

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**



**Casa abierta al tiempo**

***UNIDAD IZTAPALAPA***

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**ESTUDIO FISIOLÓGICO Y MOLECULAR DE UN CONSORCIO  
MICROBIANO EN CONDICIONES SULFATORREDUCTORAS**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**CITLALI GARCÍA SAUCEDO**

DIRECTOR

DR. GREGORIO JORGE GÓMEZ HERNÁNDEZ

CO-DIRECTOR

DR. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO

**México, D.F.**

**Junio de 2008**

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa esta incluido en el Padrón Nacional de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) con el número de registro 0472-0.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Fisiología Microbiana W-004 del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Gracias a la beca otorgada por el CONACyT, así como al apoyo financiero recibido a través del proyecto: SEP-2003-C02-43144.

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

México, D.F. a 20 de junio de 2008

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la  
Unidad Iztapalapa aprobó la Tesis

**ESTUDIO FISIOLÓGICO Y MOLECULAR DE UN CONSORCIO MICROBIANO EN  
CONDICIONES SULFATORREDUCTORAS**

Que presentó

**Citlali García Saucedo**

**Comité Tutorial:**

Director: Dr. Gregorio Jorge Gómez Hernández

Co-Director: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Asesora: Dra. Flor de María Cuervo López

Asesor: Dr. Germán Buitrón Méndez

**Jurado:**

Presidente: Dr. Simón González Martínez

\_\_\_\_\_

Secretaria: Dra. Flor de María Cuervo López

\_\_\_\_\_

Vocal: Dra. Beatriz Rendón Aguilar

\_\_\_\_\_

Vocal: Dr. Dr. Germán Buitrón Méndez

\_\_\_\_\_

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

***A mi madre María de los Ángeles***

*por todo su amor, apoyo, consejos y enseñanzas*

***A mi padre Eliseo***

*por incursionarme en el mundo de las ciencias biológicas*

***A mi compañero y mejor amigo Javier***

*por su amor, por su paciencia y por alentarme a seguir adelante en los momentos difíciles*

***y a toda mi Familia***

*por su cariño*

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

## **Agradecimientos**

Al Dr. Jorge Gómez por la dirección de este trabajo, por darme una visión nueva de la fisiología microbiana. Gracias por su tiempo, dedicación, consejos y análisis.

Al Dr. Francisco Fernández por la co-dirección de este trabajo, por compartir sus conocimientos y experiencia, por el apoyo y la confianza que me brindó.

A mi asesora la Dra. Flor de María Cuervo por su paciencia, por crear un clima de confianza para discutir los resultados de manera amena. Gracias por sus ideas, su apoyo y esfuerzo que fueron parte importante a este trabajo.

A mi asesor el Dr. Germán Buitrón por sus ideas que hicieron posible darle forma a esta Tesis.

Al jurado, Dra. Beatriz Rendón y Dr. Simón González, por la revisión de la tesis y sus acertados comentarios.

A la Dra. Anne-Claire por todas sus recomendaciones a este trabajo y al Dr. Felipe por su disponibilidad y confianza.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Landy, Edna, Emir, Sergio, Emanuel, Armando, David, Ricardo, Arturo, Julio y Raúl por sus consejos y apoyo en las jornadas de trabajo.

A Aida y Edgar por su amistad y por incursionarme en las técnicas de biología molecular. A la Dra. Natalie C. y al Dr. Hugo R. por prestarnos sus instalaciones para concluir este trabajo.

A Paty, Margarita, Diva, Mary, Toño, Ricardo H., Jorge, Rodrigo y Luis G por su amistad y consejos durante el posgrado.

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

## ÍNDICE

<b>Nomenclatura</b> .....	i
<b>Resumen</b> .....	ii
<b>Abstract</b> .....	iv
<b>Prólogo</b> .....	vi
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	
1.1. Ciclo biológico del azufre.....	1
1.2. Sulfatorreducción desasimilativa	
1.2.1. Tratamiento de aguas residuales con sulfato.....	4
1.2.2. Microbiología y fisiología de la sulfatorreducción.....	11
1.2.3. Bioquímica de la sulfatorreducción.....	14
1.2.4. El sulfuro en la sulfatorreducción .....	20
1.3. Estudio de la comunidad microbiana en reactores anaerobios.....	23
1.3.1. Diversidad microbiana en reactores.....	24
1.3.2. Dinámica de poblaciones microbianas en reactores.....	26
1.4. Referencias.....	29
<b>Capítulo 2. Justificación y objetivos</b>	
2.1. Justificación.....	40
2.2. Objetivos.....	41
<b>Capítulo 3. Materiales y métodos</b>	
3.1. Reactor continuo.....	42
3.2. Cultivo en lote.....	43
3.3. Métodos analíticos.....	44
3.3.1. Compuestos azufrados.....	44
3.3.1.1. Cuantificación de sulfato.....	44
3.3.1.2. Cuantificación de sulfuro.....	44
3.3.2. Compuestos carbonados.....	44
3.3.2.1. Cuantificación de carbono total e inorgánico.....	44
3.3.2.2. Cuantificación de ácidos grasos volátiles.....	45
3.3.2.3. Cuantificación de metano y dióxido de carbono..	45
3.3.3. Determinación de sólidos suspendidos volátiles.....	46
3.4. Cálculos.....	46
3.4.1. Evaluación del comportamiento respiratorio.....	46

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

3.4.2. Balance de carbono.....	46
3.4.3. Balance de azufre.....	46
3.5. Métodos moleculares.....	47
3.5.1. Extracción de ADN del lodo.....	47
3.5.2. RAPD: amplificación de ADN y visualización.....	47
3.5.3. Amplificación de ADN y separación por DGGE.....	48
3.5.4. Secuenciación y análisis filogenético.....	48
3.5.5. Análisis de datos.....	49
3.6. Referencias.....	51
<b>Capítulo 4. Efecto de la velocidad de carga sobre la eficiencia de consumo del COT en un proceso sulfatorreductor: efecto del sulfuro en cultivo en lote.....</b>	<b>53</b>
<b>Capítulo 5. Evaluación de la dinámica de una comunidad microbiana a diferentes velocidades de carga de sulfato en un reactor UASB: análisis molecular y fisiológico .....</b>	<b>74</b>
<b>Capítulo 6. Conclusiones generales, recomendaciones y perspectivas</b>	<b>95</b>
<b>Capítulo 7. Apéndices.....</b>	<b>98</b>
7.1. Curvas de calibración	
7.2. Cuantificación de sulfato	
7.3. Cuantificación de sulfuro	
7.4. Cuantificación de carbono total e inorgánico	
7.5. Cuantificación de ácidos grasos volátiles	
7.6. Cuantificación de metano y dióxido de carbono	
7.7. Determinación de sólidos suspendidos volátiles	
7.8. Extracción de ADN del lodo	
7.9. Electroforesis en gel de agarosa	
7.10. Reacción de PCR para RAPD	
7.11. Fotografías de los geles obtenidos por la técnica de RAPD	
7.12. Reacción de PCR para DGGE	
7.13. Índices ecológicos	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1</b> Eficiencias de consumo de sulfato y materia orgánica en digestores anaerobios de aguas residuales con sulfato en reactores continuos.....	6
<b>Tabla 1.2</b> Reacciones involucradas en la conversión de la materia orgánica en biorreactores anaerobios con lactato, propionato, acetato e hidrógeno.....	8
<b>Tabla 1.3</b> Datos cinéticos de microorganismos sulfatorreductores, metanogénicos, acetogénicos y fermentativos en presencia de hidrógeno, acetato, propionato y lactato .....	10
<b>Tabla 1.4</b> Concentraciones de sulfuro disuelto (SD) que causan el 50% de inhibición de la sulfatorreducción (IC <sub>50</sub> ).....	22
<b>Tabla 3.1</b> Concentraciones de los nutrientes del medio mineral.....	43
<b>Tabla 3.2</b> Lista de iniciadores para RAPD.....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> El ciclo biológico del azufre.....	4
<b>Figura 1.2</b> Reducción desasimilativa de sulfato a sulfuro vía tritonato y reducción asimilativa de sulfato para la formación de cisteína en <i>Escherichia coli</i> .....	15
<b>Figura 1.3</b> Ruta desasimilativa de sulfatorreducción de lactato a acetato en especies de <i>Desulfovibrio</i> y la hipótesis del ciclo de hidrógeno .....	17
<b>Figura 1.4</b> Ruta de oxidación de lactato a CO <sub>2</sub> en <i>Archaeoglobus fulgidus</i> .....	19



## Nomenclatura

<b>AGV</b>	Ácidos grasos volátiles
<b>C/S</b>	Relación carbono/azufre
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración de inhibidor que reduce la actividad microbiana en 50%
<b>COT</b>	Carbono orgánico total
<b>DGGE</b>	Denaturing gradient gel electrophoresis (electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante)
<b>DQO/SO<sub>4</sub></b>	Relación demanda química de oxígeno/sulfato
<b>E</b>	Eficiencia de consumo de sustrato (%) (mg de sustrato consumido/mg de sustrato alimentado)
<b>MM</b>	Microorganismos metanogénicos
<b>MSR</b>	Microorganismos sulfatorreductores
<b>PSR</b>	Proceso sulfatorreductor
<b>q</b>	Velocidad específica de consumo (mg sustrato/mg SSV-d)
<b>RAPD</b>	Random amplified polymorphic DNA (Amplificación al azar de ADN polimórfico)
<b>SD</b>	Sulfuro disuelto (mg S-sulfuro/L)
<b>SSV</b>	Sólidos suspendidos volátiles
<b>TRH</b>	Tiempo de residencia hidráulica (d)
<b>UASB</b>	Upflow anaerobic sludge blanket (lecho anaerobio de flujo ascendente).
<b>VCS</b>	Velocidad de carga de sulfato (g S-SO <sub>4</sub> /Ld)
<b>Y</b>	Rendimientos de productos (mg producto/mg de sustrato consumido)
<b>ΔG°'</b>	Energía libre de Gibbs (KJ/reacción)

## RESUMEN

El presente trabajo contribuye al estudio del proceso de sulfatorreducción, así como al entendimiento de las interacciones entre la respuesta fisiológica dentro de un consorcio en condiciones sulfatorreductoras y la estructura de la comunidad microbiana presente. Se estudió el efecto de la velocidad de carga y la influencia del sulfuro sobre la eliminación de sulfato y carbono orgánico total, la cual fue evaluada a través de variables de respuesta tales como eficiencias de consumo, rendimientos de producto y velocidades específicas de consumo de sustrato. Para profundizar en el estudio sobre las interacciones entre la respuesta fisiológica y la estructura microbiana se utilizaron técnicas de biología molecular como la amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD) y la técnica de separación de ADN por electroforesis en gel con gradientes desnaturalizantes (DGGE). Asimismo, las bandas del gel de DGGE fueron secuenciadas y analizadas filogenéticamente. En todos los casos se utilizó el mismo consorcio (lodo), en condiciones sulfatorreductoras y fisiológicamente estable. Para determinar el efecto de diferentes velocidades de carga de sulfato (VCS, 290 a 981 mg S-SO<sub>4</sub>/Ld) y lactato a una relación C/S estequiométrica (0.75) sobre el proceso sulfatorreductor (PSR) se utilizó un reactor continuo de lecho anaerobio de flujo ascendente (UASB). Se realizaron ensayos en cultivo en lote para evaluar el efecto diferentes concentraciones iniciales de sulfuro (0 a 200 mg S-sulfuro/L) sobre las variables de respuesta fisiológicas del PSR. Asimismo, se evaluó la dinámica de la comunidad microbiana del ADN total, de la comunidad bacteria y arquea en el reactor UASB a las cinco velocidades de carga de sulfato y lactato.

Los resultados en el UASB, mostraron que con el incremento de la VCS, las eficiencias de consumo de carbono orgánico total y de sulfato disminuyeron de 93±3 a 66%±2 y de 60±5 a 45%±4, respectivamente. Las eficiencias de consumo de lactato fueron cercanas al 100%. Se acumularon acetato y propionato. Los rendimientos de sulfuro disuelto fueron constantes y cercanos a uno, mientras los rendimientos de biomasa y metano fueron muy bajos en todos los casos. La concentración de sulfuro más alta fue de 385 ± 45 mg S-sulfuro/L. La relación producto/biomasa fue de 52 mg S-sulfuro/g sólidos suspendidos volátiles (SSV).

En los cultivos en lote, en el control con lactato sin sulfato se observó la fermentación del lactato a acetato y propionato. Cuando estuvieron presentes lactato y sulfato hubo fermentación y sulfatorreducción. Cuando se adicionó sulfuro, únicamente se presentó el PSR. Las velocidades específicas de consumo de acetato y propionato fueron hasta once veces menores que las velocidades específicas de consumo de lactato. A una concentración mayor que 150 mg S-sulfuro/L se observó una disminución de las eficiencias

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

de consumo, rendimientos de producto y velocidades específicas de consumo. El análisis de la relación sulfuro/SSV mostró que el descenso en las eficiencias de consumo y la acumulación de acetato y propionato en el reactor continuo UASB no estuvieron relacionados con la inhibición por sulfuro, sino con una baja velocidad específica de consumo de acetato y propionato.

El análisis de las secuencias del gen 16S ADNr, mostró la presencia de cepas relacionadas con la sulfatorreducción de lactato y acetato, bacterias fermentativas de lactato y metanogénicas. Los resultados indicaron que el proceso respiratorio en estado estacionario a 290 mg S-SO<sub>4</sub>/Ld estuvo relacionado con una comunidad microbiana estable. Se observaron pocos cambios en la comunidad microbiana con el incremento de la VCS. El análisis de datos de los patrones de bandas mediante los índices de diversidad (*H*), equidad (*J*) y el coeficiente de similitud (*C*) indicó una comunidad microbiana diversa, equitativa y similar mayor que 73%, independientemente de los cambios en la VCS y la concentración de sulfuro. Estos resultados sugirieron que la disminución en los valores de eficiencias de consumo del PSR no estuvo relacionada con los cambios en la comunidad microbiana o con un efecto tóxico del sulfuro.

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

## ABSTRACT

This study represents a contribution to the knowledge of sulfate reducing process (SRP) and understanding of the relationship between the functional performances in a consortium sulfate reducing and the structure of the microbial community. The effect of loading rate and the influence of sulfide on the elimination of sulfate and total organic carbon was evaluated by means of consumption efficiencies, yield products and specific consumption rates of substrate. Molecular techniques such as random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) were used in order to understand the relationship between the structure of the microbial population and functional performance. DGGE bands were sequenced and the phylogeny was analyzed. Stabilized sulfate reducing sludge was used as inoculum in all assays. An upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor was set up in order to examine the effect of different sulfate loading rates (SLR, 290 to 981 mg SO<sub>4</sub>-S/Ld) and lactate at a stoichiometric C/S ratio of 0.75 on SRP. In batch culture the effect of different initial sulfide concentration (0 to 200 mg sulfide-S/L) on SRP was evaluated. The dynamic of total, bacterial and archaeal communities in the UASB reactor at the five loading rates of sulfate and lactate, were evaluated.

The results in the UASB reactor showed that when SLR increased, the total organic carbon and sulfate consumption efficiencies decreased from  $93 \pm 3$  to  $66\% \pm 2$  and  $60 \pm 5$  to  $45\% \pm 4$ , respectively, while lactate consumption efficiencies were close to 100%. Acetate and propionate were accumulated. The sulfide dissolved yield was constant and close to one, whereas biomass and methane yields were very low in all cases. The biggest sulfide concentration was  $385 \pm 45$  mg sulfide-S/L. The product/biomass ratio was 52 mg sulfide-S/g Volatile Suspended Solids (VSS).

In batch culture, it was observed in the control assays with lactate (without add sulfate) the fermentation to acetate and propionate. When lactate and sulfate were added, SRP and fermentation were observed. When sulfide was added only SRP was observed. The specific consumption rates of acetate and propionate were eleven times lower than specific consumption rate of lactate. At concentrations higher than 150 mg sulfide-S/L the efficiencies, yields and specific consumption rates decreased. Based on the sulfide-S/Volatile Suspended Solid ratio, it was found that the decrease in consumption efficiency and accumulation of acetate and propionate in the UASB reactor was not related to sulfide inhibition but to the specific consumption rates low of acetate and propionate.

The sequence analysis of 16S rDNA genes, showed the presence of microorganisms responsible of the sulfate reduction of lactate and acetate, the presence of fermentative

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

bacteria of lactate and methanogenic. Results indicated that the respiratory steady state at 290 mg SO<sub>4</sub>-S/Ld was related with a microbial community principally stable. As the SLR increased few changes in the microbial community were observed. The indices of diversity (*H*), equitability (*J*) and similarity (*C*) used to analyze the band pattern indicated a diverse, evenness and similar up to 73% microbial community irrespectively to SLR changes and sulfide concentration. These results suggest that the diminishing in the consumption efficiencies values of the SRP was not related with the changes observed in the microbial community or with a toxic effect of sulfide.

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

## PRÓLOGO

### *Generalidades*

Algunas variables que reflejan el impacto de la actividad humana en el ambiente se encuentran relacionadas con la alteración en los ciclos biogeoquímicos de los elementos, el cambio climático, la pérdida de biodiversidad y la contaminación del agua.

El agua es quizá la sustancia más importante y versátil que se encuentra en la naturaleza, siendo ésta primordial para la vida en el planeta. La acelerada explosión demográfica provoca año con año una demanda de agua cada vez mayor, generando a su vez una enorme cantidad de aguas residuales, que en la mayoría de los casos son regresadas a los cuerpos de agua sin ningún tratamiento. Esto genera, indudablemente, serios problemas de disponibilidad de agua, de salud y contaminación ambiental. Los tipos de contaminantes en el agua pueden ser diversos, no obstante se pueden clasificar en tres grupos: microorganismos, materia orgánica y compuestos inorgánicos. La contaminación por microorganismos se relaciona con enfermedades infecciosas transmitidas por éstos. Entre los contaminantes orgánicos se encuentran los hidrocarburos, grasas y aceites, entre muchos otros. Los contaminantes inorgánicos son diversas sales, como por ejemplo sulfato, sulfito, nitrato, nitrito, carbonato, etc.

El ser humano ha intervenido en ocasiones de manera negativa en el equilibrio del ciclo biogeoquímico del azufre. Un ejemplo es la lluvia ácida (óxidos de azufre), uno de los más preocupantes problemas ambientales. Aunque hay algunas fuentes naturales de sustancias ácidas, sus cantidades son relativamente pequeñas comparadas con las emisiones antropogénicas. El mayor daño se hace a los lagos, los cuales tienen una capacidad limitada de neutralización. Asimismo, los cuerpos de agua pueden ser contaminados con compuestos de azufre por la descarga directa de aguas residuales con altas concentraciones de compuestos azufrados (Lens *et al.*, 1998b).

Las corrientes de desecho de un gran número de industrias contienen concentraciones altas de compuestos azufrados oxidados y de materia orgánica. Para eliminar simultáneamente el sulfato y la materia orgánica del agua residual puede utilizarse la sulfatorreducción. La sulfatorreducción se define como un proceso respiratorio anóxico desasimilativo, en el cual el sulfato es reducido a sulfuro en presencia de donadores de electrones. La aplicación de este proceso se ha incrementado para el tratamiento de aguas residuales de las industrias química, minera y galvánica (Hulshoff Pol *et al.*, 2001). Sin embargo, este proceso presenta un inconveniente asociado a la producción de sulfuro y a las propiedades tóxicas y corrosivas de dicho compuesto (Lens *et al.*, 1998b). La aplicación de la sulfatorreducción, en combinación con técnicas de

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

eliminación de sulfuro (como la oxidación biológica del sulfuro a azufre elemental, el cual es de baja solubilidad), resulta en una alternativa viable (Gommers *et al.* 1988; Reyes-Ávila *et al.*, 2004; Beristain, 2007).

En la sulfatorreducción se debe alcanzar la reducción completa no asimilativa de todo el sulfato a sulfuro. No obstante, pocos trabajos muestran un PSR eficiente, ya que son frecuentemente dejados al margen factores como la posible competencia del PSR con otros procesos microbianos por los sustratos, la sensibilidad de los consorcios a los niveles tóxicos de sulfuro y/o la dinámica de las poblaciones microbianas.

Algunas aguas residuales ricas en sulfato deben ser tratadas mediante el PSR, pero normalmente es insuficiente la concentración de donadores de electrones. En este caso, se puede emplear lactato como donador de electrones para el PSR, debido a que es un buen sustrato para el crecimiento de muchas bacterias sulfatorreductoras y produce mayor alcalinidad, mejorando el control del pH (Reis *et al.*, 1992; McCartney y Oleszkiewicz, 1993; Kaksonen *et al.*, 2003). En ocasiones, cuando este sustrato está presente en el PSR se acumula acetato, ocasionando una significativa disminución en la eficiencia y las velocidades de consumo (Liamleam y Annachatre, 2007). Asimismo, en la fermentación de lactato se ha observado la acumulación de acetato y propionato en una relación C-lactato/S-sulfato de 4.7, sin observar el consumo de sulfato (McCartney y Oleszkiewicz, 1991). Hay indicios de que la acumulación de acetato y/o propionato pudiera estar relacionada con aspectos cinéticos y bajas velocidades de consumo o de transporte, aunque no se cuenta con la evidencia experimental suficiente.

Los microorganismos sulfatorreductores (MSR) muestran ciertas ventajas frente a otros microorganismos, ya que pueden metabolizar (oxidar) un amplio número de sustratos, parecen ser menos sensibles a compuestos tóxicos y, bajo ciertas condiciones ambientales, son capaces de fermentar compuestos orgánicos en ausencia de sulfato (Widdel, 1988). Cuando está presente el acetato como sustrato, en biorreactores sulfatorreductores se llega a presentar el proceso metanogénico, observándose una disminución en la eficiencia del PSR (Yoda *et al.*, 1987; Harada *et al.*, 1994). Considerando que la energía libre de Gibbs y los datos cinéticos para el PSR y la metanogénesis con acetato son similares, el valor de la relación C/S puede ser el factor que esté orientando el proceso respiratorio (Omil *et al.*, 1998; Annachatre y Suktrakoolvait, 2001). También se han propuesto otras variables que pueden ser importantes en la orientación del proceso respiratorio como el pH, la concentración de sulfuro, de sulfato, la fuente de electrones (tipo y concentración) y la fuente de inóculo (Lens *et al.*, 1998b).

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Hay evidencias que indican que la acumulación de sulfuro provoca una inhibición del PSR, causando una sustancial caída en la eficiencia y la velocidad de consumo (Rinzema y Lettinga, 1988; Annachhatre y Suktrakoolvait, 2001). Los valores de sulfuro para  $CI_{50}$  que se han obtenido en el PSR varían de 100 a 1100 mg/L. El amplio intervalo de valores de  $CI_{50}$  podría estar relacionado con condiciones de cultivo tales como pH, la exposición previa al sulfuro, y la concentración microbiana (McCartney y Oleskiewicz, 1991; Visser *et al.*, 1996; Celis-García *et al.*, 2004). Al respecto, todavía es escasa la información acerca del efecto del sulfuro sobre el proceso fermentativo durante el PSR.

Además de la alteración metabólica de los microorganismos, también pueden ocurrir cambios en la estructura de la comunidad microbiana como resultado de la sensibilidad a compuestos tóxicos o cambios en la velocidad de carga. En este sentido, los estudios realizados de la comunidad microbiana en el estado estacionario no han sido claros, ni sistemáticos. Se han observado cambios en la comunidad microbiana, aun si el proceso continuo se encuentra en un aparente estado estacionario respiratorio (Fernández *et al.*, 1999), de forma contraria a lo observado por Raskin *et al.* (1996), quienes describieron una comunidad microbiana estable durante el estado estacionario. Igualmente son escasos los estudios efectuados sobre la relación entre la estructura de la comunidad microbiana y la respuesta respiratoria en reactores sulfatorreductores. La obtención de más información sobre la sulfatorreducción y la dinámica de las poblaciones microbianas podría permitir un mayor control y estabilidad de la función respiratoria en cultivos continuos y, en consecuencia, un mejor tratamiento de las aguas residuales.

Aunque en las últimas dos décadas se ha llevado a cabo una investigación intensa en el tema de la sulfatorreducción, aún no se ha logrado un pleno control del proceso. La mayoría de los trabajos no presentan un proceso sulfatorreductor eficiente, a pesar de algunas ventajas que muestran los MSR. Es, pues, necesario ahondar en su estudio para identificar cuál o cuáles son las variables más importantes: si es la acumulación de sulfuro o el tipo de microflora, por mencionar algunos casos. Lo anterior podría dar un mejor entendimiento al proceso, pudiéndose utilizar esta información como base para proponer posibilidades que permitan tratar con éxito los efluentes ricos en sulfato.

#### *Formato de la tesis*

Este trabajo pretende contribuir a un mejor entendimiento del proceso sulfatorreductor en reactores de operación continua y su relación con la dinámica poblacional bajo estas condiciones. Los resultados podrían ser utilizados en el tratamiento de aguas residuales contaminadas con materia orgánica y sales de sulfato.

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!



Esta tesis está dividida en siete Capítulos. En cada uno de ellos se hace un resumen del contenido. Al final de cada uno se presentan las conclusiones particulares de ese capítulo así como sus referencias. En el **Capítulo 1** se presenta una revisión bibliográfica en el tema de la sulfatorreducción y la dinámica de poblaciones microbianas. En el **Capítulo 2** se hace una justificación y se definen los objetivos del trabajo. En el **Capítulo 3** se indican los materiales y métodos analíticos utilizados a lo largo del trabajo experimental. En el **Capítulo 4** se hace un análisis del efecto de cinco velocidades de carga de sulfato y lactato sobre el proceso sulfatorreductor en un reactor continuo y del efecto de diferentes concentraciones de sulfuro en ensayos en lote. En el **Capítulo 5** se hace una revisión de los resultados obtenidos de la evaluación de la dinámica de la comunidad microbiana en el reactor continuo. En el **Capítulo 6** se presentan las conclusiones generales, las recomendaciones y perspectivas de este trabajo. Finalmente, en el **Capítulo 7** se incluyen los apéndices.

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

## 1. INTRODUCCIÓN

En esta sección se hace una revisión (estado del arte) sobre la eliminación biológica de contaminantes, haciendo énfasis en la eliminación biológica de carbono y azufre mediante la sulfatorreducción. Se abordarán los aspectos biológicos y bioquímicos de este proceso respiratorio, así como los factores que intervienen en la orientación del proceso hacia la sulfatorreducción. Se hace, asimismo, una revisión sobre la diversidad y dinámica de las poblaciones microbianas en reactores en continuo, y el vínculo entre la estructura de la población y la respuesta respiratoria. Finalmente, se hace una justificación y se definen los objetivos del trabajo.

### 1.1. Ciclo biológico del azufre

El azufre está presente en todos los organismos (representa, en promedio, el 3%) y forma parte de muchos compuestos orgánicos como aminoácidos, polipéptidos, proteínas, antibióticos, lípidos y carbohidratos. En contraste, el papel biológico de los compuestos inorgánicos del azufre es normalmente el de nutrientes, posibilitando su incorporación a los compuestos orgánicos celulares, o como donadores o aceptores de electrones. En estos procesos se establecen potenciales electroquímicos de membrana que pueden generar la reducción de NAD, síntesis de ATP, u otros procesos que impliquen consumo de energía (Madigan *et al.*, 1999, Widdel, 1988).

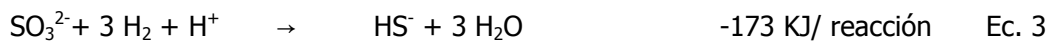
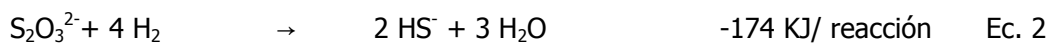
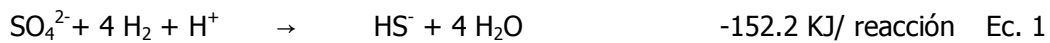
Las oxidaciones y reducciones enzimáticas de los compuestos de azufre constituyen el ciclo biológico del azufre (Figura 1.1a). Aunque son posibles varios estados de oxidación del azufre, el sulfato (estado de oxidación +6) y el sulfuro (-2) son los productos finales de la mayoría de las rutas de oxidación o reducción de los compuestos azufrados. Algunos compuestos inorgánicos que se encuentran también en ambientes naturales son los polisulfuros ( $(S(Sn)S)$ ), el tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ), los politionatos ( $(-O_3S(S)_nSO_3^-)$ ) y el bisulfito ( $HSO_3^-$ ) (Figura 1.1b).

Se pueden distinguir dos etapas en el ciclo biológico del azufre, de acuerdo al tipo de reacciones de oxido-reducción que intervienen:

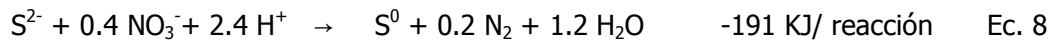
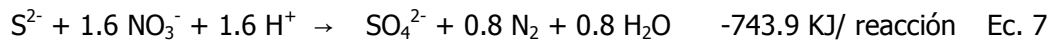
**Etapas reductoras.** Se presentan dos formas fisiológicas de reducción, la asimilativa y la desasimilativa. En la primera, el sulfato es reducido a sulfuro ( $HS^-$ ) para la biosíntesis de compuestos con azufre (R-SH). En la reducción desasimilativa el sulfato es reducido a sulfuro en condiciones anóxicas, siendo el sulfato utilizado como último aceptor de

electrones. Esta reducción está acoplada con la oxidación de materia orgánica y se genera ATP y poder reductor (Madigan *et al.*, 1999).

Los MSR desasimilativos tienen una gran importancia ecológica en los ciclos del carbono y del azufre, debido a que mineralizan la materia orgánica en los ambientes anaerobios. Varios compuestos inorgánicos azufrados como el tiosulfato, el sulfito y el azufre elemental pueden ser utilizados como aceptores de electrones para la respiración anaeróbica por microorganismos sulfatorreductores o de otro tipo (Figura 1.1 b). En las Ec. 1 a 4, se muestra la estequiometría de la reducción de algunos compuestos azufrados a sulfuro. Todas las reacciones son exergónicas y el valor de la energía libre de Gibbs de la reducción de azufre elemental a sulfuro es seis veces menor que la reducción de tiosulfato y sulfito.



**Etapa oxidativa.** Este proceso comprende todas las reacciones de oxidación. La oxidación biológica de sulfuro puede proceder en condiciones aeróbicas y anóxicas (Jensen y Webb, 1995). Bajo esas condiciones, el oxígeno, nitrato, o dióxido de carbono podrían ser utilizados como aceptores de electrones. En condiciones aeróbicas los microorganismos sulfuro oxidantes utilizan el oxígeno como aceptor de electrones (Ec. 5 y 6) (Kelly, 1999). En condiciones anóxicas desnitrificantes, los microorganismos sulfuro oxidantes liberan electrones de los compuestos reducidos del azufre, para formar  $\text{N}_2$  a partir del nitrato (Ec. 7 y 8) (Beristain, 2007). En ausencia de oxígeno, los microorganismos fotótrofos del azufre utilizan la luz solar como fuente de energía para la oxidación del sulfuro y la asimilación del  $\text{CO}_2$  (Cork *et al.*, 1986). Bajo condiciones de suficiente cantidad de oxígeno o nitrato, la oxidación de sulfuro es exergónica, procede espontáneamente. En las Ecuaciones 5 y 6 se observa que la estequiometría de la reacción de los productos finales está en función del  $\text{O}_2$ . Se requiere cuatro veces menos  $\text{O}_2$  para la conversión de sulfuro a azufre que para la oxidación completa a sulfato. Lo mismo se observa cuando se comparan las Ec. 7 y 8, para la conversión de sulfuro a azufre acoplada a la desnitrificación.



Empleando el conocimiento básico del ciclo del azufre se han desarrollado aplicaciones biotecnológicas para eliminar los compuestos azufrados. Dichas aplicaciones constan de dos etapas: en la primera de ellas se lleva a cabo la reducción de sulfato a sulfuro (sulfatorreducción) y en la segunda el sulfuro es oxidado biológicamente a azufre elemental (sulfoxidación), pudiendo ser sedimentado el  $\text{S}^0$  y separado para su confinación. En la actualidad se están realizando estudios para convertir el sulfato en  $\text{S}^0$  en una sola etapa, pretendiendo llevar a cabo en un solo reactor la reducción de sulfato a sulfuro y la oxidación de sulfuro a  $\text{S}^0$ , mediante aireación (Celis-García, 2004; González, 2007). La Ec. 9 indica, no obstante, que la reacción de sulfato a  $\text{S}^0$  en ausencia de  $\text{O}_2$  es exergónica. Asimismo, Fdz-Polanco *et al.* (2001) propusieron la Ec. 10 para explicar el comportamiento observado en su trabajo. Hasta ahora los trabajos en el tema no señalan la reducción parcial de sulfato a  $\text{S}^0$  (sin la adición de  $\text{O}_2$ ) en PSR. Este podría ser uno de los principales retos en el tratamiento biológico de los compuestos oxidados de azufre.



La etapa del ciclo biológico del azufre en la que se enfoca este trabajo está en la reducción desasimilativa del sulfato. A continuación se describen los aspectos más relevantes relacionados con este proceso respiratorio y el tratamiento de aguas residuales.

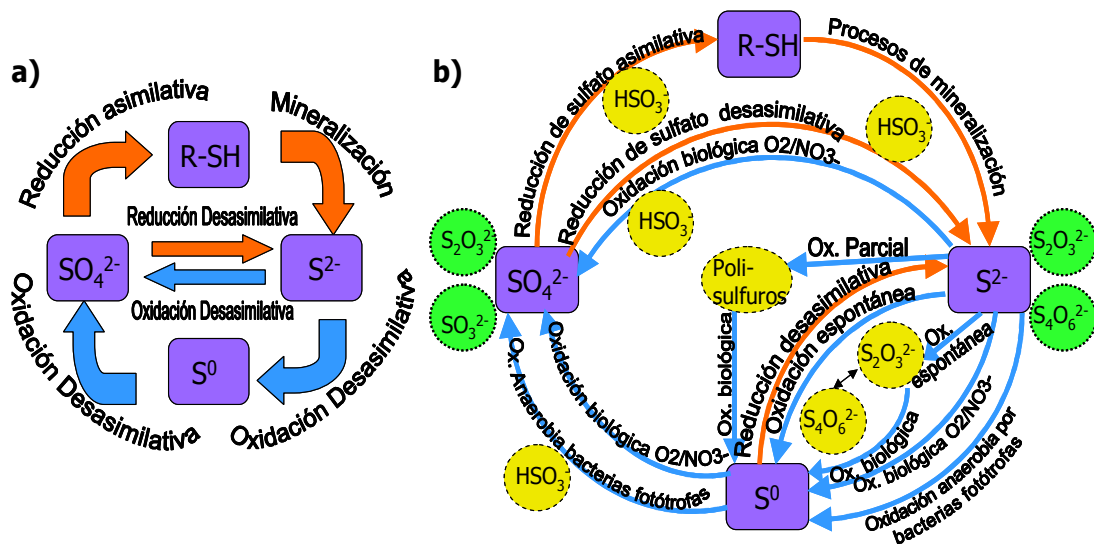


Figura 1.1. El ciclo biológico del azufre. a) ciclo simplificado, b) intermediarios (---), substratos alternos (---). Modificado de Robertson y Kuenen,1992; Brüser *et al.*, 2000; Celis-García, 2004.

## 1.2. Sulfatorreducción desasimilativa

### 1.2.1. Tratamiento de aguas residuales con sulfato

El sulfato es un compuesto no volátil, ni tóxico (Widdel, 1988). De hecho, la presencia de sulfato no constituye una amenaza directa para el ser humano, aunque se ha encontrado que puede causar problemas estomacales en niños. Sin embargo, la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (EPA) ha establecido un límite máximo permisible para aguas subterráneas de 250 ppm. Valores similares se han establecido en las normas de Holanda para la descarga de sulfato en el alcantarillado. El problema de desechar efluentes con altas concentraciones de sulfato radica en la eventual formación de sulfuro bajo condiciones anóxicas, ocasionando problemas en el ambiente debido a las propiedades tóxicas de éste para los organismos vivos. Por esta razón se vuelve indispensable el tratamiento de efluentes con sulfato disuelto (Hulshoff Pol *et al.*, 2001).

Las aguas residuales con sulfato pueden ser tratadas por métodos fisicoquímicos y procesos biológicos. La eliminación biológica de sulfato es una mejor alternativa comparada con los costosos y algunas veces complejos métodos fisicoquímicos, tales como ósmosis, electrodiálisis y nanofiltración. La precipitación es una alternativa, sin embargo en algunos casos se forman compuestos tóxicos y se requiere de varios pasos en el tratamiento (Lens *et al.*, 1998b).

Los procesos biológicos son frecuentemente empleados para el tratamiento de las aguas residuales industriales y domésticas. Su finalidad es la eliminación de la materia orgánica, nitrógeno, azufre y otros contaminantes. Diversos tipos de aguas residuales, para los cuales el tratamiento anaeróbico es considerado económicamente atractivo, tienen altas concentraciones de sulfato, sulfito u otros compuestos oxidados del azufre. Algunos tipos de aguas residuales generadas por la industria de la pulpa y el papel, tenería, procesadoras de mariscos y de la viscosa y rayón contienen sulfato (1.2 a 3 g SO<sub>4</sub>/L) y diversos compuestos orgánicos (1 a 17 g DQO/L) (Kroiss *et al.*, 1985; Habets y de Vegt, 1991; Méndez *et al.*, 1995; Shin *et al.*, 1996). Otras aguas residuales como las generadas por la fotografía, la industria farmacéutica y la fermentación presentan mayores concentraciones de materia orgánica que de sulfato (30 a 68 g DQO/L y 2.5 a 8 g SO<sub>4</sub>/L), en contraste con la industria del aceite comestible (10 a 50 g SO<sub>4</sub>/L y 2 a 6 g DQO/L) (Hoeks *et al.*, 1984, Svardal *et al.*, 1993; Lens *et al.*, 1998b). Las aguas residuales generadas en la producción de TNT y la refinería (sosas gastadas) tienen elevadas concentraciones tanto de sulfato como de materia orgánica (20 a 51 g SO<sub>4</sub>/L y 68 a 320 g DQO/L) (Hao *et al.*, 1994; Olmos *et al.*, 2004).

El tratamiento biológico de aguas residuales con sulfato y materia orgánica es realizado a través del PSR. La aplicación del PSR se ha incrementado principalmente para el tratamiento de aguas residuales de las industrias químicas, mineras y galvánicas (Hulshoff Pol *et al.*, 2001). La precipitación del sulfuro metálico reduce los potenciales problemas tóxicos causados por metales pesados en el proceso de la digestión anaerobia. Algunos ejemplos de la aplicación del PSR son la eliminación simultánea de metales y sulfato de agua subterránea (Scheeren *et al.*, 1991); la eliminación de sulfato de desecho de ácido sulfúrico (Stucki *et al.*, 1993) y la eliminación de metales tóxicos de aguas residuales de minería (Maree *et al.*, 1987).

Se han diseñado diversos reactores anaerobios para estudiar el tratamiento de aguas residuales con sulfato y materia orgánica (Tabla 1.1). La materia orgánica en estos sistemas suele ser eliminada tanto mediante sulfatorreducción como por metanogénesis. Un factor ambiental que orienta el proceso podría ser la relación DQO/SO<sub>4</sub>. Teóricamente, las aguas residuales con una relación DQO/SO<sub>4</sub> de 0.67 tienen estequiométricamente suficiente sulfato para mineralizar completamente la materia orgánica por sulfatorreducción. Con una relación DQO/SO<sub>4</sub> menor de 0.67, la concentración de materia orgánica es insuficiente para la reducción del sulfato. Si el objetivo del tratamiento es la eliminación de sulfato, debe adicionarse sustrato reductor extra.

Tabla 1.1. Eficiencias de consumo de sulfato y materia orgánica en digestores anaerobios de aguas residuales con sulfato en reactores continuos. Adaptado de Lens *et al.* (1998b).

Tipo de reactor	Influente		Efluente			Ref.
	Donador de electrones	DQO/SO <sub>4</sub>	SO <sub>4</sub> (g/L)	E <sub>DQO</sub> (%)	E <sub>SO<sub>4</sub></sub> (%)	
UASB	Sacarosa	4-2.8	1.4-2	NR	60-70	1
AF	Ácido cítrico	7.58	3.4	NR	93	2
UASB	Almidón y sacarosa	16.6	0.03	88	86	3
		3.33	0.15	88	94	
		0.83	0.6	86	42	
MUSB	Acetato	2	0.1-0.2	NR	35	4
CAD	Alimentos del mar	17-22	0.6-2.7	NR	96	5
EGSB	Acetato Propionato butirato	0.41-0.54	1.2-4.6	NR	27-68	6
USSB	Acetato Propionato butirato	0.5	1-12	NR	35	7
UASB	Melaza	6.6-1.1	0.45	50-80	50-80	8
		0.66	0.45	70	40	
		0.23	0.45	40	10	
UASB	Lactato Propionato Butirato	1.6	1.5	90	64	9
		0.67	4.5-5.5	90	43-71	

E<sub>DQO</sub>, eficiencia de consumo de DQO; E<sub>SO<sub>4</sub></sub>, eficiencia de consumo de sulfato; CAD, central activity digester, UASB, upflow anaerobic sludge bed reactor; AF, anaerobic filter; MUSB, microaerophilic granular sludge bed reactor; USSB, upflow staged sludge bed reactor; EGSB-expanded granular sludge bed reactor; NR, no reportado.

1. Clancy *et al.* (1992); 2. Colleran *et al.* (1994); 3. Harada *et al.* (1994); 4. Arora *et al.* (1995); 5. Omil *et al.* (1995); 6. Omil *et al.* (1996); 7. Lens *et al.* (1998a); 8. Annachhatre y Suktrakoolvait (2001); 9. Celis-García, (2004).

En la Tabla 1.1 se presentan las eficiencias de consumo de sulfato con diferentes relaciones DQO/SO<sub>4</sub>. En ella se observa que con una relación DQO/SO<sub>4</sub> superior a la estequiométrica las eficiencias de consumo de DQO y SO<sub>4</sub> son elevadas. No obstante, a esta relación DQO/SO<sub>4</sub> la concentración de sulfato no fue suficiente para mineralizar la materia orgánica por el PSR (esto es, un exceso de poder reductor), lo que podrían dar lugar a condiciones ambientales que permitieron la eliminación de ésta mediante metanogénesis. Con una relación DQO/SO<sub>4</sub> estequiométrica o menor, las eficiencias de consumo de sulfato son menores del 70%, pero se presenta una disminución en el proceso metanogénico, y sugiere que bajo estas condiciones el proceso predominante es la sulfatorreducción. Como se aprecia, con relaciones DQO/SO<sub>4</sub> cercanas a la estequiométrica la sulfatorreducción es parcial y esto podría ocasionar problemas al

ambiente. Por lo anterior, se requiere de más estudios para entender el PSR y establecer condiciones de cultivo que mejoren el proceso.

Otro factor que debe ser considerado en el estudio de los procesos biológicos, es el referente a la conversión de sustrato consumido, ya sea hacia la formación de biomasa ( $Y_{X/S}$ ) o de productos ( $Y_{P/S}$ ). Estos pueden ser expresados por los coeficientes de rendimiento empleando las siguientes ecuaciones:

$$Y_{X/S} = \Delta x / S_c$$

Ec. 11

$$Y_{P/S} = \Delta p / S_c$$

Ec. 12,

donde  $\Delta x$  es el incremento de la concentración de biomasa,  $\Delta p$  el incremento en la formación del producto y  $S_c$  la concentración de sustrato consumido. Así, los rendimientos muestran el destino final de los sustratos consumidos e indican la posible predominancia de una ruta metabólica sobre otra. En este sentido, son pocos los trabajos relacionados que muestran los valores de rendimientos. Uno de ellos es el de Kaksonen *et al.* (2003) en el cual obtuvieron valores de  $Y_{X/S}$  (g biomasa/g lactato oxidado) de 0.039-0.054, mientras que las eficiencias de consumo orgánico fueron cercanas al 100%. Los valores de  $Y_{X/S}$  normalmente indican que la formación de biomasa es casi nula y puede decirse que el proceso deberá ser prácticamente desasimilativo, dado que los valores de  $\Delta G^\circ$  son usualmente bajos. Por otro lado, El-Bayoumy *et al.* (1999) obtuvieron valores de rendimiento de sulfuro disuelto cercanos a 1, con valores de eficiencia de consumo de sulfato menores al 30%. Un PSR poco eficiente, pero donde el sulfato que se consumió fue reducido en su totalidad a sulfuro.

Por otro lado, la baja eficiencia del PSR, según el punto de vista de algunos autores, parece estar asociada con las interacciones competitivas entre microorganismos sulfatorreductores y otros microorganismos anaerobios para utilizar los donadores de electrones disponibles (Yoda *et al.*, 1987; Harada *et al.*, 1994). La reacción de sulfatorreducción con lactato y propionato como donadores de electrones es termodinámicamente más favorable que otras reacciones microbianas con estos sustratos (Tabla 1.2). Sin embargo, cuando se emplea acetato, los valores de la energía libre de Gibbs para el PSR y la metanogénesis son similares. Las propiedades cinéticas de las diferentes cepas también influyen en los procesos microbianos, sin descartar la enorme influencia que tiene la estequiometría del medio de cultivo (o de los influentes) lo que hace que las condiciones ambientales de ambos procesos sean muy diferentes.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!



Tabla 1.2. Reacciones involucradas en biorreactores anaerobios con lactato (LA), propionato (PA), acetato (AC) e hidrógeno.

Reacciones	<sup>(1)</sup> ΔG°	Proceso	Cepa	Ecuación
$LA^- + 2H_2O \rightarrow AC^- + 2H_2 + HCO_3^- + H^+$	-4.2 <sup>a</sup>	Acetogénesis	<i>Clostridium formicoaceticum</i>	13
$LA^- + 1.5H_2O \rightarrow 1.5CH_4 + 1.5HCO_3^- + 0.5H^+$	-102.7 <sup>b</sup>	Metanogénesis		14
$LA^- \rightarrow 0.66PA^- + 0.33AC^- + 0.33HCO_3^- + 0.33H^+$	-54.7 <sup>b, c</sup>	Fermentación	<i>Clostridium propionicum</i>	15
		Fermentación por reductoras de sulfato	<i>Desulfobulbus</i>	
$LA^- + 1.5 SO_4^{2-} \rightarrow 3 HCO_3^- + 1.5 HS^- + 0.5H^+$	-127.6 <sup>b,d</sup>	PSR oxidación completa	<i>Desulfobacter</i>	16
$LA^- + 0.5SO_4^{2-} \rightarrow AC^- + HCO_3^- + 0.5HS^- + 0.5H^+$	-80.1 <sup>b, d</sup>	PSR oxidación incompleta	<i>Desulfovibrio</i> y <i>Desulfotomaculum</i>	17
$AC^- + SO_4^{2-} \rightarrow HS^- + 2HCO_3^-$	-47.6 <sup>b, d</sup>	PSR	<i>Desulfobacter</i> <i>Desulfobacterium</i> <i>Desulfotomaculum</i>	18
$AC^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	-31.0 <sup>a</sup>	Metanogénesis	<i>Methanothrix</i> y <i>Methanosarcina</i>	19
$PA^- + 3H_2O \rightarrow AC^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$	+76.1 <sup>a</sup>	Acetogénesis	<i>Syntrophobacter</i>	20
$PA^- + 0.75SO_4^{2-} \rightarrow AC^- + HCO_3^- + 0.75HS^- + 0.25H^+$	-37.5 <sup>b, d</sup>	PSR oxidación incompleta	<i>Desulfobulbus</i>	21
$PA^- + 1.75SO_4 \rightarrow 1.75 HS^- + 3HCO_3^- + 0.25H^+$	-85.3 <sup>b</sup>	PSR oxidación completa	<i>Desulfococcus</i> y <i>Desulfobacterium</i>	22
$H_2 + 0.25 H^+ + 0.25 SO_4^{2-} \rightarrow 0.25 HS^- + H_2O$	-38 <sup>b</sup>	PSR	<i>Desulfovibrio</i>	1
$H_2 + 0.25HCO_3^- + 0.25H^+ \rightarrow 0.25CH_4 + 0.75 H_2O$	-33.9 <sup>b</sup>	Metanogénesis	<i>Methanobacterium</i>	23

(1), KJoul/reacción; <sup>a</sup> Thauer *et al.*, 1977; <sup>b</sup>, Valores calculados en este trabajo con energías libres de Gibbs de formación compilados de Madigan *et al.*, 1999 (T, 25 °C, pH, 7, P, 1 atm); <sup>c</sup>, Hao *et al.*, 1996; <sup>d</sup>, Widdel, 1988, asociación sintrófica de reductoras de sulfato (acetogénicas) con metanogénicas.

En consorcios anaerobios en condiciones desasimilativas, en los que el crecimiento microbiano es despreciable, el valor de afinidad del sustrato (K<sub>s</sub>) podría ser de mayor relevancia en la determinación de la velocidad específica del proceso (q). La concentración celular, la concentración de sustrato o el tipo de sustrato también influenciarán los valores de los parámetros cinéticos. Así:

$$dS/dt = q_s [X] \quad \text{Ec. 24}$$

Donde q<sub>s</sub> (1/tiempo) es la velocidad específica de consumo y X la concentración microbiana. Asimismo, la expresión puede definirse de la manera siguiente:

$$-dS/dt = q_s [S] \quad \text{Ec. 25}$$

En esta ecuación se observa que la cinética es de orden uno y que depende de la concentración de sustrato. Para que las ecuaciones anteriores describan de modo más explícito el proceso,  $q_s$  puede ser sustituida por la ecuación de Monod.

$$q_s = q_{\max} [S] / K_s + [S] \quad \text{Ec 26}$$

Donde  $K_s$  es la constante de afinidad del cultivo por el sustrato  $S$ . Si se sustituye la Ecuación 26 en la ecuación 24 se observa que la velocidad del consumo de sustrato depende de la concentración del mismo, y se tiene lo siguiente:

$$r = -dS/dt = (q_{\max} [S] / K_s + [S]) [X] \quad \text{Ec 27}$$

La velocidad volumétrica  $r$  de la Ecuación 27 señala claramente la dependencia del cultivo en función de la concentración de la biomasa, del sustrato y de la afinidad por el sustrato (o por el tipo de sustrato). No obstante, si la concentración de  $S$  y  $X$  son las mismas, la velocidad dependerá de  $K_s$ .

Los MSR tienen una alta afinidad por sulfato ( $K_{S_{O_4}}$ ), aunque a bajas concentraciones de sulfato diferentes tipos microbianos competirán también por el sulfato disponible. Yoda *et al.* (1987) y Visser (1995) presentaron valores de  $K_{S_{O_4}}$  con acetato en un intervalo de 18 a 45 mg/L, mientras para lactato Ingvorsen y Jorgensen (1984) y Nielsen (1987) obtuvieron un intervalo de valores de 0.1 a 7 mg/L.

La Tabla 1.3 muestra datos cinéticos que predicen cierta ventaja de los MSR sobre los microorganismos metanogénicos (MM) por el hidrógeno, en contraste con los valores para el acetato. De hecho, se ha encontrado que el acetato es convertido completamente en metano en presencia de un exceso de sulfato (Hoeks *et al.*, 1984; Mulder, 1984; Rinzema *et al.*, 1986), mientras que otros autores han observado la sulfatorreducción de ese sustrato (Choi y Rim, 1991). Estos resultados podrían ser explicados por la similitud en los valores de  $K_s$  y de la energía libre de Gibbs, mientras que otras variables como la relación C/S (y la concentración de sulfato), relación C/N, pH, temperatura y concentración de sulfuro, por mencionar algunos, podrían también influenciar la orientación del proceso respiratorio (Lens *et al.*, 1998b; Omil *et al.*, 1998; Annachatre y Suktrakoolvait, 2001).

Se sabe que algunas bacterias acetogénicas requieren de la asociación sintrófica con bacterias sulfatorreductoras para la mineralización del propionato. Desafortunadamente, hay poca información disponible sobre los valores de  $K_s$  para propionato, lo que dificulta el análisis de los procesos microbianos con propionato en

cultivos sintróficos y sulfatorreductores cuando está presente el sulfato. Asimismo, los valores de Ks son escasos para cultivos axénicos y para procesos con lactato bajo condiciones sulfatorreductoras, y por ahora no es posible predecir tampoco el resultado de la posible competencia entre MSR y bacterias fermentativas con lactato. A concentraciones bajas de sulfato se ha visto que *Clostridium* sp. presenta valores de Ks mayores que *Desulfovibrio* sp. (Zellner *et al.*, 1994). Como puede observarse, aún falta mucho trabajo experimental por realizarse.

Tabla 1.3. Datos cinéticos de microorganismos sulfatorreductores, metanogénicos, acetogénicos y fermentativos en presencia de hidrógeno, acetato, propionato y lactato.

Donador de electrones	Proceso	Inóculo	Ks	
			mM	
H <sub>2</sub>	Sulfatorreducción	<i>Desulfovibrio</i> sp. <sup>a</sup>	0.003	
	Metanogénesis	<i>Methanospirillum hungatei</i> <sup>a</sup>	0.006	
Acetato	Sulfatorreducción	<i>Desulfovibrio postgatei</i> <sup>b</sup>	0.2	
		<i>Desulfovibrio postgatei</i> <sup>f</sup>	0.06	
		Cultivo enriquecido <sup>d</sup>	0.17	
	Metanogénesis	Lodo granular <sup>e</sup>	0.93	
		Lodo suspendido <sup>e</sup>	0.17	
		Lodo suspendido <sup>f</sup>	0.1	
		Cultivo enriquecido <sup>d</sup>	0.55	
Propionato	Sulfatorreducción	Lodo granular <sup>e</sup>	0.9	
		Lodo suspendido <sup>e</sup>	0.48	
		Cultivo enriquecido <sup>g</sup>	0.85	
	Sintrofia	Cultivo enriquecido <sup>h</sup>	2.2	
Lactato	Sulfatorreducción	<i>D. desulfuricans</i> <sup>i</sup>	0.024	
		Sin SO <sub>4</sub>	<i>Desulfovibrio</i> sp. <sup>j</sup>	1.5
		Fermentación	<i>Clostridium</i> sp. <sup>j</sup>	2.5

<sup>a</sup>, Robinson y Tiedje (1984), pH, 6.7, T, 37; <sup>b</sup>, Schönheit *et al.* (1982); <sup>c</sup>, Ingvorsen *et al.* (1984); <sup>d</sup>, Yoda *et al.* (1987), pH, 7.5, T, 30 °C; <sup>e</sup>, Visser, (1995), pH, 7.5, T, 30 °C; <sup>f</sup>, Middlenton y Lawrence, (1977), T, 31 °C; <sup>g</sup>, Maillacheruvu y Parkin, (1996), <sup>h</sup>, Gujer y Zehnder, (1983), T, 33 °C; <sup>i</sup>, Okabe *et al.* (1992), pH, 7, T, 35 °C; <sup>j</sup>, Zellner *et al.* (1994).

Por otro lado, cuando el lactato está presente como fuente reductora en el PSR se llega a observar la acumulación de acetato y/o propionato (McCartney y Oleszkiewicz, 1991; Maillacheruvu *et al.*, 1993). La acumulación de estos compuestos se traduce en una disminución significativa en las eficiencias y velocidades de consumo del PSR. Omil *et al.* (1998), empleando un reactor UASB para eliminar sulfato y una mezcla de acetato, propionato y butirato (AGV) con dos relaciones DQO/SO<sub>4</sub> (0.5 y 2), observaron diferencias en las velocidades específicas de consumo (*q*) de los AGV mediante sulfatorreducción. A la relación DQO/SO<sub>4</sub> de 2 la velocidad específica de consumo de acetato, propionato y butirato en términos de DQO fue de 0.25, 0.42 y 0.5 g DQO/g SSV d, respectivamente,

mientras que con exceso de sulfato (DQO/SO<sub>4</sub> de 0.5) fue de 0.53, 0.73 y 0.73 g DQO/g SSV d, respectivamente. Estos resultados indicaron que las velocidades específicas de consumo mejoraron de manera significativa vía sulfatorreducción cuando se emplea una relación cercana a la estequiométrica (DQO/SO<sub>4</sub> de 0.67) para este proceso. Maillacheruvu y Parkin (1996) con sulfato en exceso, presentaron velocidades de consumo específico para acetato y propionato de 4.6 y 3.3 g DQO/g SSV d.

### 1.2.2. Microbiología y fisiología de la sulfatorreducción

Muchos organismos usan sulfato como fuente de azufre en sus procesos de biosíntesis. Los microorganismos que utilizan sulfato como aceptor de electrones fueron llamados sulfatorreductores. Actualmente se han identificado cerca de 18 géneros que pueden llevar a cabo la sulfatorreducción desasimilativa, los cuales presentan una morfología diversa (espiral, vibrios, ovoide, bacilo, cocoide) (Widdel y Bak, 1992). Se han clasificado con ayuda del análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA y han sido agrupadas en: bacterias sulfatorreductoras (BSR) mesofílicas Gram negativas, BSR formadoras de esporas Gram positivas, BSR termofílicas y arqueas sulfatorreductoras (ASR) termofílicas. Las BSR Gram negativas se encuentran localizadas en la subdivisión  $\delta$ -Proteobacteria, en donde también existen otras bacterias no sulfatorreductoras. Dentro de esta división hay dos familias relevantes de BSR: *Desulfovibrionaceae* y *Desulfobacteriaceae*. La familia *Desulfovibrionaceae* está formada básicamente por especies del género *Desulfovibrio* (Voordouw, 1995). Los géneros principales de la familia *Desulfobacteriaceae* son *Desulfobacter*, *Desulfococcus* y *Desulfobulbus*, entre otros. El género *Desulfotomaculum* es el más representativo de las BSR Gram positivas y sus especies forman esporas. Los microorganismos sulfatorreductores termofílicos se dividen en especies bacterianas y arqueas (Castro *et al.*, 2000). Algunas características que se consideran representativas de los MSR incluyen el contenido de desulfoviridina y citocromos presentes (*b*, *c* y *c*<sub>3</sub>). El *citocromo c*<sub>3</sub> probablemente se encuentra en organismos que usan este aceptor de electrones, que tiene la función de transportar los electrones desde la fuente de energía al ión sulfato en los pasos del adenosin fosfosulfato y del sulfito, descritos en detalle más adelante. Asimismo, los microorganismos reductores de sulfato capaces de oxidar acetato y otros ácidos grasos también contienen un citocromo de tipo *b* que se supone está implicado en la cadena de transporte de electrones de estas especies. Sin embargo, algunos MSR que emplean ácidos grasos no parecen presentar este citocromo, de acuerdo a las características que presentan algunos autores, lo que podría parecer contradictorio. Otro constituyente que se

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

considera una característica de estos microorganismos es una proteína que exhibe actividad sulfito reductasa conocida como desulfovirdina (*Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfococcus*, *Desulfonema*) o P<sub>582</sub> (*Desulfotomaculum* y *Desulfonema*), y que podría catalizar la reacción de transferencia de seis electrones (Madigan *et al*, 1999).

Algunos MSR son quimiolitotróficos y consumen un compuesto inorgánico (H<sub>2</sub>) como donador de electrones para reducir el sulfato y utilizar CO<sub>2</sub> como fuente de carbono (Voordouw, 1995). Los MSR pueden ser también quimiorganotróficos, consumiendo compuestos orgánicos como donadores de electrones y fuente de carbono. Algunos donadores de electrones usados para soportar la sulfatorreducción se muestran en la Tabla 1.1, entre los que se encuentran formiato, ácidos grasos ramificados, una gran variedad de alcoholes como etanol y metanol, compuestos aromáticos, ácidos monocarboxílicos, dicarboxílicos, algunos aminoácidos, azúcares y largas cadenas de alcanos saturados. La literatura muestra que ciertos MSR pueden deshalogenar compuestos organoclorados (Ensley y Sufliata, 1995). En este sentido, la estimación de la energía libre de Gibbs (-130 a -180 KJ/reacción) y los potenciales redox (E<sup>o</sup>, +260 a +480 mV) para un amplio intervalo de compuestos halogenados alifáticos y aromáticos han indicado que son excelentes aceptores de electrones (Dolfing y Harrison, 1992; Dolfing y Janssen, 1994). De hecho, desde hace más de dos décadas, fue aislada y caracterizada *Desulfomonile tiedjei* una cepa capaz de acoplar la deshalogenación reductiva de 3-clorobenzoato (DeWeerd *et al.*, 1990). El género *Desulfovibrio* sp también ha sido relacionado con otros compuestos halogenados (Sun *et al.*, 2000), sin embargo no se ha encontrado ningún cultivo axénico que sea capaz de deshalogenar oxidativamente bajo condiciones sulfatorreductoras, tal como lo hace *Pseudomonas stutzeri*. Esta especie ha sido descrita como el primer cultivo axénico capaz de realizar la descloración oxidativa del 2-cloroetanol bajo condiciones de nitrato reducción (Dijk *et al.*, 2003). Los MSR son conocidos por poseer actividad metabólica contra algunos de los contaminantes ambientales más persistentes y problemáticos conocidos, como pentaclorofenol, percloroetileno, tricloroetileno, tolueno y p-Cresol, por mencionar algunos (Ensley and Sufliata, 1995).

Los MSR han sido subdivididos de acuerdo a su capacidad de oxidación en dos grandes subgrupos. El grupo I (oxidación incompleta) oxida su fuente de energía al nivel de acetato y excretan este ácido graso como producto final (Widdel, 1988). Los organismos del grupo II (oxidación completa) difieren de los del grupo I por su capacidad de oxidación de acetato y de otros ácidos grasos, lactato, succinato y, en algunos casos, benzoato para formar CO<sub>2</sub> (Widdel, 1988). Las diferencias entre estos dos grupos de MSR

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

pueden deberse a su metabolismo enzimático. Aunque se hace la generalización de que el tipo de oxidación que realizan depende del género al que pertenezcan los microorganismos, se ha observado que el género *Desulfotomaculum* presenta la oxidación completa en algunas especies e incompleta en otras. Dentro del género *Desulfovibrio*, normalmente clasificado dentro del grupo I, una especie oxida acetato y hay también especies termofílicas, e incluso una especie del género *Arqueoglobus* produce metano (Widdel 1988; Madigan *et al.*, 1999; Castro *et al.*, 2000). Muchos MSR son capaces de fermentar ciertos compuestos orgánicos en ausencia de sulfato o de otros aceptores terminales de electrones. De esta forma, pueden ser utilizados lactato, piruvato, propionato, etanol, fumarato, fructosa y malato (Stams *et al.*, 1984; Pankhania *et al.*, 1988; Widdel, 1988). La fermentación de homoacetato forma acetato a partir de  $H_2 + CO_2$ , formiato, etanol o lactato (Cypionka y Pfennig, 1986). Además de usar sulfato como aceptor de electrones, muchos MSR obtienen energía usando sulfito, tiosulfato, azufre elemental, hierro III, nitrato ( $NO_3^-$ ), nitrito ( $NO_2^-$ ) y otros iones como aceptores de electrones (Widdel y Pfennig, 1984; Hamilton, 1998). Algunos MSR también pueden fijar  $N_2$ , pero esta propiedad no está distribuida uniformemente en el grupo. Representantes de los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfobacter* es más probable que fijen  $N_2$  (Madigan *et al.*, 1999).

Los MSR están esparcidos en ambientes acuáticos y terrestres que se vuelven anóxicos debido a procesos microbianos de descomposición. Los MSR están ampliamente distribuidos en sedimentos marinos, de lagos y lagunas de agua salada, yacimientos petroleros e intestinos de animales, tolerando un amplio intervalo de pH y temperatura. Sin embargo, los MSR llegan a estar presentes en ambientes óxicos (Cypionka, 2000).

Se ha evidenciado que el  $O_2$  puede ser reducido por algunos MSR y han sido descritas en ellos enzimas reductoras de oxígeno (Postgate, 1984; Abdollahi y Wimpenny, 1990; Dilling y Cypionka, 1990, Cypionka, 2000). La reacción con oxígeno es termodinámicamente más favorable, pues, la energía libre de la oxidación de  $H_2$  con oxígeno es mucho más negativa (-237 KJ/ reacción) que con sulfato (-39 KJ/ reacción). Asimismo, el  $O_2$  puede ser reducido sin la activación de consumo de ATP, como se requiere para sulfato (Cypionka, 2000). Además, se ha encontrado que algunos MSR con  $O_2$  pueden oxidar compuestos de azufre inorgánico reducido. Sulfuro, sulfito, azufre elemental y tiosulfato pueden ser completamente oxidados a sulfato (Dannenberg *et al.*, 1992). De aquí que algunos autores se atrevan a decir que estos microorganismos son capaces de catalizar todas las reacciones del ciclo del azufre (Cypionka, 2000). La información anterior nos muestra la diversidad metabólica de estos microorganismos, que fueron nombrados hace muchos años sólo como sulfatorreductores.

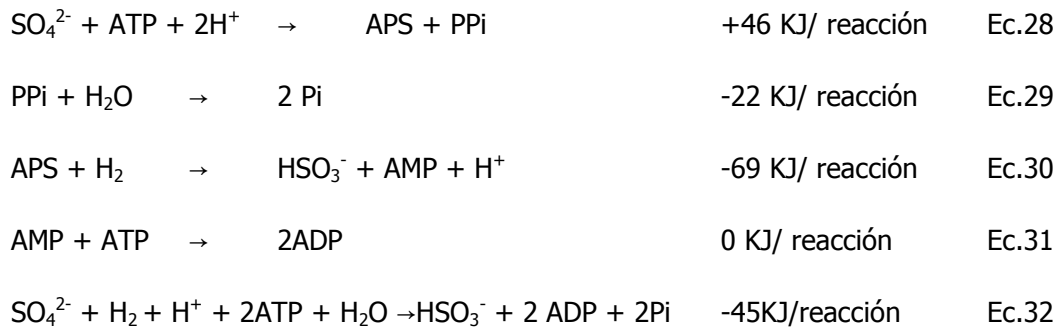
pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

### 1.2.3. Bioquímica de la sulfatorreducción

En la reducción asimilativa de sulfato, el sulfuro formado se convierte inmediatamente en azufre orgánico bajo forma de aminoácidos (cisteína y metionina) y diversas coenzimas (coenzima A y biotina), y en la desasimilativa se secreta. La diferencia radica en la ruta bioquímica de la formación de sulfuro (Figura 1.2). El ión sulfato es estable con un potencial redox bajo y no puede consumirse sin que antes se active. Después de ser transportado al citoplasma, el sulfato se activa por el ATP, y la enzima ATP sulfurilasa cataliza el enlace del sulfato al fosfato alfa del ATP originando la formación de adenosin 5'-fosfosulfato (APS) y liberando pirofosfato. La enzima ATP sulfurilasa tiene un equilibrio desfavorable ( $K_{eq} \sim 10^{-7}$  M) en la dirección de la formación de APS, y aunque el ATP es hidrolizado la reacción es fuertemente endergónica (Ec. 28). Se ha postulado que la reacción es favorecida por la hidrólisis del pirofosfato, mediada por una pirofosfatasa (Ec. 29) y por la reacción mas exergónica de la reducción de APS a sulfito y AMP mediada por la APS reductasa (Ec. 30). El  $\Delta G^{\circ}$  de la reacción global es termodinámicamente favorable (Ec. 32). Asimismo, se ha observado que el molibdato puede interactuar con la enzima ATP sulfurilasa y ocasionar un ineficaz consumo de ATP (Nemati, 2001).



Posteriormente, el sulfito es reducido a sulfuro mediante una serie de pasos poco conocidos. Se ha identificado una sulfito reductasa, pero no está claro si esta enzima también reduce todos los intermediarios potenciales entre el sulfito y el sulfuro. La sulfito reductasa encontrada en *Desulfovibrio vulgaris* parece ser parcialmente inhibida por arsenito en concentraciones de  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$  M (Kobayashi *et al.*, 2000). En la reducción de sulfito a sulfuro se han propuesto diferentes pasos. En la Figura 1.2 se ha incluido uno de ellos, que involucra un mecanismo de recirculación del sulfito ( $SO_3$ ) que es liberado durante la reducción de tritionato ( $S_3O_6^{2-}$ ) a tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ) y de la reducción de tiosulfato a sulfuro (Kobayashi *et al.*, 1969). El  $\Delta G^{\circ}$  de las reacciones involucradas es negativo, el valor más alto (-122 KJ/reacción) ocurre durante la reducción de tritionato a

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!



tiosulfato. El cambio de energía libre de la reducción de sulfito a sulfuro con H<sub>2</sub> como donador de electrones es -174 KJ/reacción (Cypionka, 1995). Por otro lado, varios organismos incapaces de llevar a cabo la reducción desasimilativa de sulfato pueden realizar la reducción desasimilativa de sulfito, probablemente porque aunque son capaces de convertir él sulfito a H<sub>2</sub>S carecen del sistema APS. La antraquinona puede actuar como un inhibidor del proceso, debido a que desacopla la síntesis de ATP de las reacciones de transferencia de electrones asociados con la respiración de sulfato que dependen de H<sub>2</sub> (Cooling III *et al.*, 1996).

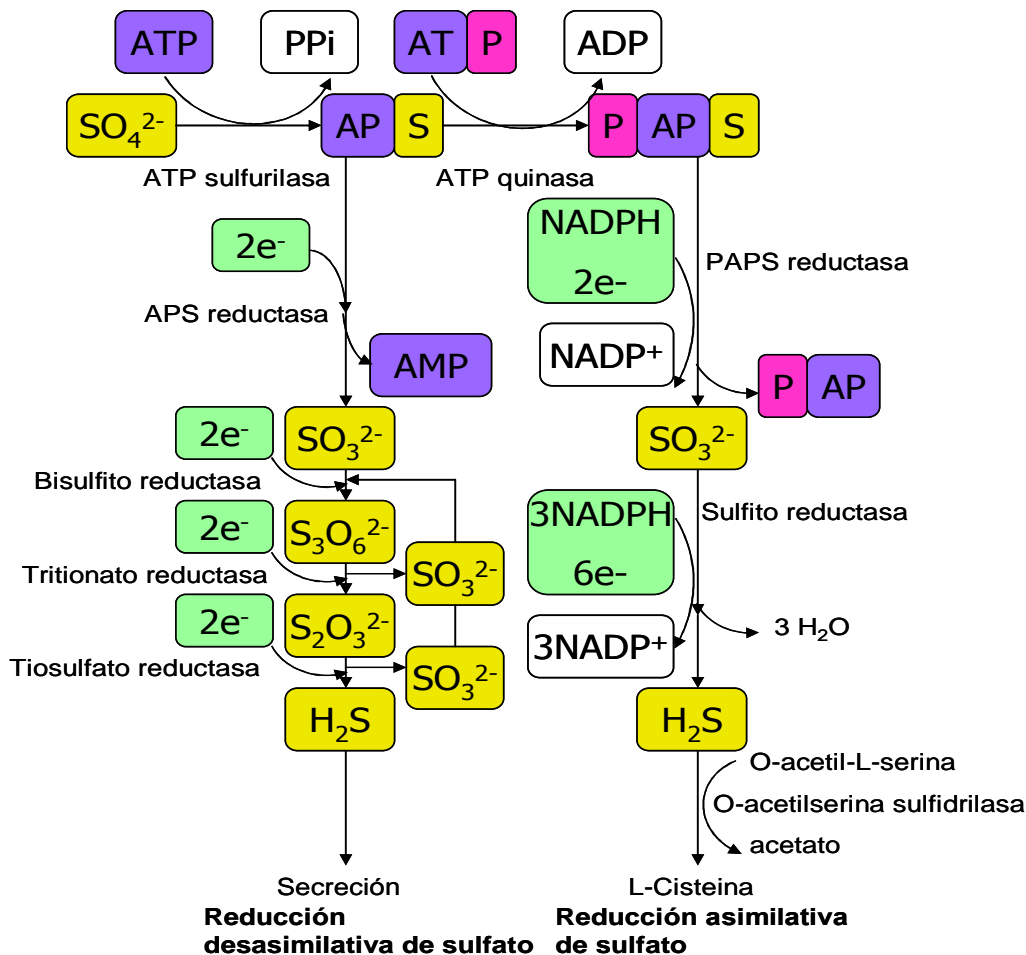


Figura 1.2. Reducción desasimilativa de sulfato a sulfuro vía tritronato y reducción asimilativa de sulfato para la formación de cisteína en *Escherichia coli*. APS, adenosin 5'-fosfosulfato; PAPS, fosfoadenosin fosfosulfato; PAP, fosfoadenosin 5'-fosfato. Modificado de Kobayashi *et al.*, (1969) y Madigan *et al.*, (1999).

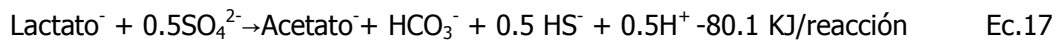
La diferencia entre la sulfatorreducción desasimilativa y asimilativa se presenta después de la formación del APS. En la sulfatorreducción asimilativa la formación de APS sigue otra vía distinta, se añade otro fósforo al APS para formar fosfoadenosin fosfosulfato (PAPS). Por medio de la fosfoadenosin fosfosulfato reductasa se transfieren dos electrones



para formar sulfuro y la sulfuro reductasa cataliza la transferencia de 6 electrones de 3 moléculas de NADPH al sulfuro, con la formación de sulfuro (Figura 1.2). Ya que éste es tóxico para muchos microorganismos, el sulfuro es inmediatamente incorporado en o-acetilserina en muchas bacterias. El producto formado, L-cisteína, es el más importante precursor de compuestos de azufre de la célula. Parece que los hongos combinan el sulfuro de hidrógeno con serina para formar cisteína.

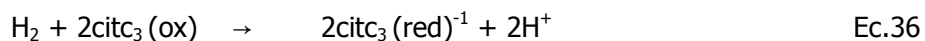
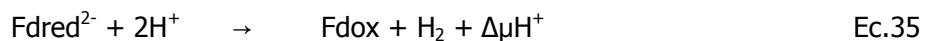
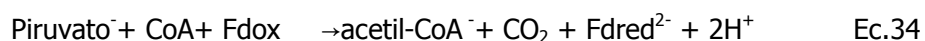
#### Oxidación incompleta de sustratos

La oxidación incompleta de lactato a acetato (Ec. 17) para la sulfatorreducción propuesta por Odom y Peck (1981), se realiza vía piruvato y acetyl-CoA, la cual podría ser un mecanismo de formación de ATP también para la oxidación de piruvato, formato o hidrógeno (Figura 1.3).



Probablemente una flavoproteína funcionaría como aceptor del hidrógeno en el primer paso de la oxidación, y la piruvato-ferredoxin oxidoreductasa se acoplaría con la formación de acetyl-CoA. Los equivalentes reductores serían liberados por la hidrogenasa citoplásmica y transferidos a la hidrogenasa periplásmica, que a su vez los cedería al citocromo  $c_3$ . Los electrones generados de esta oxidación se moverían a través de la membrana, dejando los protones en la superficie externa de la membrana. Los electrones serían usados en el citoplasma para reducir sulfato a sulfuro, resultando en el consumo de 8 electrones. El efecto neto sería la transferencia de 8 protones a través de la membrana citoplasmática y el gradiente de protones conduciría a la síntesis de ATP. En resumen, 4 moléculas de  $\text{H}_2$  (8 protones periplásmicos) permitirían una síntesis neta de 2.7 moléculas de ATP por molécula de sulfato. La síntesis del producto final, acetato, también se encuentra acoplada con la síntesis de ATP (Figura 1.3) (Voordouw, 2002).

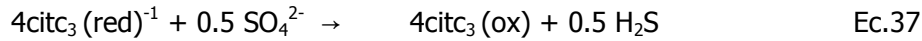
La Ecuación 17 probablemente involucra los siguientes pasos de oxidoreducción (Thauer *et al*, 2007):



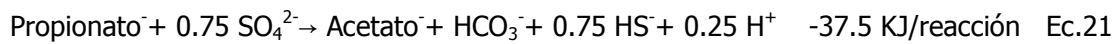
**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!



Los problemas energéticos para la oxidación de lactato a acetato pueden ser vistos a través de los potenciales redox ( $E^\circ$ ) de los intermediarios. Se sugiere que la oxidación de lactato a piruvato (Ec. 33), con un  $E^\circ$  de -190 mV para el par piruvato/lactato, es el paso que requiere mayor energía. Se ha encontrado que la formación de  $\text{H}_2$  a partir de piruvato, el cual es oxidado a acetato y  $\text{CO}_2$ , no requiere de energía; el  $E^\circ$  del par acetyl-CoA+ $\text{CO}_2$ /piruvato es de -500 mV y del par  $\text{H}^+/\text{H}_2$  de -414 mV (Thauer *et al.*, 2007). Por otro lado, en la oxidación incompleta de propionato a acetato por sulfatorreducción (Ec. 21), se forma propionil-CoA, el cual es oxidado vía metilmalonil-CoA, con succinil-CoA, succinato, fumarato, malato, oxalacetato, piruvato y acetyl-CoA como intermediarios (Stams *et al.*, 1984).



La evidencia de esta ruta ha sido obtenida en *Desulfobulbus propionicus* con propionato y sulfato (Stams *et al.*, 1984).

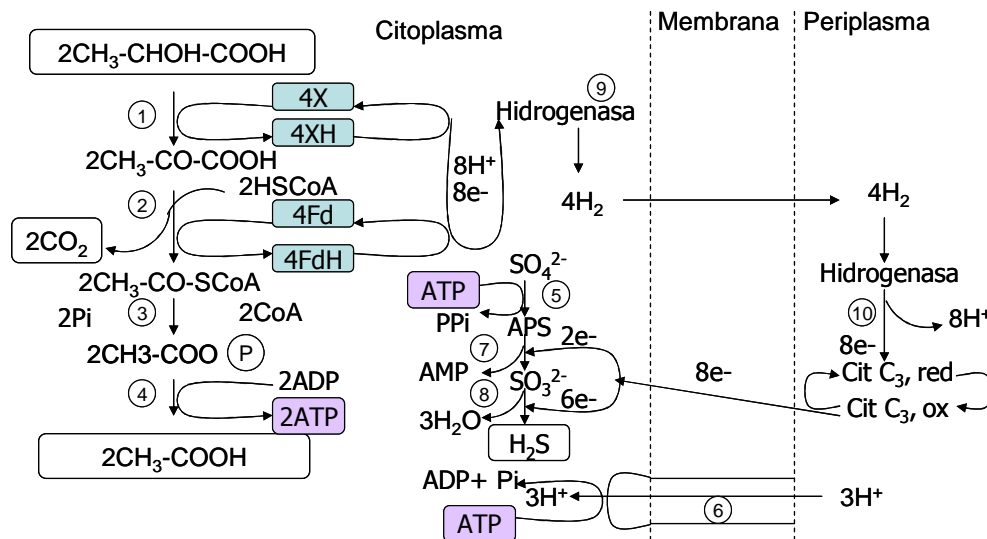


Figura 1.3. Ruta desasimilativa de sulfatorreducción de lactato a acetato en especies de *Desulfovibrio* y la hipótesis del ciclo de hidrógeno. 1. Lactato deshidrogenasa, (XH) unida a la membrana, aceptor-H no conocido; 2. piruvato-ferredoxin oxidorreductasa; 3. fosfotransacetilasa; 4. acetato quinasa; 5. ATP sulfurilasa; 6. ATP sintasa 7. APS reductasa; 8. sulfito reductasa; 9. hidrogenasa citoplásmica; 10. hidrogenasa periplásmica. Modificado de Lupton *et al.* (1984) y Gottschalk (1986).

La ruta del metilmalonil-CoA parece ser energéticamente más favorable que la oxidación de propionil-CoA vía acriloil-CoA, si se compara el potencial redox del par fumarato/succinato (+33 mV) con el par acriloil-CoA/propionil-CoA (+69 mV), este último sugiere que se requiere mayor aporte de energía antes de que la reacción pueda proceder (Thauer *et al.*, 2007).

#### Oxidación completa de sustratos

Hay muchos MSR que pueden oxidar compuestos orgánicos tales como acetato, lactato, ácidos grasos de cadena larga, alcanos o ácido benzoico completamente a CO<sub>2</sub>, usando sulfato como aceptor de electrones. En todos los casos, el acetil-CoA es un intermediario en la ruta hasta CO<sub>2</sub>. Algunos MSR usan el ciclo del ácido cítrico modificado para oxidar acetil-CoA a CO<sub>2</sub>. La mayoría, incluido *Archaeoglobus fulgidus*, usan la ruta del acetil-CoA (acetil-CoA sintasa oxidativa (descarboxilasa)/carbon monóxido deshidrogenasa). Los microorganismos reductores de sulfato autótrofos también usan la vía metabólica del acetil-CoA para la fijación de CO<sub>2</sub> (Hamilton, 1998; Madigan *et al.*, 1999). La oxidación completa de acetato a CO<sub>2</sub> (Ec. 18) vía acetil-CoA puede ser analizada mediante los potenciales redox (Thauer y Kunow, 1995).



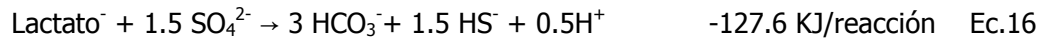
A manera de recordatorio, para la reacción redox de dos semirreacciones cualquiera:

$$\Delta E^{\circ} = E^{\circ} (\text{aceptor de electrones}) - E^{\circ} (\text{donador de electrones})$$

Debe tenerse en cuenta que un valor positivo de  $\Delta E^{\circ}$  da lugar a un  $\Delta G^{\circ}$  negativo, indicando una reacción espontánea. Al combinar dos semirreacciones en condiciones estándar, la dirección de la reacción espontánea será por tanto aquella en la que se reduzca el par redox con el potencial redox estándar más positivo. Ahora bien, la sulfatorreducción desasimilativa de acetato a CO<sub>2</sub> por la vía del acetil-CoA, tiene la ventaja de que todos los pasos de oxidación involucrados proceden con potenciales redox más negativos que los del par APS/AMP+HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> (-60 mV) y los del par HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>/HS<sup>-</sup> (-116 mV). Por el contrario, el ciclo del ácido cítrico involucra un paso, la oxidación de succinato a fumarato, con un potencial redox de +33 mV. La oxidación de succinato a fumarato con

sulfato como aceptor terminal de electrones es por tanto una reacción endergónica ( $\Delta E^\circ$  negativo) (Thauer *et al.*, 2007).

El mecanismo de oxidación de lactato a  $\text{CO}_2$  con sulfato (Ec. 16) vía acetil-CoA se conoce en *Archaeoglobus fulgidus* (arquea sulfatorreductora). La ruta es similar a la encontrada en los sulfatorreductores *Desulfotomaculum acetoxidans* y *Desulfobacterium autotrophicum* (Figura 1.4) (Thauer y Kunow, 1995).



La oxidación de lactato a  $\text{CO}_2$  esta asociada con la reducción de la ferredoxina, coenzima  $\text{F}_{420}$ , menaquinona y un aceptor de electrones desconocido (denominado X). La oxidación de estos transportadores de electrones se da vía sulfatorreducción a  $\text{H}_2\text{S}$ . (Möler-Zinkhan *et al.*, 1989; Möler-Zinkhan y Thauer, 1990; Schmitz *et al.*, 1991). Una enzima que interviene en la primera conversión, de lactato a piruvato, conocida como lactato deshidrogenasa puede ser una de las más sensibles al oxígeno (Cypionka, 2000).

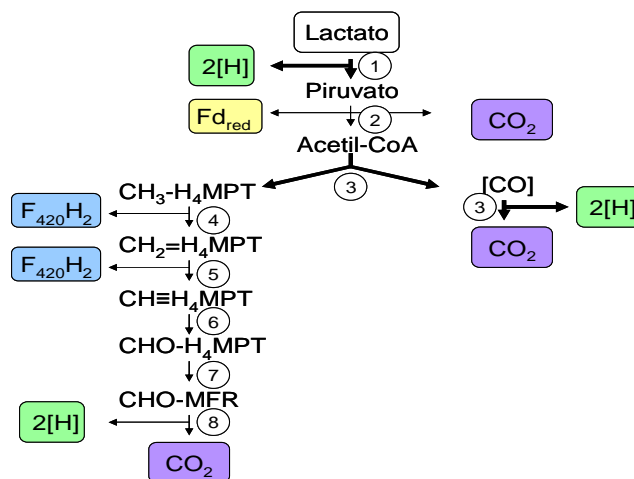


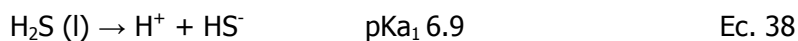
Figura 1.4. Ruta de oxidación de lactato a  $\text{CO}_2$  en *Archaeoglobus fulgidus*. MPT, metanopterin. 1. Lactato deshidrogenasa, 2. Ferredoxin oxidorreductasa, 3. Monóxido de carbono deshidrogenasa, 4.  $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -metilene- $\text{H}_4$ MPTreductasa, 5.  $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -metilene- $\text{H}_4$ MPTdeshidrogenasa, 6.  $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -metenil- $\text{H}_4$ MPTciclohidrolasa, 7. N-formilmetanofurano:  $\text{H}_4$ MPTformiltransferasa, 8. N-formilmetanofurano deshidrogenasa. Flechas gruesas indican reacciones catalizadas por la fracción de membrana de extractos celulares, flechas delgadas indican reacciones catalizadas por la fracción soluble de extractos celulares. Abreviaciones:  $\text{CH}_3\text{-H}_4\text{MPT}$ ,  $\text{N}^5$ -metiltetrahidrometanopterin;  $\text{CH}_2=\text{H}_4\text{MPT}$ ,  $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -metilenetetrahidrometanopterin;  $\text{CH}=\text{H}_4\text{MPT}$ ,  $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -meteniltetrahidrometanopterin;  $\text{CHO-H}_4\text{MPT}$ ,  $\text{N}^5$ -formiltetrahidrometanopterin;  $\text{CHO-MFR}$ , formil-metanofuran;  $\text{Fd}_{\text{red}}$ , ferredoxin reducida,  $\text{F}_{420}\text{H}_2$ , coenzima reducida  $\text{F}_{420}$ ;  $[\text{CO}]$ , CO unido a monóxido de carbono deshidrogenasa (Thauer y Kunow, 1995).

El CO, NO y el acetileno son algunos inhibidores de enzimas con metales, tales como las hidrogenasas (Fe-hidrogenasas, NiFe-hidrogenasa y NiFeSe-hidrogenasa) abundantes en el género *Desulfovibrio* (van Dongen, 1995). Asimismo, la oxidación de algunos substratos por algunas enzimas puede ser más sensible al O<sub>2</sub> que otras, como es el caso de la hidrogenasa de *Desulfovibrio vulgaris*, NADP deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa (Cypionka, 1995; Cypionka, 2000).

#### 1.2.4. El sulfuro en la sulfatorreducción

Otro factor que podría estar asociado con la disminución de las eficiencias y las velocidades de consumo del PSR es la acumulación de sulfuro. La producción de sulfuro es el mayor problema asociado con el tratamiento anaerobio de aguas residuales ricas en sulfato. El sulfuro parece ser un compuesto tóxico para los microorganismos metanogénicos, acetogénicos, y sulfatorreductores. La acumulación de sulfuro puede resultar en una severa intoxicación o inhibición del proceso de tratamiento de las aguas residuales (Rinzema y Lettinga, 1988; Maillacheruvu *et al.*, 1993; Annachhatre y Suktrakoolvait, 2001; Kaksonen *et al.*, 2004a).

El sulfuro producido en un reactor anaerobio se distribuye en S<sup>2-</sup>, HS<sup>-</sup> y H<sub>2</sub>S en solución (sulfuro disuelto), H<sub>2</sub>S en biogás, y sulfuros metálicos insolubles, de acuerdo al equilibrio (determinado principalmente por el valor del pH). El sulfuro en solución es un ácido débil (Ec. 38 y 39). El valor de pKa de la primera disociación del equilibrio de cantidades del H<sub>2</sub>S, es cercano a 6.9 a 30 °C (Lide, 1993). Consecuentemente, las variaciones en el intervalo de pH entre 6 y 8 afectarán a la concentración de H<sub>2</sub>S. La proporción de HS<sup>-</sup> y H<sub>2</sub>S en el sistema puede ser calculada de manera sencilla mediante la ecuación de Henderson-Hasselbach (Ec. 40).



$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \left( \frac{[\text{Sal}]}{[\text{Ácido} - \text{H}]} \right) \quad \text{Ec. 40}$$

El equilibrio entre el H<sub>2</sub>S en solución y el H<sub>2</sub>S en la fase gas estará gobernado por la ley de Henry (Ec. 41), donde el coeficiente de absorción  $\alpha$  de la proporción  $[\text{mol}/\text{m}^3]_{\text{gas}}/[\text{mol}/\text{m}^3]_{\text{líquido}}$  de H<sub>2</sub>S tendrá un valor cercano a 1.99 a 30 °C (Wilhelm *et al.*,

1977). Eso significa que el H<sub>2</sub>S en el biogás producido puede ser significativamente menor que la concentración de H<sub>2</sub>S en la fase líquida.

$$H_2S(L) = \sigma H_2S(g)$$

Ec. 41

Un posible mecanismo para explicar la toxicidad del sulfuro es que el compuesto podría penetrar la membrana mediante gradientes osmóticos y una vez en el citoplasma desnaturalizar proteínas, interferir con las coenzimas A y M, y afectar el pH interno de la célula (Widdel, 1988). El efecto tóxico del sulfuro en los MSR ocurre probablemente también cuando alguna de las especies de sulfuro (H<sub>2</sub>S, HS<sup>-</sup> y S<sup>2-</sup>) se combinan con el hierro de la ferredoxina, del citocromo y de otros compuestos esenciales que contienen hierro en la célula, causando que el sistema de transporte de electrones cese su actividad (Hao *et al.*, 1996). Estudios realizados con un cultivo axénico (*Desulfovibrio desulfuricans*) y mixto mostraron que la inhibición por sulfuro sobre el PSR es no competitiva y que puede ser reversible (Okabe *et al.*, 1995; Kaksonen *et al.*, 2004a).

La literatura sobre la inhibición por sulfuro es compleja, y a veces contradictoria. Algunos trabajos muestran que la inhibición del proceso se correlaciona con la concentración de H<sub>2</sub>S, a valores de pH altos y bajos (Visser, 1995). Otros señalan que está relacionada con la concentración de sulfuro total (o sulfuro disuelto) en el intervalo de pH entre 7 y 9 (Koster *et al.*, 1986; Visser *et al.*, 1996; O'Flaherty *et al.*, 1998). Además del pH y las características del lodo, se piensa que la relación DQO/SO<sub>4</sub> también influye en la susceptibilidad de un lodo al efecto tóxico del sulfuro. Estas diferencias en la tolerancia al sulfuro fueron atribuidas al desarrollo de un consorcio sintrófico más sensible a sulfuro a altas relaciones DQO/SO<sub>4</sub> (3.7), en contraste con relaciones DQO/SO<sub>4</sub> ≤ 1.6, donde las poblaciones de MSR presentaron mayor tolerancia al sulfuro (McCartney y Oleszkiewicz, 1991 y 1993). Asimismo, esos autores encontraron que la oxidación de acetato fue el paso más inhibido por sulfuro, lo que también se observó en cultivos mixtos (Uberoi y Bhattacharya, 1995) y lodos granulares sulfatorreductores (Omil *et al.*, 1996). Los valores de K<sub>i</sub> (inhibición de la utilización de sustrato) encontrados por Maillacheruvu *et al.* (1996) para propionato, acetato e hidrógeno fueron 681, 35 y 422 mg/L de sulfuro, con lo cual concluyeron que las ventajas cinéticas y termodinámicas de los MSR que utilizan acetato fueron suprimidas por la sensibilidad al sulfuro.

La toxicidad por sulfuro es un factor que podría influenciar la competencia entre MSR y MM por los sustratos (Visser *et al.*, 1995). Los autores mencionan que a valores de pH elevados (mayores que 7.5), los MSR que oxidan acetato probablemente dejarán fuera

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

de competencia a los MM, debido a que con estos valores los MSR parecen ser menos sensibles al sulfuro. La concentración de sulfuro disuelto que causa el 50% de inhibición (CI<sub>50</sub>) de la actividad metanogénica varía de 240 a 1260 mg/L (pH de 7.2 a 8 y T de 30 a 35 °C) (Koster *et al.*, 1986; McCartney y Oleszkiewicz, 1993; Visser *et al.*, 1996). En la Tabla 1.4 se muestran los valores de CI<sub>50</sub> para la toxicidad de sulfuro en sistemas sulfatorreductores, los cuales varían de 100 a 1100 mg/L en un intervalo de pH de 7.2 a 7.6. El amplio intervalo de valores de CI<sub>50</sub> para sulfuro en la literatura es discordante y sólo en algunos casos se presenta la concentración microbiana (g SSV/L). Esta última debe ser tomada en consideración, debido a que la concentración de sulfuro inhibitoria dependerá también de la concentración de biomasa presente en los experimentos. Las diferencias encontradas en los valores de CI<sub>50</sub> pueden deberse a diversos factores, tales como tipo y concentración de sustrato, tipo (lodo suspendido, granular, biomasa adherida y composición) e historial (exposición previa o tolerancia a altas concentraciones de sulfuro) del inóculo, difusión del H<sub>2</sub>S y/o sulfuro disuelto, el pH y la temperatura (Rinzema y Lettinga, 1988; Lens *et al.*, 1998b; Celis-García, 2004).

Tabla 1.4. Concentraciones de sulfuro disuelto (SD) que causan <sup>(1)</sup> el 50% de inhibición de la sulfatorreducción (IC<sub>50</sub>). Modificado de Lens *et al.* (1998b) y Kaksonen *et al.* (2004a).

Biomasa	Donador de electrones	T(°C)	pH	SD(mg/L)	Referencia
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Lactato	35	7	500	Okabe <i>et al.</i> , 1992
<i>Desulfonema magnum</i> , <i>Desulfotomaculum acetoxidans</i> , <i>Desulfobacter postgatei</i>	Acetato	30/3 7	7.2 7.6	671-926 660-1360	O'Flaherty <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfococcus multivorans</i>	Etanol	37	7.2 7.6	851 1383	O'Flaherty <i>et al.</i> , 1998
Lodo suspendido	Lactato/ acetato	35	7.2-7.6	83	McCartney y Oleskiewicz, 1991
Lodo anaerobio	Acetato	37	7.2 7.6	550 867	O'Flaherty <i>et al.</i> , 1998
Lodo granular	Acetato	30	7.2-7.4 8.1-8.3	615 1125	Visser <i>et al.</i> , 1996
Lodo anaerobio	Etanol	37	7.2 7.6	788-880 878-990	O'Flaherty <i>et al.</i> , 1998
Lodo granular	Propionato	35	7.5	750	Celis-García <i>et al.</i> , 2004
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Lactato	37	7	250	Okabe <i>et al.</i> , 1995
Cultivo mixto	Acetato/ lactato	35	7	1000	Hilton y Oleskiewicz, 1988
Lodo suspendido	Lactato	35	8	2244	McCartney y Oleskiewicz, 1993

(1) las concentraciones de tolerancia varían porque son dependientes de las condiciones ambientales de cada caso.

Algunos tratamientos químicos que existen para la reducción de sulfuros son la dilución del influente, operación del reactor a pH alcalinos para reducir la concentración de  $H_2S$  y, la precipitación de sulfuros con metales pesados (Lens *et al.*, 1998b). Otros ejemplos son las técnicas de eliminación de sulfuro con procesos de oxidación tales como los tratamientos de aireación (no catalizadas y biocatalizadas), oxidación electroquímica, cloración, ozonización, o la oxidación con permanganato de potasio o peróxido de hidrógeno, entre otros métodos. En todos estos procesos, el azufre elemental, tiosulfato y sulfato son los productos finales.

Entre los tratamientos biológicos, destaca la oxidación parcial de sulfuro a  $S^0$ . El  $S^0$  es poco soluble en agua y puede ser eliminado de las aguas residuales para su confinación o posterior reuso (Hulshoff Pol *et al.*, 2001).

### 1.3. Estudio de la comunidad microbiana en reactores anaerobios

Cuando se alimenta un compuesto en concentraciones bajas y constantes en biorreactores, son pocos los problemas de control y estabilidad de la función respiratoria que se presentan. Pero cuando ocurren condiciones desfavorables, como cuando la concentración de alguna sustancia tóxica es alta en el agua residual, o hay una subida de la velocidad de carga, puede observarse una disminución en las eficiencias de consumo. Los problemas antes mencionados podrían estar relacionados con cambios en la estructura de la comunidad microbiana, entre otros factores, pero en ocasiones no se presentan las suficientes evidencias para sostener este supuesto.

El estudio de la estructura y dinámica de poblaciones microbianas en el tiempo podría ayudar a tener más evidencia experimental y, en consecuencia, un mejor entendimiento del proceso desde el punto de vista microbiológico. Dicho estudio se puede realizar por métodos de cultivo convencionales o por técnicas moleculares. Los primeros pueden presentar algunas limitaciones para dilucidar la comunidad microbiana, debido a que cultivar los microorganismos para identificarlos ha limitado la comprensión de la diversidad microbiana. Se tiene la idea de que más del 90% de los microorganismos en los ambientes naturales no pueden ser cultivados usando las técnicas tradicionales (Amann y Kühn, 1998). Los avances en las técnicas de biología molecular pueden proporcionar herramientas para seguir la estructura y dinámica de una comunidad en el tiempo, caracterizar y cuantificar microorganismos en muestras ambientales y en reactores biológicos. Algunos marcadores moleculares están siendo utilizados para la clasificación de microorganismos. En MSR en concreto, el gen *aps*, que codifica la enzima adenosín-5'-fosfosulfato reductasa (Friedrich, 2002), y el gen *dsrAB*, que codifica para las subunidades

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!



alfa y beta de la enzima sulfito reductasa desasimilativa (Wagner *et al.*, 1998). Estos genes son altamente conservados para algunas eubacterias y arqueas sulfatorreductoras, lo que está permitiendo describir y reclasificar nuevos géneros y familias (Ravenschlag *et al.*, 2000; Joulain *et al.*, 2001; Teske *et al.*, 2003). Estos genes se están empleando también en la caracterización de MSR dentro de comunidades microbianas (Dhillon *et al.*, 2003).

Para el estudio de comunidades en un consorcio es necesaria la selección de un método molecular apropiado. El uso de las técnicas de separación de ADN por electroforesis en gel con gradientes desnaturalizantes (DGGE) ofrece la posibilidad de analizar géneros bacterianos específicos, dentro de comunidades complejas. Esta técnica permite la separación de bandas de ADN de igual tamaño (peso molecular) pero con diferente información de secuencia. Por consiguiente, son altamente apropiados para analizar secuencias generadas de una mezcla compleja. Idealmente, el perfil electroforético (definido por el número de bandas) reflejará la abundancia relativa de miembros diferentes de una comunidad microbiana (Muyzer *et al.*, 1993; Felske *et al.*, 1997). Esta técnica ya se ha aplicado para determinar la filogenia de los miembros de una comunidad microbiana (Ferris *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 2000).

Otro método usado en el estudio de poblaciones es el análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), por ser rápido, simple, económico y no requerir ningún conocimiento preliminar del genoma (Hadrys *et al.*, 1992; Gibbs *et al.*, 1994). Genomas distintos dan patrones de amplificación diferentes, utilizando oligonucleótidos cortos, con secuencia arbitraria que dan como resultado un patrón de bandas, como si de una huella digital se tratara (Williams *et al.*, 1990). Los patrones de bandas de esta técnica no son siempre reproducibles, debido a que es un método sensible a pequeñas variaciones en la concentración y pureza del ADN blanco, en la concentración del  $Mg^{+2}$  y en la temperatura (Davin Regli *et al.*, 1995; Skroch y Nienhuis, 1995; Erlandson y Batt, 1997). No obstante, una vez controladas esas variables, permite diferenciar entre individuos dentro de las mismas especies e incluso mutantes derivadas de las mismas cepas originales, por lo que la técnica se ha usado ampliamente en la clasificación de especies y el análisis filogenético (Dweikat *et al.*, 1993), análisis de genomas (Grajal-Martin *et al.*, 1993) y análisis de ADN de comunidades microbianas de suelo y lodo (Xia *et al.*, 1995; Xie, 2004).

### 1.3.1. Diversidad microbiana en reactores

Se entiende por diversidad microbiana al grado de heterogeneidad del sistema; la variedad de poblaciones diferentes de microorganismos que pueden encontrarse juntos en

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

una comunidad biológica. En los reactores anaerobios utilizados en el tratamiento de aguas residuales existe una gran variedad de microorganismos que consumen la materia orgánica. Algunos estudios señalan una baja diversidad de especies en ecosistemas abiertos, como resultado de la presión selectiva de, por ejemplo, donadores de electrones particulares (Tirola *et al.*, 2002), aceptores de electrones (von Canstein *et al.*, 2002), o inhibidores (Nyman *et al.*, 1999). En contraste con estos trabajos, reactores sulfatorreductores en presencia de lactato o etanol estuvieron compuestos con una mezcla microbiana diversa (Kaksonen *et al.*, 2004b). En este sentido, parece que la diversidad microbiana provee un reservorio de cepas con nichos ecológicos complementarios que mejoran la estabilidad del desarrollo del biorreactor bajo condiciones ambientales cambiantes (von Canstein *et al.*, 2002), o bien que las interacciones entre los grupos microbianos aumentan la eficiencia y diversidad metabólica (Fernández *et al.*, 2000). Por tanto, la diversidad y flexibilidad de la comunidad microbiana podrían añadir robustez (Kaksonen *et al.*, 2004b) y estabilidad metabólica bajo condiciones de variaciones operacionales tales como descargas de sulfato, sulfuro y compuestos orgánicos.

La diversidad microbiana en reactores sulfatorreductores alimentados con glucosa, lactato, acetato y propionato, entre otros sustratos, se ha estudiado con cierta amplitud. En uno de ellos, en presencia de glucosa, se estimó que la composición microbiana estuvo constituida de manera importante por MSR (30% *Desulfovibrio* sp. y 6% entre *Desulfobacterium* sp., *Desulfobulbus* sp., *Desulfobacter* sp., *Desulfococcus* sp.) y microorganismos metanogénicos (13%), sin embargo, no fueron identificadas las demás poblaciones microbianas (Raskin *et al.*, 1996). Otro estudio señala que es posible mantener un consorcio sulfatorreductor diverso empleando lactato y etanol (Kaksonen *et al.*, 2004b). La comunidad microbiana con ambos sustratos estuvo compuesta por bacterias relacionadas con sulfatorreductoras conocidas (*Desulfobacca* sp., *Desulforhabdus* sp. y *Desulfovibrio* sp.) y bacterias relacionadas con otros grupos diferentes (*Chloroflexi*, *Chlorobi* y agrupadas con Spirochaetales, a  $\beta$ -,  $\delta$ - y  $\epsilon$ -Proteobacteria). Con etanol se encontraron secuencias agrupadas con  $\gamma$ -Proteobacteria, mientras que con lactato se encontraron secuencias relacionadas con *Nitrospira*. Sin embargo, el reactor con etanol mostró mejores eficiencias de consumo de sustrato (77-95%) que el de lactato (60-75%). En contraste, los estudios de la estructura microbiana realizados por Ito *et al.* (2002) con acetato y propionato marcado, no mostraron diferencias importantes entre ambos sustratos en la hibridación de sondas con BSR (*Desulfobacter* sp., *Desulfobulbus* sp., *Desulfovibrio* sp. y *Desulfonema* sp.).

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Por otro lado, algunos estudios en reactores metanogénicos alimentados con glucosa han mostrado la presencia significativa de BSR. En ellos se encontraron a *Desulfovibrio* sp. y *Desulfobacterium* sp. (Raskin *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 2000). Esta presencia fue atribuida a una función acetogénica y fermentativa (Raskin *et al.*, 1996). De hecho, los MSR se caracterizan por tener la capacidad metabólica de emplear otras rutas, además de la sulfatorreducción, y no es de sorprender que sean encontradas en reactores metanogénicos donde no hay sulfato suficiente para llevar a cabo la sulfatorreducción.

### 1.3.2. Dinámica de poblaciones microbianas en reactores

Además de caracterizar y cuantificar las poblaciones microbianas en un sistema biológico, la importancia de estudiar la dinámica de las poblaciones en el tiempo podría permitir entender mejor cómo son los procesos biológicos.

Una pregunta que nos surge primeramente cuando se estudia la dinámica de las poblaciones es cómo se relaciona la estabilidad fisiológica y microbiana de un lodo, es decir, si un ecosistema funcionalmente estable implica necesariamente una comunidad constante; o también al revés, si una comunidad variable implica variaciones en el patrón respiratorio. Trabajos relacionados con este tema, presentan diferentes escenarios. Uno de ellos es el de Fernández *et al.* (1999), en el cual estudiaron la estructura de la comunidad en un biorreactor metanogénico alimentado con glucosa durante un largo periodo en un aparente estado estacionario. En este trabajo concluyeron que una comunidad extremadamente dinámica puede mantener un ecosistema funcionalmente estable. Sin embargo, llama la atención que el dominio Archaea fue el menos variable y que la variación microbiana fue observada en el dominio Bacteria, entre diversos grupos taxonómicos que exhibieron un alto grado de similitud de secuencia (es decir, que podrían presentar un metabolismo similar). Lo anterior, además de presentar una comunidad diversa, pudo haber influido en mantener la respuesta respiratoria constante. No se indica la variación del proceso respiratorio y sólo se hace mención al intervalo de eliminación de DQO (89 y 99%) y pH, haciendo difícil aseverar el estado estacionario. Puede ser necesario el análisis de más variables de respuesta (sustrato, intermediarios y productos, por ejemplo) para definir el estado estacionario, permitiendo encontrar variaciones que ayuden a ser más exigentes en definir el estado estacionario. Por otro lado, Fernández *et al.* (2000) sugirieron que la estabilidad en la respuesta respiratoria podría estar relacionada con una comunidad flexible, reflejada en la capacidad de cambiar el flujo de electrones y carbono a través de los componentes de una manera eficiente.

Fernández *et al.* (2000) y Hashsham *et al.* (2000) estudiaron la estabilidad en la comunidad microbiana después de la perturbación de una descarga de glucosa en dos diferentes comunidades microbianas en estado estacionario. Un inóculo estuvo expuesto más tiempo en glucosa (200 d) que el otro (60 d). Los resultados indicaron que a pesar de presentar una respuesta respiratoria similar antes de la perturbación se desarrolló una comunidad microbiana distinta. Asimismo, se encontraron diferencias en la fisiología y microbiología después de la perturbación de glucosa. El inóculo que estuvo más tiempo expuesto a glucosa alcanzó la estabilidad funcional más rápido y la estructura de la población regreso a su estado original, de antes de la perturbación, cosa que no sucedió con el segundo inóculo. Aunque es posible dirigir y controlar un proceso respiratorio, la composición microbiana no se puede predecir del todo; estos estudios, no obstante, sugieren que la composición y magnitud de las poblaciones microbianas podrían tener alguna influencia en el tiempo de recuperación de la respuesta respiratoria a cambios drásticos en las condiciones ambientales.

En contraste con esos trabajos, en los resultados de Raskin *et al.* (1996) cuando se observa un posible estado estacionario respiratorio la comunidad metanogénica y sulfatorreductora se encontró también estable. Las diferencias encontradas en los trabajos mencionados anteriormente abren a nuevas preguntas que llevan a seguir con el estudio de este tema. Un mayor estudio sobre la relación entre el estado estacionario y la estructura microbiana podría ayudar a comprender mejor y controlar los procesos microbianos en reactores.

Por otro lado, se ha incrementado el interés por estudiar cómo son los cambios en las poblaciones microbianas y su relación con la respuesta respiratoria cuando se hacen modificaciones al medio de cultivo (como la adición de compuestos tóxicos, cambios en la velocidad de carga, entre otros) o por conocer si el tipo de nutrientes puede determinar el tipo de poblaciones presentes en un consorcio, o en dado caso, si los cambios ambientales sólo modifican el metabolismo de la población microbiana. Raskin *et al.* (1996) estudiaron la dinámica de poblaciones microbianas en reactores de biopelícula, antes y después de la adición de sulfato. El PSR inició inmediatamente después de la adición de sulfato (6 h). Se observaron cambios en la abundancia de las poblaciones; las BSR aumentaron notablemente de 15 a 40% mientras las metanogénicas disminuyeron de 25 a 8%. La respuesta respiratoria también cambió, el consumo de sulfato aumentó y la concentración de acetato y metano disminuyeron. En este caso, se observó una estrecha relación entre la composición microbiana y la fisiología cuando se modificaron las condiciones de cultivo. Martínez (2004) cuantificó, evaluó y comparó los cambios microbiológicos de un mismo

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

consorcio, que se presentaron al pasar de la desnitrificación a la metanogénesis durante el estado estacionario por la técnica de RAPD. Observó cambios en el patrón de bandas, una desaparición de bandas relacionadas con poblaciones desnitrificantes y un aumento en bandas relacionadas con poblaciones metanogénicas con el cambio del proceso.

Algunos índices ecológicos, como la riqueza de secuencias ( $S$ ), el índice de diversidad de Shannon-Weaver ( $H$ ), el índice de equidad ( $J$ ) y el del coeficiente de similitud ( $C$ ), son utilizados para la interpretación de los patrones de bandas obtenidos (Shannon y Weaver, 1963; Nei y Li, 1979). El valor de  $S$  representa el número de poblaciones,  $H$  indica la distribución y variación genética dentro de las poblaciones y entre ellas,  $J$  la distribución de la abundancia de las poblaciones y  $C$  la similitud entre dos poblaciones o comunidades. Cuando se estudia la dinámica de poblaciones, los índices permiten analizar de manera cuantitativa los patrones y comparar entre diferentes tratamientos. Xie (2004) investigó por RAPD el efecto de iones zinc sobre los microorganismos de un lodo activado, aplicando estos índices de diversidad. Observó cambios en los patrones de bandas con la exposición a zinc y el tiempo de exposición. Aparentemente algunos microorganismos desaparecieron y otros, tolerantes al zinc, sobrevivieron. Hubo amplias diferencias en los índices de diversidad ( $S$ ,  $H$  y  $J$ ) entre el experimento sometido a zinc al inicio y al final. Sin embargo, la velocidad de consumo de DQO fue similar al control al final de los ensayos, pero no en las velocidades de consumo de amonio y nitrito. El autor sugirió que la disminución en la diversidad poblacional pudo haber tenido un efecto negativo en algunos parámetros de evaluación de la respuesta respiratoria (amonio y nitrito) y que posiblemente el zinc tuvo un efecto tóxico en microorganismos oxidantes de amonio y nitrito. Asimismo, un estudio de la comunidad bacteriana en suelos con 3-clorobenzoato y 2,5-diclorobenzoato usando la técnica de separación de ADN en electroforesis en gel por gradiente de temperatura (TGGE) también empleando los índices, mostró que los tratamientos con estos compuestos reflejaron una disminución en  $S$ ,  $H$  y  $J$  en el tiempo, indicando una menor diversidad y abundancia desigual de las poblaciones (Ramírez-Saad *et al.*, 2003). Esos resultados sugieren que algunos compuestos podrían influir en la estructura de la comunidad y en consecuencia se podría modificar la respuesta respiratoria.

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

#### 1.4. REFERENCIAS

- Abdollahi, H., Wimpenny, J.W. (1990). Effects of oxygen on the growth of *Desulfovibrio desulfuricans*, *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1025-1030.
- Amann, R.I., Kühl, M. (1998). In situ methods for assessment of microorganisms and their activities. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**:352-358.
- Annachhatre, A.P., Suktrakoolvait, S. (2001). Biological sulfate reduction using molasses as a carbon source. *Water Environ. Res.* **73**:118-126.
- Arora, S., Mino, T., Matsuo, T. (1995). Mechanism and favorable operating conditions of organic substrate removal in microaerophilic up flow sludge bed reactor (MUSB). *Water Res.* **29**: 1895-1901.
- Beristain, C. (2007). Estudio de la sulfoxidación organo-litotrófica y litotrófica bajo condiciones desnitrificantes. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F.
- Brüser, T., Lens, P., Trüper, H. (2000). The biological sulfur cycle. In: Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution-Principles and Engineering. Lens, P., Hulshoff Pol, L., (Eds.). International Water Association. Londres, pp. 47-85.
- Castro, H., Williams, N., Ogram, A. (2000). Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *Mini Rev. FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 1-9.
- Celis-García, M.L.B. (2004). Eliminación de óxidos de azufre de efluentes. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, DF.
- Celis-García, M.L.B., Ramirez, F., Revah, S., Razo-Flores, E., Monroy, O. (2004). Sulphide and oxygen inhibition over the anaerobic digestion of organic matter: Influence of microbial immobilization type. *Environ. Technol* **25**:1265-1275.
- Choi, E., Rim, J.M. (1991). Competition and inhibition of sulfate reducers and methane producers in anaerobic treatment. *Water Sci. Technol.* **23**: 1259-1264.
- Clancy, P.B., Venkatamaran, N., Lynd, L.R. (1992). Biochemical inhibition of sulphate reduction in batch and continuous anaerobic digesters. *Water Sci. Technol.* **25**: 51-60.
- Colleran, E., Finnegan, S., O'Keffe, R.B. (1994). Anaerobic digestion of high sulfate-containing wastewater from industrial production of citric acid. *Water Sci. Technol.* **30**: 263-273.
- Cooling III, F.B., Maloney, C.L., Nagel, E., Tabinowski, J., Odom, J.M. (1996). Inhibition of sulfate respiration by 1,8-dihydroxyanthraquinone and other anthraquinone derivatives. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2999-3004.

- Cork, D.J., Jerger, D.E., Maka, A. (1986). A biocatalytic production of sulphur process waste streams. *Biotechnol. Bioeng. Symp. Ser.* **16**: 149-162.
- Cypionka, H. (1995). Solute transport and cell energetics, in Barton LL (ed), *Sulfate-Reducing Bacteria*. Biotechnology handbooks 8. Plenum Press, New York, NY, pp. 151-184.
- Cypionka, H. (2000). Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 827-848.
- Cypionka, H., Pfennig, N. (1986) Growth yields of *Desulfotomaculum orientis* with hydrogen in chemostat culture. *Arch. Microbiol.* **143**: 366-369.
- Dannenberg, S., Kroder, M., Diling, W., Cypionka, H. (1992). Oxidation of H<sub>2</sub>, organic compounds and inorganic sulfur compounds coupled to reduction of O<sub>2</sub> or nitrate by sulfate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* **158**: 93-99.
- Davin Regli, A., Abed, Y., Charrel, R.N., Bollet, C., de Micco, P. (1995). Variations in DNA concentrations significantly alter the reproducibility of RAPD fingerprint patterns. *Res. Microbiol.* **146**: 561-568.
- DeWeerd, K.A., Mandelco, L., Tenner, R.S., Woese, C.T., Suflita, J.M. (1990). *Desulfomonile tiedjei*, new genus new species, a novel anaerobic dehalogenating, sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* **154**:23-30.
- Dhillon, A., Teske, A., Dillon, J., Stahl, D., Sogin, M. (2003). Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymass Basin. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2765-2772.
- Dijk, J.A., Stams, A.J.M., Schraa, G., Ballerstedt, H., de Bont, J.A.M., Gerritse, J. (2003). Anaerobic oxidation of 2-chloroethanol under denitrifying conditions by *Pseudomonas stutzeri* strain JJ. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 68-74.
- Dilling, W., Cypionka, H. (1990). Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria, *FEMS Microbiol. Lett.*, **71**: 123-128.
- Dolfing, J., Harrison, B.K. (1992). Gibbs free energy of formation of halogenated aromatic compounds and their potential as electron acceptors in anaerobic environments. *Environ. Sci. Technol.* **26**: 2213-18.
- Dolfing, J., Janssen D.B. (1994). Estimation of Gibbs free energies of formation of chlorinated aliphatic compounds. *Biodegradation.* **5**: 21-28.
- Dweikat, I., Mackenzie, S., Levy, M., Ohm, H. (1993). Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species. *Theor. Appl. Genet.* **85**:497-505.



- El-Bayoumy, M.A., Bewtra, J.K., Ali, H.I., Biswas, N. (1999). Sulfide production by sulfate reducing bacteria with lactate as feed in an upflow anaerobic fixed film reactor. *Water, Air, and Soil Pollution*. **112**: 67-84.
- Ensley, B.D., Suflita, J.M. (1995). Metabolism of environmental contaminants by mixed and pure cultures of sulfate-reducing bacteria, in Barton LL (ed), *Sulfate-Reducing Bacteria*. Biotechnology handbooks 8. Plenum Press, New York, NY, pp. 293-332.
- EPA. U.S.A. Environmental Protection Agency.  
<http://www.epa.gov/safewater/dwh/c.ioc/sulfate.htm>
- Erlandson, K., Batt, C.A. (1997). Strain-specific differentiation of *Lactococci* in mixed starter culture populations using randomly amplified polymorphic DNA-derived probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2702-2707.
- Fdz-Polanco, F., Fdz-Polanco, M., Fernandez, N., Urueña, M.A., García, P.A., Villaverde, S. (2001). New process for simultaneous removal of nitrogen and sulphur under anaerobic conditions. *Water Res.* **35**:1111-1114.
- Felske, A., Rheims, H., Woltering, A., Stackebrandt, E., Akkermans, A.D.L. (1997). Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in glasslands soils. *Microbiol.* **143**: 2983-2989.
- Fernández, A., Huang, S., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., Criddle, C., Tiedje, J. (1999). How stable is stable? Function versus community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3697-3704.
- Fernández, A., Hashsham, S., Dollhopf, S., Raskin, L., Glagoleva, O., Dazzo, F., Hickey, R., Criddle, C., Tiedje, J. (2000). Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4058-4067.
- Ferris, M.J., Muyzer, G., Ward, D.M., (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 340-346.
- Friedrich, M. (2002). Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5'-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms. *J. Bacteriol.* **184**: 278-289.
- Gibbs, H.L. Prior, KA, Weatherhead, P.J. (1994). Genetic analysis of populations of threatened snake species using RAPD markers. *Molec. Ecol.* **3**: 329-337.
- Gommers, P.J., Bijleveld, W., Kuenen, J.G. (1988). Simultaneous sulfide and acetate oxidation in a denitrifying fluidized bed reactor. *Water Res.* **22**:1075-1083.



- González, G. (2007). Conversión de sulfato a azufre elemental en un reactor de lecho fluidificado inverso bajo condiciones de limitación de oxígeno disuelto. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F.
- Gottschalk, G. (1986). Bacterial Metabolism. Segunda edición. Springer-Verlag. New York. Pp. 42-43, 260-265.
- Grajal-Martin, M.J., Simon, C.J., Muehlbauer, F.J. (1993). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp.pisi. *Phytopath.* **83**:612-614.
- Gujer, W., Zehnder, A.J.B. (1983). Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* **15**: 127-167.
- Habets, L.H.A., de Vegt, A.L. (1991). Anaerobic treatment of bleached TMP and CTMP effluent in the biopaq UASB system. *Water Sci. Technol.* **24**:331-345.
- Hadrys, H., Balick, M., Schierwater, B. (1992). Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molec. Ecol.* **1**:55-63.
- Hamilton, W. (1998). Bioenergetics of sulphate-reducing bacteria in relation to their environment impact. *Biodegradation.* **9**: 201-212.
- Hao, O.J., Chen, J.M., Huang, L., Buglass, R.L. (1996). Sulfate-reducing bacteria. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **26**:155-187.
- Harada, H., Uemura, S., Momonoi, K. (1994). Interaction between sulfate-reducing bacteria and methane-producing bacteria in UASB reactors fed with low strength wastes containing different levels of sulfate. *Water Res.* **28**:355-367.
- Hashsham, S., Fernandez, A., Dollhopf, S., Dazzo, F., Hickey, R., Tiedje, J. Criddle, C. (2000). Parallel processing of substrate correlates with greater functional stability in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4050-4057.
- Hilton, M.G., Oleszkiewicz, J.A. (1988). Sulfide induced inhibition of anaerobic digestion. *J. Environ Eng.* **114**: 1377-1391.
- Hoeks, F.W.J.M.M., Ten Hoopen, H.J.G., Roels, J.A., Kuenen, J.G. (1984). Anaerobic treatment of acid water (methane production in a sulfate rich environment). *Progr. Ind. Microbiol.* **20**:113-119.
- Hulshoff Pol, L.W., Lens, P.N.L., Weijma, J. Stams, A.J.M. (2001). New developments in reactor and process technology for sulfate reduction. *Water Sci. Technol.* **44**:67-76.
- Ingvorsen, K., Jorgensen, B.B. (1984). Kinetics of sulfate uptake by freshwater and marine species of desulfovibrio. *Arch. Microbiol.* **139**: 61-66.

- Ingvorsen, K., Zehnder, A.J.B., Jorgensen, B.B. (1984). Kinetics of sulfate and acetate uptake by *Desulfobacter postgatei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 403-408.
- Ito, T., Nielsen, J., Okabe, S., Watanabe, Y., Nielsen, P. (2002). Phylogenetic Identification and substrate uptake patterns of sulfate-reducing bacteria inhabiting an oxic-anoxic sewer biofilm determined by combining microautoradiography and fluorescent in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 356-364.
- Jensen, A., Webb, C. (1995). Treatment of H<sub>2</sub>S-containing gases: A review of microbiological alternatives. *Enzyme Microbiol. Technol.* **17**:2-10.
- Joulian, C., Ramsing, N., Ingvorsen, K. (2001). Congruent phylogenies of most common small-subunit rRNA and dissimilatory sulfide reductase gene sequences retrieved from estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3314-3318.
- Kaksonen, AH, Riekkola-Vanhanen, M-L., Puhakka, J.A. (2003). Optimization of metal sulphide precipitation in fluidized-bed treatment of acidic wastewater. *Water Res.* **37**:255-266.
- Kaksonen, A. H., Franzmann, P.D., Puhakka, J.A., (2004a). Effects of hydraulic retention time and sulfide toxicity on ethanol and acetate oxidation in sulfate-reducing metal-precipitating fluidized bed reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **86**: 332-343.
- Kaksonen, A. H., Plumb, J. J., Franzmann, P.D., Puhakka, J.A. (2004b). Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized reactor treating acidic metal- and sulfate-containing wastewater. *FEMS Microbiol. Ecol.* **47**:279-289.
- Kelly, D. (1999). Thermodynamic aspects of energy conservation by chemolithotrophic sulfur bacteria in relation to the sulfur oxidation pathways. *Arch. Microbiol.* **171**:219-229.
- Kobayashi, K., Tachibana, S., Ishimoto, M. (1969). Intermediary formation of trithionate in sulfite reduction by a sulfate-reducing bacterium. *J. Biochem.* **65**: 155-157.
- Koster, I.W., Rinzema, A., de Vegt, A.L., Lettinga, G. (1986). Sulfide inhibition of the methanogenic activity of granular sludge at different pH levels. *Water Res.* **12**: 1561-1567.
- Kroiss, H., Plahl-Wabnegg, F., Svardal, K. (1985). Anaerobic treatment of viscose wastewater. *Water Sci. Technol.* **17**: 307-311.
- Lens, P., van den Bosch, M., Hulshoff Pol, L., Lettinga, G. (1998a). The use of staged sludge bed reactors for the treatment of sulfate rich wastewaters. *Water Res.* **32**: 1178-1192.

- Lens, P., Visser, A., Janssen, A.J.H., Hulshoff Pol, L.W. and Lettinga, G. (1998b). Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* **28**: 41-88.
- Liamleam W., Annachhatre, A.P. (2007). Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnol. Adv.* **25**: 452-463.
- Lide, D.R. (1993). CRC Handbook of Chemistry and Physics, 73<sup>rd</sup> ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Lupton, F.S., Zeikus, J.G. (1984). Physiological basis for sulfate- dependent hydrogen competition between sulfidogens and methanogens. *Curr. Microbiol.* **11**: 7-11.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (1999). Capítulo 13. Diversidad metabólica de los microorganismos. En: Brock Biología de los microorganismos. 8<sup>a</sup> edición. Prentice Hall, Iberia. pp. 473-531.
- Maillacheruvu, K.Y., Parkin, G.F. (1996). Kinetics of growth, substrate utilization and sulfide toxicity for propionate, acetate, and hydrogen utiliziers in anaerobic systems. *Water Environ. Res.* **68**:1099-1106.
- Maillacheruvu, K.Y., Parkin, G.F., Peng, C.Y., Kuo, W-C., Oonge, Z.I., Lebduschka, V. (1993). Sulfide toxicity in anaerobic systems fed sulfate and various organics. *Water Env. Res.* **65**: 100-109.
- Maree, J.P., Gerber, A., Hill, E. (1987). An integrated process for biological treatment of sulphate-containing industrial effluent. *JWPCF.* **59**: 1069-1074.
- Martínez, E. (2004). Estudio molecular de las poblaciones de un lodo anaerobio en condiciones desnitrificantes y metanogénicas. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F.
- McCartney, D.M., Oleskiewicz, J.A. (1991). Sulfide inhibition of anaerobic degradation of lactate and acetate. *Water Res.* **25**:203-209.
- McCartney, D.M., Oleskiewicz, J.A. (1993). Competition between methanogens and sulfate reducers: effect of COD:sulfate ratio and acclimation. *Water Environ. Res.* **65**:655-664.
- Méndez, R., Lema, JM, Soto, M. (1995). Treatment of seafood-processing wastewater in mesophilic and thermophilic anaerobic filters. *Water Environ. Res.* **67**: 33-45.
- Middlenton, A.G., Lawrence, A W. (1977). Kinetics of microbial sulfate reduction. *JWPCF.* **229**: 1659-1670.
- Möler-Zinkhan, D., Thauer, R.K. (1990). Anaerobic lactate oxidation to 3 CO<sub>2</sub> by *Archaeoglobus fulgidus* via the carbon monoxide dehydrogenase pathway:

- demonstration of the acetyl-CoA carbon-carbon cleavage reaction in cell extracts, *Arch. Microbiol.* **15**:215-218.
- Möler-Zinkhan, D., Börner, G., Thauer, R.K. (1989). Function of methanofuran, tetrahydromethanopterin, and coenzyme F<sub>420</sub> in *Archaeoglobus fulgidus*. *Arch. Microbiol.* **152**:362-368.
- Mulder A. (1984). The effects of high sulfate concentration on the methane fermentation of waste water. *Progr. Ind. Microbiol.* **20**: 133-143.
- Muyzer, G., de Waal, E. C., Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.
- Nei, M., Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleasas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:5269-5273.
- Nemati, M. (2001). Control of biogenic H<sub>2</sub>S production with nitrite and molybdate. *J Ind. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 350-355.
- Nielsen, P.H. (1987). Biofilm dynamics and kinetics during high rate sulfate reduction under anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 27-32.
- Nyman, J.A. (1999). Effect of crude oil and chemical additives on metabolic activity of mixed microbial population in fresh marsh soils. *Microb. Ecol.* **37**: 152-162.
- O'Flaherty, V., Mahony, T., O'Kennedy, R., Colleran, E. (1998). Effect of pH on growth kinetics and sulfide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulfate-reducing bacteria. *Process Biochem.* **33**: 555-569.
- Odom, J.M., Peck, H.D. (1981). Hydrogen cycling as a general mechanism for energy coupling in the sulfate reducing bacteria, *Desulfovibrio* sp., *FEMS Microbiol. Lett.* **12**: 47-50.
- Okabe, S., Nielsen, P., Characklis, W. (1992). Factors affecting microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in continuous culture: Limiting nutrients and sulfide concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 725-734.
- Okabe, S., Nielsen, P. H., Jones, W. L., Characklis, W.G. (1995). Sulfide product inhibition of *Desulfovibrio desulfuricans* in batch and continuous cultures. *Water Res.*, **29**: 571.
- Olmos, A., Olguín, P., Fajardo, C., Razo, E., Monroy, O. (2004). Physicochemical characterization of spent caustic from the OXIMER process and sour waters from mexican oil refineries. *Energy & Fuels.* **18**: 302-304.
- Omil, F., Méndez, R., Lema, J. M. (1995). Anaerobic treatment of saline wastewaters under high sulfide and ammonia content. *Biores. Technol.* **54**: 269-278.

- Omil, F., Lens, P., Hulshoff Pol, L., Lettinga, G. (1996). Effect of upward velocity and sulfide concentration on volatile fatty acid degradation in a sulphidogenic granular sludge reactor. *Process Biochem.* **31**: 699-710.
- Omil, F., Lens, P., Visser, A., Hulshoff Pol, L.W., Lettinga, G. (1998). Long term competition between sulfate reducing and methanogenic bacteria in UASB reactors treating volatile fatty acids. *Biotechnol. Bioeng.* **57**:676-685.
- Pankhania, I.P., Spormann, A.M., Hamilton, W. A., Thauer, R.K. (1988). Lactate conversion to acetate, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> in cell suspensions of *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg): indications for the involvement of an energy driven reaction. *Arch. Microbiol.* **150**: 26-31.
- Postgate, J.R. (1984). Genus *Desulfovibrio*. In Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol.1, Williams &Wilkins, Krieg, N.R. and Holt, J.G. (eds.), Baltimore, Md. pp. 666-672.
- Ramírez-Saad, H. C., Sessitsch, A., Akkermans, A. D.L. (2003). Molecular diversity in the bacterial community and the fluorescent pseudomonads group in natural and chlorobenzoate-stressed peat-forest soil. *Microbiol. Res.* **158**: 47-54.
- Raskin, L., Rittmann, B.E., Stahl, D.A. (1996). Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**:3847-3857.
- Reis, M.A.M., Almeida, J.S., Lemos, P.C., Carrondo, M.J.T. (1992). Effect of hydrogen sulfide on growth of sulfate reducing bacteria. *Biotechnol. Bioeng* **40**:593-600.
- Ravenschlag, K., Sahm, K., Knoblauch, C., Jorgensen, B., Amann, R. (2000). Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine arctic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3592-3602.
- Reyes-Avila, J., Razo-Flores, E., Gómez, J. (2004). Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Res.* **38**: 3313-3321.
- Rinzema, A., Lettinga, G. (1988). Anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. in Wise DL (ed), *Biotreatment systems*, Vol. III. CRC Press Inc, Boca Raton, FL, pp. 65-109.
- Rinzema, A., Paardekooper, A.H., De Vegt, A.L., Lettinga, G. (1986). Anaerobic treatment of edible oil refinery waste water in granular sludge UASB reactors. In: Proc. EWPCA Conf Anaerobic Treatment, a grown up technology. Amsterdam, The Netherlands, pp 205-217.
- Robertson, L., Kuenen, J. (1992). The colorless sulfur bacteria. In: The prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification,

- Applications. (Barlows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schilefer, H.K., eds.) Segunda edición. Springer Verlag, New York, Vol. 1, pp. 385-413.
- Robinson, J.A., Tiedje, J.M. (1984). Competition between sulfate-reducing and methanogenic bacteria for H<sub>2</sub> under resting and growing conditions. *Arch. Microbiol.* **137**: 26-32.
- Scheeren, P.J.H., Koch, R.O., Buisman, C.J.N., Barnes, L.J., Versteegh, J.H. (1991). A new biological treatment plant for heavy metal contaminated groundwater. *Trans. Instn. Metall.* (Sect C : Mineral Process Extr. Metal. **101**: C188-C197.
- Schmitz, R.A., Linder, D., Stetter, K.O., Thauer, R.K. (1991). N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methylenetetrahydromethanopterin reductase (coenzyme F<sub>420</sub>-dependent) and formylmethanofuran dehydrogenase from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Arch. Microbiol.* **156**:427-434.
- Schönheit, P., Kristjansson, J.K., Thauer, R.K. (1982). Kinetic mechanism for the ability of sulfate reducers to outcompete methanogens for acetate. *Arch. Microbiol.* **132**: 285-288.
- Shannon, C.E., Weaver, W., 1963. The mathematical theory of communication. Univ Illinois Press, Urbana.
- Shin, HS., Oh, SE., Bae, BU. (1996). Competition between SRB and MPB according to temperature change in the anaerobic treatment of tannery wastes containing high sulfate. *Environ. Technol.* **17**: 361-370.
- Skroch, P., Nienhuis, J. (1995). Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theor. Appl. Genet.* **91**: 1086-1091.
- Stams, A.J.M., Kremer, D.R., Nicolay, K., Weenk, G.H., Hansen, A.T. (1984). Pathway of propionate formation in *Desulfobulbus propionicus*. *Arch. Microbiol.* **139**: 167-173.
- Stucki, G., Hanselmann, K.W., Hurzeler, A. (1993). Biological sulfuric acid transformation: reactor design and process optimization. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 303-315.
- Sun, B., Cole, J.R., Sanford, R.A., Tiedje, J.M. (2000). Isolation and characterization of *Desulfovibrio dechloracetivorans* sp. nov., a marine dechlorinating bacterium growing by coupling the oxidation of acetate to the reductive dechlorination of 2-chlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2408-2413.
- Svardal, K., Gotzendorfer, K., Nowak, O., Kroiss, H. (1993). Treatment of citric acid wastewater for high quality effluent on the anaerobic-aerobic route. *Water Sci. Technol.* **28**: 117-186.

- Teske, A., Dhillon, A., Sogin, M. (2003). Genomic markers of ancient anaerobic microbial pathways: sulfate reduction, methanogenesis, and methane oxidation. *Biol. Bull.* **204**: 186-191.
- Thauer R., Kunow, J. (1995). Sulfate-reducing Archaea, in Barton LL (ed), *Sulfate-Reducing Bacteria*. Biotechnology handbooks 8. Plenum Press, New York, NY, pp. 33-48.
- Thauer, R. K., Jungermann, K., Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria, *Bacteriol. Rev.*, **41**: 100.
- Thauer, R.K., Stackebrandt, E., Hamilton, W.A. (2007). Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems. Barton, L., Hamilton, WA (eds). Cambridge University Press, New York, pp. 1-38.
- Tirola, M.A., Männistö, M.K., Puhakka, J.A. and Kulomaa, M.S. (2002). Isolation and characterization of *Novosphingobium* sp. strain MTI, a dominant polychlorophenol-degrading strain in a ground-water bioremediation system. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 173-180.
- Uberoi, V., Battacharya, S.K. (1995). Interactions among sulfate reducers, acetogens, and methanogenic in anaerobic propionate systems. *Water Environ. Res.* **67**: 330-339.
- van Dongen, W.M.A.M. (1995). Molecular Biology of redox-active metal proteins from *Desulfovibrio*, in Barton LL (ed), *Sulfate-Reducing Bacteria*. Biotechnology handbooks 8. Plenum Press, New York, NY, pp. 293-332.
- Visser, A. (1995). The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. PhD-thesis Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- Visser, A., Hulshoff Pol, L.W., Lettinga, G. (1996). Competition of methanogenic and sulfidogenic bacteria. *Water Sci. Technol.* **33**:99-110.
- von Canstein, H., Kelly, S., Li, Y., Wagner-Döbler, I. (2002). Species diversity improves the efficiency of mercury-reducing biofilms under changing environmental conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2829-2837.
- Voordouw, G. (1995). The genus *Desulfovibrio*: the centennial. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2813-2819.
- Voordouw, G. (2002). Carbon monoxide cycling by *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Journal of Bacteriology.* **184**: 5903-5911.
- Wagner, M., Roger, A., Flax, J., Brussesau, G., Stahl, D. (1998). Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports and early origin of sulfate respiration. *J. Bacteriol.* **180**: 2975-2982.



- Watanabe, K., Kodama, Y., Syutsubo, K., Harayama, S. (2000). Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from under-ground crude oil storage cavities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4803-4809.
- Widdel, F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate and sulfur reducing bacteria. in Zehnder AJB (ed), *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley & Sons, New York, NY, pp. 469-586.
- Widdel, F., Bak, F. (1992). Gram-negative mesophilic sulphate-reducing bacteria. In Balows A, Trüper HG, Dworkin, M. Harder, W., Schleifer, K-H (eds): *The Prokaryotes*, 2<sup>nd</sup> ed. Vol 4. Springer-Verlag, New York, pp 3352-3378.
- Widdel, F., Pfennig, N. (1984). Dissimilatory sulfate- or sulfur reducing bacteria, in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. Krieg, NR., Holt JG. (Eds.) Williams & Wilkins, Baltimore, MD. pp. 663-679.
- Wilhelm, E., Battino, R., Wilcock, R.J. (1977). Low-pressure solubility of gases in liquid water. *Chem. Rev.* **77**: 219-262.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research.* **18**: 6531-6535.
- Xia, X., Bollinger, J., Ogram, A. (1995). Molecular genetic analysis of the response of three soil microbial communities to the application of 2, 4-D. *Molec. Ecol.* **4**: 17-28.
- Xie, B. (2004). Analysis of the effect of zinc ions on activated sludge microbes by random amplified polymorphism DNA (RAPD). *Int. J. Environ. Pollut.* **21**: 533-546.
- Yoda, M., Kitagawa, M., Miyaji, Y. (1987). Long term competition between sulfate-reducing and methane-producing bacteria for acetate in anaerobic biofilm. *Water Res.* **21**:1547-1556.
- Zellner, G., Neudöfer, F., Diekmann, H. (1994). Degradation of lactate by an anaerobic mixed culture in a fluidized-bed reactor. *Water Res.* **28**: 1337-1340.



## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### 2.1. JUSTIFICACIÓN

Un método efectivo para la eliminación de azufre es la reducción biológica de sulfato a sulfuro, el cual puede ser eliminado por tratamietos químicos y biológicos. Al respecto, no se ha logrado un pleno control del proceso sulfatorreductor y aunque se conocen algunas de las posibles causas por las que el PSR es poco eficiente no están bien esclarecidas. Algunas de estas pueden estar relacionadas con la competencia del PSR con otros procesos microbianos (que incluye tanto aspectos termodinámicos como cinéticos) y con la acumulación de sulfuro, que puede resultar en una inhibición del PSR. Los cambios en la velocidad de carga de sulfato, así como la presencia de sulfuro, podrían inducir cambios en la comunidad microbiana y estar relacionados con la respuesta respiratoria, los cuales podrían ocasionar un PSR deficiente. En este sentido, los estudios realizados de la comunidad microbiana en el estado estacionario no son claros. Cambios en la comunidad microbiana han sido observados aun cuando el proceso continuo está aparentemente en el estado estacionario. Asimismo, son insuficientes los estudios efectuados sobre la relación de la estructura de la comunidad y la respuesta respiratoria en reactores sulfatorreductores. Trabajar bajo condiciones de cultivo bien definidas, estequiométricas, nuevas técnicas analíticas y métodos de análisis más precisos permitirán entender mejor este proceso y contribuir al establecimiento de las condiciones ambientales y factores que intervienen en un PSR y hacerlo más eficiente.

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

## **2.2. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Entender el proceso sulfatorreductor mediante la evaluación del comportamiento fisiológico y el estudio de la dinámica de un consorcio microbiano, a través de variables de respuesta.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Evaluar el efecto de diferentes velocidades de carga de sulfato y lactato a una relación C/S estequiométrica y constante sobre el proceso respiratorio sulfatorreductor en un reactor UASB.
2. Evaluar los posibles cambios de la comunidad microbiana a diferentes velocidades de carga de sulfato y lactato en un reactor UASB, así como elucidar las interacciones entre la respuesta fisiológica del consorcio con su estructura en términos de comunidades microbianas.
3. Evaluar a través de estudios cinéticos, el efecto de diferentes concentraciones iniciales de sulfuro sobre la eficiencia, rendimientos y la velocidad específica de consumo del proceso sulfatorreductor en cultivo en lote.

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describe el diseño experimental y los métodos analíticos para la evaluación del efecto de la velocidad de carga sobre el proceso sulfatorreductor en un reactor continuo y para la evaluación del efecto de diferentes concentraciones de sulfuro en cultivo en lote. Asimismo, se describen los métodos de biología molecular para evaluar la dinámica de la comunidad microbiana en el reactor continuo.

#### 3.1. Reactor continuo

Los experimentos se llevaron a cabo en un reactor UASB de 1.5 L con una temperatura de 32 °C y un tiempo de residencia hidráulica (TRH) de 1 día. El biogás se colectó en una columna de vidrio invertida llena de solución salina saturada (NaCl 300 g/L) acidificada (pH de 2) y con rojo de metilo como indicador de la dilución de CO<sub>2</sub>.

La fuente de inóculo provino de un reactor UASB de laboratorio, alimentado con una mezcla de compuestos orgánicos y sulfato (C/S de 0.65). Este lodo granular fue inoculado en el reactor UASB de 1.5 L obteniéndose una concentración final de 3.6 g de SSV/L.

El reactor continuo se alimentó con cinco velocidades de carga de sulfato (VCS, mg S-SO<sub>4</sub>/Ld): 290, 436, 654, 817 y 981. Se alimentó lactato (mg C-lactato/Ld): 217, 327, 490, 612 y 736, manteniendo una relación C/S estequiométrica de 0.75, como se indica en la Ecuación 3.1. La alimentación del carbono no incluye el consumo de sustrato para síntesis celular. Se alimentaron dos medios minerales definidos (fracción 1, F1; fracción 2, F2) (Tabla 3.1). F1 contuvo la fuente de sulfato (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) mientras que F2, la fuente de electrones (lactato de sodio). Se adicionó NH<sub>4</sub>Cl como fuente de nitrógeno (F1) para una relación C/N de 50. El pH de F1 y F2 fue ajustado a 7.0.



El estado estacionario respiratorio se estableció para al menos 12 veces el TRH y cuando el coeficiente de variación para las velocidades del proceso sulfato reductor (PSR, esto es, las velocidades de consumo de sulfato, producción de bicarbonato y sulfuro) fue menor al 11%. La media y desviación estándar fueron calculadas a partir de por lo menos siete medidas independientes obtenidas durante el estado estacionario.

Tabla 3.1. Concentraciones de los nutrientes del medio mineral

<b>Composición</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>
<b>F1</b>	
MgCl <sub>2</sub>	5
NaMoO <sub>4</sub>	0.5
FeCl <sub>3</sub>	3
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	5
<b>F2</b>	
CoCl <sub>2</sub>	0.5
CaCl <sub>2</sub>	5
CuSO <sub>4</sub>	1
NiCl <sub>2</sub>	0.8
ZnCl <sub>2</sub>	0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2000

### 3.2. Cultivo en lote

El inóculo para los ensayos en lote fue obtenido del reactor UASB antes descrito, el cual fue operado en estado estacionario a la VCS de 817 mg S-SO<sub>4</sub>/Ld y 612 mg C-lactato/Ld. Previo a cada ensayo, el lodo fue retirado del reactor UASB y lavado con solución salina (0.9% NaCl). El medio mineral usado fue cualitativamente y cuantitativamente el mismo para los ensayos en continuo.

Los ensayos cinéticos fueron realizados en botellas serológicas de 60 mL de capacidad con un volumen de trabajo de 55 mL. Cada botella fue una unidad experimental independiente, y después de analizar el contenido las botellas fueron eliminadas. Cuarenta y ocho mililitros de medio mineral fueron suplementados en cada botella con una concentración final de 262 mg C-lactato/L y 350 mg S-SO<sub>4</sub>/L (C/S estequiométrica de 0.75). Las botellas fueron inoculadas para una concentración final de 1 g de SSV/L. Diferentes concentraciones iniciales de sulfuro disuelto (0, 50, 75, 150 y 200 mg/L) fueron adicionadas a cada botella en forma de Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O. En todos los casos, el pH fue ajustado a 7. Cada botella fue sellada con un tapón de goma. Para desplazar el oxígeno se empleó una corriente de helio durante 3 min. Se usaron dos controles, uno con medio mineral, lodo sulfatorreductor y sulfato pero sin fuente de electrones (lactato). El segundo control tuvo medio mineral, lodo sulfatorreductor y lactato (sin sulfato). Las botellas fueron incubadas a 32 °C en un agitador rotatorio a 250 rpm. El tiempo experimental total fue de 8 días para todos los ensayos en lote.

### 3.3. Métodos analíticos

En todos los métodos de medida se obtuvieron coeficientes de variación menores al 8% y coeficientes de regresión mayores que 0.98 (Apéndice 7.1), lo que indicó una confiabilidad aceptable.

#### 3.3.1. Compuestos azufrados

##### 3.3.1.1. Cuantificación de sulfato

El ión sulfato se determinó en un analizador capilar de iones (Waters Capillary Ion Analyzer, 4000, Millipore, Bedford, MA) a una temperatura de 25 °C, a partir de una muestra diluida con agua desionizada y filtrada a través de una membrana de nylon con poro de 0.45 µm de diámetro. Se utilizó como electrolito de trabajo 4 mM de cromato de sodio y 0.5 mM del reactivo CIA Pack Anion (Waters) (Apéndice 7.2). Como capilar se empleó una columna de sílice fundida, de 60 cm de largo y 75 µm de diámetro interno, con una corriente de 18 µA y un voltaje de 20 kV. El modo de la inyección fue hidrostático, a 10 cm de altura durante 30 seg. La absorbancia se midió en la región ultravioleta, con una lámpara de mercurio, a 254 nm. El tiempo de corrida fue 5 minutos.

El método se basa en la migración electroforética de iones que, al aplicar un voltaje a través de un capilar, causa una migración diferencial de los componentes de la muestra cargada eléctricamente hacia el electrodo respectivo. Dependiendo de la polaridad, de la energía suministrada y la composición del electrolito, el analito separado pasa a través del detector.

##### 3.3.1.2. Cuantificación de sulfuro

El sulfuro disuelto se determinó por el método yodométrico (APHA, 1995) El método se basa en la capacidad del yodo como oxidante débil frente a un reductor fuerte como el ión sulfuro en medio ácido. La cuantificación se llevó a cabo de forma indirecta por una valoración en retroceso del yodo residual, empleando una solución estándar de tiosulfato de sodio (Apéndice 7.3). El método es confiable para determinar sulfuro a concentraciones de hasta 1 mg/L.

#### 3.3.2. Compuestos carbonados

##### 3.3.2.1. Cuantificación de carbono total e inorgánico

El carbono total e inorgánico se determinó con un analizador de carbono orgánico total (Shimadzu TM, TOC-5000A, Kyoto, Japan). El equipo analiza por separado el contenido de carbono total y carbono inorgánico. Por diferencia se puede obtener el carbono orgánico presente. La muestra se filtra a través de una membrana de nylon con

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

poro de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro y es introducida por el inyector de muestra al equipo. La muestra para determinar carbono total es acarreada por un flujo de aire extrapuro (150 mL/min.) a una cámara de combustión a 680 °C, donde es oxidada a  $\text{CO}_2$ . El  $\text{CO}_2$  es transportado a un vaso de reacción de carbono inorgánico y finalmente es analizado mediante un detector infrarrojo. El principio de la medición se basa en la propiedad de absorción de radiación infrarroja que presentan moléculas de gas como el  $\text{CO}_2$ . El  $\text{CO}_2$  detectado genera un pico cuya área es calculada por un procesador de datos, con base en una curva patrón elaborada previamente (Apéndice 7.4). El área es proporcional a la concentración de carbono en la muestra. Para cuantificar el carbono orgánico, la muestra es acidificada antes de su inyección al equipo y posteriormente sometida a burbujeo con el gas acarreador, de tal forma que los compuestos de carbono inorgánico, como el carbonato y bicarbonato, se eliminan en forma de  $\text{CO}_2$ . Por último, la muestra es analizada, de forma similar al proceso anteriormente mencionado. El equipo proporciona los valores de carbono inorgánico ( $\text{HCO}_3^-$ ).

#### 3.3.2.2. Cuantificación de ácidos grasos volátiles

Los ácidos grasos volátiles (AGV) acetato y propionato se determinaron por cromatografía de gases, usando un cromatógrafo HP modelo 5890 equipado con una columna AT1000 (0.53 mm x 1.2 mm x 10 m) y detector de ionización de flama (FID). El flujo del gas acarreador (nitrógeno) fue de 4 mL/min. La temperatura de la columna, inyector y detector fue 120, 130 y 150 °C respectivamente. Las muestras para la determinación de los AGV fueron filtradas y almacenadas a -4 °C para el análisis. Posteriormente, del filtrado se tomó una alícuota de 950  $\mu\text{L}$  y se acidificó con 50  $\mu\text{L}$  de HCl al 50 % (Apéndice 7.5). El tiempo de corrida fue de aproximadamente 5 minutos. El C-lactato fue determinado como carbono orgánico total menos C-acetato y C-propionato.

#### 3.3.2.3. Cuantificación de metano y dióxido de carbono

Las determinaciones de biogás fueron hechas para el reactor continuo y en lote (Apéndice 7.6). La medición de metano y dióxido de carbono se realizó con un cromatógrafo de gases (marca Varian, modelo 3350, Walnut Creek, CA, USA), y un detector de conductividad térmica. El gas acarreador fue helio (18 mL/min), y las condiciones de operación fueron: columna, 40 °C; inyector 100 °C; detector, 100 °C; filamentos 135 °C, con un volumen de inyección de 0.1 mL de muestra. La columna, 1.20 m de largo y 1/8 de pulgada de diámetro, está empacada con Poropak Q de malla 80/100. La concentración de  $\text{HCO}_3^-$  para la evaluación del comportamiento respiratorio representó el C- $\text{HCO}_3^-$  (85 a 90%) y C- $\text{CO}_2$  (10 a 15%).

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

### 3.3.3. Determinación de sólidos suspendidos volátiles

Los sólidos suspendidos volátiles (SSV), sólidos suspendidos totales (SST) y fijos (SSF) en el lodo se determinaron por el método gravimétrico descrito en APHA (1995). Para determinar los sólidos suspendidos totales se adicionó una muestra conocida de lodo en los crisoles a peso constante y se dejó secar en la estufa a 105 °C de 12-24 horas, el contenido de sólidos suspendidos fijos se midió después de 30 minutos a 550 °C. El contenido de SSV de la muestra se calculó de la diferencia de los sólidos suspendidos totales y fijos (Apéndice 7.7).

### 3.4. Cálculos

#### 3.4.1. Evaluación del comportamiento respiratorio

El análisis estadístico se realizó con el software NCSS 2001 (Hintze, 2001). El proceso respiratorio fue evaluado por medio de las eficiencias de consumo de sustrato ( $E$ , mg de sustrato consumido/mg de sustrato alimentado), rendimientos de producto ( $Y$ , mg de producto/mg de sustrato consumido) y, en cultivo en lote, por las velocidades específicas de consumo ( $q$ , mg de sustrato consumido/mg de SSV·d).

#### 3.4.2. Balance de carbono

El balance de masa para el carbono empleado para el cultivo continuo, en términos de las velocidades de carga y descarga (mg/Ld), se describe mediante la siguiente ecuación:

$$Q_e \text{C-lactato} = Q_s \text{C-lactato} + Q_s \text{C-acetato} + Q_s \text{C-propionato} + Q_s \text{C-HCO}_3 + Q_s \text{C-CH}_4 + Q_s \text{C-biomasa}$$

Donde:  $Q_e$  = velocidad de carga en la entrada;  $Q_s$  = velocidad de carga a la salida

Y para el cultivo en lote (mg/L):

$$[\text{C-lactato}]_{\text{inicial}} = [\text{C-lactato}]_{\text{final}} + [\text{C-acetato}]_{\text{final}} + [\text{C-propionato}]_{\text{final}} + [\text{C-HCO}_3]_{\text{final}} + [\text{C-CH}_4]_{\text{final}} + [\text{C-biomasa}]_{\text{final}}$$

#### 3.4.3. Balance de azufre

El balance de azufre empleado para el cultivo continuo se describe mediante la siguiente ecuación:

$$Q_e \text{S-SO}_4 = Q_s \text{S-SO}_4 + Q_s \text{S-S} =$$

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Y para cultivo en lote:

$$[S-SO_4]_{inicial} = [S-SO_4]_{final} + [S-S^-]_{final}$$

### 3.5. Métodos moleculares

#### 3.5.1. Extracción de ADN del lodo

Las muestras de lodo fueron retiradas del reactor UASB en el estado estacionario respiratorio. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C. El ADN total fue extraído de 500 mg de lodo mediante el paquete UltraClean™ Soil DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA), siguiendo una modificación del protocolo sugerido por el proveedor (Apéndice 7.8). Para comprobar la cantidad y calidad del ADN extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % (Apéndice 7.9), durante 30 min y 90 V. Se tiñó el gel con bromuro de etidio y se visualizó con luz ultravioleta.

#### 3.5.2. RAPD: amplificación de ADN y visualización

El ADN total de la comunidad fue analizado por la técnica de RAPD. La reacción de PCR se describe en el Apéndice 7.10. La amplificación fue realizada en un termociclador Mastercycler personal programado para 30 ciclos de 45 seg a 94 °C (desnaturalización), 45 seg a la temperatura de hibridación (Tabla 3.2), y 90 seg a 72° C (elongación).

Tabla 3.2. Lista de iniciadores para RAPD

Código	Secuencia (5' a 3')	% GC	Temperatura hibridación (°C)	de Temperatura de referencia (°C)
F01	ACG CGC CCT	77	45	36 <sup>b</sup>
A09	GGG TAA CGC C	70	45	38 <sup>c</sup>
LE	CTG CTG GGA C	70	40	36 <sup>d</sup>
LO	CCC GTC AGC A	70	40	40 <sup>e</sup>
6.1	ACC CGG TCA C	70	45	36 <sup>f</sup>
6.2	TTC GAG CCA G	60	45	36 <sup>f</sup>
6.3	GTG AGG CGT C	70	45	36 <sup>f</sup>
6.4	GGG GGT CTT T	60	No amplificación <sup>a</sup>	36 <sup>f</sup>
6.5	CCG CAT CTA C	60	No amplificación <sup>a</sup>	36 <sup>f</sup>
6.6	GAT GAC CGC C	70	45	36 <sup>f</sup>
6.7	GAA CGG ACT C	60	45	36 <sup>f</sup>
6.8	GTC CCG ACG A	70	No amplificación <sup>a</sup>	36 <sup>f</sup>
6.9	TGG ACC GGT G	70	45	36 <sup>f</sup>
6.10	CTC ACC GTC C	70	40	36 <sup>f</sup>

<sup>a</sup> No amplificación a 40 y 45 °C; <sup>b</sup> Quednau *et al.*, 1998; <sup>c</sup> This *et al.*, 1997; <sup>d</sup> Ruimy *et al.*, 2001; <sup>e</sup> Lopez-Jiménez *et al.*, 2001; <sup>f</sup> Xie, 2004.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!



La temperatura de hibridación fue elevada con el propósito de obtener datos reproducibles. Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Apéndice 7.9) y visualizados en un transiluminador de UV Gel Doc 2000 (Bio-Rad, Segrate, Italy) con el software Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Las reacciones y geles fueron hechos por duplicado de manera independiente (Apéndice 7.11).

### 3.5.3. Amplificación de ADN y separación por DGGE

La región V6-V8 de genes bacterianos del ARNr 16S fue amplificada usando iniciadores universales bacterianos 968-f con una grapa (5'-GAACGCGAAGAACCTTACC-3') y 1401-r (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3') (Nübel *et al.*, 1996). La región V2-V3 de los genes de arqueas del 16S rRNA fueron amplificados usando los iniciadores A109(T)-f (5'-ACTGCTCAGTAACACGT-3') y 515-r con grapa (ATCGTATTACCGCGGCTGCTGCTGGCAC) (Lane, 1991; Muyzer *et al.*, 1993; Grosskopf *et al.*, 1998). La grapa consistió en una secuencia de 40 pb compuesta exclusivamente de guanosinas y citidinas (5'-CGCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGG-3'). La amplificación del PCR se describe en el Apéndice 7.12. La reacción de amplificación fue de 5 min. a 95 °C (pre-desnaturalización), 35 ciclos de 30 s a 95 °C (desnaturalización), 40 s a 54 y 53 °C (hibridación) para la amplificación de bacteria y arquea, respectivamente, 1 min. a 72° C (elongación) y 7 min. a 72 °C (post-elongación) usando un termociclador CG1-96 (Corbett Research, Sydney, Australia). El tamaño de los productos amplificados fue verificado por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los productos de amplificación fueron separados por DGGE en un DCode universal mutation detection system (Bio-RAD Laboratories, Hercules, USA) siguiendo el procedimiento descrito por Cervantes *et al.* (2003), aunque se utilizaron geles de poliacrilamida al 6% p/v y un gradiente desnaturizante de 30 a 55% y de 40 a 55% para bacteria y arquea, respectivamente. Los geles de DGGE fueron teñidos con nitrato de plata, de acuerdo con Sanguinetti *et al.* (1994) y visualizados usando un fotodocumentador Epichemi<sup>3</sup> Darkroom (UVP Bioluminescence Systems, Upland, CA) y el software Labworks Image Acquisition and Analysis 4.0.

### 3.5.4. Secuenciación y análisis filogenético

Las bandas del gel de DGGE fueron cortadas y reamplificadas usando los mismos iniciadores. Los productos de PCR fueron purificados (Wizard<sup>®</sup> SV gel and PCR clean-up system, Promega, Madison, WI, USA), visualizados por electroforesis en gel de agarosa y secuenciados usando ABI Prism Big-Dye Terminator 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing en un secuenciador ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Warrington,

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

UK). Las secuencias de ADN fueron analizadas usando los programas Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) y BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). La afiliación filogenética de las secuencias parciales fue estimada usando el programa Basic Local Alignment Search Tool BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (McGinnis y Madden, 2004). La presencia de quimeras fue revisada por medio del programa Ribosomal Database Project Chimera Check (<http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi?su=SSU>) (Cole *et al.*, 2003). Los árboles filogenéticos de las secuencias del gen para el ARNr 16S de las bandas del gel de DGGE (posiciones de *Escherichia coli* 110 a 482 y 969 a 1367) fueron construidos usando el método de neighbor-joining (Saitoi y Nei, 1987) por medio del software MEGA4 (<http://www.megasoftware.net>) (Tamura *et al.*, 2007). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en el Genbank con los números de acceso EU287856-EU287864, EU287866-EU287867, EU443144, EU443146 y EU443148.

### 3.5.5. Análisis de datos

En el análisis de los patrones de bandas fue considerado la presencia de bandas cuantificables y reproducibles. En el caso de los perfiles de bandas de los geles obtenidos por DGGE cada banda de un carril fue considerada como una población diferente (o secuencia diferente para RAPD), mientras que las bandas con migración similar dentro de los diferentes carriles fueron consideradas como una misma población. Además, se emplearon algunos índices de diversidad ecológica adaptados para analizar los patrones de bandas obtenidos mediante las técnicas moleculares. Uno de ellos, y el más simple, es el índice  $S$ , que representa la riqueza de bandas (o poblaciones) en cada velocidad de carga.  $S$  es el número total de bandas en cada carril. Los índices de Shannon-Weaver ( $H$ ) y equidad ( $J$ ) fueron estimados mediante la abundancia relativa de bandas (Shannon y Weaver, 1963), para este propósito las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ 1.37v (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para calcular la superficie de la banda y la intensidad medida en píxeles de dicha banda, los cuales fueron usados como una medida relativa de la abundancia de la banda.

El índice de diversidad  $H$  determina el nivel de polimorfismo en la frecuencia de bandas amplificadas (en RAPD) o la distribución y variación de la diversidad genética dentro de las especies y entre ellas (en DGGE).

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Los valores de  $H$  para cada carril se calcularon como sigue:

$$H = -\sum P_i \ln(P_i),$$

$P_i$  es la proporción (o frecuencia) de una banda amplificada.

donde:

$$P_i = n_i/N$$

$n_i$  es la abundancia relativa de una banda

$N$  es la suma de la abundancia relativa de cada banda

La equidad de la comunidad  $J$  indica la distribución de la abundancia de las diferentes bandas o poblaciones, si está igual o desigualmente distribuida. El intervalo de los valores de  $J$  es de 0 a 1. Valores cercanos a 1 indican que no hay poblaciones dominantes.

La  $J$  se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$J = H/\ln S,$$

Para determinar el coeficiente de similitud ( $C$ ), se generó un matriz de distancia a partir del patrón de bandas obtenido de los geles usando la técnica de RAPD siguiendo la formula de Nei y Li (1979). El valor de  $C$  puede reflejar la diferencia en la secuencia de ADN entre las muestras de lodo de la comunidad microbiana. La matriz binaria fue construida con [0,1] en el que 1 fue codificado como la presencia de una banda amplificada y 0 como la ausencia de ésta. El coeficiente de similitud fue calculado como:

$$C_{(i,j)} = 2N_{(i,j)} / [N_{(i)} + N_{(j)}],$$

Donde:

$C_{(i,j)}$  es el coeficiente de similitud de la secuencia de ADN entre la muestra  $i$  y  $j$ ,

$N_{(i,j)}$  es el número de bandas de RAPD en común entre la muestra  $i$  y  $j$ ,

$N_{(i)}$  es el número de bandas amplificadas de la muestra  $i$

$N_{(j)}$  es el número de bandas amplificadas de la muestra  $j$

En el Apéndice 7.13 se ejemplifica el cálculo de los índices mencionados.

### 3.6. Referencias

- APHA. (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (19th edn). American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC.
- Cervantes FJ, Duong-Dac T, Ivanova AE, Roest K, Akkermans ADL, Lettinga G and Field JA. (2003). Selective enrichment of *Geobacter surfurreducens* from anaerobic granular sludge with quinones as terminal electron acceptors. *Biotechnol. Lett.* **25**: 39-45.
- Cole JR, Chai B, Marsh TL, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, Chandra S, McGarrell DM, Schmidt TM, Garrity GM and Tiedje JM. (2003). The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* **31**:442-443.
- Grosskopf, R., Janssen, P.H., Liesack, W. (1998). Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl Environ Microbiol.* **64**: 960-969.
- Hintze, J.L. (2001). Number Cruncher Statistical Systems 2001. Jerry L. Hintze, Kaysville, Utah.
- Lane, D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In; Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (eds) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, pp 115-175.
- Lopez-Jiménez, G., Ramirez, F., Loera, O., LeBorgne, S., Monroy, O., Fernandez, L.L. (2001). Development of molecular probe by random amplified polymorphic DNA (RAPD) of sulfate reducing bacteria isolated from mexican gas pipelines. In 8<sup>th</sup> International Petroleum Environmental Conference, Houston, Texas.
- McGinnis, S., Madden, T.L. (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **32**:W20-W25.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* **59**: 695-700.
- Nei, M., Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleasas. *Proc Natl Acad Sci USA.* **76**:5269-5273.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16 rRNAs in

- Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol.* **178**: 5636-5643.
- Quednau, M., Ahrne, S., Petersson, A. C., Molin, G. (1998). Identification of clinically important species of *Enterococcus* within 1 day with randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Curr Microbiol.* **36**: 332–336.
- Ruimy, R., Genauzeau, E., Barnabe, C., Beaulieu, A., Tibayrenc, M., Andremont, A. (2001). Genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from ventilated patients with nosocomial pneumonia, cancer patients with bacteremia, and environmental water. *Infect Imm.* **69**: 584-588.
- Saitoi, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- Sanguinetti, C.J.E., Dias, N.E., Simpson, A.J. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques.* **17**: 914-921.
- Shannon, C.E., Weaver, W. (1963). The mathematical theory of communication. Univ Illinois Press, Urbana.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007). MEGA 4, Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1595-1599.
- This, P., Cuisset, C., Boursiquot, J.M. (1997). Developed of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships. *Am J Enol Vitic.* **48**: 492-501.
- Xie, B. (2004). Analysis of the effect of zinc ions on activated sludge microbes by random amplified polymorphism DNA (RAPD). *Int J Environ Pollut.* **21**: 533-546.

## **CAPÍTULO 4. Efecto de la velocidad de carga sobre la eficiencia de consumo del COT en un proceso sulfatorreductor: efecto del sulfuro en cultivo en lote**

En este capítulo se hace una discusión a detalle de los resultados obtenidos del proceso respiratorio sulfatorreductor en reactor continuo y lote, a manera de artículo de investigación. Este capítulo se envió para su publicación y se encuentra aceptado por la revista **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. Previamente se expone un resumen del mismo.

**Resumen del artículo:** Effect of loading rate on TOC consumption efficiency in a sulfate reducing process: Sulfide effect in batch culture. Citlali García-Saucedo, Francisco J. Fernández, Germán Buitrón, Flor M. Cuervo-López and Jorge Gómez.

En el presente trabajo se estudió en un reactor de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB, por sus siglas en inglés) el proceso de sulfatorreducción, mediante la evaluación del efecto de la velocidad de carga sobre las eficiencias de consumo y, en cultivo en lote, el efecto del sulfuro sobre el proceso respiratorio. El trabajo se analizó mediante variables de respuesta fisiológica, como eficiencias de consumo de sustrato, rendimientos de producto y velocidades específicas de consumo de sustrato. Se analizó la comunidad microbiana en el reactor UASB mediante la técnica de DGGE. Para el cultivo continuo se utilizó un reactor UASB que fue alimentado con diferentes velocidades de carga de sulfato (290, 436, 654, 817 y 981 mg S-SO<sub>4</sub>/Ld) y de lactato, en una relación C/S estequiométrica de 0.75. El cultivo en lote se realizó en botellas serológicas en las que se evaluaron diferentes concentraciones de sulfuro (0, 50, 75, 150 y 200 mg S-sulfuro/L) sobre el proceso sulfato reductor (PSR). Se usaron dos controles, uno con sulfato (sin lactato) y el otro con lactato (sin sulfato). En los resultados en continuo se observó que cuando se aumentó la velocidad de carga de sulfato las eficiencias de consumo de carbono orgánico total y de sulfato disminuyeron de  $93 \pm 3$  a  $66\% \pm 2$  y de  $60 \pm 5$  a  $45\% \pm 4$ , respectivamente, mientras las eficiencias de consumo de lactato fueron cercanas al 100%. El acetato y el propionato se acumularon por fermentación y PSR. Los rendimientos de sulfuro disuelto fueron constantes, mientras los rendimientos de bicarbonato disminuyeron de 0.79 a 0.54. El metano no fue detectado a ninguna velocidad de carga de sulfato y la máxima concentración de sulfuro fue de  $385 \pm 45$  mg S-sulfuro/L (52 mg S-sulfuro/g SSV). El análisis molecular mostró la presencia de microorganismos relacionados con la sulfatorreducción de lactato y acetato, con bacterias fermentativas de lactato y

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

metanogénicas. En los ensayos en lote con solo lactato se produjeron acetato y propionato por fermentación. Cuando estuvieron presentes lactato y sulfato (sin sulfuro) fueron observados simultáneamente dos procesos metabólicos; la sulfatorreducción y la fermentación. Por el contrario, cuando se adicionó sulfuro solamente se observó el PSR. A concentraciones mayores que 150 mg S-sulfuro/L disminuyeron las eficiencias, rendimientos y velocidades específicas de consumo. Se empleó la relación mg S-sulfuro/g SSV con el propósito de evaluar el efecto inhibitorio del sulfuro. Ninguna inhibición del PSR se observó de 0 a 75 mg S-sulfuro/g SSV, mientras que a 150 y 200 mg S-sulfuro/g SSV las velocidades específicas de consumo disminuyeron 27 y 93%, respectivamente, indicando un efecto inhibitorio del sulfuro a esos niveles sobre el PSR en cultivo en lote. Por otro lado, en el reactor UASB la máxima relación mg S-sulfuro/g SSV medida fue cercana a 52 mg S-sulfuro/g SSV y ninguna inhibición del PSR se detectó en cultivo en lote a esa relación. Basados en lo anterior, la disminución en las eficiencias de consumo y la acumulación de acetato y propionato en el reactor UASB no estuvo relacionada con la inhibición de sulfuro pero sí con las velocidades específicas de consumo de acetato y propionato las cuales fueron once veces mas bajas que las de lactato.

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

## **Effect of loading rate on TOC consumption efficiency in a sulfate reducing process: Sulfide effect in batch culture**

**Citlali García-Saucedo, Francisco J. Fernández<sup>1</sup>, Germán Buitrón<sup>2</sup>, Flor M. Cuervo-López<sup>1</sup> and Jorge Gómez<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>*Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Vicentina, C.P 09340, México, DF., México*

<sup>2</sup>*Coordinación de Bioprocesos Ambientales, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar, 04510, México, D. F. México*

\*Correspondence to: Jorge Gómez, Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, División CBS, Av. San Rafael Atlixco 186, Vicentina, C.P 09340. México, D.F., México. Tel.: 52 (55) 58 04 64 08; fax: 52 (55) 58 04 64 07.

E-mail: [dani@xanum.uam.mx](mailto:dani@xanum.uam.mx)

### **ABSTRACT**

**BACKGROUND:** The sulfate reducing process (SRP) was analyzed in order to identify some factors which diminish the effectiveness of the SRP during wastewater treatment. The effect of different sulfate loading rates (SLR, 290 to 981 mg SO<sub>4</sub>-S L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) and lactate at a stoichiometric C/S ratio of 0.75 on SRP was studied in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. The effect of sulfide concentration (0 to 200 mg sulfide-S L<sup>-1</sup>) on SRP in batch culture was evaluated.

**RESULTS:** When the SLR increased the total organic carbon (TOC) and sulfate consumption efficiencies decreased from 93 ± 3 to 66% ± 2 and 60 ± 5 to 45% ± 4, respectively. Acetate and propionate were accumulated. Microbial analysis showed the presence of microorganisms related with the SRP, fermentation and methanogenesis. In batch culture, when lactate and sulfate were present SRP and fermentation were observed. When sulfide was added only SRP was observed. At concentrations higher than 150 mg sulfide-S L<sup>-1</sup> the efficiencies, yields and specific consumption rates ( $q$ ) decreased.

**CONCLUSION:** Based on the sulfide-S/volatile suspended solid ratio, it was found that the decrease in efficiency and accumulation of acetate and propionate in the UASB reactor was not related to sulfide inhibition but to the  $q$  of acetate and propionate which were up to eleven times lower than lactate.

**Keywords:** acetate; fermentation; lactate; propionate; sulfate reduction; sulfide

pdfMachine

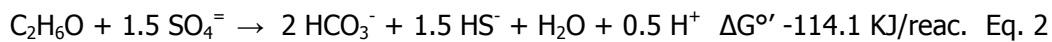
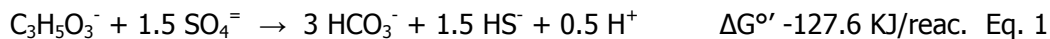
**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

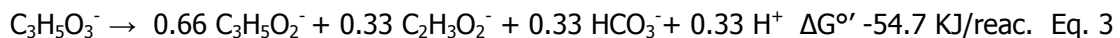


## Introduction

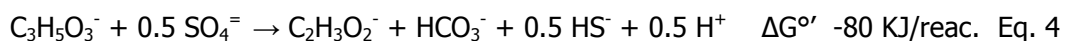
Biological sulfate reduction is a dissimilative anoxic respiratory process where sulfate is reduced to sulfide. However, some factors can influence the efficiency process. During the sulfate reduction methane can also be produced and intermediates such as acetate and propionate may accumulate affecting the sulfate removal efficiency.<sup>1,2</sup> Likewise, sulfide accumulation can result in an inhibiting factor. Accumulation of sulfide and intermediates might be associated to the increase in loading rates but kinetic aspects such as the substrate consumption rate should also be considered. Nevertheless, it is not yet well understood which are the main factors affecting the efficiency of the sulfate reducing process (SRP). On the other hand, the application of the SRP has increased for the treatment of chemical, mining and galvanic industrial wastewaters.<sup>3</sup> The sulfate-rich wastewater must be treated by SRP, but in some cases the concentration of electron donors is deficient. Compounds such as ethanol, hydrogen, lactate, volatile fatty acids, alcohols, organic acids, alkanes and phenylsubstituted substances can be used as electron donors for the SRP.<sup>4</sup> In spite of some of these substrates can result in consumption efficiencies close to 80%, most of them are converted to acetate which remained accumulated along the process.<sup>2</sup> Lactate is a good growth substrate for many of sulfate reducing bacteria.<sup>5-7</sup> Likewise, lactate consumption (eq. 1) produces more alkalinity than ethanol oxidation (eq. 2) improving the pH control.



It has been observed that *Desulfobulbus propionicus* is able to ferment lactate in the absence of sulfate.<sup>8</sup> McCartney and Oleszkiewicz<sup>9</sup> observed that fermentation of lactate (eq. 3) occurred in a microbial consortium when sulfate was present at the lactate-C/sulfate-S ratio of 4.7, but sulfate was not consumed and acetate and propionate were accumulated.



McCartney and Oleszkiewicz<sup>6</sup> observed that at lactate-C/sulfate-S ratios  $\leq 2.06$  sulfate was consumed and acetate was accumulated as a result of the SRP (eq. 4), but no information about efficiencies and consumption rates of substrates was mentioned.



Accumulation of acetate and propionate in SRP could be related to kinetic properties. In this sense, the constant affinity ( $K_s$ ) value could determine the specific rate of the process. Yoda *et al.*<sup>10</sup> and Visser<sup>1</sup> reported values of  $K_s$  for acetate ranged from 10 to 55 mg L<sup>-1</sup> while Maillacheruvu and Parkin<sup>11</sup> obtained a value of 62 mg L<sup>-1</sup> for propionate. Evidence suggests that accumulation of acetate and propionate could also be associated with the microorganisms present and their doubling time.<sup>12</sup>

Evidence exists indicating that sulfide accumulation results in an inhibition of the SRP causing a significant decrease in the efficiency and consumption rate.<sup>13,14</sup> The possible effects of sulfide on the microbial metabolism have been reported elsewhere.<sup>12,15</sup> Sulfide IC<sub>50</sub> values in SRP vary from 100 to 1100 mg L<sup>-1</sup>. The large variation could be related to the environmental culture conditions such as pH, sludge acclimation and microbial concentration.<sup>9,16,17</sup> However, information about the sulfide effect on the fermentative process during the SRP is still scarce.

Decreasing SRP efficiency may also be associated with the presence of methanogenic processes, as some substrates can be used for both processes.<sup>10,18</sup> Considering that free Gibbs energy and kinetic data for SRP and methanogenesis with acetate are similar for both processes, the C/S ratio value could determinate the orientation of the respiratory process. Thus, in order to obtain an effective SRP the C/S ratio must be close to the stoichiometric value.<sup>14,19</sup>

This work was carried out under well defined culture conditions in order to identify factors which diminish SRP effectiveness. Therefore, the objectives were to evaluate: (1) the effect of different sulfate and lactate loading rates at stoichiometric C/S ratio on total organic carbon (TOC) and SRP efficiencies in continuous culture; and (2) the influence of different initial sulfide concentrations on the consumption efficiencies and specific consumption rates of SRP in batch culture.

## **Materials and methods**

### **UASB reactor: continuous assays**

An UASB reactor of 1.5 L inoculated with 3.6 g volatile suspended solids (VSS) L<sup>-1</sup> of sulfate reducing sludge previously obtained in a bench scale UASB reactor, was fed with five sulfate loading rates (SLR, mg SO<sub>4</sub>-S L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>): 290, 436, 654, 817 and 981. These loading rates were selected considering the usual SLR range of many industrial effluents. Lactate was added as electron donor for the SRP to obtain a C/S ratio of 0.75 (eq. 1). The reactor was operated at 32 °C, one day of hydraulic retention time (HRT) and fed with two separate mineral media, fraction 1 (F1) and fraction 2 (F2). F1 contained sulfate source

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) while F2 the electron source (sodium lactate). Definition and formulation of mineral media was as follows (mg L<sup>-1</sup>): medium F1: MgCl<sub>2</sub>, (5); NaMoO<sub>4</sub>, (0.5); FeCl<sub>3</sub>, (3); Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, (5). Medium F2: CoCl<sub>2</sub>, (0.5); CaCl<sub>2</sub>, (5); CuSO<sub>4</sub>, (1); NiCl<sub>2</sub>, (0.8); ZnCl<sub>2</sub>, (0.5); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (2000). NH<sub>4</sub>Cl was used as nitrogen source (F1) and adjusted to a C/N ratio value of 50. The pH of each fraction was adjusted to 7.0. Helium was bubbled through flasks containing F1 and F2 for 10 min in order to displace oxygen.

## **Batch assays**

### *Inoculum source*

The inoculum for batch assays was obtained from the UASB reactor operating at a SLR of 817 mg SO<sub>4</sub>-S L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> in steady state sulfate reducing process. The sludge was withdrawn from UASB reactor and washed with saline solution (0.9% (wt vol) NaCl) prior to each batch assay.

### *Culture conditions*

The kinetic assays were carried out in serological bottles of 60-mL capacity with a working volume of 55 mL. Each bottle was considered as an independent experimental unit and eliminated at designated times after sampling. Forty-eight milliliters of mineral medium (F1 plus F2) were supplemented in each bottle with a concentration of 262 mg lactate-C L<sup>-1</sup> and 350 mg SO<sub>4</sub>-S L<sup>-1</sup> in order to maintain the stoichiometric C/S ratio. The bottles were inoculated obtaining a concentration of 1 g of VSS L<sup>-1</sup>. Different initial concentrations (0, 50, 75, 150 and 200 mg L<sup>-1</sup>) of dissolved sulfide (Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O) were added to each bottle. In all cases, pH was adjusted to 7 and each bottle was sealed with a rubber plug. Molecular oxygen was displaced by bubbling with helium for 3 min. Two controls were used, one contained mineral medium, sulfate and sulfate reducing sludge (without lactate). The second contained mineral medium, lactate and sulfate reducing sludge (without sulfate). The bottles were incubated at 32 °C on a shaker at 250 rpm for 8 days.

The respiratory process was evaluated by substrate consumption efficiencies ( $E$ , mg of substrate consumed mg of substrate fed<sup>-1</sup>), yield products ( $Y$ , mg of product mg of substrate consumed<sup>-1</sup>) and in batch cultures also by considering specific consumption rates ( $q$ , mg of substrate consumed mg of VSS<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>).

## **Analytical methods**

Inorganic carbon measured as HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and organic carbon were analyzed in a total organic carbon analyzer as described by Cuervo-López *et al.*<sup>20</sup> From the theoretical point of

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

view, at the experimental conditions the main species are the  $\text{HCO}_3^-$  (around 85%) and  $\text{CO}_2$  (15%). The concentration of acetate and propionate was determined by gas chromatography (HP model 5890, NJ USA) using a flame ionization detector and capillary column (10 m and 0.53 mm internal diameter, Alltech AT 1000, Deerfield IL, USA). The column, injector and detector temperatures were 120, 130 and 150 °C, respectively. The carrier gas was nitrogen ( $4.5 \text{ mL min}^{-1}$ ).  $\text{CO}_2$  and  $\text{CH}_4$  were quantified by gas chromatography as described by Peña-Calva *et al.*<sup>21</sup> The sulfate concentration was measured by capillary electrophoresis as described by Reyes-Avila *et al.*<sup>22</sup> Lactate-C was determined as TOC minus acetate-C and propionate-C. Dissolved sulfide and total and volatile suspended solids (TSS, VSS) contents were determined using standard methods.<sup>23</sup>

### Microbial analysis

In order to determine the diversity of the bacterial and archaeal communities of the UASB reactor, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and sequencing methods were used. A sludge sample was withdrawn from the UASB reactor under respiratory steady state at the SLR of  $817 \text{ mg SO}_4\text{-S L}^{-1}\text{d}^{-1}$  and stored at  $-20 \text{ °C}$  until analysis. Total DNA was extracted from 500 mg of sludge by means of an UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Solana Beach, CA, USA). The V6-V8 regions of the bacterial 16S rRNA genes were amplified using universal bacterial primers 968GC-f and 1401-r.<sup>24</sup> The V2-V3 regions of archaeal 16S rRNA genes were amplified using the primers A109 (T) f and 515GC-r.<sup>25-27</sup> The polymerase chain reaction (PCR) amplifications were performed as describe by de Bok *et al.*<sup>28</sup> but with annealing temperature at 54 and 53 °C for bacterial and archaeal amplification, respectively (CG1-96 thermocycler, Corbett Research, Sydney, Australia). The amplification product was separated by DGGE on a DCode universal mutation detection system (Bio-RAD Laboratories, Hercules, USA) as indicated by Cervantes *et al.*<sup>29</sup>, but on 6% (w/v) polyacrilamide gels using denaturant gradients of 30 to 55% and 40 to 55% for bacterial and archaeal amplicons respectively. The 100% denaturant contained 7 M urea and 40% (vol/vol) formamide. The DGGE gels were stained with silver nitrate<sup>30</sup> and visualized using Epichemi Darkroom (UVP Bioluming Systems, Upland, CA) and Labworks Image Acquisition and Analysis software 4.0. The bands were excised and reamplified using the same primers. The PCR products were purified (Wizard® SV gel and PCR clean-up system, Promega, Madison, WI, USA), visualized by agarose gel electrophoresis and sequenced using ABI Prism Big-Dye Terminator 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing on an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Warrington, UK). The DNA sequences were analyzed using Chromas

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

(<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) and BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) programs. Phylogenetic affiliations of the partial sequences were estimated using the program Basic Local Alignment Search Tool BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).<sup>31</sup> The presence of chimerical sequences was checked with the Ribosomal Database Project Chimera Check program (<http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi?su=SSU>).<sup>32</sup> Phylogenetic trees of the 16S rRNA gene sequences of DGGE fragments (*Escherichia coli* positions 110 to 482 and 969 to 1367) were constructed using neighbor-joining method<sup>33</sup> as implemented in MEGA4 software (<http://www.megasoftware.net>).<sup>34</sup> The robustness of the phylogeny was tested by bootstrap analysis with 1000 iterations. Sequences obtained in this study were deposited in Genbank under accession numbers EU287856-EU287864, EU287866-EU287867, EU443146 and EU443148.

### *Statistical analysis*

Standard curves were conducted at least in triplicates for each analytical method. In all cases, the coefficient of variation for slope, coefficient of determination ( $R^2$ ) and intercept were less than 8%. In continuous culture, standard deviations were calculated from at least seven independent measurements obtained during the steady state (at least 12 HRT times were considered in each SLR). Values obtained in batch assays represent mean values and the  $\pm$  range from two independent samples. In all cases, statistic analyses were conducted with the Number Cruncher Statistical System (NCSS) 2001 software.<sup>35</sup>

## **Results and discussion**

### **UASB continuous reactor**

Steady-state SRP was reached at each SLR when the variation coefficient for sulfate consumption, sulfide and  $\text{HCO}_3^-$  production rates was less than 11%. Under these culture conditions the pH value was maintained at  $7.5 \pm 0.1$ . At the stoichiometric lactate- $\text{C}/\text{SO}_4\text{-S}$  ratio of 0.75, the mass balance indicated that 90% of  $\text{SO}_4\text{-S}$  fed was quantified in the effluent as sulfate-S plus dissolved sulfide-S (Figure 1a). From 290 to 654  $\text{mg SO}_4\text{-S L}^{-1}\text{d}^{-1}$  the VSS concentration increased from 3.6 to 4.9  $\text{g L}^{-1}$ , the sulfate consumption efficiency ( $E_{\text{SO}_4}$ ) was  $60\% \pm 5$ , but at higher SLR decreased to  $45\% \pm 4$  (Table 1). According to carbon mass balance, lactate consumption efficiency ( $E_{\text{LAC}}$ ) was maintained at levels higher than  $91\% \pm 4$ . Nevertheless, a gradual decrease in the TOC consumption efficiency ( $E_{\text{TOC}}$ ) from  $93\% \pm 3$  to  $66\% \pm 2$  was observed and the production loading rate

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

of acetate and propionate progressively was increasing (Figure 1b). This result indicated the existence of two processes: SRP and lactate fermentation (eq. 3 and 4). In the range from 654 to 981 mg  $\text{SO}_4\text{-S L}^{-1}\text{d}^{-1}$  the sulfide production was constant ( $377 \pm 7$  mg sulfide- $\text{S L}^{-1}$ ), the VSS concentration increased from 4.9 to 7.3 g  $\text{L}^{-1}$  and the mg sulfide- $\text{S/ g VSS}$  ratio was close to 52. Celis-García *et al.*<sup>36</sup> using COD/ $\text{SO}_4$  stoichiometric ratio of 0.67 reported  $E_{\text{TOC}}$  values close to 90% but methanogenic activity was also detected. In contrast, in our work the methanogenesis was low, as only represented 7% of the TOC consumed. Throughout experimentation the sludge residence time (SRT) was  $253 \pm 57$  d which is considered as common value in UASB reactors.<sup>1</sup> Likewise, the food microorganism (F/M) ratio ranged from 0.043 to 0.079 kg TOC kgVSS<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> suggesting that the system was not limited by the biomass concentration.

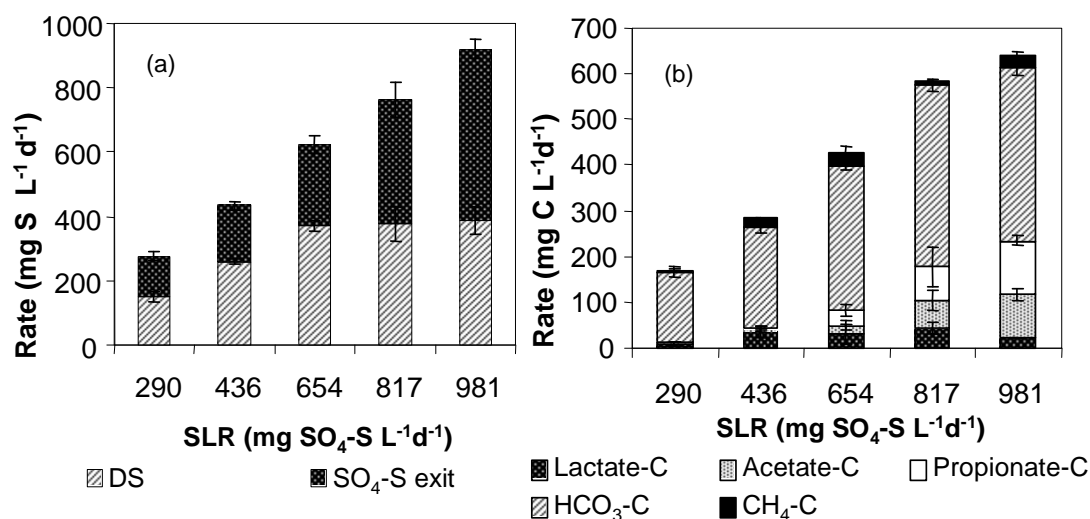


Figure 1. Mass balance in steady-state at different SLR in the UASB reactor. (a) Sulfate and dissolved sulfide (DS) balance; (b) Lactate-C, acetate-C, propionate-C,  $\text{HCO}_3\text{-C}$  and  $\text{CH}_4\text{-C}$  balance. As biomass-C values were lower than 7% of lactate fed they were not included.

Yield values for different products at each SLR are shown in Table 1. It can be seen that the dissolved sulfide yield ( $Y_{\text{DS}}$ ) values were always higher than  $0.87 \pm 0.07$  irrespective of the SLR, while the biomass yields ( $Y_x$ ) remained between 0.03 and 0.05. Similarly, methane yield ( $Y_{\text{CH}_4}$ ) values were also very low ( $0.07 \pm 0.02$ ). Lactate was mineralized at an average value of bicarbonate yield ( $Y_{\text{HCO}_3}$ ) of  $0.75 \pm 0.03$  during the first three SLR. At higher SLR, the  $Y_{\text{HCO}_3}$  values decreased while acetate yield ( $Y_A$ ) and propionate yield ( $Y_P$ ) increased significantly ( $\alpha, 0.05$ ). Therefore, at these loading rates the sulfate reduction (eq. 4) and fermentation (eq. 3) were the main processes. These results

indicated that the effectiveness of the SRP was negatively affected by fermentation. However, the diminishing SRP efficiency might also be due to a possible inhibitor effect of the sulfide. Batch cultures with different initial sulfide concentrations were carried out to investigate whether sulfide inhibited the SRP.

Table 1. Substrate consumption efficiency ( $E$ ) and yields in product formation ( $Y$ ) of sulfate reduction process in UASB reactor.

SLR	$E$ (%) <sup>1</sup>					$Y$ <sup>2</sup>	
	mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> $E_{TOC}$	$E_{LAC}$	$E_{SO4}$	$Y_{HCO3}$	$Y_A$	$Y_P$	$Y_{DS}$
290	93 ± 3	96 ± 2	59 ± 5	0.79±0.06	0.02±0.01	0.01±0.008	0.89±0.10
436	87 ± 4	91 ± 4	59 ± 5	0.75±0.04	0.03±0.02	0.01±0.007	1.04±0.01
654	82 ± 2	93 ± 4	60 ± 5	0.73±0.04	0.04±0.02	0.07±0.020	0.93±0.09
817	71 ± 1	93 ± 2	52 ± 3	0.69±0.03	0.10±0.04	0.13±0.070	0.87±0.07
981	66 ± 2	95 ± 1	45 ± 4	0.54±0.03	0.14±0.01	0.17±0.010	0.88±0.06

<sup>1</sup> $E$ , mg of substrate consumed mg of substrate fed<sup>-1</sup>; <sup>2</sup> $Y$ , mg of product mg of substrate consumed<sup>-1</sup>;  $Y_A$ , mg of acetate mg of lactate consumed<sup>-1</sup>;  $Y_P$ , mg of propionate mg of lactate consumed<sup>-1</sup>;  $Y_{DS}$ , mg of dissolved sulfide mg of sulfate consumed<sup>-1</sup>

#### Microbial analysis

Phylogenetic trees were constructed based on 16S rRNA gene sequences from bacterial, archaeal and reference sequences (Figure 2). Microbial analysis of the sludge showed the presence of strains related to *Desulfobacca acetoxidans* (95% similarity to the closest related sequence based on 16S rRNA) which is acetate consumer and other related to *Desulfovibrio* sp (98%) which produces acetate from lactate. In accordance with Postgate<sup>37</sup> and Oude Elferink *et al.*<sup>38</sup> the related strains found in the present work could be involved in the SRP. Also detected were a fermentative strain bacterium related to *Clostridium propionicum* (96%),<sup>39</sup> two strains hydrogenotrophic methanogenic related to *Methanobacterium beijingense* (93-99%) and six strains acetoclastic methanogenic related to *Methanosaeta* sp (99%) and member from Methanosarcinaceae family (99%).<sup>40, 41</sup> In spite of the presence of these methanogenic strains, methane formation was negligible in all cases. These results might be related to the C/S ratio used which was close to stoichiometric value of the SRP. Similar results were also observed by Raskin *et al.*<sup>41</sup> in a SRP.



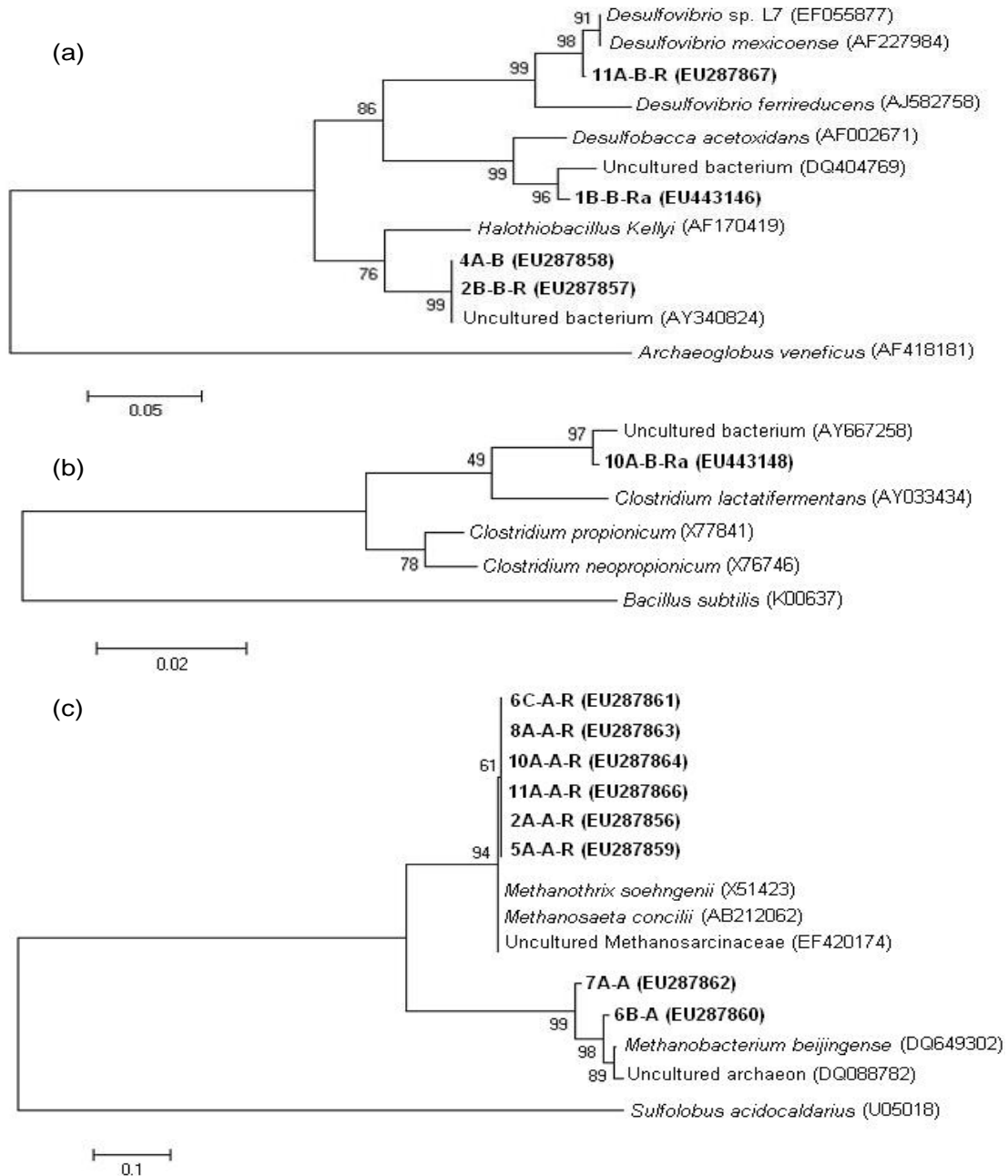


Figure 2. Phylogenetic tree of the microorganisms identified in the UASB reactor. It was generated by the neighbor-joining method based on the 16S rRNA gene sequences of DGGE fragments and reference sequences from databases. a: Relationship among the proteobacterial sequences. b: Relationship among members of the *Clostridia* class. c: Relationship among the archaeal sequences. The numbers in the nodes indicate bootstrap support. *Archaeoglobus veneficus* (AF418181), *Bacillus subtilis* (K00637) and *Sulfolobus acidocaldarius* (U05018) were used for rooting the tree. The scale bar indicates 5, 2 and 10% sequence difference.



## Batch assays

### Control assays

In the control assay with only sulfate (without lactate), sulfide production was negligible and this quantity was used to correct the sulfide generation in the rest of the assays. The control assay with only lactate (without sulfate) showed that close to 20% of the initial lactate (262 mg lactate-C L<sup>-1</sup>) was mineralized to HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> while the 24 and 56% was fermented to acetate and propionate, respectively (Figure 3a). Under these culture conditions the specific consumption rate for lactate was of 0.17 mg C mg VSS<sup>-1</sup>-d<sup>-1</sup>. As the microbial analysis of the sludge used as inoculum showed the presence of a strain related to *Clostridium propionicum*, the lactate fermentation might be associated to this strain. In fact, these results were similar to that reported by Janssen<sup>39</sup> with *C. propionicum* and Widdel and Pfennig<sup>8</sup> with *Desulfobulbus propionicus*.

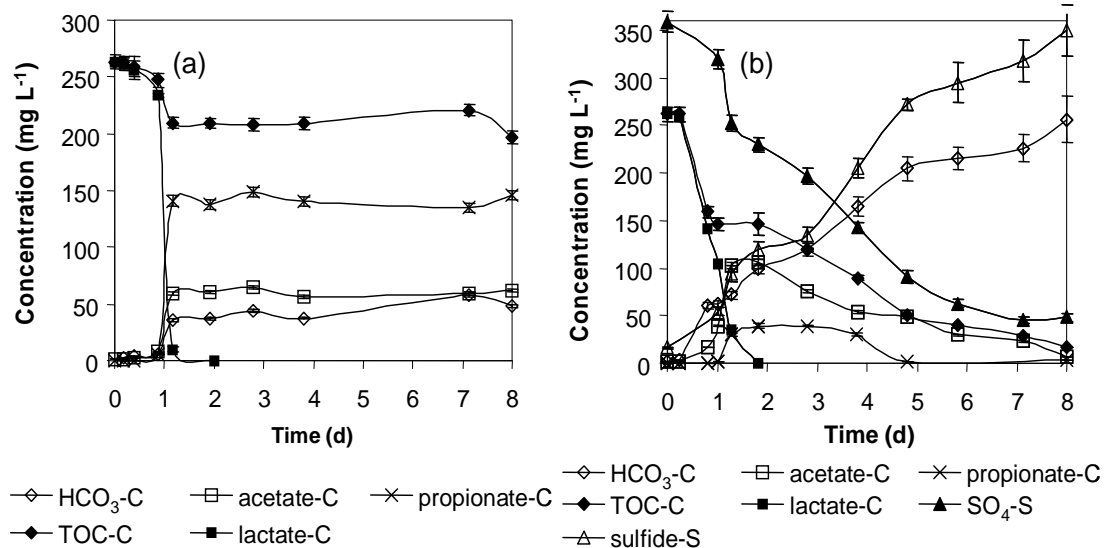


Figure 3. (a) Profiles of lactate-C consumption without sulfate addition; (b) Profiles of lactate-C and sulfate-S consumption in batch culture.

### Effect of initial sulfide concentration on SRP

The pH value in all batch cultures was  $7.3 \pm 0.1$ . In Table 2 is shown the mass balance for carbon and sulfur compounds. The mass balance indicated that lactate was oxidized to acetate, propionate and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. At zero sulfide concentration the respiratory pattern showed two stages (Figure 3b). During the first stage (two days) lactate was converted to propionate (39 mg propionate-C L<sup>-1</sup>, 16% of the total carbon), acetate (106 mg acetate-C L<sup>-1</sup>, 43%) and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (99 mg HCO<sub>3</sub>-C L<sup>-1</sup>, 41%), while 118 mg sulfide-S L<sup>-1</sup>

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

was produced corresponding to 34% of total sulfate consumption. The results indicated the existence of two processes operating simultaneously using lactate for fermentation (27%) according to equation 3 as well as for sulfate reduction (68%) according to equation 4. In the second stage, during the subsequent 6 days, acetate and propionate produced were mineralized to  $\text{HCO}_3^-$  and the remaining sulfate was converted into sulfide as a result of SRP (eq. 5 and 6).

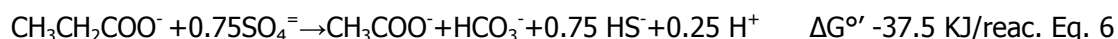


Table 2. Sulfur and carbon mass balance in batch cultures. Final-S and -C are reported at eight days of culture.

Sulfide	Initial-S		Final-S (mg L <sup>-1</sup> )		
	mg L <sup>-1</sup>	Sulfate-S	Sulfate-S	DS-S <sup>†</sup>	
0	359 ± 10.8	48.4 ± 3.9	327.7 ± 15.7		
50	350 ± 12.3	64.3 ± 4.5	341.7 ± 10.6		
75	351 ± 11.3	24.4 ± 1.7	399.3 ± 19.9		
150	344 ± 14.6	98.7 ± 8.2	397.2 ± 26		
200	353 ± 12	322.6 ± 24.4	223.1 ± 11		
	Initial-C		Final-C (mg L <sup>-1</sup> )		
	Lactate-C	Lactate-C	Acetate-C	Propionate-C	HCO <sub>3</sub> -C
0	262 ± 8.1	3.8 ± 0.2	7 ± 0.4	3.3 ± 0.1	256.3 ± 19
50	259 ± 6.5	6.3 ± 0.4	13.2 ± 0.9	12.9 ± 0.6	240.5 ± 15
75	248 ± 7.7	7.3 ± 0.5	1 ± 0.07	1.9 ± 0.07	246.7 ± 16
150	248 ± 5.6	4.4 ± 0.2	61.5 ± 3.8	1.7 ± 0.1	197.1 ± 10
200	270 ± 9.4	236.3 ± 14.6	7.3 ± 0.5	0.8 ± 0.03	22.2 ± 1.5

<sup>†</sup>DS-S: Dissolved sulfide, values determined considering initial sulfide concentrations

At eight days of culture the  $E_{\text{SO}_4}$  was 86%, while  $E_{\text{TOC}}$  was 95% (Table 3). These results strongly suggest differences in consumption rate among lactate, propionate and acetate. The differences might be related to the  $K_s$  values.<sup>1,10,11</sup> However, microbiological aspects such as strain types might also be involved.<sup>8, 37-39</sup>

Fermentation from lactate to propionate and acetate at C/S ratio of 4.7 has been detected, whereas at C/S ratios  $\leq 2.06$ , acetate accumulation was observed.<sup>6, 9</sup> In contrast, in our work acetate and propionate were produced by fermentation simultaneously with SRP, in spite of using a low C/S stoichiometric (0.75) ratio in continuous and batch cultures. Nevertheless, the thermodynamic data predict that the SRP with lactate is more favorable than the fermentation of lactate as is pointed out in equations 3 and 4. However, the experimental results showed that both processes occurred simultaneously. Therefore, it is also necessary to take into consideration the kinetic aspects of SRP and fermentation.

Table 3. Substrate consumption efficiencies ( $E$ ) and yields in product formation ( $Y$ ) at different initial sulfide concentrations in batch cultures.

Sulfide mg L <sup>-1</sup>	$E$ (%) <sup>1</sup>				$Y$ <sup>2</sup>		
	$E_{TOC}$	$E_{LAC}$	$E_{SO4}$	$Y_{HCO3}$	$Y_A$	$Y_P$	$Y_{DS}$
0	95 ± 3.8	98 ± 1.3	86 ± 3.3	0.99 ± 0.03	0.03 ± 0.001	0.01 ± 0.003	1.03±0.03
50	87 ± 3.9	97 ± 2.1	82 ± 3.2	0.97 ± 0.03	0.05±0.001	0.05 ± 0.002	1.0±0.03
75	96 ± 4.1	97 ±2.1	93 ± 2.3	1.02 ±0.02	0.004±0.001	0.007±0.001	0.98±0.03
150	73 ± 2.2	98 ± 1	71 ± 2.5	0.81 ± 0.02	0.25±0.005	0.007±0.001	0.97±0.02
200	9 ± 0.39	12 ± 0.4	8 ± 0.3	0.66 ± 0.02	0.27±0.009	0.03±0.001	0.86±0.02

<sup>1</sup> $E$ , mg of substrate consumed mg of substrate fed<sup>-1</sup>; <sup>2</sup> $Y$ , mg of product mg of substrate consumed<sup>-1</sup>.

The difference between the respiratory pattern of the assays with 50 and 75 mg sulfide-S L<sup>-1</sup> was negligible and consequently the profile of latter is only shown (Figure 4). Two stages in the respiratory pattern were observed. At first, within two days 50% of lactate was converted to acetate and the other fraction was mineralized to HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> by SRP. The addition of sulfide resulted in a possible change of the fermentation pattern, as propionate formation was negligible. This result might be associated with the possible inhibition of fermentative bacteria due to the addition of sulfide. During this time the sulfate consumption efficiency was close to 44%. In the second stage, after 6 days acetate was oxidized to HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and the remaining sulfate was converted into sulfide (Table 3). At the end of the culture the  $E_{TOC}$ ,  $E_{LAC}$  and  $E_{SO4}$  were all higher than 90%.

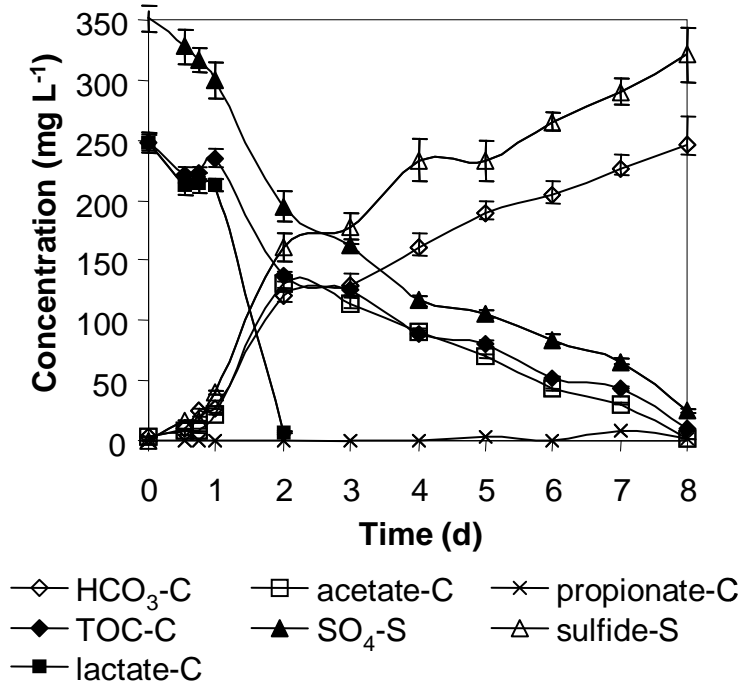


Figure 4. Profiles of lactate-C and sulfate-S consumption at 75 mg L<sup>-1</sup> of initial sulfide-S in batch culture. Only the sulfide-S produced was accounted for.

At 150 mg sulfide-S L<sup>-1</sup> only one stage was seen where lactate was completely converted by SRP to acetate and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> within eight days. The  $Y_A$  value increased significantly (Table 3). Under these conditions, nearly 30% of acetate produced was not consumed diminishing the  $E_{TOC}$  and  $E_{SO_4}$  while  $E_{LAC}$  remained high. The  $Y_{DS}$  value was as high as in the previous concentrations of sulfide. Thus, sulfate consumed was converted to sulfide by the sulfate reducing pathway. At 200 mg sulfide-S L<sup>-1</sup>,  $E_{LAC}$  and  $E_{SO_4}$  were around 12 and 8%, respectively during the eight days of culture. Under these conditions the  $Y_A$  and  $Y_{DS}$  values remained high.

Specific consumption rates of lactate ( $q_{LAC}$ ), propionate ( $q_P$ ) and acetate ( $q_A$ ) obtained at the different initial concentrations of sulfide are shown in Table 4. It was observed that  $q_{LAC}$  value was eleven times higher than  $q_A$  and  $q_P$  depending of the initial sulfide concentration. Therefore, a limiting step during TOC consumption by sulfate reduction was related to the lower specific consumption rate of acetate and propionate.

Table 4. Specific consumption rates of lactate, propionate and acetate at different initial sulfide concentrations in batch culture. The initial concentration of lactate-C and sulfate-S were  $257 \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$  and  $349 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively.

<b>mg L<sup>-1</sup></b>	<b><math>q^{\dagger}</math>, mg substrate mg VSS<sup>-1</sup>-d<sup>-1</sup></b>		
	<b>Stage 1</b>	<b>Stage 2</b>	
<b>Sulfide</b>	<b>Lactate-C</b>	<b>Acetate-C</b>	<b>Propionate-C</b>
0	$0.15 \pm 4 \times 10^{-3}$	$0.013 \pm 4 \times 10^{-4}$	$0.006 \pm 1 \times 10^{-4}$
50	$0.10 \pm 5 \times 10^{-3}$	$0.014 \pm 7 \times 10^{-4}$	-
75	$0.11 \pm 3 \times 10^{-3}$	$0.019 \pm 5 \times 10^{-4}$	-
150	$0.03 \pm 9 \times 10^{-4}$	0	-
200	$0.003 \pm 1 \times 10^{-4}$	0	-

<sup>†</sup> $q$ , specific consumption rate, mg of substrate consumed mg of VSS<sup>-1</sup>-d<sup>-1</sup>

Sulfide inhibition can be related to changes in pH and the type of microorganisms in the consortium besides other factors. Microbial biomass concentration ( $\text{g VSS L}^{-1}$ ) also affects the process rate, however frequently no information of the VSS concentration is reported. Sulfide-S/biomass ratio of the culture may be also an important factor associated to the efficiency of the SRP. This ratio relates the concentration of microbial biomass respect to a toxic compound like the dissolved sulfide. This value can be indicative of the toxic effect on the microbial population. Considering this, the effect of different mg sulfide-S/g VSS ratios (from 0 to 200) on specific consumption rate for TOC and sulfate was calculated (Figure 5). In all cultures the biomass concentration remained constant at  $1 \text{ g VSS L}^{-1}$ . No inhibition of the SRP was observed in the range from 0 to 75 mg sulfide-S/g VSS ratios, while at 150 and 200 mg sulfide-S/g VSS ratios the consumption rate of TOC and sulfate decreased 27 and 93%, respectively. Thus, as the mg sulfide-S/g VSS ratio increases the inhibition for SRP also increases. On the other hand, at the highest loading rate in the UASB reactor ( $981 \text{ mg SO}_4\text{-S L}^{-1}\text{d}^{-1}$  the  $E_{\text{SO}_4}$  of 45% and  $Y_{\text{HCO}_3}$  of 0.54) the mg sulfide-S/g VSS ratio was around 52. Taking into account these values, it was not possible to relate the decrease in substrate consumption efficiency in the continuous UASB reactor SRP to the sulfide accumulated. Instead, regardless of the specific lactate consumption rate, the batch culture kinetic results indicated that the decreased UASB efficiency in the reactor was related to the lower specific acetate and propionate consumption rate. Therefore, in the UASB reactor the lower specific consumption rate for acetate and propionate produced by SRP and fermentation was the limiting step.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

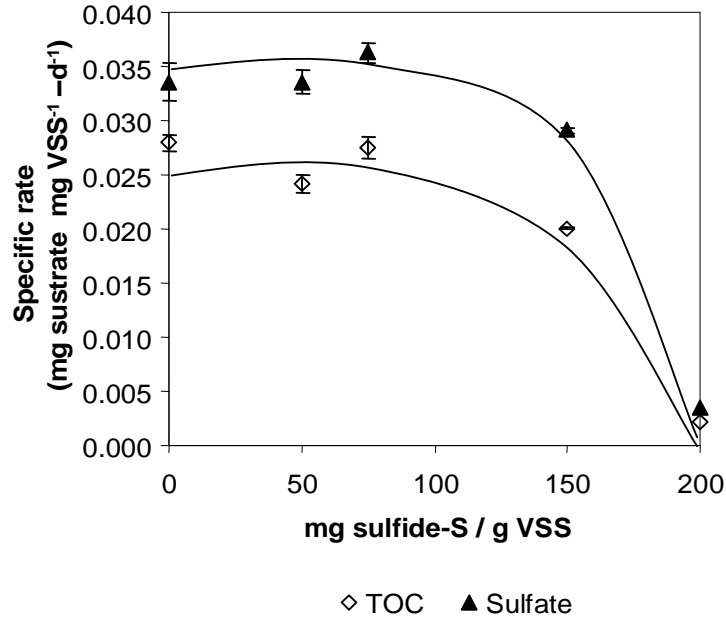


Figure 5. Total organic carbon (TOC) and sulfate specific consumption rates at different sulfide-S ( $\text{mg L}^{-1}$ )/VSS ( $\text{g L}^{-1}$ ) ratios in batch culture. In all cases, the concentration of VSS was of  $1 \text{ g L}^{-1}$ .

Considering that lactate is a recommended substrate for the SRP due to the bicarbonate production, which is appropriated for controlling pH, two actions could be recommended during the operation of a SRP in order to increase the consumption efficiency of sulfate and TOC: 1) maintaining mg sulfide-S/g VSS ratio between 75 and 150 for diminishing the fermentation process and avoiding sulfide inhibition. In fact, this is one of the contributions from this work for the operation of a SRP; 2) enhancing the acetate consumption rate by two possible means, either increasing the concentration of acetate consumer biomass in the UASB reactor or increasing the HRT in the reactor. In this sense, a biofilter reactor could be useful in order to obtain a higher biomass concentration and shorter HRT. However, further experimental work must be done.

## Conclusions

In the continuous culture at  $981 \text{ mg SO}_4\text{-S L}^{-1}\text{d}^{-1}$  and lactate at stoichiometric C/S ratio of 0.75, a sulfide concentration of  $385 \pm 45 \text{ mg sulfide-S L}^{-1}$  (corresponding to mg sulfide-S/ g VSS ratio of 52) was detected. Although lactate consumption efficiency was always close to 100%, acetate and propionate were accumulated by SRP and fermentation of lactate. Consequently, a reduction in TOC and sulfate consumption efficiencies was observed. However, the  $Y_{DS}$  values were always close to 1. By molecular phylogenetic

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

techniques, bacteria related with the sulfate reduction coupled to lactate and acetate oxidation as well as related with lactate fermenting bacteria were found.

In batch culture with sulfate and lactate two metabolic processes were simultaneously observed: sulfate reduction and fermentation of lactate to acetate and propionate. When sulfide was added only sulfate reduction was observed. The specific consumption rates obtained at different initial sulfide concentrations indicated that the rate of lactate consumption was up to eleven times higher than those obtained for acetate or propionate. No inhibition of the SRP was observed from 0 to 75 mg sulfide-S/g VSS, while at 150 and 200 mg sulfide-S/g VSS specific consumption rates decreased by 27 and 93%, respectively, showing an inhibitory effect of sulfide on SRP.

Considering that in the UASB reactor the mg sulfide-S/g VSS ratio was not higher than 52 and in batch culture no inhibition of sulfide was observed at that ratio, the decrease in SRP efficiency in the UASB reactor was not due to the sulfide accumulation, but to the specific consumption rates of acetate and propionate, which were lower than lactate specific consumption rate. Therefore, the mg sulfide-S/g VSS ratio was very useful to evaluate the effect of sulfide in the SRP.

**Acknowledgements.** This research was partially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) grant SEP-2003-C02-43144. Citlali Garcia Saucedo was a PhD student financed by CONACyT.

## References

- 1 Visser A, *The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater*. PhD-thesis, Wageningen Agricultural University Wageningen, The Netherlands (1995).
- 2 Liamleam W and Annachhatre AP, Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnol Adv* **25**: 452-463 (2007).
- 3 Hulshoff Pol LW, Lens PNL, Weijma J and Stams AJM, New developments in reactor and process technology for sulfate reduction. *Water Sci Technol* **44**:67-76 (2001).
- 4 Ensley BD and Suflita JM, Metabolism of environmental contaminants by mixed and pure cultures of sulfate-reducing bacteria. In Barton LL (ed), *Sulfate-Reducing Bacteria*. Biotechnology handbooks 8. Plenum Press, New York, NY, pp. 293-332 (1995).
- 5 Reis MAM, Almeida JS, Lemos PC and Carrondo MJ T, Effect of hydrogen sulfide on growth of sulfate reducing bacteria. *Biotechnol Bioeng* **40**:593-600 (1992).
- 6 McCartney DM and Oleskiewicz JA, Competition between methanogens and sulfate reducers: effect of COD:sulfate ratio and acclimation. *Water Environ Res* **65**:655-664 (1993).

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

- 7 Kaksonen AH, Riekkola-Vanhanen M-L and Puhakka JA, Optimization of metal sulphide precipitation in fluidized-bed treatment of acidic wastewater. *Water Res* **37**:255-266 (2003).
- 8 Widdel F and Pfennig N, Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov. *Arch Microbiol* **131**:360-365 (1982).
- 9 McCartney DM and Oleskiewicz JA, Sulfide inhibition of anaerobic degradation of lactate and acetate. *Water Res* **25**:203-209 (1991).
- 10 Yoda M, Kitagawa M and Miyaji Y, Long term competition between sulfate-reducing and methane-producing bacteria for acetate in anaerobic biofilm. *Water Res* **21**:1547-1556 (1987).
- 11 Maillacheruvu KY and Parkin GF, Kinetics of growth, substrate utilization and sulfide toxicity for propionate, acetate, and hydrogen utilizers in anaerobic systems. *Water Environ Res* **68**:1099-1106 (1996).
- 12 Widdel F, Microbiology and ecology of sulfate and sulfur reducing bacteria. in Zehnder AJB (ed), *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley & Sons, New York, NY, pp. 469-586 (1988).
- 13 Rinzema A and Lettinga G, Anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. in Wise DL (ed), *Biotreatment systems*, Vol. III. CRC Press Inc, Boca Raton, FL, pp. 65-109 (1988).
- 14 Annachatre A P and Suktrakoolvait S, Biological sulfate reduction using molasses as a carbon source. *Water Environ Res* **73**:118-126 (2001).
- 15 Hao OJ, Chen JM, Huang L and Buglass RL, Sulfate-reducing bacteria. *Crit Rev Environ Sci Technol* **26**:155-187 (1996).
- 16 Visser A, Hulshoff Pol LW and Lettinga G, Competition of methanogenic and sulfidogenic bacteria. *Water Sci Technol* **33**:99-110 (1996).
- 17 Celis-García MLB, Ramirez F, Revah S, Razo-Flores E and Monroy O, Sulphide and oxygen inhibition over the anaerobic digestion of organic matter: Influence of microbial immobilization type. *Environ Technol* **25**:1265-1275 (2004).
- 18 Harada H, Uemura S and Momonoi K, Interaction between sulfate-reducing bacteria and methane-producing bacteria in UASB reactors fed with low strength wastes containing different levels of sulfate. *Water Res.* **28**:355-367 (1994).
- 19 Omil F, Lens P, Visser A, Hulshoff Pol LW and Lettinga G, Long term competition between sulfate reducing and methanogenic bacteria in UASB reactors treating volatile fatty acids. *Biotechnol Bioeng* **57**:676-685 (1998).



- 20 Cuervo-López F M, Martínez F, Gutiérrez-Rojas M, Noyola R A and Gómez J, Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Water Sci Technol* **40**:123-130 (1999).
- 21 Peña-Calva A, Olmos-Dichara A, Viniegra-González G, Cuervo-López FM and Gómez J, Denitrification in presence of Benzene, Toluene, and m-Xylene. Kinetics, Mass Balance and Yields. *Appl Biochem Biotechnol* **119**: 195-208 (2004).
- 22 Reyes-Avila J, Razo-Flores E and Gómez J, Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Res* **38**: 3313-3321 (2004).
- 23 APHA, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (19th edn). American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC (1995).
- 24 Nübel U, Engelen B, Felske A, Snaidr J, Wieshuber A, Amann RI, Ludwig W and Backhaus H, Sequence heterogeneities of genes encoding 16 rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* **178**:5636-5643 (1996).
- 25 Lane D, 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt E and Goodfellow M (eds), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 115-175 (1991).
- 26 Muyzer G, Dewaal EC and Uitterlinden AG, Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S ribosomal RNA. *Appl Environ Microbiol* **59**:695-700 (1993).
- 27 Grosskopf R, Janssen PH and Liesack W, Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl Environ Microbiol* **64**:960-969 (1998).
- 28 de Bok FAM, van Leerdam RC, Lomans BP, Smidt H, Lens PNL, Janssen AJH and Stams AJM, Degradation of methanethiol by methylotrophic methanogenic archaea in a lab-scale upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Appl Environ Microbiol* **72**:7540-7547 (2006).
- 29 Cervantes FJ, Duong-Dac T, Ivanova AE, Roest K, Akkermans ADL, Lettinga G and Field JA, Selective enrichment of *Geobacter sulfurreducens* from anaerobic granular sludge with quinones as terminal electron acceptors. *Biotechnol Lett* **25**: 39-45 (2003).

- 30 Sanguinetti CJE, Dias N, and Simpson AJ, Rapid silver staining and recovered of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques* **17**:914-921 (1994).
- 31 McGinnis S and Madden TL, BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* **32**:W20-W25 (2004).
- 32 Cole JR, Chai B, Marsh TL, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, Chandra S, McGarrell DM, Schmidt TM, Garrity GM and Tiedje JM, The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res* **31**:442-443 (2003).
- 33 Saitoi N and Nei M, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**:406-425 (1987).
- 34 Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S, MEGA 4, Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1595-1599 (2007).
- 35 Hintze JL, Number Cruncher Statistical Systems 2001. Jerry L. Hintze, Kaysville, Utah. (2001).
- 36 Celis-García MLB, Razo-Flores E and Monroy O, Sulfate reduction in biofilms: performance of an inverse fluidized bed reactor. In *VIII Workshop and Symposium Latin-American on Anaerobic Digestion*. Universidad de la Republica, International Water Association Universidad de la Republica, Vol. 1, Punta del Este, Uruguay, pp. 183-188 (2005).
- 37 Postgate JR, Genus *Desulfovibrio*. In Krieg NR and Holt JG (eds), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol.1, Williams &Wilkins, Baltimore, Md, pp. 666-672 (1984).
- 38 Oude Elferink SJWH, Akkermans-van Vliet WM, Bogte JJ and Stams AJM, *Desulfobacca acetoxidans* gen. nov. sp. nov., a novel acetate-degrading sulfate reducer isolated from sulfidogenic granular sludge. *Int J Syst Bacteriol* **49**:345-350 (1999).
- 39 Janssen PH, Isolation of *Clostridium propionicum* strain 19acry3 and further characteristics of the species. *Arch Microbiol* **155**:566-571 (1991).
- 40 Ma K, Liu X and Dong X, *Methanobacterium beijingense* sp. nov., a novel methanogen isolated from anaerobic digesters. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**:325-329 (2005).
- 41 Raskin L, Rittmann BE and Stahl DA, Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**:3847-3857 (1996).

## **CAPÍTULO 5. Evaluación de la dinámica de una comunidad microbiana a diferentes velocidades de carga de sulfato en un reactor UASB: análisis molecular y fisiológico**

En este capítulo se hace una discusión de los resultados obtenidos del análisis de la dinámica de poblaciones en el reactor continuo en condiciones sulfatorreductoras. Al igual que en el capítulo anterior, éste se presentará también en forma de artículo de investigación, que próximamente se enviará a revisión para su publicación. Se comienza con un resumen.

**Resumen del artículo:** Evaluation of the dynamics of a microbial community at different sulfate loading rates in a UASB reactor: physiological and molecular analysis. Citlali García-Saucedo, Flor M Cuervo-López, Francisco J Fernández and Jorge Gómez.

En esta parte del trabajo se estudió la dinámica de una comunidad microbiana a diferentes velocidades de carga de sulfato y lactato en un reactor UASB, y su posible relación con la respuesta respiratoria del consorcio. Diferentes muestras de lodo fueron tomadas del reactor UASB, sometido a cinco velocidades de carga de sulfato (290, 436, 654, 817 y 981 mg S-SO<sub>4</sub>/Ld) y lactato a una relación C/S estequiométrica de 0.75. El proceso respiratorio fue evaluado por medio de las eficiencias de consumo de sustrato y rendimientos de producto. Para el análisis de la comunidad de ADN total se usó la técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) y para la comunidad bacteria y arquea se usó la separación de ADN por electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE). El análisis de datos de los patrones de bandas obtenidos se hizo con los índices de diversidad (*H*), equidad (*J*) y el coeficiente de similitud (*C*). Las bandas del gel de DGGE fueron secuenciadas y analizadas filogenéticamente. Con el incremento de la VCS las eficiencias de consumo de carbono orgánico total (COT) y sulfato disminuyeron de 93±3 a 66%±2 y de 60±5 a 45%±4, respectivamente. Se acumularon acetato y propionato por fermentación y sulfatorreducción de lactato.

Como el análisis microbiológico mostró la presencia de una cepa relacionada con *C. propionicum* (96% de similitud), la fermentación de lactato pudo estar asociada con esta cepa. El análisis molecular también mostró la presencia de microorganismos relacionados con la sulfatorreducción de lactato y acetato, tales como *Desulfovibrio* sp. (98%) y *Desulfobacca* sp (95%). El análisis de la composición microbiana mostró también la presencia de cepas relacionadas con microorganismos metanogénicos. Los resultados

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

indicaron que el proceso respiratorio en estado estacionario a 290 mg S-SO<sub>4</sub>/Ld estuvo relacionado con una comunidad microbiana principalmente estable. Se observaron pocos cambios en la comunidad microbiana con el incremento de la VCS. Un alto número de bandas de la comunidad microbiana (por encima del 80%) permanecieron sin cambio a lo largo del proceso experimental. Los índices *H*, *J* y *C* indicaron una comunidad microbiana diversa, equitativa y similar (hasta 73%), independientemente de los cambios en la VCS y la concentración de sulfuro. Como pocos cambios fueron observados y la relativa abundancia de las cepas relacionados con el PSR fue elevada, independientemente de la VCS, los resultados sugirieron que la disminución en los valores de eficiencias de consumo del PSR no estuvo relacionada con los cambios en la comunidad microbiana o con un efecto tóxico del sulfuro. El comportamiento observado podría ser atribuido a propiedades metabólicas del cultivo, como los factores cinéticos.

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

## **Evaluation of the dynamics of a microbial community at different sulfate loading rates in a UASB reactor: physiological and molecular analysis**

**Citlali García-Saucedo, Flor M Cuervo-López, Francisco J Fernández and Jorge Gómez\***

*Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Vicentina, C.P 09340, México, DF., México*

\*Corresponding author: Jorge Gómez, Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, División CBS, Av. San Rafael Atlixco 186, Vicentina, C.P 09340. México, D.F., México. Tel.: 52 (55) 58 04 64 08; fax: 52 (55) 58 04 64 07.

### **ABSTRACT**

In a sulfate reducing process (SRP) changes in loading rates as well as presence of sulfide, could induce modification in the microbial community resulting in a failure of the process. In this work an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor was set up in order to evaluate the dynamic of a microbial community at different sulfate loading rates (SLR, 290 to 981 mg SO<sub>4</sub>-S L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) and lactate (C/S ratio of 0.75) and its possible relation with the respiratory performance of the consortium. The total, archaeal and bacterial DNA were analyzed for this purpose using random amplified polymorphism DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). As the SLR increased, total organic carbon and sulfate consumption efficiencies decreased from 93±3 to 66%±2 and from 60±5 to 45%±4, respectively. Acetate and propionate were accumulated. A maximum of 377±7 mg sulfide-S L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> was detected (equivalent to a mg sulfide-S/g volatile suspended solid ratio of 58). Molecular analysis showed the presence of microorganism related with the sulfate reduction of lactate and acetate, fermentation of lactate and methanogenesis. Respiratory steady state at the SLR of 290 mg SO<sub>4</sub>-S L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> was related with a microbial community stable. Likewise, few changes in the microbial community with SLR increase were observed. The ecological indices indicated a microbial community diverse and similar up to 73%, irrespectively to SLR changes and sulfide concentration. Therefore, the results suggest that the decreasing in consumption efficiencies values were not related to the changes observed in the microbial community or with a toxic effect of sulfide.

### **INTRODUCTION**

The sulfate reducing process (SRP) can be used to remove biologically sulfate from wastewater generated by many industrial processes. The SRP is a dissimilative anoxic respiratory process where sulfate is reduced to sulfide using different compounds as

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

electron donor. However, a limitation of the biological treatment of sulfate-rich wastewaters is the sulfide accumulation which can result in a severe inhibition of the microbial metabolic pathways resulting in a significant decrease in the efficiency and consumption rates of the SRP (Lens *et al.*, 1998). Besides metabolic alteration of the microorganisms, changes in the microbial community structure as resulted of the toxicity to sulfide or to the environmental changes can occur. In this sense, a functionally stable ecosystem do not necessarily implies a stable microbial community. In fact, in a methanogenic reactor changes in the microbial community have been observed even if a continuous process is under respiratory steady state (SS) (Fernández *et al.*, 1999), contrary to those observed by Raskin *et al.* (1996), where the microbial community was stable under the respiratory SS. Studies suggest that the performance of respiratory process can be closely related to the structure and diversity of the microbial community (McMahon *et al.*, 2001). Dar *et al.* (2007) with ethanol and sulfate using an UASB reactor, obtained a sulfate consumption efficiency more than 93% with only four different species of sulfate reducing bacteria identified. In contrast, Kaksonen *et al.* (2004) reported sulfate consumption efficiency of 60-75% with a relatively more diverse consortium of SRB in a fluidized-bed reactor with ethanol or lactate. On the other hand, some studies show that the change of environmental conditions such as the C/S ratio could modify the metabolism process from the fermentation to the sulfate reduction of lactate (McCartney and Oleskiewicz, 1991, 1993), suggesting that the environmental conditions (C/S ratio) could influence the respiratory process. However, in that study the structure of microbial community was not analyzed. Thus, the studies about the relationship between the community structure and the physiological respiratory pattern in sulfate reducing reactors are still insufficient. In this sense, studies to understand whether the respiratory process is essentially dependent of the microbial composition, or if the metabolic change is in function of the environmental conditions are required.

The use of molecular methods to study the structure and dynamics of microbial populations over time and under the influence of environmental changes in bioreactors could be helpful in order to the behavior of respiratory processes (Boon *et al.*, 2002). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) has been widely used in classification of microbial species and phylogenetic analysis (Dweikat *et al.*, 1993), genome analysis (Grajal-Martin *et al.*, 1993), and in DNA analysis of soil and sludge microbial communities (Xia *et al.*, 1995; Xie, 2004). Another method used in genetic analysis of population is denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). This method has been widely used to

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

identify complex microbial communities and to determine the phylogenetic affiliation of the community members (Ferris *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 2000).

The present work was focused on the evaluation of the dynamics of the microbial community subjected to different loading rates of sulfate and lactate in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and its possible relation with the physiological respiratory pattern of the consortium. This evaluation was conducted in the UASB reactor by means of substrate consumption efficiencies, yield products and ecological indices.

## **MATERIALS AND METHODS**

**UASB reactor: continuous assays.** An UASB reactor of 1.5 L inoculated with 3.6 g volatile suspended solids (VSS) L<sup>-1</sup> of sulfate reducing sludge, previously obtained in a bench scale UASB reactor, was fed with five sulfate loading rates (SLR, mg SO<sub>4</sub>-S L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>): 290, 436, 654, 817, and 981. These loading rates were selected considering the usual SLR range of many industrial effluents. Lactate was added as electron donor for the SRP to obtain a stoichiometric C/S ratio of 0.75. The reactor was operated at 32°C, one day of hydraulic retention time (HRT) and fed with two separate mineral media, fraction 1 (F1) and fraction 2 (F2). F1 contained sulfate source (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) while F2 provided the electron source (sodium lactate). NH<sub>4</sub>Cl was used as nitrogen source (F1) and adjusted to a C/N ratio value of 50. Composition of mineral media is previously described in García-Saucedo *et al.* (in press). The pH of each fraction was adjusted to 7.0.

The respiratory process was evaluated by means of the substrate consumption efficiencies ( $E$ , mg of substrate consumed mg of substrate fed<sup>-1</sup>) and yield products ( $Y$ , mg of product mg of substrate consumed<sup>-1</sup>).

**Sludge samples and extraction of DNA.** Sludge samples homogeneous were withdrawn from the UASB reactor under respiratory steady state at each SLR. Samples were stored at -20°C until analysis. Total DNA was extracted from 500 mg of sludge by means of an UltraClean<sup>TM</sup> Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Solana Beach, CA, USA)

**DNA amplification and band visualization: RAPD fingerprints.** Total DNA of the community was analyzed by RAPD. PCR amplification reactions were carried out in a volume of 50 µL, containing 5 µL of 10× buffer magnesium free, 5 µL of magnesium chloride 25 mM, 1 µL of the nucleotide mix (10 mM of each dNTP), 0.5 µL of Taq DNA polymerase 5 u/µL, 2 µL of primer 20 pmol/µL (Table 1) and 1µL of sludge DNA (200

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!



ng/μL). DNA amplification was carried out in an Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Germany) with the following procedure: 30 cycles for 45 s at 94°C (denature), 45 s at the annealing temperature indicated in Table 1, in order to obtain reproducible data and 90 s at 72°C (extension). The amplified products were analyzed by agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and visualized in a transilluminator of UV by means of Quantity One software and Gel Doc 2000 transilluminator (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Reactions and gels were made by duplicate.

Table 1. List of random primers for RAPD.

Code	Sequence (5' to 3')	% GC	T annealing (°C)	T reference (°C)
F01	ACG CGC CCT	77	45	36 <sup>a</sup>
A09	GGG TAA CGC C	70	45	38 <sup>b</sup>
LE	CTG CTG GGA C	70	40	36 <sup>c</sup>
LO	CCC GTC AGC A	70	40	40 <sup>d</sup>
6.1	ACC CGG TCA C	70	45	36 <sup>e</sup>
6.2	TTC GAG CCA G	60	45	36 <sup>e</sup>
6.3	GTG AGG CGT C	70	45	36 <sup>e</sup>
6.6	GAT GAC CGC C	70	45	36 <sup>e</sup>
6.7	GAA CGG ACT C	60	45	36 <sup>e</sup>
6.9	TGG ACC GGT G	70	45	36 <sup>e</sup>
6.10	CTC ACC GTC C	70	40	36 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Quednau *et al.*, 1998; <sup>b</sup> This *et al.*, 1997; <sup>c</sup> Ruimy *et al.*, 2001; <sup>d</sup> Lopez-Jiménez *et al.*, 2001; <sup>e</sup> Xie, 2004.

**PCR and DGGE analysis of 16 rRNA genes.** The V6-V8 regions of the bacterial 16S rRNA genes were amplified using universal bacterial primers 968GC-f and 1401-r (Nübel *et al.*, 1996). The V2-V3 regions of archaeal 16S rRNA genes were amplified using the primers A109 (T) f and 515GC-r (Lane, 1991; Muyzer *et al.*, 1993; Grosskopf *et al.*, 1998). PCR amplifications were performed as describe by de Bok *et al.* (2006) but using annealing temperatures of 54 and 53°C for bacterial and archaeal DNA amplification, respectively (CG1-96 thermocycler, Corbett Research, Sydney, Australia). The amplification product was separated by DGGE on a DCode universal mutation detection system (Bio-RAD Laboratories, Hercules, USA) as indicated by Cervantes *et al.* (2003) but on 6% (w/v) polyacrilamide gels using denaturant gradients of 30 to 55% and 40 to 55% for bacterial and archaeal amplicons, respectively. The 100% denaturant contained 7 M urea and 40% (vol/vol) formamide. The DGGE gels were stained with silver nitrate (Sanguinetti *et al.*, 1994) and visualized using Epichemi<sup>3</sup> Darkroom (UVP Bioluming Systems, Upland, CA) and Labworks Image Acquisition and Analysis software 4.0.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!



DGGE bands were excised and reamplified using the primers previously described. The PCR products were purified (Wizard<sup>®</sup> SV gel and PCR Clean-Up System, Promega, Madison, WI, USA), visualized by agarose gel electrophoresis and sequenced using ABI Prism Big-Dye Terminator 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing on an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Warrington, UK). The DNA sequences were analyzed using Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) and BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) programs. The identification of the partial sequences were estimated using the Basic Local Alignment Search Tool BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) algorithm (McGinnis and Madden, 2004). The presence of chimerical sequences was checked with the Ribosomal Database Project Chimera Check program (<http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi?su=SSU>) (Cole *et al.*, 2003).

**Nucleotide sequence accession numbers.** Sequences obtained in this study were deposited in Genbank under accession numbers EU287856-EU287864, EU287866-EU287867, EU443144, EU443146 y EU443148.

**Data analysis of RAPD and DGGE.** The richness ( $S$ ) value represents the total number of quantifiable and reproducible bands in each lane. The value of Shannon-Weaver index ( $H$ ) indicates the distribution and variation of genetic diversity within the species and between them (Shannon and Weaver, 1963). The equitability index ( $J$ ) indicates the distribution of the abundance of the different bands.  $H$  and  $J$  indices were calculated according to Yang *et al.* (2000) and Ramírez-Saad *et al.* (2003). Images were analyzed by ImageJ 1.37v software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Band surface and pixel intensity were taken as a surrogate measure of band abundance. The similarity coefficient ( $C$ ) was calculated from the results obtained by RAPD technique as described by Yang *et al.* (2000) following the formula of Nei and Li (1979). The similarity coefficient counts only the presence of a band in both individuals as a match and ignores the shared absence of a band. While minor is the value of  $C$  there are more differences among the communities of a treatment.

**Analytical methods.** Inorganic carbon measured as  $\text{HCO}_3^-$  and organic carbon were analyzed in a total organic carbon analyzer as described by Cuervo-López *et al.* (1999). The concentration of acetate and propionate was determined by gas chromatography as described by García-Saucedo *et al.* (in press). Lactate-C was determined as total organic carbon (TOC) minus acetate-C and propionate-C.  $\text{CO}_2$  and  $\text{CH}_4$  were quantified by gas chromatography as described by Peña-Calva *et al.* (2004). The sulfate concentration was measured by capillary electrophoresis as described by Reyes-Avila *et al.* (2004). Dissolved sulfide and total and volatile suspended solids (TSS, VSS) contents were determined using

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

standard methods (APHA, 1995). Standard curves were conducted at least in triplicates for each analytical method. In all cases, the coefficient of variation for slope, coefficient of determination ( $R^2$ ) and intercept were less than 8%. Statistic analyses were conducted with the Number Cruncher Statistical System (NCCS) 2001 software (Hintze, 2001).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Effect of sulfate and lactate loading rate on the respiratory behavior.** Steady-state was considered when the variation coefficient of sulfate consumption rate, sulfide and  $\text{HCO}_3^-$  production rates obtained at each SLR was lower than 11%. Standard deviations were calculated from at least seven independent measurements obtained during the steady state (at least 12 HRT times were considered in each SLR). Under these conditions the pH value was  $7.5 \pm 0.1$ .

Consumption efficiencies of sulfate, lactate and TOC are shown in Figure 1a. Lactate consumption efficiency ( $E_{LAC}$ ) was higher than  $91\% \pm 4$  irrespectively to the SLR. From 290 to  $654 \text{ mg SO}_4\text{-S L}^{-1}\text{d}^{-1}$ , sulfate consumption efficiency ( $E_{SO4}$ ) was  $60\% \pm 5$ . However, at higher SLR the  $E_{SO4}$  decreased to  $45\% \pm 4$ . Concomitant to the increase in SLR a gradual decrease in the TOC consumption efficiency ( $E_{TOC}$ ) from  $93 \pm 3$  to  $66\% \pm 2$  was observed.

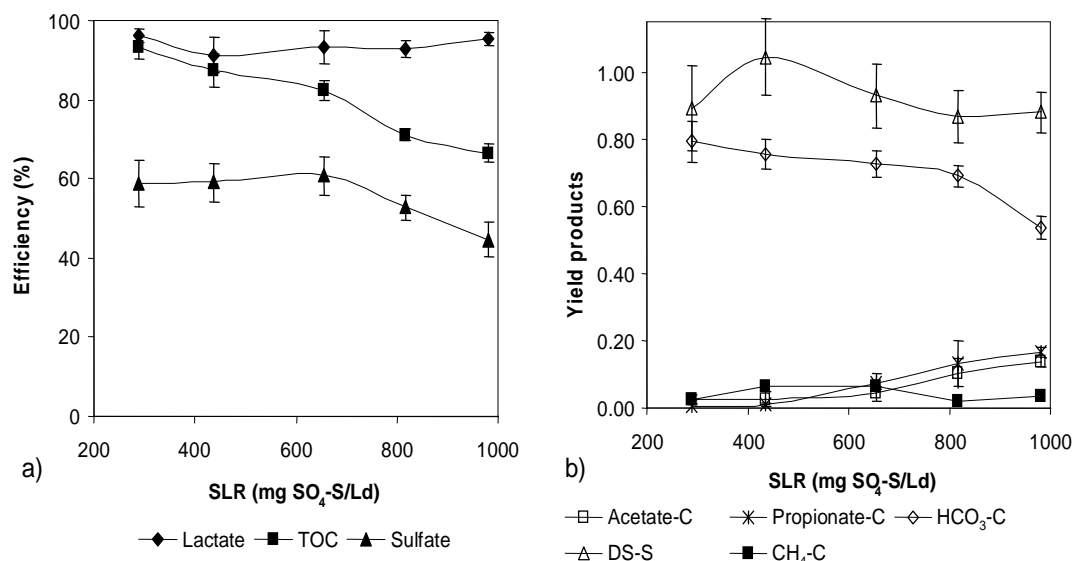
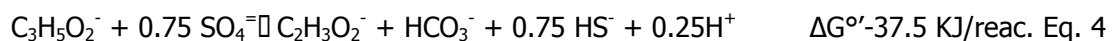
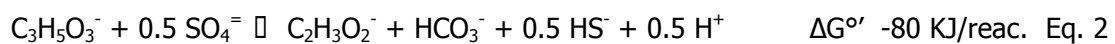
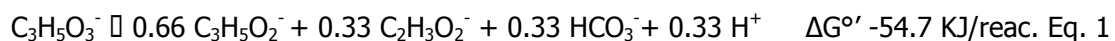


Figure 1. (a) Substrate consumption efficiency and (b) yields in product formation of the sulfate reducing process. Efficiency, mg of substrate consumed mg of substrate fed<sup>-1</sup>. Yield products, mg of product mg of substrate consumed<sup>-1</sup>. DS, dissolved sulfide.

Yield values for different products at each SLR are shown in Figure 1b. The increase in SLR from 290 to 436 mg SO<sub>4</sub>-S L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> resulted in an increase in sulfide production rate from 148.7±17 to 260.3±10 mg S-sulfide L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>. In the range from 654 to 981 mg SO<sub>4</sub>-S L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> the sulfide production rate was 377 ± 7 mg sulfide-S L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (58 mg sulfide-S/g volatile suspended solid). In all cases, dissolved sulfide yield values were always higher than 0.87 ± 0.07 irrespectively of the SLR. The biomass yields in contrast, remained between 0.03 and 0.05 ± 0.008, indicating that the process was dissimilative. Methane yield values were not higher than 0.07 ± 0.02, thus the methanogenic process was negligible. Lactate was mineralized to HCO<sub>3</sub> at a yield average value ( $Y_{HCO_3}$ ) of 0.75 ± 0.03 during the first three SLR. However, at 981 mg SO<sub>4</sub>-S L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>,  $Y_{HCO_3}$  values decreased while acetate ( $Y_A$ ) and propionate ( $Y_P$ ) yields increased significantly ( $\alpha$ , 0.05). Results suggest that lactate fermentation process (eq. 1) and lactate mineralization by SRP (eq. 2, 3 and 4) occurred. Considering that these assays were conducted at a C/S stoichiometric ratio (0.75), the results are in contrast with those reported by McCartney and Oleszkiewicz (1991; 1993), where accumulation of acetate and propionate was observed in microbial consortia at C/S ratio close to 4.7 and sulfate was not consumed, while, acetate accumulation was observed at C/S ratios ≤ 2.06 by SRP. The inefficient SRP in this current work could be related with the presence of the fermentation besides kinetic factors (García-Saucedo et al., in press). Lactate fermentation could be carried out by sulfate reducing microorganisms (Widdel and Pfennig, 1982) and some other fermentative microorganisms (Janssen, 1991) present in the microbial consortium.



In order to evaluate the dynamics of the microbial community exposed to different loading rates of sulfate and lactate and its possible relation with the physiological respiratory response of the consortium, the total DNA, archaeal and bacterial DNA were analyzed.

**Microbial community in the UASB reactor.** The pattern of bands of archaeal and bacterial DNA obtained by DGGE at the different SLR during respiratory SS is shown in Figure 2. Some differences were noted in position, intensity and number of bands in the microbial DGGE patterns. The patterns revealed at different SLR in the UASB reactor the presence of 11 and 8 distinguishable bands in archaeal and bacterial community respectively, reflecting the richness (*S*) and structure of the microbial community. The results of the analysis of archaeal and bacterial community of the sludge are shown in Table 2. The analysis shows the presence of strains related with sulfate reducing bacteria, fermentative bacteria and methanogenic archaea (MA).

Some bacteria could be involved in the SRP, strains related to *Desulfobacca acetoxidans* (94-95%), which is an acetate consumer, and other related to *Desulfovibrio* sp. (98%) which produces acetate from lactate were present (Postgate, 1984; Oude Elferink *et al.*, 1999). In fact, they have been identified in sulfate reducing reactors to a C-lactate/S-SO<sub>4</sub> ratio stoichiometric of 0.75, at 35°C and pH effluent close to 8 (Kaksonen *et al.* 2004). A strain related to *Clostridium propionicum* (96%) was detected, which suggests that lactate fermentation could be carried out by this bacterium (Janssen, 1991). Strains clustering with  $\gamma$ -*Proteobacteria* (bands B1, B3 and B4, Table 2) showed similarity to sulfur- and sulfide-oxidizing bacteria such as *Halothiobacillus kellyi* (93%) (Sievert *et al.*, 2000). These strains also have been identified in sulfate reducing reactors (Kaksonen *et al.* 2004). Some bands of DGGE gels were not sequenced, therefore the bacterial strains presented in this work do not conform the total bacterial community.

The microbial analysis also showed methanogenic archaea (MA) close to *Methanobacterium Beijerinckense* (93-98%) a hydrogenotrophic MA which is present in many anaerobic digesters (Ma *et al.*, 2005; de Bok *et al.*, 2006). Several acetoclastic MA close to uncultured *Methanosaeta* sp (99%) and members from the *Methanosarcinaceae* family were also present (Raskin *et al.*, 1996). In spite of the presence of these MA, the methane formation was very low irrespectively of the SLR (Figure 1b). These results might be related to the C/S ratio of 0.75 used which was close to stoichiometric value for SRP and possibly also with the C/N ratio of 50. Similar results were also observed by Raskin *et al.* (1996) in a sulfate reducing reactor with 450 d of operation where methane production was negligible and MA were detected. Thus, it is suggest the culture conditions could influence the orientation of the respiratory process independently of the microbial structure.

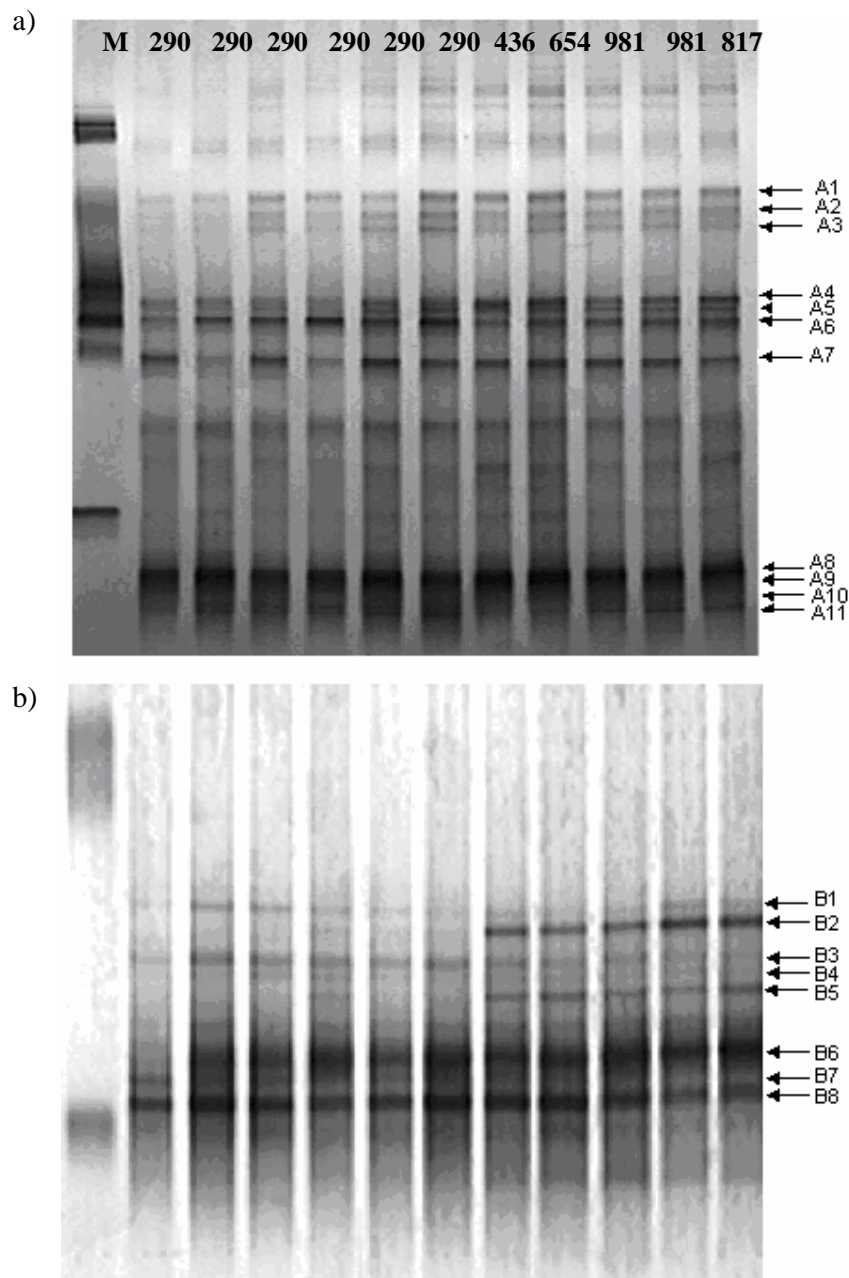


Figure 2. DGGE profiles of 16S rRNA amplicons in respiratory steady state. (a) Archaeal DGGE profiles and (b) bacterial with lane numbers indicating the SLR ( $\text{mg SO}_4\text{-S L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) each sample was collected. Identified DGGE bands are labeled to the right. M, marker; A, archaeal community; B, bacterial community. Samples from UASB reactor (day zero, start up) were 57 days (lane 2), 65 days (lane 3), 71 days (lane 4), 79 days (lane 5), 87 days (lane 6), 101 days (lane 7), 144 days (lane 8), 165 days (lane 9), 183 days (lane 10), 193 days (lane 11) and 202 days (lane 12).

Table 2. Identification of archaeal and bacteria 16 S rRNA genes retrieved from a UASB reactor and percent similarities to the closest related sequence in the NCBI database. *Escherichia coli* positions 110 to 482 and 969 to 1367.

Position <sup>a</sup>	Accession no.	Closest related sequences in database (NCBI)	Accession no.	% Similarity
<b>Archaea</b>				
A1	EU287863	Uncultured <i>Methanosaeta</i> sp.	AY692056	99
		<i>Methanosaeta concilii</i>	AB212062	99
A2	NA			
A3	NA			
A4	EU287866	Uncultured Methanosarcinaceae archaeon	EF420174	99
		<i>Methanotherix soehngenii</i>	X51423	99
A5	EU287864	Uncultured Methanosarcinaceae archaeon	EF420174	99
		<i>Methanotherix soehngenii</i>	X51423	99
A6	EU287860	<i>Methanobacterium beijingense</i>	DQ649302	98
A7	EU287862	Uncultured archaeon	DQ088782	94
		<i>Methanobacterium beijingense</i>	DQ649302	93
A8	S <sup>b</sup>	Uncultured <i>Methanosaeta</i> sp.	AY692056	99
A9	EU287859	Uncultured <i>Methanosaeta</i> sp.	AY692056	99
A10	EU287856	Uncultured <i>Methanosaeta</i> sp.	AY692056	99
A11	EU287861	Uncultured <i>Methanosaeta</i> sp.	AY692056	99
<b>Bacteria</b>				
B1	S <sup>c</sup>	Uncultured bacterium	AY340824	100
B2 <sup>d</sup>	EU443148	Uncultured bacterium	AY667258	99
		<i>Clostridium propionicum</i>	X77841	96
B3	EU287857	Uncultured bacterium	AY340824	100
B4	EU287858	Uncultured bacterium	AY340824	99
B5	NA			
B6	EU287867	<i>Desulfovibrio</i> sp. L7	EF055877	98
B7 <sup>d</sup>	EU443146	Uncultured bacterium	DQ404769	98
		<i>Desulfobacca acetoxidans</i>	AF002671	95
B8 <sup>d</sup>	EU443144	<i>Desulfobacca acetoxidans</i>	AF002671	94

<sup>a</sup> positions of the amplicons in the DGGE gel (Fig. 2); NA, no accession number; S<sup>b</sup> similar to A9 (Accession no., EU287859); S<sup>c</sup> similar to B3 (Accession no., EU287857)

The amplification of total DNA was conducted by RAPD using eleven primers. As only seven primers showed changes in band patterns (F01, A09, LE, 6.1, 6.2, 6.3 and 6.9) these primers were considered for the analysis. Figure 3 shows the amplification of bands with the primer F01 at different SLR.

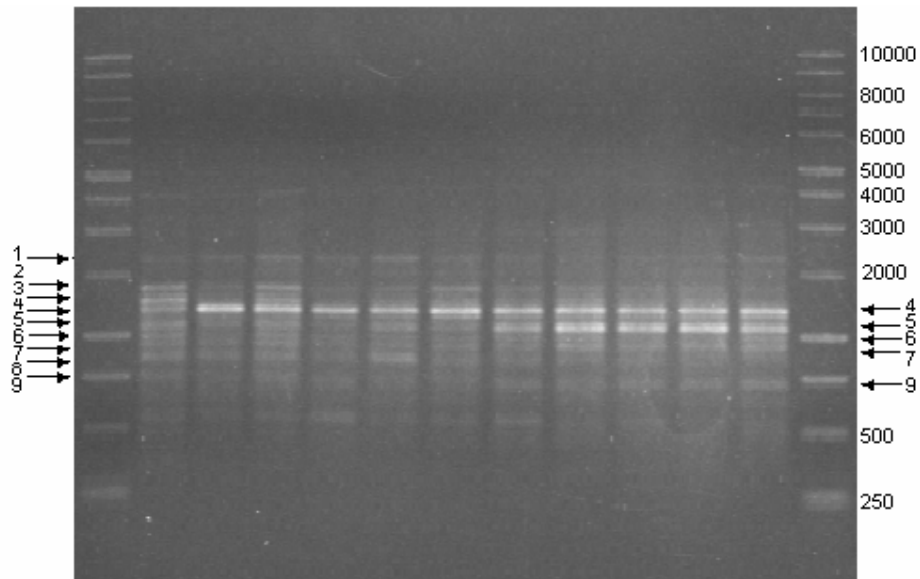


Figure 3. DNA amplification with the primer F01 by RAPD with lane numbers indicating the SLR ( $\text{mg SO}_4\text{-S L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) each sample was collected. Identified RAPD bands are labeled to the right and left. M: 100 bp DNA marker to the right. Samples from UASB reactor (day zero, start up) were 57 days (lane 2), 65 days (lane 3), 71 days (lane 4), 79 days (lane 5), 87 days (lane 6), 101 days (lane 7), 144 days (lane 8), 165 days (lane 9), 183 days (lane 10), 193 days (lane 11) and 202 days (lane 12).

**Effect of SLR on the microbial community.** At SLR of  $290 \text{ mg SO}_4\text{-S L}^{-1}\text{d}^{-1}$  six samples of sludge in respiratory SS were analyzed. Within a period of 48 days, two bands related with *Methanosaeta* sp (A10 and A11, Figure 2a) appeared, one band related with *Desulfovibrio* sp appeared (B6, Figure 2b) while a band related with *Desulfobacca* sp disappeared (B7, Figure 2b). The analysis of banding pattern in terms of *H* and *J* indices (Table 3 and 4) showed values constant, and *C* values close to 1 (Table 5), suggesting a diverse, evenness and similar microbial community. Therefore, the respiratory SS was related with a microbial community stable. Fernández *et al.* (1999), as mentioned previously, observed changes in the microbial community even when the continuous process was in respiratory SS. However, authors use only parameters like COD and pH to evaluate the physiological respiratory state of the process. A factor considered in this



current work was the use of others measuring variables to evaluate the respiratory process which allowed to be more strict in defining the respiratory SS.

Table 3. Estimation of richness ( $S$ ), indices of diversity ( $H$ ) and equitability ( $J$ ) for each SLR (mg  $\text{SO}_4\text{-S L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) of total DNA by RAPD.

SLR	S/H index	Primers							Total S	Average	J
		F01	Le	6.1	6.2	6.3	6.9	A09			
290	S1	9.0	3.0	4.0	5.0	5.0	7.0	5.0	38	5.43±1.99	0.965
	H1	2.2	1.1	1.3	1.6	1.5	1.9	1.6			
290	S2	9.0	3.0	4.0	5.0	5.0	7.0	5.0	38	5.43±1.99	0.964
	H2	2.2	1.1	1.3	1.6	1.5	1.9	1.6			
290	S3	9.0	3.0	4.0	5.0	5.0	7.0	5.0	38	5.43±1.99	0.964
	H3	2.2	1.1	1.3	1.6	1.5	1.9	1.6			
290	S4	9.0	3.0	4.0	5.0	5.0	7.0	5.0	38	5.43±1.99	0.963
	H4	2.2	1.0	1.3	1.6	1.5	1.9	1.6			
290	S5	9.0	3.0	4.0	5.0	5.0	8.0	5.0	39	5.57±2.15	0.959
	H5	2.2	1.0	1.3	1.6	1.5	2.0	1.6			
290	S6	9.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	5.0	40	5.71±2.14	0.962
	H6	2.2	1.0	1.3	1.6	1.7	2.0	1.6			
436	S7	7.0	3.0	4.0	6.0	6.0	7.0	6.0	39	5.57±1.51	0.972
	H7	1.9	1.0	1.3	1.7	1.7	1.9	1.7			
654	S8	6.0	6.0	5.0	7.0	6.0	7.0	6.0	43	6.14±0.69	0.992
	H8	1.8	1.7	1.6	1.9	1.7	1.9	1.7			
981	S9	6.0	7.0	6.0	7.0	6.0	7.0	6.0	45	6.43±0.53	0.995
	H9	1.8	1.9	1.7	1.9	1.7	1.9	1.7			
981	S10	6.0	7.0	6.0	7.0	6.0	7.0	6.0	45	6.43±0.53	0.995
	H10	1.8	1.9	1.7	1.9	1.7	1.9	1.7			
817	S11	6.0	7.0	6.0	7.0	6.0	6.0	6.0	44	6.29±0.49	0.994
	H11	1.8	1.9	1.7	1.9	1.7	1.7	1.7			

Table 4. Estimation of richness ( $S$ ), indices of diversity ( $H$ ) and equitability ( $J$ ) for each SLR of bacterial and archaeal community by DGGE.

	Sulfate loading rates (mg $\text{SO}_4\text{-S L}^{-1}\text{d}^{-1}$ )										
	290	290	290	290	290	290	436	654	981	981	817
Bacterial											
S	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
H	1.39	1.45	1.49	1.48	1.43	1.46	1.86	1.85	1.86	1.88	1.89
J	0.86	0.89	0.92	0.92	0.89	0.90	0.95	0.95	0.95	0.96	0.97
Archaeal											
S	9.00	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00
H	2.13	2.36	2.37	2.37	2.37	2.39	2.38	2.38	2.38	2.38	2.39
J	0.96	0.98	0.98	0.98	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!



Table 5. Coefficients similarity (C) of total DNA sequence by RAPD for each SLR (mg SO<sub>4</sub>-S L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>). Samples from UASB reactor (day zero, start up) were 57 days (sample 1), 65 days (sample 2), 71 days (sample 3), 79 days (sample 4), 87 days (sample 5), 101 days (sample 6), 144 days (sample 7), 165 days (sample 8), 183 days (sample 9), 193 days (sample 10) and 202 days (sample 11).

SLR	Samples	290	290	290	290	290	290	436	654	981	981	817
290	1	1										
290	2	1	1									
290	3	1	1	1								
290	4	1	1	1	1							
290	5	0.98	0.98	0.98	0.98	1						
290	6	0.97	0.97	0.97	0.97	0.98	1					
436	7	0.88	0.88	0.88	0.88	0.89	0.91	1				
654	8	0.81	0.81	0.81	0.81	0.82	0.84	0.92	1			
981	9	0.74	0.74	0.74	0.74	0.76	0.77	0.85	0.93	1		
981	10	0.74	0.74	0.74	0.74	0.76	0.77	0.85	0.93	1	1	
817	11	0.73	0.73	0.73	0.73	0.74	0.76	0.84	0.91	0.98	0.98	1

On the other hand, when the SLR was increased from 290 to 436 mg SO<sub>4</sub>-S L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, the biggest changes in the pattern of bands were observed. Many microorganisms remained constant with the increase of SLR, such as those related with *Desulfovibrio* sp, *Desulfobacca* sp, and MA. Likewise, the increment in the rate of sulfide production in the first three SLR, did not imply an increase in the number and in the relative abundance of bands related with the SRP. In spite of the increase in SLR to 817 and 981 mg SO<sub>4</sub>-S L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> which resulted in a higher  $Y_A$  and  $Y_P$  values (close to 31% of the carbon fed was converted into acetate and propionate) and decreasing in  $E_{SO_4}$  and  $E_{TOC}$ , the smallest changes in banding pattern were observed. At the end of the experimentation the bands number of total DNA, bacterial and archaeal patterns increased in 15, 40 and 22% respectively, and high number bands detected at the first SLR remained constant (up to 80%). Likewise, similarity coefficient values showed a similar up to 73% between the community at 290 and 817 mg SO<sub>4</sub>-S L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> (Table 5). This behavior suggests that the changes observed in banding pattern with the increase of SLR were not related to decrease of  $E_{SO_4}$  and  $E_{TOC}$  values and increase  $Y_A$  and  $Y_P$  values.

When the SLR was increased from 290 to 436 mg SO<sub>4</sub>-S L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, an increase in the *H* values (27%) of the bacterial community (by DGGE) was observed (Table 4). When was increased from 436 to 654 mg SO<sub>4</sub>-S L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> an increase in the *H* values (7%) in the total DNA community (by RAPD) was detected (Table 3), later on the *H* values remained without change. These *H* values suggesting that neither SLR nor sulfide accumulation negatively affected the diversity of the microbial community. These results are in contrast with previous studies where a lower microbial diversity was observed as a result of a selective pressure (Nyman *et al.*, 1999; Tirola *et al.*, 2002; von Canstein *et al.*, 2002). The diversity of the microbial community may enhance robustness and flexibility under variable operational conditions (Kaksonen *et al.*, 2004), such as increases in discharges of sulfate or increase in sulfide and organic compound concentration. Likewise, the *J* index values were close to 1, indicating that irrespective of the SLR the abundance of the microbial population was rough similar among them. However, the relative abundance of bands B6 and B8 in bacterial community related with SRP and A8 and A9 in archaeal community was the biggest (Figure 2), suggesting that possibly these population be in more proportion inside the domains. Therefore, ecological indices, *H*, *J* and *C* indicated a microbial community diverse, evenness and similar up to 73% along the increases in SLR and sulfide concentration.

On the other hand, the sulfide produced does not seem have been a strongly toxic compound on the microbial community accord with the presented values (Table 3 and 4). In contrast, a previous study using other compounds toxics, like, 3-chlorobenzoate and 2,5-dichlorobenzoate, showed the decrease over the time of *S*, *H* and *J* values in a bacterial community, indicating a decrease in the diversity and the populations' unequal abundance (Ramírez-Saad *et al.*, 2003). This suggests that the magnitude of the change of the community structure could also depend on the type and concentration of the toxic compounds. Thus, the sulfide it does not seem to be related with the decrease of carbon and sulfate efficiencies and increase in acetate and propionate yields, as was found in a previous study in batch culture with different initial sulfide concentration (García-Saucedo *et al.*, in press).

Finally, no clear relationship was found between shifts in the microbial community and the changes in metabolism, namely, the decrease in the TOC and sulfate elimination efficiency and bicarbonate yield values. Thus, the respiratory behavior observed could be attributed to metabolic properties of culture such as kinetic factors.

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was partially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) grant SEP-CONACyT, CB-2005-C01-49748-Z. Citlali García Saucedo was a PhD student financed by CONACyT.

## REFERENCES

- APHA. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater (19th edn). American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC.
- Boon, N., W. de Windt, W. Verstraete, and E. M. Top. 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **39**:101–112.
- Cervantes, F. J., T. Duong-Dac, A. E. Ivanova, K. Roest, A. D. L. Akkermans, G. Lettinga, and J. A. Field. 2003. Selective enrichment of *Geobacter sulfurreducens* from anaerobic granular sludge with quinones as terminal electron acceptors. *Biotechnol. Lett.* **25**:39–45.
- Cole J. R., B. Chai, T. L. Marsh, R. J. Farris, Q. Wang, S. A. Kulam, S. Chandra, D. M. McGarrell, T. M. Schmidt, G. M. Garrity, and J. M. Tiedje. 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* **31**:442–443.
- Cuervo-López, F. M., F. Martínez, M. Gutiérrez-Rojas, R. A. Noyola, and J. Gómez. 1999. Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Water Sci. Technol.* **40**:123–130.
- Dar S.A., J.M. Stams, J.G. Kuenen, and G. Muyzer. 2007. Co-existence of physiologically similar sulfate-reducing bacteria in a full-scale sulfidogenic bioreactor fed with a single organic donor. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **75**: 1463-1472.
- de Bok, F. A. M., R. C. van Leerdam, B. P. Lomans, H. Smidt, P. N. L. Lens, A. J. H. Janssen, and A. J. M. Stams. 2006. Degradation of methanethiol by methylotrophic methanogenic archaea in a lab-scale upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:7540–7547.
- Dweikat, I., S. Mackenzie, M. Levy, and H. Ohm. 1993. Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species. *Theor. Appl. Genet.* **85**:497–505.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

- Fernández, A., S. Huang, S. Seston, J. Xing, R. Hickey, C. Criddle, and J. Tiedje. 1999. How stable is stable? Function versus community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3697–3704.
- Ferris, M. J., G. Muyzer, and D. M. Ward. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:340–346.
- García-Saucedo, C., F. J. Fernández, G. Buitrón, F. M. Cuervo-López, and J. Gómez. Effect of loading rate on TOC consumption efficiency in a sulfate reducing process: sulfide effect in batch culture. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, in press.
- Grajal-Martin, M. J., C. J. Simon, and F. J. Muehlbauer. 1993. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Phytopath.* **83**:612–614.
- Grosskopf, R., P. H. Janssen, and W. Liesack. 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:960–969.
- Hintze, J.L. 2001. Number Cruncher Statistical Systems 2001. Jerry, L. Hintze, Kaysville, Utah.
- Janssen, P. H. 1991. Isolation of *Clostridium propionicum* strain 19acry3 and further characteristics of the species. *Arch. Microbiol.* **155**:566–571.
- Kaksonen, A. H., J. J. Plumb, P. D. Franzmann, and J. A. Puhakka. 2004. Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized reactor treating acidic metal- and sulfate-containing wastewater. *FEMS Microbiol. Ecol.* **47**:279–289.
- Lane, D. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115–175. *In* E. Stackebrandt, M. Goodfellow (ed.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.
- Lens, A., A. Visser, A. J. H. Janssen, L. W. Hulshoff Pol, and G. Lettinga. 1998. Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* **28**:41–88.
- López-Jiménez, G., F. Ramírez, O. Loera, S. LeBorgne, O. Monroy, L.L. Fernández. 2001. Development of molecular probe by random amplified polymorphic DNA (RAPD) of sulfate reducing bacteria isolated from mexican gas pipelines. In 8<sup>th</sup> International Petroleum Environmental Conference, Houston, Texas.

- Ma, K., X. Liu, and X. Dong. 2005. *Methanobacterium beijingense* sp. nov., a novel methanogen isolated from anaerobic digesters. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:325–329.
- McCartney, D. M., and J. A. Oleskiewicz. 1991. Sulfide inhibition of anaerobic degradation of lactate and acetate. *Water Res.* **25**:203–209.
- McCartney, D.M., and J. A. Oleskiewicz. 1993. Competition between methanogens and sulfate reducers: effect of COD, sulfate ratio and acclimation. *Water Environ. Res.* **65**:655–664.
- McGinnis, S., and T. L. Madden. 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **32**:W20–W25.
- McMahon, K. D., P. G. Stroot, R. I. Mackie, and L. Raskin. 2001. Anaerobic co-digestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions-II. Microbial population dynamics. *Water Res.* **35**: 1817-1827.
- Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695–700.
- Nei, M., and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:5269–5273.
- Nübel, U., B. Engelen, A. Felske, J. Snaidr, A. Wieshuber, R. I. Amann, W. Ludwig, and H. Backhaus. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16 rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **178**:5636–5643.
- Nyman, J. A. 1999. Effect of crude oil and chemical additives on metabolic activity of mixed microbial population in fresh marsh soils. *Microb. Ecol.* **37**:152–162.
- Oude Elferink, S. J. W. H., W. M. Akkermans-van Vliet, J. J. Bogte, and A. J. M. Stams. 1999. *Desulfobacca acetoxidans* gen. nov. sp. nov., a novel acetate-degrading sulfate reducer isolated from sulfidogenic granular sludge. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:345–350.
- Peña-Calva, A., A. Olmos-Dichara, G. Viniegra-González, F. M. Cuervo-López, and J. Gómez. 2004. Denitrification in presence of benzene, toluene, and m-xylene. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **119**:195–208.
- Postgate, J. R. 1984. Genus *Desulfovibrio*, p. 666–672. *In* N. R. Krieg, and J. G. Holt (ed.), *Bergey`s manual of systematic bacteriology*, Vol.1, Williams &Wilkins, Baltimore, Md.

- Quednau, M., S. Ahrne, A. C. Petersson, and G. Molin. 1998. Identification of clinically important species of *Enterococcus* within 1 day with randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Curr. Microbiol.* **36**:332–336.
- Ramírez-Saad, H. C., A. Sessitsch, and A. D. L. Akkermans. 2003. Molecular diversity in the bacterial community and the fluorescent pseudomonads group in natural and chlorobenzoate-stressed peat-forest soil. *Microbiol. Res.* **158**:47–54.
- Raskin, L., B. E. Rittmann, and D. A. Stahl. 1996. Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3847–3857.
- Reyes-Avila, J., E. Razo-Flores, and J. Gómez. 2004. Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Res.* **38**:3313–3321.
- Ruimy, R., E. Genauzeau, C. Barnabe, A. Beaulieu, M. Tibayrenc, and A. Andremont. 2001. Genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from ventilated patients with nosocomial pneumonia, cancer patients with bacteremia, and environmental water. *Infect. Imm.* **69**:584–588.
- Sanguinetti, C. J. E., E. Dias N., and A. J. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques.* **17**:914–921.
- Shannon, C. E., and W. Weaver. 1963. *The mathematical theory of communication.* Univ Illinois Press, Urbana.
- Sievert, S. M., T. Heidorn, and J. Kuever. 2000. *Halothiobacillus kellyi* sp. nov., a mesophilic, obligately chemolithoautotrophic, sulfur,-oxidizing bacterium isolated from a shallow-water hydrothermal vent in the Aegean Sea, and emended description of the genus *Halothiobacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:1229–1237.
- Tirola, M. A., M. K. Männistö, J. A. Puhakka, and M. S. Kulomaa. 2002. Isolation and characterization of *Novosphingobium* sp. strain MTI, a dominant polychlorophenol-degrading strain in a ground-water bioremediation system. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:173–180.
- This, P., C. Cuisset, and J. M. Boursiquot. 1997. Developed of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships. *Am. J. Enol. Vitic.* **48**:492–501.
- von Canstein, H., S. Kelly, Y. Li, and I. Wagner-Döbler. 2002. Species diversity improves the efficiency of mercury-reducing biofilms under changing environmental conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2829–2837.

- Watanabe, K., Y. Kodama, K. Syutsubo, and S. Harayama. 2000. Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from under-ground crude oil storage cavities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4803–4809.
- Widdel, F., and N. Pfennig. 1982. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiol.* **131**:360–365.
- Xia, X., J. Bollinger, and A. Ogram. 1995. Molecular genetic analysis of the response of three soil microbial communities to the application of 2, 4-D. *Molec. Ecol.* **4**:17–28.
- Xie, B. 2004. Analysis of the effect of zinc ions on activated sludge microbes by random amplified polymorphism DNA (RAPD). *Int. J. Environ. Pollut.* **21**:533–546.
- Yang, Y. H., J. Yao, S. Hu, and Y. Qi. 2000. Effects of agricultural chemicals on DNA sequence diversity of soil microbial community: a study with RAPD marker. *Microb. Ecol.* **39**:72–79.

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

## 6. CONCLUSIONES GENERALES, RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se identificaron algunos factores que contribuyen a disminuir la efectividad del PSR bajo condiciones de cultivo definidas, cuando el lactato es el donador de electrones, tales como la fermentación y las bajas velocidades específicas de consumo de acetato y propionato. Las principales conclusiones obtenidas durante este trabajo fueron las siguientes:

Se encontró que conforme la VCS aumentó en el reactor UASB, las eficiencias de consumo de carbono orgánico total y de sulfato disminuyeron significativamente de  $93\pm 3$  a  $66\pm 2$  y de  $60\pm 5$  a  $45\pm 4$ , respectivamente. El acetato y el propionato fueron acumulados por el PSR y la fermentación, siendo estos los principales procesos que se llevaron a cabo. Estos resultados indicaron que la eficiencia del proceso sulfatorreductor fue afectada negativamente por la fermentación. El análisis de la composición microbiana mostró la presencia de bacterias relacionadas con la sulfatorreducción de lactato y acetato y relacionadas con bacterias fermentativas de lactato, lo cual sugiere que la respuesta respiratoria observada podría estar asociada con la presencia de estas cepas. Independientemente de la VCS, los  $Y_{SD}$  fueron cercanos a 1, mientras que los  $Y_{CH_4}$  fueron muy bajos. No obstante, el análisis microbiano mostró la presencia de microorganismos metanogénicos. Estos resultados dan evidencia de que las condiciones de cultivo podrían ser las determinantes en la orientación del proceso, más que el tipo de poblaciones en el consorcio microbiano. En este sentido, el empleo de una relación C/S cercana al valor estequiométrico de la sulfatorreducción fue la de mayor importancia.

En cultivo en lote con sulfato y lactato se observaron simultáneamente dos procesos metabólicos: la sulfatorreducción y la fermentación, al igual que ocurrió en el cultivo continuo. No obstante, los ensayos realizados con adición de sulfuro revelaron un cambio en el perfil de fermentación del lactato, mostrando que bajo estas condiciones se alcanzó un proceso completamente sulfatorreductor. Para evaluar el efecto inhibitorio del sulfuro se empleó la relación S-sulfuro/biomasa, y con base en ésta se encontró que la disminución en las eficiencias de consumo y la acumulación de acetato y propionato en el reactor UASB no parece estar relacionada con una inhibición debida al sulfuro. Sin embargo, las velocidades específicas de consumo de acetato y propionato obtenidas fueron hasta once veces menores a la obtenida para el lactato, indicando que estas diferencias importantes pudieron afectar a la respuesta respiratoria del PSR cuando se incrementó la velocidad de carga. Los hallazgos encontrados en estos ensayos son innovadores, ya que a diferencia de otros trabajos donde solo se sugiere una posible

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!



inhibición del sulfuro cuando hay una disminución en las eficiencias de consumo, en este trabajo se muestra evidencia que indicó lo contrario. Emplear la relación mg S-sulfuro/biomasa en reactores continuos podría ayudar a identificar un efecto inhibitorio del sulfuro.

En el análisis de la dinámica de comunidad en cultivo continuo se encontró que el estado estacionario respiratorio estuvo relacionado con una comunidad microbiana estable. Con el incremento de la velocidad de carga se presentaron pocos cambios en la comunidad microbiana. Los valores de  $C$  mostraron que la comunidad fue hasta 73% similar. Los valores de  $S$  y el índice  $H$  no indicaron un efecto negativo sobre la comunidad microbiana por el incremento de la velocidad de carga y la producción de sulfuro.

Aunque los valores del índice  $J$  tampoco indicaron el predominio de ciertas poblaciones, sí se logra observar una mayor abundancia relativa en las bandas relacionadas con el PSR.

Estos resultados muestran que la disminución en la eficiencia de consumo y rendimiento en el cultivo continuo no estuvo relacionada con cambios en la comunidad microbiana, ni tampoco con un posible efecto tóxico del sulfuro. Por el contrario, queda claro que puede ser fuertemente atribuida a las propiedades cinéticas del cultivo, tales como las bajas velocidades de consumo específicas de acetato y propionato.

A diferencia de otros trabajos, en éste se logró conjuntar el análisis del proceso respiratorio sulfatorreductor y la relación que existe con la composición microbiana, tanto en el estado estacionario respiratorio como a través de los cambios de las condiciones ambientales. Un factor importante al que se le podría atribuir la relación entre el estado estacionario fisiológico y la microbiología observada, pudo ser el uso de las variables de respuesta adecuadas para evaluar la fisiología respiratoria, las cuales permitieron ser más estrictos en definir el estado estacionario respiratorio, en contraste con otros trabajos. Los hallazgos encontrados en la comunidad microbiana mostraron también que es posible mantener una elevada diversidad microbiana en un reactor sulfatorreductor, lo que le confiere estabilidad al proceso. Esto podría ser un avance a nivel práctico, lo que implicaría en un futuro PSR fisiológicamente estables durante más tiempo y alcanzar una rápida recuperación fisiológica bajo cambios drásticos de condiciones. Cuando se tiene un pleno conocimiento del proceso podrían conjuntarse el análisis del proceso respiratorio y el empleo de técnicas moleculares simples para evaluar la dinámica de la comunidad microbiana y tener indicios cuantitativos y cualitativos de las poblaciones microbianas a lo largo del tiempo, y, por ejemplo, identificar si existe riesgo de perder el inóculo bajo cambios drásticos de condiciones. Esto es importante, ya que si se trata de procesos

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

desasimilativos, la recuperación fisiológica y microbiológica del reactor podría tardar un tiempo considerable.

La presencia de cepas relacionadas con bacterias sulfoxidantes, que se mantuvieron en nuestro consorcio independientemente de la velocidad de carga, da evidencia de la factibilidad de emplear procesos integrados de sulfatorreducción y sulfoxidación. Sin embargo, también la presencia de nuevas secuencias encontradas en este estudio da indicio de la escasa información que todavía existe en relación a la capacidad metabólica de muchas cepas no identificadas. Muy posiblemente, a algunas de ellas se les pueda incluso atribuir en el futuro más de una capacidad metabólica (o proceso microbiano), como ya ha ocurrido con otros microorganismos.

Debido a que en este estudio se observó una disminución considerable en las eficiencias de consumo de sulfato y COT en cultivo continuo, dos acciones pueden ser recomendadas con el propósito de incrementar la eficiencia de consumo, de acuerdo con los resultados obtenidos: 1) mantener la relación mg S-sulfuro/g SSV entre 75 y 150 para disminuir la fermentación y evitar la inhibición por sulfuro, y 2) aumentar la velocidad de consumo de acetato por dos medios posibles, ya sea incrementando la concentración de biomasa o incrementando el TRH en el reactor. Una vez lograda la reducción completa no asimilativa de todo el sulfato a sulfuro, este último podría ser oxidado biológicamente a azufre elemental como siguiente propósito.

La relación S-sulfuro/biomasa permitió evaluar la inhibición por sulfuro en un PSR. Considerando esto, sería recomendable realizar más estudios encaminados a explorar el efecto inhibitorio del sulfuro, empleando la relación S-sulfuro/biomasa bajo diferentes condiciones de cultivo. Un ejemplo, podría ser evaluar el efecto inhibitorio del sulfuro a una relación C/S estequiométrica con donadores de electrones sencillos como acetato, propionato y etanol y complejos como melaza. Otro ejemplo, podría ser evaluar el efecto inhibitorio del sulfuro sobre el consumo de sustrato a relaciones C/S mayores que la ensayada en este trabajo. Esos resultados podrían ayudar, a resolver algunos problemas que son atribuidos a la toxicidad del sulfuro, a tener un mejor control para dirigir un proceso y consecuentemente tener procesos más eficientes.

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

## APÉNDICES

### Apéndice 7.1.

#### Curvas de calibración

Para la validación de los métodos se prepararon muestras estándar. Las curvas estándar se realizaron por duplicado para evaluar la reproducibilidad del análisis para cada método analítico. Se calculó la pendiente, el coeficiente de correlación y el coeficiente de variación.

Pendientes, coeficientes de correlación ( $r^2$ ) y coeficientes de variación (C.V.) de las curvas de calibración de los diferentes métodos analíticos

Análisis	Pendiente	$r^2$	C.V. (%)
Sulfato	106.6±4.45	0.9981±0.0004	4.17
Carbono inorgánico	183.5±5.3	0.9993±0.0005	2.91
Carbono total	111.9±0.5	0.9999	0.45
Acetato	506.7±24	0.999±0.0003	4.75
Propionato	849.3±44	0.9998±0.0007	5.23

### Apéndice 7.2.

#### Cuantificación de sulfato por el analizador capilar de iones (CIA-Waters)

Se filtra el electrolito, la solución estándar de concentración conocida, y la muestra problema utilizando un filtro de membrana de tamaño de poro de 0.45 micras. Se depositan 0.5 mL de filtrado en un vial de vidrio, evitando la formación de burbujas. Durante la rutina del análisis en el equipo, después de cada 4 muestras, se incluyó una solución de concentración conocida (20, 40, 60, 80 y 100 ppm) para determinar el estado de calibración del equipo, que a su vez sirvió como estándar de referencia para calcular la concentración de la muestra.

Electrolito de trabajo. Adicionar 3 mL de electrolito 0.3 mM CIA-Pack<sup>TM</sup>OFM Anion BT, pH 8, y 4 mL de una solución de Cromato de Na (100 mM) en un matraz volumétrico de 100 mL y aforar con agua Milli-Q.

Solución estándar de concentración conocida. Preparar una solución de 1000 ppm de  $\text{SO}_4^{=}$  y realizar diluciones para tener intervalos de concentración de 20 a 100 ppm del ión.

### Apéndice 7.3

#### Cuantificación de sulfuro

En un matraz erlenmeyer de 100 mL adicionar 5 mL de solución de yodo, agregar 10 mL de agua destilada y 1 mL de HCl 3N. Enseguida medir un volumen (10 mL) de la

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

muestra problema y adicionarlo. Dejar en reposo durante 10 min. y proceder a titular lentamente con la solución de tiosulfato de sodio, al alcanzar una coloración amarilla en el contenido del matraz adicionar 0.5 a 1 mL del indicador de almidón. Adquirirá una coloración oscura que al continuar la titulación en el punto final cambiará a incoloro (o simplemente hasta observar el vire del color violeta-oscuro debido a la reacción del almidón con el yodo).

Cálculo:  $\text{mg S}^2/\text{L} = [((\text{AXB})-(\text{CXD}))\times 16000]/\text{mL muestra}$

A = mL de la solución de yodo

B = normalidad de la solución de yodo

C = mL de la solución de tiosulfato

D = normalidad de la solución de tiosulfato

Soluciones de sulfuro requeridas:

Solución de tiosulfato de sodio 0.025 N, (para un volumen de 0.5 L). Calentar y mantener en ebullición 0.7 L de agua destilada durante 10 min. Dejar enfriar y guardar. Pesar 3.102 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  disolver en el agua destilada antes mencionada aforando a 0.5 L, guardar en un frasco ámbar y agregar 2.5 mL de tolueno como conservador.

Para su valoración: Pesar 0.25 g de patrón primario  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  previamente secado a 100 °C durante 1 h y aforar a 200 mL. Esta solución tiene una normalidad 0.025 N.

Procedimiento: En 100 mL de agua destilada en un matraz erlenmeyer disolver 1.5 g de KI y 1 g de  $\text{NaCO}_3$  agregar 20 mL de la solución  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ . A continuación agregar 5 mL de HCl concentrado cubrir y dejar en reposo aproximadamente 10 min. Agregar 0.5 a 1 mL de indicador de almidón y titular con la solución preparada de tiosulfato de sodio. Detener la titulación hasta el punto final, dado por el cambio de color canela a azul ligero.

Cálculo:  $\text{N-Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = 20 \text{ mL de dicromato} * \text{N-dicromato} / \text{mL de tiosulfato}$

Solución de yodo 0.025 N. Para un volumen de 0.5 L. Disolver 10 -12.5 g de yoduro de potasio (KI) en un volumen pequeño de agua. Adicionar 1.6 g de yodo ( $\text{I}_2$ ), después de disolver el yodo verter en un matraz aforando con 500 mL de agua destilada. Almacenar en un frasco ámbar.

Para su valoración. En un matraz erlenmeyer poner 20 mL de la solución de yodo. Agregar 1 mL de HCl 3N, dejar en reposo 8 a 10 min. Adicionar unas gotas del indicador

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

de almidón y titular con la solución de tiosulfato. Registrar el volumen de tiosulfato consumido hasta el vire del color.

$$\text{Cálculo: } N\text{-yodo} = (N_{\text{tiosulfato}} * V_{\text{tiosulfato}}) / V_{\text{yodo}}$$

Indicador de almidón. Pesar 3 g de almidón soluble y con un pequeño volumen de agua preparar una emulsión. Verter la emulsión en 500 mL de agua destilada en ebullición, continuar hirviendo durante 3-5 min. Dejar enfriar y sedimentar durante 12 hrs. Recuperar por decantación el líquido claro sobrenadante. Guardar en un frasco ámbar. Se puede preservar usando 0.8 g de ácido salicílico o unas gotas de tolueno.

Interferencia. El método yodométrico puede tener interferencias por la presencia de sustancias reductoras que reaccionan con el yoduro, como por ejemplo el tiosulfato, sulfito y varios compuestos orgánicos. La presencia de ciertos metales, como Hg, Cd, Cu, Mo y Fe, puede dar bajos valores por la sal insoluble del sulfuro que se forma. Para eliminar las interferencias de sustancias solubles (sulfito y tiosulfato) se precipita primero el sulfuro de zinc, se remueve el sobrenadante y se reemplaza con agua destilada. Este procedimiento se puede utilizar también para concentrar el sulfuro.

Para corroborar la reproducibilidad del método se llevaron a cabo mediciones con una concentración de 50, 70 y 100 mg/L de sulfuro.

#### Apéndice 7.4.

##### Cuantificación de carbono total e inorgánico

Se requirió la construcción de dos curvas de calibración, una para el carbono total (0 a 500 mg C-total/L) y otra para carbono inorgánico (0 a 500 mg C-CO<sub>2</sub>/L). Para realizar las curvas de calibración se prepararon diluciones a partir de una solución madre con una concentración de 1000 mg C/L. Para determinar el carbono total se usó ftalato de potasio y para el carbono inorgánico una mezcla de bicarbonato y carbonato de sodio siguiendo las indicaciones del manual del equipo. La validación del método se realizó con cuatro muestras estándar y dos mediciones por muestra. El analizador genera la regresión lineal para cada curva de calibración.

#### Apéndice 7.5.

##### Cuantificación de ácidos grasos volátiles

Para la determinación de acetato y propionato por cromatografía de gases, se prepararon curvas estándar a partir de una solución madre de AGV 5 mM, en viales de 2

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

mL. Se prepararon 9 diluciones a una concentración de acetato de 30 a 270 mg/L y de propionato de 37 a 333 mg/L. Los estándares fueron acidificados con 50 µL de HCl (50%) en un volumen final de 1 mL de muestra.

#### Apéndice 7.6.

##### Cuantificación de metano y dióxido de carbono

Para la cuantificación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en el reactor continuo se consideró el volumen de biogas producido por unidad de tiempo y el porcentaje del biogás. La cuantificación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en cultivo en lote se llevó a cabo mediante el empleo de curvas estándar. Se utilizaron botellas serológicas de 60 mL con 55 mL de solución salina saturada (pH de 2). Se prepararon 5 estándares por duplicado purgando con helio 3 min. y retirando un volumen conocido de helio (0.1 a 1 mL) que fue remplazado con CH<sub>4</sub> o CO<sub>2</sub>. El volumen de inyección de muestra fue de 0.1 mL. Para determinar la concentración de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> se utilizó la ecuación de los gases ideales (V, 31.7 L; T, 25 °C y 0.77 atm).

#### Apéndice 7.7.

##### Determinación de sólidos suspendidos volátiles (SSV)

##### Sólidos suspendidos totales (SST)

$$SST \text{ (g /L)} = (B-A)/V$$

Donde:

A = peso del crisol (g)

B = peso del crisol + residuo (g), secado a 105 °C

V = volumen de muestra (L)

##### Sólidos suspendidos fijos (SSF)

$$SSF \text{ (g /L)} = (C-A)/V$$

C = peso del crisol + residuo (g), incinerado 550 °C

##### Sólidos suspendidos volátiles (SSV)

$$SSV \text{ (g/L)} = SST-SSF$$

#### Apéndice 7.8.

##### Extracción de ADN del lodo usando el paquete UltraClean™ Soil DNA Isolation (MO BIO Laboratories)

##### A. Muestra de lodo

1. Tomar 7 mL de muestra de lodo homogénea del reactor
2. Esperar a que sedimente y desechar el exceso de medio del envase

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

3. Remover el contenido de los tubos Bead y pasarlo a un tubo limpio
4. Pesar el tubo Bead vacío
5. Tomar el sedimento y vaciar en el tubo Bead
6. Centrifugar 1' a 14000 g
7. Eliminar el sobrenadante con una pipeta
8. Pesar aproximadamente 0.5 g de sedimento en el tubo Bead
9. Adicionar de nuevo al tubo la solución Bead

B. Protocolo modificado del paquete de extracción de ADN de lodo

1. Agitar en vortex la mezcla de la solución Bead con el sedimento del lodo 10 seg.
2. Adicionar 60  $\mu$ L de la solución S1. Agitar en vortex 10 seg. Calentar a 70 °C durante 5'.
3. Adicionar 200  $\mu$ L de la solución IRS. Agitar en vortex 10 seg. Calentar a 70 °C durante 5'. Agitar en vortex 10 seg. Calentar a 70 °C durante 5'. Agitar en vortex 10 seg.
4. Centrifugar 1' a 14 000 g. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio. Deben obtenerse aproximadamente 450  $\mu$ L de sobrenadante con 0.25g de lodo.
5. Adicionar 250  $\mu$ L de la sol. S2. Agitar en vortex 5 seg. Incubar en hielo frappe (4 °C) durante 5'.
6. Centrifugar a 14 000 g durante 1'. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
7. Adicionar 1.3 mL de la sol. S3. Agitar en vortex 5 seg.
8. Adicionar 700  $\mu$ L a un tubo con filtro. Centrifugar 1' a 14000 g. Decantar el líquido, limpiar la boca del tubo. Adicionar otros 700  $\mu$ L del sobrenadante al tubo con filtro. Centrifugar 1' a 14 000 g. Repetir el proceso hasta que todo el sobrenadante haya pasado a través del filtro.
9. Adicionar 300  $\mu$ L de la solución S4. Centrifugar 1' a 14 000 g.
10. Decantar el líquido. Centrifugar de nuevo 1' a 14 000 g.
11. Colocar cuidadosamente el filtro en un tubo limpio. Adicionar 50  $\mu$ L de la solución S5 al centro de la columna (acercar la punta al filtro, asegurándose de que las gotas caigan dentro de él).
12. Esperar 2.5' y centrifugar 1' a 14 000 g.
13. Descartar el filtro

Apéndice 7.9.

Electroforesis en gel de agarosa

1. Preparar agarosa al 0.7% en buffer TAE 1X
2. Colocar la agarosa en el horno de microondas durante 1' a máximo.

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

3. Dejar enfriar la agarosa hasta 50 °C.
4. Colocar las gomas en las orillas de la cámara de preparación del gel para sellarlo y colocar el peine correspondiente.
5. La agarosa se vacía en la cámara y se deja hasta que solidifique. (20-25 °C).
6. Cuando el gel a polimerizado, se retira el peine y las gomas y el gel se coloca en la cámara de electroforesis con buffer TAE.
7. Preparar las muestras y el marcador de peso molecular e introducir en los pozos.
8. Correr la electroforesis a 90 V durante 30 min.
9. Sacar el gel de la cámara de electroforesis y teñirlo incubándolo en una solución de bromuro de etidio (10 mg/mL) de 10-15 min.
10. Visualizar el gel con luz UV.

#### Soluciones

##### Agarosa 0.7%

50 mL TAE 1X

0.35 g agarosa

##### Buffer TAE. Solución para geles 1X

20 mL Solución Stock 50X

1000 mL Agua estéril

##### Buffer TAE. Solución Stock 50X

242 g TRIS Base

57.1 mL Ácido acético glacial

100 mL EDTA 0.5 M pH=8

1000 mL Agua desionizada y desmineralizada

Filtrar con filtros Millipore 0.45 µm y esterilizar a 15 lb. durante 20 min.

#### Apéndice 7.10.

##### Reacción de PCR para RAPD

Componentes de la reacción	Volumen para 50 µL
Agua	35.5 µL
Amortiguador sin magnesio 10X	5 µL
Cloruro de magnesio 25 mM	5 µL
Mezcla de nucleótidos 10 mM de cada dNTP	1 µL

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!



Taq ADN polimerasa (5u/ $\mu\text{L}$ )	0.5 $\mu\text{L}$
Iniciador (20 pmol/ $\mu\text{L}$ )	2 $\mu\text{L}$
ADN de lodo (200 ng/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$

**pdfMachine**

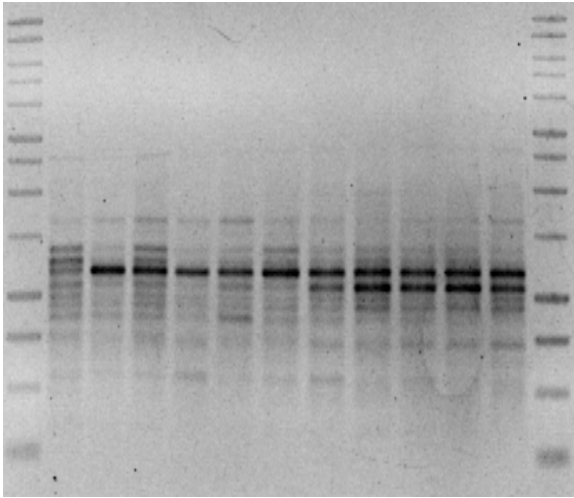
**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

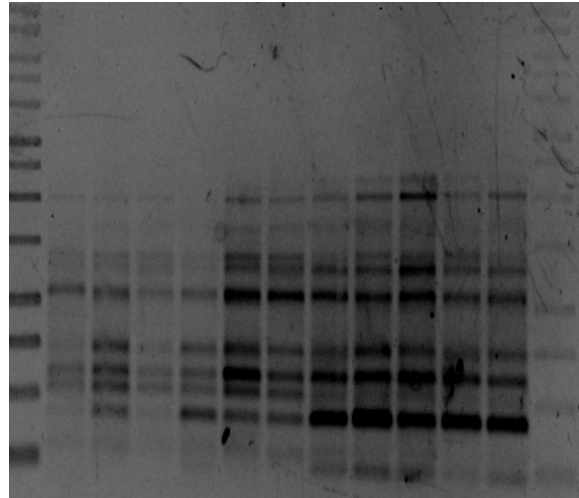
Apéndice 7.11.

Fotografías de los geles obtenidos por la técnica de RAPD

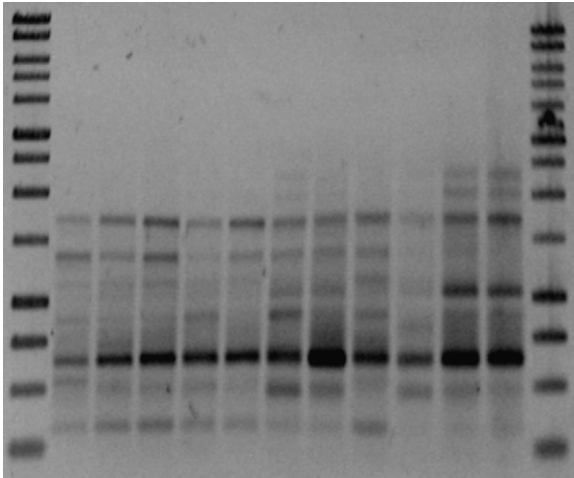
Iniciador F01



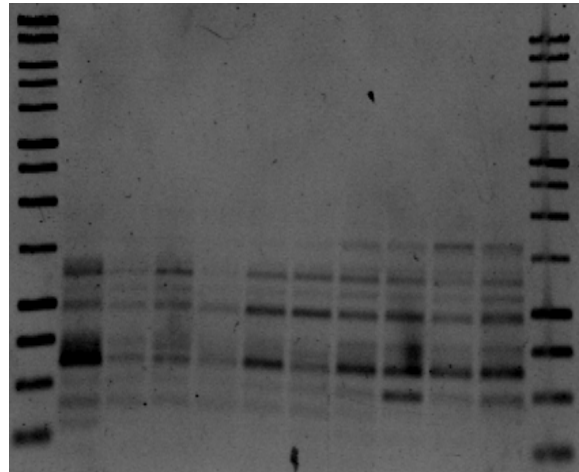
Iniciador 6.9



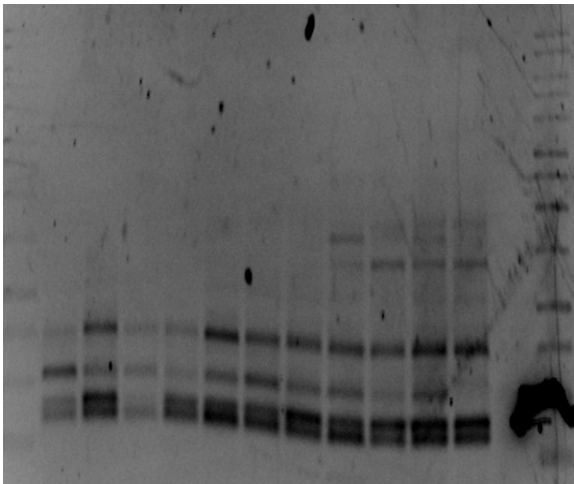
Iniciador 6.3



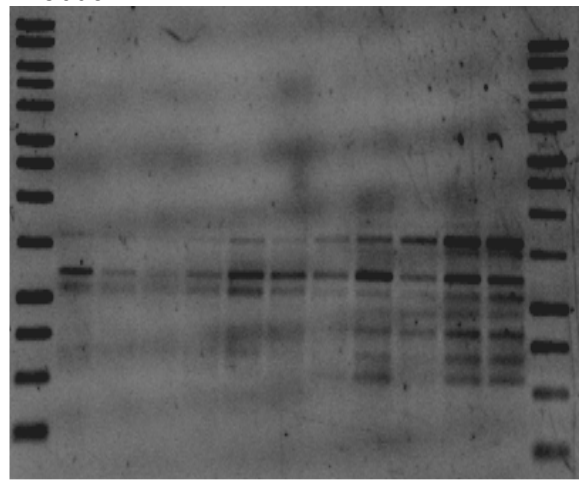
Iniciador 6.2



Iniciador 6.1



IniciadorLE

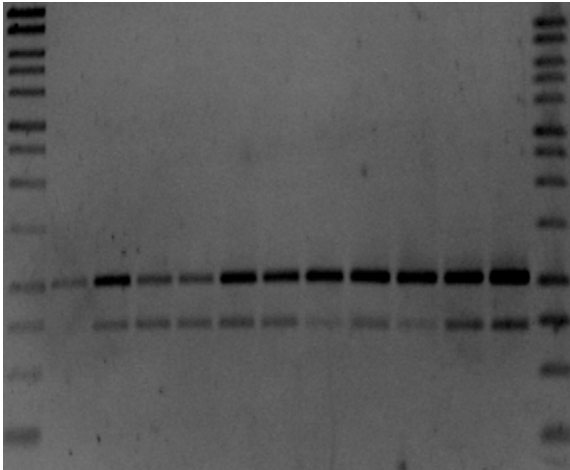


pdfMachine

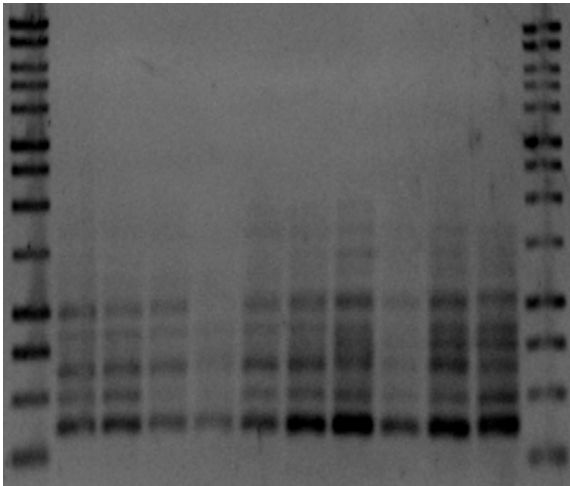
A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

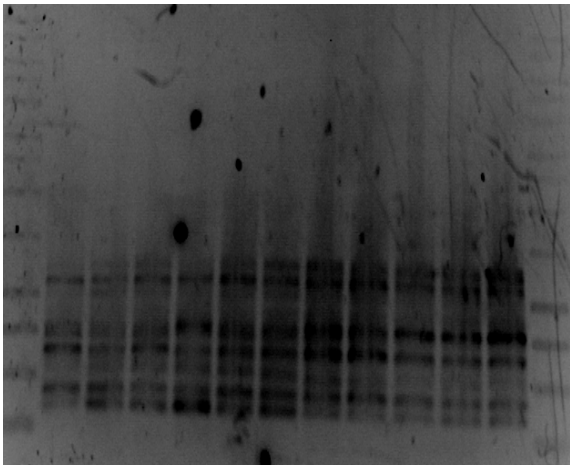
Iniciador 6.10



Iniciador A09



Iniciador 6.6



**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Apéndice 7.12.

Reacción de PCR para DGGE

Componentes de la reacción	Volumen para 50 $\mu\text{L}$
Agua	28.7 $\mu\text{L}$
Amortiguador sin magnesio 10X	10 $\mu\text{L}$
Cloruro de magnesio 25 mM	3 $\mu\text{L}$
Mezcla de nucleótidos 10 mM de cada dNTP	1 $\mu\text{L}$
Taq ADN polimerasa (5u/ $\mu\text{L}$ )	0.3 $\mu\text{L}$
Iniciador f (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$
Iniciador r (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$
ADN de lodo (200 ng/ $\mu\text{L}$ )	5 $\mu\text{L}$

Apéndice 7.13.

Índices ecológicos

En esta tabla se presenta un ejemplo para calcular los índices ecológicos  $H$  y  $J$ .

Supongamos que se tienen cinco cepas con su respectiva abundancia.

Cepa	Abundancia	Pi	Pi ln(Pi)
1	n1=50	0.5	-0.347
2	n2=30	0.3	-0.361
3	n3=10	0.1	-0.230
4	n4=9	0.09	-0.217
5	n5=1	0.01	-0.046
<b>S= 5</b>	<b>N= 100</b>	$\Sigma P_i = 1$	<b>-H= -1.201</b>

Sustituyendo los valores en las ecuaciones de  $H$  y  $J$  que se presentan en la sección 3.5.5 se obtiene:

$$H = 1.201$$

$$J = 0.746.$$

Supongamos que se quiere saber la similitud ( $C$ ) entre dos comunidades microbianas. Se construye una matriz binaria de 0 y 1 obtenida de un patron de bandas de la técnica de RAPD usando solo un iniciador.

<b>Banda</b>	<b>Comunidad microbiana 1</b>	<b>Comunidad microbiana 2</b>
1	0	1
2	1	0
3	1	1
4	1	0
5	0	1
6	1	1
7	1	0
8	1	1
9	0	1
10	0	1
11	1	1

Sustituyendo los valores en la ecuación presentada en la sección 3.5.5 para el cálculo de  $C_{(1,2)}$ .

Donde:

$$N_{(1,2)} = 4$$

$$N_{(1)} = 7$$

$$N_{(2)} = 8$$

Se obtiene:

$$C_{(1,2)} = 2(4)/(7+8) = 0.53$$

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

México, D.F. a 20 de junio de 2008

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la  
Unidad Iztapalapa aprobó la Tesis

**ESTUDIO FISIOLÓGICO Y MOLECULAR DE UN CONSORCIO MICROBIANO EN  
CONDICIONES SULFATORREDUCTORAS**

Que presentó  
**Citlali García Saucedo**

**Comité Tutorial:**

Director: Dr. Gregorio Jorge Gómez Hernández

Co-Director: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Asesora: Dra. Flor de María Cuervo López

Asesor: Dr. Germán Buitrón Méndez

**Jurado:**

Presidente: Dr. Simón González Martínez

Secretaria: Dra. Flor de María Cuervo López

Vocal: Dra. Beatriz Rendón Aguilar

Vocal: Dr. Dr. Germán Buitrón Méndez

The image shows four horizontal lines, each with a handwritten signature written over it. The signatures are in black ink and appear to be the names of the jury members: Simón González Martínez, Flor de María Cuervo López, Beatriz Rendón Aguilar, and Germán Buitrón Méndez.