technology* 48, 12206-12212.
- Holmes D.E., Finneran K.T., O'Neil R.A., Lovley D.R. (2002) Enrichment of members of the family *Geobacteraceae* associated with stimulation of dissimilatory metal reduction in uranium-contaminated aquifer sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2300-2306.
- Ivanova E.P., Bowmanc J.P., Lysenko A.M., Zhukova N.V., Gorshkova N.M., Kuznetsova T.A., Kalinovskaya N.I. , Shevchenko L.S. , Mikhailov V.V. (2005) *Erythrobacter vulgaris* sp. nov., a novel organism isolated from the marine invertebrates. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 123-130.
- Jabari L., Gannoun H., Cayol J.L., Hamdi M., Ollivier B., Fauque G., Fardeau M.L. (2013) *Desulfotomaculum peckii* sp. nov., a moderately thermophilic member of the genus *Desulfotomaculum*, isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 2082-2087.

- Jameson E., Rowe O.F., Hallberg K.B., Johnson D.B. (2010) Sulfidogenesis and selective precipitation of metals at low pH mediated by *Acidithiobacillus* spp. and acidophilic sulfate-reducing bacteria. *Hydrometallurgy* 104, 488-493.
- Javed M.A., Stoddart P.R., Wade S.A. (2015) Corrosion of carbon steel by sulphate reducing bacteria: Initial attachment and the role of ferrous ions. *Corrosion Science* 93, 48-57.
- JICA-EPEN. (1992) The feasibility study on the northern Neuquén geothermal development project. Final Report 1, 5-89.
- Johnson D.B. (1995) Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 23, 205-218.
- Johnson D.B. (2012) Reductive dissolution of minerals and selective recovery of metals using acidophilic iron- and sulfate-reducing acidophiles. *Hydrometallurgy* 127-128, 172-177.
- Johnson D.B., Hallberg K.B. (2005) Acid mine drainage remediation options: a review. *The Science of the Total Environment* 338, 3-14.
- 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 waters. *Advanced Materials Research* 71-73, 693-696.
- Johnson D.B., Joulain C., d'Hugues P., Hallberg K.B. (2008) *Sulfobacillus benefaciens* sp. nov., an acidophilic facultative anaerobic *Firmicute* isolated from mineral bioleaching operations. *Extremophiles* 12, 789-798.
- Johnson D.B., Okibe N., Roberto F.F. (2003) Novel thermo-acidophilic bacteria isolated from geothermal sites in Yellowstone National Park: physiological and phylogenetic characteristics. *Archives of Microbiology* 180, 60-68.
- Johnson D.B., Rowe O., Kimura S., Hallberg K.B. (2004) Development of an integrated microbiological approach for remediation of acid mine drainage and recovery of heavy metals. En: Jarvis A.P., Dudgeon B.A., Younger P.L., ed., *Mine Water 2004 – Proceedings International Mine Water Association Symposium. Volume 2*, 1<sup>st</sup> ed. Newcastle upon Tyne: University of New Castle, pp. 151-157.

- Jong T., Parry D.L. (2003) Removal of sulphate and heavy metal by sulphate reducing bacteria in short-term beach scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Research* 37, 3379-3389.
- Juárez A.B., Vélez C.G. (1993) Sobre la presencia de *Chlorella kessleri* (Chlorococcales, Chlorophyceae) en aguas del Complejo Termal Copahue (prov. De Neuquén, Argentina). *Boletín de la Asociación Argentina de Botánica* 29, 105-107.
- Jurío R.L. (1977) Características geoquímicas de los fluidos termales de Copahue (Neuquén, Argentina). Principales implicaciones geotérmicas. *Minería* 172, 11-14.
- Kaksonen A.H., Spring S., Schumann P., Kroppenstedt R.M. Puhakka J.A (2006) *Desulfotomaculum thermosubterraneum* sp. nov., a thermophilic sulfate-reducer isolated from an underground mine located in a geothermally active area. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 2603-2608.
- Karavaiko G.I., Bogdanova T.I., Tourova T.P., Kondrat'eva T.F., Tsaplina I.A., Egorova M.A., Krasil'nikova E.N., Zakharchuk L.M (2005) Reclassification of '*Sulfobacillus thermosulfidooxidans subsp. thermotolerans*' strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidooxidans* Dufresne et al. 1996 as *Alicyclobacillus disulfidooxidans* comb. nov., and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 941-947.
- Kay C.M., Hedrich S., Johnson D.B. (2013) Selective metal removal from Scandinavian mine waters using novel biomineralization technologies. *Advanced Materials Research* 825, 479-482.
- Kieu H.T.Q., Muller 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, 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.

- Kleikemper J., Schroth M.H., William V.S., 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, 1516-1523.
- Kousi P., Remoundaki E., Hatzikioseyan A., Battaglia-Brunet F., Joulian C., Kousteni V., Tsezos M. (2011). Metal precipitation in an ethanol-fed, fixed-bed sulphate-reducing bioreactor. *Journal of Hazardous Materials* 189, 677-684
- Krebs W., Brombacher C., Bosshard P.P., Bachofen R., Brandl H. (1997) Microbial recovery of metals from solids. *FEMS Microbiology Reviews* 20, 605-617.
- Krishna K.R., Philip L. (2005) Bioremediation of Cr(VI) in contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials* 121, 109-117.
- Krishnamurthi S., Spring S., Kumar P.A., Mayilraj S., Klenk H-P., Suresh K. (2013) *Desulfotomaculum defluvii* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from the subsurface environment of a landfill. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 2290-2295.
- Kublanov I.V., Prokofeva M.I., Kostrikina N.A., Kolganova T.V., Tourova T.P., Wiegel J., Bonch-Osmolovskaya E.A. (2007) *Thermoanaerobacterium aciditolerans* sp. nov., a moderate thermoacidophile from a Kamchatka hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 260-264.
- Kuever J., and Rainey, F.A. (2015) *Desulfotomaculum*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 1–12.
- Kuever J., Rainey F., Widdel F. (2005) Class IV: Deltaproteobacteria. En: Garrity G.M., Brenner J.D., Krieg R.N., Staley T.J., ed., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2*, 2<sup>nd</sup> ed. United States: Springer, pp. 922-1144.
- Kuever J., Visser M., Loeffler C., Boll M., Worm P., Sousa D.Z., Plugge C.M., Schaap P.J., Muyzer G., Cardoso Pereira I.A., Parshina S.N., Goodwin L.A., Kyrpides N.C., Detter J.C., Woyke T., Chain P., Davenport K.W., Rohde M., Spring S., Klenk H.P., Stams A.J.M. (2014) Genome analysis of *Desulfotomaculum gibsoniae* strain Groll a highly versatile Gram-positive sulfate-reducing bacterium. *Standards in Genomic Sciences* 9, 821-839.

- Lantican N.B., Diaz M.G.Q., Cantera J.J.L., de los Reyes III F.L., Raymundo A.K. (2011) Microbial community of a volcanic mudspring in the Philippines as revealed by 16S rDNA sequence analysis and fluorescence in situ hybridization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 859-867.
- Lavalle L., Chiacchiarini P., Pogliani C., Donati E. (2005) Isolation and characterization of acidophilic bacteria from Patagonia, Argentina. *Process Biochemistry* 40, 1095-1099.
- 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.
- Liamleam W., Annachhatre A.P (2007) Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnology Advances* 25, 452-463.
- Liu S.Y., Rainey F.A., Morgan H.W., Mayer F., Wiegel J. (1996) *Thermoanaerobacterium aotearoense* sp. nov., a slightly acidophilic, anaerobic thermophile isolated from various hot springs in New Zealand, and emendation of the genus *Thermoanaerobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 388-396.
- Logan T.C., Seal T., Brierley J.A. (2007) Whole-ore heap biooxidation of sulfidic gold-bearing ores. En: Rawlings D.E., Johnson D.B., eds., *Biomining*, 1<sup>st</sup> ed. Berlín, Germany: Springer, pp. 151-157.
- Lopes S.I.C., Capela M.I., Lens P.N.L. (2010) Sulfate reduction during the acidification of sucrose at pH 5 under thermophilic (55°C) conditions. I: Effect of trace metals. *Bioresource Technology* 101, 4269-4277.
- López Pérez P.A., Aguilar López R., Neria González M.I. Cadmium removal at high concentration in aqueous medium: mediated by *Desulfovibrio alaskensis*. *International Journal of Environmental Science and Technology* 12, 1975-1986.
- Love C.A., Patel B.K.C., Nichols P.D., Stackebrandt E. (1993) *Desulfotomaculum australicum*, sp. nov., a thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated from the Great Artesian Basin of Australia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 16, 244-251.

- Lu J., Chen T., Wu J., Wilson P.C., Hao X., Qian J. (2011) Acid tolerance of an acid mine drainage bioremediation system base on biological sulfate reduction. *Bioresource Technology* 102, 10401-10406.
- Lu S., Gischkat S., Reiche M., Akob D.M., Hallberg K.B., Kußel K. (2010) Ecophysiology of Fe-Cycling Bacteria in Acidic Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 8174-8183.
- Madigan M., Martinko J., Parker J. (2004) *Biología de los Microorganismos – Brock*. 10th ed. Buenos Aires: Pearson Education.
- Magar V.S. (2001) Natural recovery of contaminated sediments. *Journal of Environmental Engineering* 127, 473-474.
- Malik A. (2004) Metal bioremediation through growing cells. *Environment International* 30, 261-278.
- Marbán L., de López Camelo L.G., Ratto S., Agostini A. (1999) Contaminación con metales pesados en un suelo de la cuenca del río Reconquista. *Ecología Austral* 9, 15-19.
- Marchevsky N., Urbietta M.S., Bernardelli C., Mas M., Donati E.R. (2015) Zinc recovery during refractory ore biooxidation by an indigenous consortium. *International Journal of Mineral Processing* 138, 30-37.
- Martins M., Leonor Faleiro M., Barros R.J., Raquel Veríssimo A., Alexandra Barreiros M., 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.
- Mas G., Mas L., Bengochea L. (1996) Alteración ácido-sulfática en el campo geotérmico Copahue, Provincia de Neuquén. *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 51, 78-86.
- Min H., Zinder S.H. (1990) Isolation and characterization of a thermophilic sulfate-reducing bacterium *Desulfotomaculum thermoacetoxidans* sp. nov. *Archives of Microbiology* 153, 399-404.
- Mockaitis G., Fiedl G.F., Rodrigues J.A.D., Ratusznei S.M., Zaiat M., Foresti E. (2010) Influence of feed time and sulfate load on the organic and sulfate removal in an ASBR. *Bioresource Technology* 101, 6642-6650.

- Morelli I.S., Del Panno M.T., De Antoni G.L., Pinceira M.T. (2005) Laboratory study on the bioremediation of petrochemical sludge-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 55, 271-278.
- Muñoz Bravo J.O., Stern C., Bermúdez A., Delpino D., Dobbs M.F., Frey F.A. (1989) El vulcanismo de Los Andes. *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 44, 270-283.
- Ñancuqueo I., Johnson D.B. (2012) Selective removal of transition metals from acidic mine waters by novel consortia of acidophilic sulfidogenic bacteria. *Microbial Biotechnology* 5, 34-44.
- Ñancuqueo I., Johnson D.B. (2014) Removal of sulfate from extremely acidic mine waters using low pH sulfidogenic bioreactors. *Hydrometallurgy* 150, 222-226.
- Naz N., Young H.K., Ahmed N., Gadd G.M. (2005) Cadmium accumulation and DNA homology with metal resistance genes in sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4610-4618.
- Neale J.W., Robertson S.W., Muller H.H., Gericke M. (2009) Integrated piloting of a thermophilic bioleaching process for the treatment of a low-grade nickel-copper sulphide concentrate. *Journal of the Southern African Institute of Mining and Metallurgy* 109, 273-293.
- Neculita C.M., Zagury G.J., Bussiere B. (2007) Passive treatment of acid mine drainage in bioreactors using sulfate-reducing bacteria. *Journal of Environmental Quality* 36, 1-16.
- Nelson D.L., Cox M.M. (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry*. (5<sup>th</sup> ed.). W.H. Freeman and Company, New York.
- Nilsen R.K., Torsvik T., Lien T. (1996) *Desulfotomaculum thermocisternum* sp. nov., a sulfate reducer isolated from a hot north sea oil reservoir. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 397-402.
- Norris P.R., Johnson D.B. (1998) Acidophilic microorganisms. En: K. Horikoshi, W.D Grant, ed., *Extremophiles: microbial life in extreme environments*, 1<sup>st</sup> ed. New York, United States: Wiley-Liss, pp. 133-153.



- Norris P.R., Gould O.J.P., Ogden T.J. (2015) Iron solubilization during anaerobic growth of acidophilic microorganisms with a polymetallic sulfide ore. *Minerals Engineering* 75, 77-84.
- Ohmura N., Sasaki K., Matsumoto N., Saiki H. (2002) Anaerobic respiration using Fe(III), S<sup>0</sup>, and H<sub>2</sub> in the chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* 184, 2081-2087.
- Oyekola O.O., van Hille R.P., Harrison S.T.L. (2009) Study of anaerobic lactate metabolism under biosulfidogenic conditions. *Water Research* 43, 3345-3354.
- Pagnanelli F., Cruz Viggi C., Toro L. (2010) Isolation and quantification of cadmium removal mechanisms in batch reactors inoculated by sulphate reducing bacteria: biosorption versus bioprecipitation. *Bioresource Technology* 101, 2981-2987.
- Pagnanelli F., Cruz Viggia C., Cibati A., Uccelletti D., Toroa L., Palleschi C. (2012) Biotreatment of Cr(VI) contaminated waters by sulphate reducing bacteria fed with ethanol. *Journal of Hazardous Materials* 199-200, 186-192.
- Panarello H.O., Levin M., Albero M.C., Sierra J.L., Gingsins M.O. (1988) Isotopic and geochemical study of the vapour dominated geothermal field of Copahue (Neuquén, Argentina). *Revista Brasileira de Geofísica* 5, 275-282.
- Pedrozo F., Kelly L., Diaz M., Temporetti P., Baffico G., Kringel R., Friese K., Mages M., Geller W., Woelfl S. (2001) First results on the water chemistry, algae and trophic status of Andean acidic lake system of volcanic origin in Patagonia (Lake Caviahue). *Hidrobiología* 452, 129-137.
- Pedrozo F.L., Temporetti P.F., Beamud G., Diaz M.M. (2008) Volcanic nutrient inputs and trophic state of Lake Caviahue, Patagonia, Argentina. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 178, 205-212.
- Perelo L.W. (2010) Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *Journal of Hazardous Materials* 177, 81-89.
- Pérez R.M., Cabrera G., Gómez J.M., Ábalos A., Cantero D. (2010) Combined strategy for the precipitation of heavy metals and biodegradation of petroleum in industrial wastewaters. *Journal of Hazardous Materials* 182, 896-902.
- Pesce A. (1989) Evolución volcano-tectónica del complejo efusivo Copahue-Caviahue y su modelo geotérmico Preliminar. *Asociación Geológica Argentina* 44, 307-327.

- Plaza Cazón J., Benitez L., Murray J., Kirschbaum A., Kirschbaum P., Donati E. (2013) Environmental impact on soil, water and plants from the abandoned Pan de Azúcar Mine. *Advanced Materials Research* 825, 88-91.
- Plugge C.M., Balk M., Stams A.J.M. (2002) *Desulfotomaculum thermobenzoicum* susp. *thermosyntrophicum* subsp.nov., a thermophilic, syntrophic, propionate-oxidizing, spore-forming bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 391-399.
- Portillo M.C., Gonzalez J.M. (2009) Sulfate-reducing bacteria are common members of bacterial communities in Altamira Cave (Spain). *The Science of the Total Environment* 407, 1114-1122.
- Postgate J.R., Campbell L.L. (1966) Classification of *Desulfovibrio* species, the nonsporulating sulfate-reducing bacteria. *Bacteriological Reviews* 30, 732-738.
- Poulson S.R., Colberg P.J.S., Drever J.I. (1997) Toxicity of heavy metals (Ni, Zn) to *Desulfovibrio desulfuricans*. *Geomicrobiology Journal* 14, 41-49.
- Price M., Ray J., Wetmore K.M., Kuehl J.V., Bauer S., Deutschbauer A.M., Arkin A.P. (2014) The genetic basis of energy conservation in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio alaskensis* G20. *Frontiers in Microbiology* 5, 1-20.
- Qian J., Zhu X., Tao Y., Zhou Y., He X., Li D. (2015) Promotion of Ni<sup>2+</sup> Removal by masking toxicity to sulfate-reducing bacteria: addition of citrate. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 7932-7943.
- Quilntana M., Curutchet G., Donati E. (2001) Factors affecting chromium(VI) reduction by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochemical Engineering Journal* 9, 11-15.
- Radhika V., Subramanian S., Natarajan, K.A. (2006) Bioremediation of zinc using *Desulfotomaculum nigrificans*: bioprecipitation and characterization studies. *Water Research* 40, 3628-3636.
- Reysenbach A.L., Liu Y., Lindgren A.R., Wagner I.D., Sislak C.D., Mets A., Schouten S. (2013) *Mesoaciditoga lauensis* gen. nov., sp. nov., a moderately thermoacidophilic member of the order *Thermotogales* from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 4724-4729.
- Rowe O.F., Sanchez-España J., Hallberg K.B., Johnson D.B. (2007) Microbial communities and geochemical dynamics in an extremely acidic, metal-rich

- stream at an abandoned sulfide mine (Huelva, Spain) underpinned by two functional primary production systems. *Environmental Microbiology* 9, 1761-1771.
- Ruberto L., Vazquez S., Mac Cormack W.P. (2003) Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 52, 115-125.
- Russo G., Libkind D., Sampaio J.P., van Brock M.R. (2008) Yeast diversity in the acidic Rio Agrio-Lake Caviahue volcanic environment (Patagonia, Argentina). *FEMS Microbial Ecology* 65, 415-424.
- Sahinkaya E., Altun M., Bektas S., Komnitsas K. (2012) Bioreduction of Cr(VI) from acidic wastewaters in a sulfidogenic ABR. *Minerals Engineering* 32, 38-44.
- Sánchez-Andrea I., Rodríguez N., Amils R., Sanz J.L. (2011) Microbial diversity in anaerobic sediments at Río Tinto, a naturally acidic environment with high heavy metal content. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 6085-6093.
- Sánchez-Andrea I., Rojas-Ojeda P., Amils R., Sanz J.L. (2012) Screening of anaerobic activities in sediments of an acidic environment: Tinto River. *Extremophiles* 16, 829-839.
- Sánchez-Andrea I., Sanz J.L., Bijmans M.F.M., Stams A.J.M. (2014) Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. *Journal of Hazardous Materials* 269, 98-109.
- Sánchez-Andrea I., Stams A.J.M., Amils R., Sanz J.L. (2013) Enrichment and isolation of acidophilic sulfate-reducing bacteria from Tinto River sediments. *Environmental Microbiology Reports* 5, 672-678.
- Sánchez-Andrea I., Stams A.J.M., Hedrich S., Ñancucheo I., Johnson D.B. (2015) *Desulfosporosinus acididurans* sp. nov.: an acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acidic sediments. *Extremophiles* 19, 39-47.
- Sarti A., Silva A.J., Zaiat M., Foresti E. (2009) The treatment of sulfate-rich wastewater using an anaerobic sequencing batch biofilm pilot-scale reactor. *Desalination* 249, 241-246.

- Seeger A., Langworthy T.A., Stetter K.O. (1988) *Thermoplasma acidophilum* and *Thermoplasma volcanium* sp. nov. from Solfatara fields. *Systematic and Applied Microbiology* 10, 161-171.
- Sen A.M., Johnson D.B. (1999) Acidophilic sulphate-reducing bacteria: candidates for bioremediation of acid mine drainage. En: Amils R., Ballester A., ed., *Biohydrometallurgy and the Environment towards the mining of the 21<sup>st</sup> century*. Process Metallurgy Vol 9A, 1<sup>st</sup> ed. Amsterdam: Elsevier, pp. 709-718.
- Senko J.M., Zhang G., McDonough J.T., Bruns M.A., Burgos W.D. (2009) Metal reduction at low pH by a *Desulfosporosinus* species: implications for the biological treatment of acid mine drainage. *Geomicrobiology Journal* 26, 71-82.
- Shang S., Qian L., Zhang X., Li K., Chagan I. (2013) *Thermoanaerobacterium calidifontis* sp. Nov., a novel anaerobic, thermophilic, ethanol-producing bacterium from hot springs in China. *Archives in Microbiology* 195, 439-445.
- 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.
- Siegel F.R. (2002) *Environmental geochemistry of potentially toxic metals*. 1<sup>st</sup> ed. New York: Springer.
- Simate G.S., Ndlovu S. (2014) Acid mine drainage: challenges and opportunities. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2, 1785-1803.
- Singh N., Gadi R. (2009) Biological methods for speciation of heavy metals: different approaches. *Critical Reviews in Biotechnology* 29, 307-312.
- Spring S., Lapidus A., Schroder M., Gleim D., Sims D., Meincke L., Del Rio T.G., Tice H., Copeland A., Cheng J.F., Lucas S., Chen F., Nolan M., Bruce D., Goodwin L.A., Pitluck S., Ivanova N., Mavromatis K., Mikhailova N., Pati A., Chen A., Palaniappan K., Land M., Hauser L., Chang Y.J., Jeffries C.D., Chain P., Saunders E., Brettin T., Detter J.C., Goker M., Bristow J., Eisen J.A., Markowitz V., Hugenholtz P., Kyrpids N.C., Klenk H.P., Han C. (2009) Complete genome sequence of *Desulfotomaculum acetoxidans* type strain (5575). *Standards in Genomic Sciences* 1, 242-253.

- Spring S., Visser M., Lu M., Copeland A., Lapidus A., Lucas S., Cheng J.F., Han C., Tapia R., Goodwin L.A., Pitluck S., Ivanova N., Land M., Hauser L., Larimer F., Rohde M., Goker M., Detter J.C., Kyrpides N.C., Woyke T., Schaap P.J., Plugge C.M., Muyzer G., Kuever J., Cardoso Pereira I.A., Parshina S.N., Bernier-Latmani R., Stams A.J.M., Klenk H.P. (2012) Complete genome sequence of the sulfate-reducing firmicute *Desulfotomaculum ruminis* type strain (DL). *Standards in Genomic Sciences* 7, 304-319.
- Stackebrandt E., Sproer C., Rainey F.A., Burghardt J., Pauker O., Hippe H. (1997) Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: Evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 1134-1139.
- Stenuit B., Eysers L., Schuler L., Agathos S.N., George I. (2008) Emerging high-throughput approaches to analyze bioremediation of sites contaminated with hazardous and/or recalcitrant wastes. *Biotechnology Advances* 26, 561-575.
- Tabak H.H., Scharp R., Burckle J., Kawahara F.K., Govind R. (2003) Advances in biotreatment of acid mine drainage and biorecovery of metals: 1. Metal precipitation for recovery and recycle. *Biodegradation* 14, 423-436.
- Tasaki M., Kamagata Y., Nakamura K., Mikami E. (1991) Isolation and characterization of a thermophilic benzoate-degrading, sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum thermobenzoicum* sp. nov. *Archives of Microbiology* 155, 348-352.
- Tomotada I., Masao N. (2001) Current bioremediation practice and perspective. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92, 1-8.
- Urbietta M.S, Willis Poratti G., Segretin A., Gonzalez Toril E., Giaveno A., Donati E. (2015) Copahue geothermal system: a volcanic geothermal environment with rich prokaryotic biodiversity. *Microorganisms* 3, 344-363.
- Urbietta M.S. (2013) *Diversidad Microbiana en Ambientes Volcánicos*. Tesis para acceder al título de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

- Urbietta M.S., González Toril E., Giaveno M.A., Aguilera Bazán A., Donati E.R. (2014 a) Archaeal and bacterial diversity in five different hydrothermal ponds in the Copahue region in Argentina. *Systematic and Applied Microbiology* 37, 429-441.
- Urbietta M.S., González-Toril E., Aguilera A., Giaveno M.A., Donati E. (2012) First prokaryotic biodiversity assessment using molecular techniques of an acidic river in Neuquén, Argentina. *Microbial Ecology* 64, 91-104.
- Urbietta M.S., Rascovan N., Castro C., Revale S., Giaveno M.A., Vazquez M., Donati E.R. (2014 b) Draft genome sequence of the novel thermoacidophilic archaeon *Acidianus copahuensis* strain ALE1, isolated from the Copahue volcanic area in Neuquén, Argentina. *Genome Announcements* 2, 1-2.
- USEPA (1996) Report: Recent developments for in situ treatments of metals contaminated soils, U.S. *Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response*.
- Utgikar V.P, Harmon S.M, Chaudhary N., Tabak H.H, Govind R., Haines J.R. (2002) Inhibition of sulphate-reducing bacteria by metal sulfide formation in bioremediation of acid mine drainage. *Environmental Toxicology* 17, 40-48.
- Vallés J., Baschini M., Pettinari G., García, N. (2004) Characterization of muds and waters of the Copahue Geothermal Field, Neuquén Province, Patagonia, Argentina. En: *Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Congress on Applied Mineralogy, Águas de Lindóia, Brazil*, pp. 507-510.
- Valls M., Lorenzo V. (2002) Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 327-338.
- Varekamp J.C. (2004) Copahue volcano: a modern terrestrial analog for the opportunity landing site. *Eos* 85, 401-407.
- Varekamp J.C., Ouimette A., Herman S., Delpino D., Bermúdez A. (2001) The 1990-2000 eruptions of Copahue, Argentina: a “beehive” volcano in turmoil. *Geology* 29, 1059-1062.
- Veglio F., Beolchini F. (1997) Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy* 44, 301-316.

- Viera M., Curutchet G., Donati E. (2003) A combined bacterial process for the reduction and immobilization of chromium. *International Biodeterioration and Biodegradation* 52, 31-34.
- Viera M., Donati E. (2004) Microbial processes for metal recovery from waste products. *Current Topics in Biotechnology* 1, 117-127.
- Visser M., Parshina S.N., Alves J.I., Sousa D.Z., Cardoso Pereira I.A., Muyzer G., Kuever J., Lebedinsky A.V., Koehorst J.J., Worm P., Plugge C.M., Schaap P.J., Goodwin L.A., Lapidus A., Kyrpides N.C., Detter J.C., Woyke T., Chain P., Davenport K.W., Spring S., Rohde M., Klenk H.P., Stams A.J.M. (2014) Genome analysis of the carboxydrotrophic sulfate-reducers *Desulfotomaculum nigrificans* and *Desulfotomaculum carboxydivorans* and reclassification of *Desulfotomaculum carboxydivorans* as a later synonym of *Desulfotomaculum nigrificans*. *Standards in Genomic Sciences* 9, 655-675.
- Visser M., Worm P., Muyzer G., Cardoso Pereira I.A., Schaap P.J., Plugge C.M., Kuever J., Parshina S.N., Nazina T.M., Ivanova A.E., Bernier-Latmani R., Goodwin L.A., Kyrpides N.C., Woyke T., Chain P., Davenport K.W., Spring S., Klenk H.P., Stams A.J.M. (2013) Genome analysis of *Desulfotomaculum kuznetsovii* strain 17 reveals a physiological similarity with *Pelotomaculum thermopropionicum* strain SI. *Standard in Genomic Sciences* 8, 69-87.
- Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. (2007) Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5261-5667.
- Watanabe M., Kojima H., Fukui M. (2013) *Desulfotomaculum intricatum* sp. nov., a sulfate reducer isolated from freshwater lake sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 3574-3578.
- Wendt-Potthoff K., Koschorreck M. (2002) Functional groups and activities of bacteria in a highly acidic volcanic mountain stream and lake in Patagonia, Argentina. *Microbial Ecology* 43, 92-106.
- Wheaton G., Counts J., Mukherjee A., Kruh J., Kelly R. (2015) The confluence of heavy metal biooxidation and heavy metal resistance: Implications for bioleaching by extreme thermoacidophiles. *Minerals* 5, 397-451.

- Widdel F., Hansen T., Balows A., Truper H., Dworkin M., Harder W. (1992) The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria. En: Balows A., Trüper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H, eds., *The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, applications*, 2nd ed., Vol. 1. New York: Springer-Verlag, pp. 582-624.
- Widdel F., Pfenning N. (1977) A new anaerobic, sporing, acetate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum* (emend.) *acetoxidans*. *Archives of Microbiology* 112, 119-122.
- Wikel A.J., Datsenko I., Vera M., Sand W. (2014) Impact of *Desulfovibrio alaskensis* biofilms on corrosion behaviour of carbon steel in marine environment. *Bioelectrochemistry* 97, 52-60.
- Willis Poratti G., Hedrich S., Ñancucheo I., Johnson B., Donati E.R. (2013) Microbial diversity in acidic anaerobic sediments from geothermal Cavihue – Copahue system. *Advanced Materials Research* 825, 7-10.
- Wuana R.A., Okieimen F.E. (2011) Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *International Scholarly Research Network Ecology* 1, 1-20.
- Yaakop A.S, Chan C.S, Kahar U.M, Ee R., Chan K-G, Goh K.M. (2015) Draft genome sequence of *Erythrobacter vulgaris* strain O1, a glycosyl hydrolase-producing bacterium. *Genome Announcements* 3, 1-2.
- Yao Z., Li J., Xie H., Yu C. (2012) Review on remediation technologies of soil contaminated by heavy metals. *Procedia Environmental Sciences* 16, 722-729.
- Zagury G.J., Kulnieks V.I., Neculita C.M. (2006) Characterization and reactivity assessment of organic substrates for sulphate-reducing bacteria in acid mine drainage treatment. *Chemosphere* 64, 944-954.