



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATO DE
SEDIMENTOS COSTEROS COMO UNA
ALTERNATIVA PARA LA GENERACIÓN DE
ENERGÍA RENOVABLE

Tesis que presenta:

I.B.Q. Muriel Elisa González Muñoz

Con opción al título de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán

(Febrero de 2015)

A mi madre, por su amor y apoyo incondicional,
a mi padre, por las enseñanzas que vivirán para siempre,
a José y Carolina, mis segundos padres.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades realizadas durante el periodo que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C, y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal de Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivares de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por los dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor, Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de los expuesto en la presente declaración.

Mérida, Yucatán. Febrero de 2015.

I.B.Q. Muriel Elisa González Muñoz

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LAS UNIDADES DE ENERGÍA RENOVABLE Y BIOTECNOLOGÍA DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN A.C., BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. RUBY ALEJANDRA VALDEZ OJEDA Y LA COODIRECCIÓN DE LA DRA. BLONDY BEATRÍZ CANTO CANCHÉ.

Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, la Dra. Ruby Alejandra Valdez Ojeda, por todo su apoyo y enseñanzas, pero sobre todo, por su gran paciencia y dedicación. A mi coodirectora de tesis, la Dra. Blondy Beatríz Canto Canché, por sus invaluable consejos y toda la ayuda brindada.

A mis asesores, el Dr. Roberto Briones Gallardo y el Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado, por su gran interés, así como por todo el conocimiento compartido y sus excelentes recomendaciones. Agradezco también a la Dra. Liliana María Alzate Gaviria y la Dra. María del Carmen Ponce Caballero por todas las valiosas aportaciones realizadas a esta tesis.

Al Dr. David Valdez y al laboratorio de química marina del CINVESTAV por la ayuda otorgada.

Al M.C. Jorge Arturo Domínguez Maldonado, técnico de la unidad de energía renovable, por todo el apoyo brindado durante la elaboración de esta tesis y por las grandes lecciones enseñadas.

A los técnicos, Tanit Toledano Thompson (UER), así como a Miguel Tzec Simá y Bartolomé Chi Manzanero (UBT) por toda la ayuda prestada.

A la Dra. Rosa María Escobedo García Medrano por las instalaciones y equipo prestado durante el desarrollo experimental de la presente tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca nacional No. 345750 y la beca No. 21892 correspondiente al proyecto CB-2011/166371: "Diversidad Molecular de Microorganismos en Sedimentos y Aguas de la Costa Yucateca con Capacidad para la Producción de Bioenergía" a cargo de la Dra. Ruby Alejandra Valdez Ojeda, a la que agradezco infinitamente las facilidades otorgadas.

A mis familiares y amigos, por toda la compañía y el apoyo que me han dado durante esta travesía.

ÍNDICE

ÍNDICE	II
LISTADO DE TABLAS	III
LISTADO DE FIGURAS	IV
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
I. ANTECEDENTES.....	5
I.1. El sulfuro como fuente de energía renovable.....	5
I.1.1. Sulfurogénesis	7
I.1.2. Obtención de hidrógeno	9
I.1.3. Obtención de electricidad	10
I.2. Diversidad y metabolismo de las bacterias reductoras de sulfato	15
I.2.1. Diversidad	17
I.2.2. Reducción de sulfato por vía desasimilatoria.....	19
I.2.3. Metabolismo del carbono y obtención de energía	20
I.3. Hipótesis.....	23
II. METODOLOGÍA	25
II.1. Estrategia experimental	25
II.2. Descripción de los sitios de colecta	25
II.3. Colecta de sedimento	26
II.4. Obtención de cultivos	27
II.5. Cinética de producción de sulfuro.....	28
II.5.1. Balance de masa y actividad reductora de sulfato.....	29

II.5.2. Análisis de riqueza y diversidad de especies.....	29
II.6. Análisis estadístico	32
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
III.1. Colecta de sedimentos	35
III.2. Obtención de cultivos productores de sulfuro	40
III.3. Cinética de producción de sulfuro.....	46
III.3.1. Cinética del cultivo PD-102.	46
III.3.2. Cinética del cultivo SC-469	52
III.3.3. Cinética del cultivo SD-636	56
III.3.4. Producción de sulfuro in vitro vs. concentración de sulfuro in situ	60
III.3.5. Balance de masa y evaluación de la actividad reductora de sulfato ...	63
III.3.6. Análisis de gases	65
III.3.7. Análisis de riqueza y diversidad de especies de BRS	67
CONCLUSIÓN	79
PERSPECTIVAS.....	81
REFERENCIAS.....	83
ANEXO 1	99
ANEXO 2	101
ANEXO 3	103
ANEXO 4	105

LISTADO DE TABLAS

Tabla I-1. Bioenergía generada por microorganismos.....	6
Tabla I-2. Reacciones de oxidación acopladas a la reducción de sulfato.....	21
Tabla III-1. Caracterización de agua y sedimento en Progreso.....	35
Tabla III-2. Caracterización de agua y sedimentos en Sisal.....	36
Tabla III-3. Caracterización de agua y sedimentos en Dzilam de Bravo.....	36
Tabla III-4. Sedimentos seleccionados como inóculo para la producción de sulfuro.	46
Tabla III-5. Balance de masa y evaluación del desempeño de los cultivos PD-102, SC-469 y SD-636.....	63
Tabla III-6. Pureza del ADN extraído de PD-102, SC-469 y SD-636.....	68
Tabla III-7. Número de bandas, distancia relativa y matriz de patrón de bandeo.	72
Tabla III-8. Riqueza de BRS en los cultivos PD-102, SC-469 y SD-636.....	75

LISTADO DE FIGURAS

Figura I-1. Digestión anaerobia sulfurogénica y metanogénica	8
Figura I-2. Esquema de generación de electricidad de una celda de combustible bentónica en el que participan BRS reductoras de sulfato y oxidadoras de azufre	13
Figura I-3. Esquema de funcionamiento de una celda de combustible microbiana que emplea BRS y bacterias oxidadoras de azufre de forma acoplada	13
Figura I-4. Reacciones biológicas involucradas en el ciclo del azufre en las que participan bacterias reductoras de sulfato	16
Figura I-5. Diversidad de bacterias reductoras de sulfato según la secuencia nucleotídica del gen RNA ribosomal 16S	18
Figura I-6. Reducción de sulfato por vía desasimilatoria en <i>Desulfovibrio</i> spp.	19
Figura I-7. Metabolismo del lactato acoplado a la reducción de sulfato por vía desasimilatoria en <i>Desulfovibrio</i> spp.	22
Figura III-1. Sedimentos colectados en Progreso.....	38
Figura III-2. Sedimentos colectados en Sisal.	39
Figura III-3. Sedimentos colectados en Dzilam de Bravo.	40
Figura III-4. Cultivos productores de sulfuro establecidos en lactato, acetato, benzoato y etanol a partir de sedimentos marinos costeros colectados en el puerto de Progreso.	43
Figura III-5. Cultivos productores de sulfuro establecidos en lactato (rojo), acetato (amarillo), benzoato y etanol a partir de sedimentos marinos costeros colectados en el puerto de Sisal.....	44
Figura III-6. Cultivos productores de sulfuro establecidos en lactato, acetato, benzoato y etanol a partir de sedimentos marinos costeros colectados en el puerto de Dzilam de Bravo.	45
Figura III-7. Cinética de producción de sulfuro, pH y Eh, consumo de sulfato, producción de ácidos grasos volátiles (AGVs), y consumo de lactato del cultivo PD-102..	48
Figura III-8. Cinética de producción de sulfuro, pH y Eh, consumo de sulfato y producción de ácidos grasos volátiles (AGVs), y consumo de lactato del cultivo SC-469	53

Figura III-9. Cinética de producción de sulfuro, pH y Eh, consumo de sulfato y producción de ácidos grasos volátiles (AGVs), y consumo de lactato del cultivo SD-636.	57
Figura III-10. Ácidos grasos volátiles (AGVs) totales, ácido acético y ácido propiónico del cultivo SD-636.	59
Figura III-11. Cinética de producción de sulfuro de los cultivos PD-102, SC-469 y SD-636 contra el control.	61
Figura III-12. Intensidad de señal de metano hallada por cromatografía de gases en los cultivos PD-102, SC-459 y SD-636.	66
Figura III-13. Extractos de ADN obtenidos de los cultivos empleados para las cinéticas de producción de sulfuro de PD-102, SC.469 y SD-636.	67
Figura III-14. Amplificación del gen <i>dsrB</i> a partir de ADN metagenómico de PD-102, SC-469 y SD-636.	68
Figura III-15. Efecto de la purificación de amplicones del gen <i>dsrB</i> para la remoción de dímeros de PCR.	69
Figura III-16. Adición de pinza de guaninas y citosinas al gen <i>dsrB</i> (gen GC+ <i>dsrB</i>) obtenido a partir del ADN correspondiente a los cultivos PD-102, SC-469 y SD-636.	70
Figura III-17. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante de urea-formamida (60 – 70%) realizada a los fragmentos del gen GC + <i>dsrB</i> obtenidos a partir del ADN de los cultivos PD-102, SC.469 y SD-636.	71
Figura III-18. Dendograma construido a partir de los perfiles de bandeo del gen GC+ <i>dsrB</i> obtenidos por EGGD.	74
Figura III-19. Gráfica de correlación entre la concentración de sulfuro alcanzada <i>in vitro</i> contra la riqueza de OTUs detectadas mediante EGGD del gen GC+ <i>dsrB</i> en los cultivos PD-102, SC-469 y SD-636.	75
Figura III-20. Gráfica de correlación entre la producción de sulfuro <i>in vitro</i> contra la diversidad de Shannon-Weaver encontrada en los cultivos PD-102, SC-469 y SD-636.	76

RESUMEN

El sulfuro de hidrógeno (H_2S) producido por las bacterias reductoras de sulfato (BRS) es una alternativa atractiva para la producción de energía renovable. A pesar de que las BRS son microorganismos de fácil acceso por su ubicuidad en los sedimentos marinos costeros, su potencial para producir sulfuro en condiciones de laboratorio no ha sido estudiado a profundidad. En consecuencia, tres sedimentos (PD-102, SC-469 y SD-636) fueron empleados como inóculo en medio Postgate B con la finalidad de evaluar su capacidad sulfurogénica. Los resultados obtenidos indicaron que la fase estacionaria en la producción de sulfuro se alcanzó más rápidamente en el cultivo PD-102, seguido de SD-636 y SC-469, con una concentración final de 140, 220 y 366 ppm (4.32, 11.44 y 7.09 mM), respectivamente. SC-469 alcanzó eficiencias de reducción de sulfato del 100%, mientras que SD-636 logró alcanzar eficiencias cercanas al 80%; PD-102 mostró las menores eficiencias, sobrepasando ligeramente el 50%. El rendimiento de oxidación de lactato fue de 0.23, 1.13 y 0.37 moles de sulfuro por mol de lactato consumido para PD-102, SC-469 y SD-636. Así, se determinó que SC-469 tiene mayor capacidad para emplear los electrones provenientes del lactato para la formación de sulfuro. Adicionalmente, se encontró evidencia de actividad fermentativa y metanogénica en los cultivos. De acuerdo a los resultados, SC-469 fue el cultivo que mostró un mejor desempeño en cuanto a la producción de sulfuro se refiere, el cual puede ser aprovechado para la generación de energía renovable. Adicionalmente, se observó que la diversidad de especies puede estar relacionada con la producción de sulfuro.

De forma paralela, se obtuvo una colección de cultivos productores de sulfuro empleando diferentes fuentes de carbono a partir de sedimentos marinos provenientes de zonas costeras donde las BRS no han sido estudiadas de forma extensiva.

ABSTRACT

Hydrogen sulfide (H_2S) produced by sulfate-reducing bacteria (SRB) is an attractive alternative to generate renewable energy. SRB are quite accessible as they are ubiquitous in marine sediments nevertheless its potential to produce sulfide at laboratory conditions has not been thoroughly assessed. Therefore, three different sediments (PD-102, SC-469 and SD-636) were used as inoculum in Postgate's B medium to evaluate its sulfide production capacity. We found that sulfide production reached the stationary phase more rapidly in PD-102 cultures, followed by SD-636 and SC-469, with a final concentration of 140, 220 and 366 ppm (4.32, 11.44 and 7.09 mM), respectively. SC-469 achieved 100% of theoretical conversion of sulfate to sulfide. Meanwhile a conversion of 80% and 50% was accomplished by SD-636 and PD-102. The sulfate reduction ratio was of 0.23, 1.13 and 0.37 moles of sulfate per mole of lactate for PD-102, SC-469 and SD-636, respectively, as an indicator that SC-469 was the culture with more capability to drive the electron flux to sulfide formation. Additionally, evidence of fermentation and methanogenic activity was observed. According to results, SC-469 culture showed the best performance for sulfide production, which is suitable for renewable energy generation. Furthermore, we observed that sulfide productivity might be related with species diversity.

In addition, a collection of sulfide producing cultures with different carbon sources was obtained from marine sediments of a coastal zone where SRB had not been studied extensively.

INTRODUCCIÓN

El sulfuro de hidrógeno (H_2S) es bien conocido por su toxicidad y mal olor. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto que posee un alto potencial para generar energía renovable [1, 2]. Convenientemente, el H_2S puede ser empleado para la obtención de hidrógeno, a través de la descomposición de la molécula en azufre e hidrógeno molecular [3]. Por otro lado, el sulfuro, en cualquiera de sus formas, puede ser empleado para la producción de electricidad en celdas electroquímicas [2]. Inclusive, es posible utilizar bacterias productoras de sulfuro para producir electricidad a partir de la oxidación de la materia orgánica en celdas de combustible microbianas [4]. Estas bacterias se conocen como bacterias reductoras de sulfato (BRS) y se les atribuye la producción de alrededor del 50% del sulfuro presente en la naturaleza [5].

Las BRS se caracterizan por emplear al ion sulfato como aceptor final de electrones en su cadena respiratoria, lo que trae como consecuencia la formación del sulfuro. Los electrones empleados para reducir el sulfato (SO_4^{2-}) a sulfuro (S^{2-}) son obtenidos a partir de la oxidación de compuestos orgánicos. Es por esto que las BRS habitan comúnmente en ambientes anóxicos ricos en sulfato y materia orgánica. Estos microorganismos son capaces de degradar una gran variedad de compuestos, tales como ácidos grasos, alcoholes y compuestos aromáticos, pero presentan particular afinidad por el lactato [5, 6]. Muchos de los compuestos mencionados abundan de manera natural en los sedimentos marinos y lagunares, sitios donde las BRS son prolíferas. Es de destacar que en sedimentos que reciben aportes nutrimentales de naturaleza antropogénica, la presencia de BRS es más profusa [6, 7].

Las regiones costeras se caracterizan por su alta población y urbanización. Esto se debe a la abundancia de recursos, además de que fungen como puertos de comunicación y comercio con otras poblaciones [8]. Es por esto que muchas ciudades costeras son puntos de concentración de nutrientes por efecto de la actividad humana [9], lo que las torna en sitios atractivos para la obtención de consorcios microbianos ricos en BRS. A pesar de lo expuesto, la utilización de BRS de sedimentos marinos costeros para la producción de sulfuro ha sido poco estudiada.

El presente trabajo tiene como objetivo obtener una colección de sedimentos marinos costeros en sitios con distintos aportes nutrimentales y a partir de ellos, obtener cultivos productores de sulfuro en cuatro fuentes de carbono distintas. A su vez, se

cuantificará la producción de sulfuro *in vitro* alcanzada por tres cultivos sulfurogénicos inoculados con sedimentos con diferentes concentraciones de sulfuro *in situ*. Esto último, se realizará para conocer si existe una relación entre la cantidad de sulfuro encontrado en los sedimentos costeros y la cantidad de sulfuro que se puede producir en el laboratorio a partir de BRS cultivables aisladas de éstos. De igual forma, la construcción de cinéticas de sulfuro y el monitoreo continuo de diversos parámetros físico-químicos en dichos cultivos, brindarán información valiosa acerca de su comportamiento y de la capacidad que poseen para producir sulfuro como fuente de energía renovable.

OBJETIVOS

Objetivos generales

1. Obtener cultivos mixtos productores de sulfuro a partir diferentes fuentes de carbono, empleando como inóculo sedimentos marinos costeros de sitios con diferentes condiciones eutróficas.
2. Estudiar la cinética de producción de sulfuro de diferentes cultivos mixtos ricos en bacterias reductoras de sulfatos, obtenidos a partir de sedimentos marinos costeros con diferentes concentraciones de sulfuro *in situ*.

Objetivos particulares

- 1.1. Obtener cultivos mixtos en un medio selectivo para bacterias reductoras de sulfato empleando lactato, acetato, benzoato y etanol como fuente de carbono, y usando como inóculo sedimentos obtenidos en sitios clasificados con eutrofización alta, media y baja.
- 2.1. Estudiar las cinéticas de producción de sulfuro en cultivos mixtos establecidos en un medio selectivo para bacterias reductoras de sulfato con lactato como fuente de carbono, empleando como inóculo sedimentos que posean diferentes concentraciones de sulfuro.
- 2.2. Determinar la eficiencia de la reducción de sulfato en los cultivos.
- 2.3. Comprobar la presencia de bacterias reductoras de sulfatos y así determinar la riqueza, así como la diversidad de especies de estos microorganismos en los cultivos.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

I.1. El sulfuro como fuente de energía renovable

En 2012, se registró una demanda energética mundial de 13.2 Gtoe, lo que equivale a un aumento del 50%, si se compara con los 8.8 Gtoe registrados en 1990. Se ha pronosticado que, bajo las políticas actuales de consumo, la demanda energética continuará aumentando hasta alcanzar los 18.7 Gtoe en 2035 [10]. Hoy en día, más del 80% de la energía demandada en el mundo es obtenida de los combustibles fósiles [10, 11]. Esto generó la emisión de 31.5 Gton a la atmósfera en 2012 y se espera que, en 2035, se emitan 44.1 Gton de CO₂ por el mismo concepto [10]. Debido a que este gas invernadero es el principal responsable del cambio climático, es necesario realizar esfuerzos para disminuir sus emisiones [12]. Adicionalmente, se calcula que las reservas de combustibles fósiles se agotarán en 35, 37 y 107 años, refiriéndose respectivamente al petróleo, gas natural y carbón. Todo lo anterior, aunado al aumento de precios que se ha observado en los últimos años [13], resulta en la imperante necesidad de encontrar fuentes de energía que sean renovables y benévolas con el medio ambiente.

Desde hace algunas décadas, la generación de energía alternativa a partir de microorganismos ha cobrado importancia. Lo anterior se debe a que se pueden emplear para generar una amplia gama de bioenergéticos, entre los que se encuentran el metano, el hidrógeno, diversos alcoholes, alcanos, aceites, ésteres metílicos o etílicos (biodiesel), e inclusive electricidad (Tabla I-1) [14, 15]. En comparación con los bioenergéticos de origen agrícola, los microorganismos poseen altas tasas de crecimiento, lo que posibilita la obtención de biocombustibles en cortos periodos de tiempo, además de que no se requiere de suelo agrícola durante su producción. Otra característica muy interesante sobre los microorganismos es que pueden ser empleados para obtener energía directamente del sol, así como de la materia orgánica, la cual incluye una gran variedad de desechos derivados de la actividad humana [16]. Esto último, resulta muy atractivo, ya que el uso de microorganismos puede contribuir de forma simultánea a la generación de energía renovable y a la remediación de residuos generados por el hombre.

Tabla I-1. Bioenergía generada por microorganismos.

Bioenergéticos	Ruta metabólica	Dominio
Etanol y otros alcoholes	Fermentación	<i>Bacteria y Eucaria</i>
Biodiesel	Biosíntesis de ácidos grasos	<i>Bacteria y Eucaria</i>
Hidrógeno	Respiración anaerobia Digestión anaerobia Biofotólisis Fotofermentación	<i>Archaea, Bacteria y Eucaria</i>
Metano	Respiración/digestión anaerobia	<i>Archaea y Bacteria</i>
Electricidad	Respiración anaerobia	<i>Archaea y Bacteria</i>

Obtenido de [14, 15]

A esta lista de bioenergéticos se le suma el sulfuro de hidrógeno (H_2S), que ha cobrado importancia como fuente de energía en las últimas décadas [1, 17]. El H_2S es una especie azufrada completamente reducida, con un número de oxidación de -2. Puede encontrarse también como ion sulfhidrilo (HS^-) o como ion sulfuro (S^{2-}), dependiendo de las condiciones de acidez y potencial redox del medio [18]. Se produce naturalmente por vía geológica y biosintética y se estima que más del 50% se produce por actividad microbiana [5, 19]. Se caracteriza por ser altamente tóxico, sin embargo, posee un alto potencial para generar energía [1]. Cabe mencionar que su producción por vía biosintética, se realiza a partir de la degradación de la materia orgánica, mediante un proceso denominado sulfurogénesis [19, 20]. El H_2S producido en dicho proceso puede emplearse para la obtención de hidrógeno mediante la descomposición de la molécula por diversas vías [1]. De igual forma, el ion sulfuro puede fungir como un acarreador de electrones en una celda de combustible microbiana y así, obtener la energía almacenada en la materia orgánica en forma de electricidad [4, 17].

En los siguientes apartados, se describen algunos aspectos de la sulfurogénesis y se presenta un panorama sobre los últimos avances en lo referente a la generación de energía a partir del sulfuro.

1.1.1. Sulfurogénesis

Las digestiones anaerobias han sido empleadas desde hace más de 100 años para la remoción de materia orgánica de residuos tanto líquidos como sólidos [21]. Estas consisten en la degradación secuencial de compuestos orgánicos complejos hasta formar compuestos sencillos, en ausencia de oxígeno libre [22].

De forma clásica, se pueden distinguir cuatro etapas principales: 1) La hidrólisis, que consiste en la degradación de polisacáridos, proteínas y lípidos a azúcares sencillos, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga; 2) la acidogénesis, donde azúcares, aminoácidos y ácidos grasos producidos en la hidrólisis son transformados en ácidos orgánicos y alcoholes de bajo peso molecular (lactato, butirato, propionato, etanol, etc.); 3) la acetogénesis, donde los productos de la etapa anterior son convertidos en ácido acético e hidrógeno por bacterias que se denominan acetogénicas; y por último, 4) la metanogénesis, donde las bacterias metanogénicas acetoclásticas e hidrogenotróficas, transforman el ácido acético, y el hidrógeno y CO₂ en metano, respectivamente [14, 22-24].

Como producto se obtiene biogás, el cual posee un alto valor energético (18.63 MJ m⁻³). Este está conformado en su mayoría por metano (50 – 80%) y CO₂, así como por trazas de hidrógeno, amoníaco y sulfuro de hidrógeno [14, 25]. Estos últimos dos compuestos se obtienen por la actividad de dos grupos de bacterias, las bacterias reductoras de nitratos y las bacterias reductoras de sulfato (BRS). Dichos grupos bacterianos compiten con las bacterias metanogénicas por el uso de sustratos (acetato e hidrógeno, principalmente) [5, 19, 23, 24]. En ciertos sistemas anaerobios, donde la concentración de sulfato es elevada (generalmente con una relación DQO/SO₄²⁻<1), la metanogénesis es inhibida y prospera la producción de sulfuro a partir de sulfato (sulfurogénesis) (Figura I-1) [26-28].

La sulfurogénesis o biosulfurogénesis consiste en la producción biológica de sulfuro mediante procesos metabólicos de reducción [20]. En este proceso, las BRS oxidan ácidos orgánicos y alcoholes de bajo peso molecular para obtener energía en forma de ATP; el sulfuro se forma cuando los electrones desprendidos en la oxidación son transferidos al sulfato, que es empleado como aceptor final en la cadena respiratoria. En los sedimentos marinos y de agua dulce, la sulfurogénesis ocurre de forma natural. También se encuentra presente en digestores anaerobios de residuos e inclusive, en el tracto digestivo de los mamíferos [6].

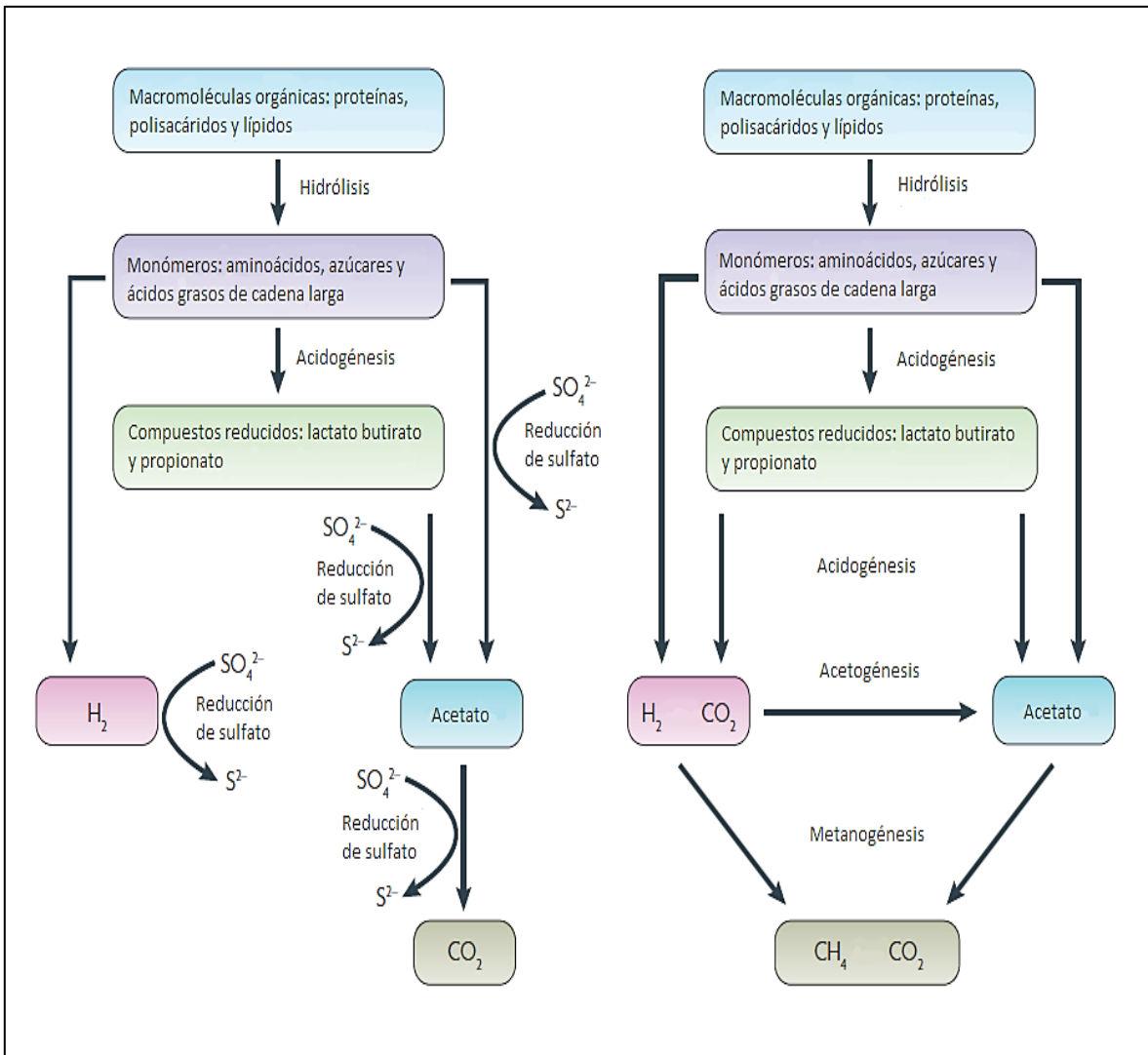


Figura I-1. Digestión anaerobia sulfurogénica y metanogénica [5].

En las últimas décadas, el interés en la sulfurogénesis se ha acrecentado, ya que permite el tratamiento de una variedad de residuos ricos en sulfato y materia orgánica [29]. Algunos ejemplos son las melazas [30] y las aguas residuales derivadas de la industria del caucho [31]. De forma similar, se ha estudiado la producción de sulfuro a partir de residuos de la industria textil (manufactura de fibras de acrílico) [29]. También, la sulfurogénesis tiene un gran potencial para remover las altas concentraciones de sulfatos de las aguas residuales mineras, las cuales son pobres en materia orgánica, por lo que es necesaria la incorporación de una fuente de carbono que permita la reducción del sulfato [32]. Algunos residuos empleados como fuente de carbono son los efluentes derivados la industria vinícola y de lácteos [33], así como residuos agroforestales, pastos y bagazo

[32]. La sulfurogénesis también ha sido aplicada para la remediación de fosfoyeso (CaSO_4), un residuo derivado de la producción industrial de ácido fosfórico, donde se ha empleado lactato o CO_2 como fuente de carbono [7]. De igual manera, se ha demostrado su capacidad para remover sulfatos de residuos de minas de plomo (anglesita), así como de la desulfuración de gases de combustión del carbón (yeso y hannebachita), adicionando lactato como fuente de carbono [34].

1.1.2. Obtención de hidrógeno

El H_2S es un recurso valioso, ya que a partir de éste es posible obtener energía en forma de hidrógeno (H_2). Lo anterior se logra a través de la descomposición de la molécula, dando como producto hidrógeno y compuestos azufrados [1, 35]. Existen diversas técnicas para cumplir con dicho objetivo, las cuales se clasifican en térmicas, termoquímicas, electroquímicas, fotoquímicas y plasmquímicas, muchas de ellas diseñadas originalmente para obtener hidrógeno de la molécula de agua. Éstas técnicas son fácilmente adaptables para producir hidrógeno a partir del H_2S ($\Delta G^\circ = 33.44 \text{ kJ/mol}$), el cual requiere de menos energía para su descomposición (86% menos) en comparación con el agua ($\Delta G^\circ = 237.19 \text{ kJ/mol}$) [3].

Entre las técnicas de descomposición térmica, el ciclo de Claus es la más común. Éste fue diseñado en 1883 para la recuperación de azufre a partir de H_2S . Como subproducto se obtiene hidrógeno [35, 36], el cual ha sido propuesto como vector energético en décadas recientes. Una desventaja del ciclo de Claus, y de las técnicas térmicas en general, es el consumo de grandes cantidades de combustible para alcanzar las altas temperaturas requeridas ($\sim 800^\circ\text{C}$); sin embargo, es posible obtener dicha energía de una fuente renovable, mediante el uso de concentradores solares [37]. En un esfuerzo por reducir los requerimientos energéticos de las técnicas térmicas e incrementar su rendimiento, se ha empleado el uso de diversos catalizadores, tales como metales (Mo, Cu, Fe, V, etc.), monóxido de carbono y yodo. Estos procesos se conocen como ciclos termoquímicos y algunos de ellos son considerados neutrales en cuanto a emisiones de carbono, como es el caso del ciclo termoquímico del sulfuro-yoduro [1, 37].

Por otro lado, las técnicas electroquímicas tienen como ventaja que la energía necesaria para la descomposición puede obtenerse de fuentes renovables como la solar, y eólica [38]. Sin embargo, los compuestos azufrados que se producen ocasionan la pasivación de los electrodos, mermando el desempeño de los dispositivos

electroquímicos. Las técnicas fotoquímicas, por su parte, tienen como objetivo aprovechar la energía del sol, pero requieren del uso de fotocatalizadores; por eso actualmente se realizan investigaciones para el desarrollo de materiales con dicha finalidad, que van desde polímeros sencillos hasta semiconductores diseñados a escala nanométrica [3, 37, 39]. Por último, están las técnicas plasmquímicas, que como su nombre lo indica, emplean plasma para la descomposición de la molécula de H₂S [37].

1.1.3. Obtención de electricidad

El uso del sulfuro como combustible para la producción de electricidad fue propuesto por primera vez por Habermann y Pommer [40] a principios de la década de los 90. Estos autores emplearon una celda de combustible microbiana (CCM) con un electrolito sólido rico en sulfato, inoculada con un cultivo bacteriano mixto que incluía a la BRS *Desulfovibrio desulfuricans*. En el trabajo mencionado, se propone el aprovechamiento del sulfuro como reservorio de energía. Esto se logra mediante la reducción del sulfato a expensas de la materia orgánica, empleando a *D. desulfuricans* como biocatalizador, de tal forma que los electrones que provienen de la materia orgánica se almacenan en forma de sulfuro, hasta que este último es reoxidado en el ánodo para generar una corriente eléctrica.

Si bien el trabajo de Habermann y Pommer [40] ha resultado trascendental por ser la primera propuesta para el tratamiento de agua residual doméstica y la generación de energía eléctrica de forma simultánea, el aprovechamiento del sulfuro generado por BRS fue dejado de lado en estudios posteriores, centrándose éstos en el desarrollo de CCMs con otro tipo de microorganismos como *E. coli*, *Pseudomonas*, *Shewanella* y *Geobacter* [41-46]. No fue sino hasta una década después, que el papel del sulfuro y las BRS en la generación de electricidad llamaron la atención de la comunidad científica. Esto sobrevino con el desarrollo de las celdas de combustible bénticas (CCB o BUGs por sus siglas en inglés), que son una variante de las CCMs que emplean el gradiente de voltaje que ocurre naturalmente en los sedimentos marinos [4, 47, 48]. Dicho gradiente de voltaje se debe en gran parte a la acumulación de sulfuro en las zonas anóxicas del sedimento por acción de las BRS, que se encuentran a unos cuantos centímetros de profundidad [49].

Al estudiar las comunidades microbianas que proliferaron en una CCB, Reimers *et al.* [50] encontraron que en la parte superior del ánodo (primeros 14 cm) estaba dominada en un 90% por especies del género *Desulfuromonas*. Éstas se encontraron también, pero

en menor proporción (19%), en la parte media (30 – 39 cm), junto con especies de *Desulfocapsa* (16%), ambas BRS. Resultados similares fueron hallados por Bond *et al.* [51], donde el 70% de las secuencias están estrechamente relacionadas con *Desulfuromonas*. En ese mismo trabajo, se observó que un cultivo puro de *Desulfuromonas acetoxidans*, una BRS de origen marino, mostró actividad exoelectrónica al ser inoculada en una CCM en el laboratorio. El término exoelectrónico hace referencia a la capacidad de un microorganismo para sostener su crecimiento empleando un ánodo como único aceptor final de electrones en la cadena respiratoria. Esta característica la comparten especies del género *Geobacter*, que suelen encontrarse en CCMs de agua dulce [42]. Por otro lado, Holmes *et al.* [52] implementaron una CCM en el laboratorio donde se emularon las condiciones de una CCB; esto se logró mediante la colocación de sedimentos dentro de la celda, en los cuales se instaló el ánodo. Como resultado, hallaron que en los sedimentos provenientes de aguas saladas, además de *Desulfuromonas*, en el ánodo proliferaron especies de *Desulfobulbus* y *Desulfocapsa*. También, se ha reportado proliferación de BRS en los bioánodos de CCMs de sedimentos establecidas en el laboratorio, cuando se emplean como inóculo sedimentos tanto de plantas de tratamiento de agua residuales como de origen marino [53, 54].

Casi de forma simultánea, Rabaey *et al.* [17] realizaron estudios sobre la cinética de oxidación de sulfuro en una celda electroquímica, retomando la idea de Habermann y Pommer [40]. De forma muy interesante, encontraron que la adición de sulfuro en el compartimento anódico generó caídas de potencial, las cuales se redujeron conforme decreció la concentración de sulfuro, esto en periodos menores a 24 h. Así, este trabajo comprueba de forma directa lo propuesto por Habermann y Pommer [40], es decir, que el sulfuro tiene la capacidad de producir electricidad en las celdas de combustible. Sin embargo, el trabajo de Rabaey *et al.* [17] demostró que la oxidación del sulfuro no se da de forma completa como se había propuesto, sino que se oxida parcialmente, dando lugar a la formación de azufre. Esto es una desventaja ya que se vio que su acumulación deteriora el desempeño de la celda. Este fenómeno ha sido observado en otros estudios, donde además de azufre elemental, se han hallado otros compuestos azufrados derivados de la oxidación parcial del sulfuro, los cuales pueden interferir en el funcionamiento de los dispositivos electroquímicos [55-58].

Sin embargo, estudios realizados con *Desulfobulbus propionicus* demostraron que esta especie tiene la capacidad de oxidar el azufre (S^0) a sulfato (SO_4^{2-}) empleando un

electrodo como aceptor final de electrones [52, 59]. Esta capacidad metabólica permitiría la reoxidación de las especies azufradas generadas durante la oxidación incompleta del sulfuro en las celdas de combustible. De esta manera, es posible aprovechar toda la energía contenida en el sulfuro y restablecer de manera simultánea la concentración de sulfato, quedando disponible para ser nuevamente reducido por las BRS a expensas de la materia orgánica [60].

Los hallazgos expuestos anteriormente, sentaron las bases para dilucidar los mecanismos de generación de electricidad en las CCB, donde se ha visto que las BRS juegan un papel trascendental. Esto ocurre en tres formas donde 1) el sulfuro generado por las BRS se oxida en el ánodo para dar lugar a una corriente eléctrica, 2) especies exoelectrógenas como *D. acetoxidans* transfieren electrones de forma directa desde la materia orgánica al ánodo y 3) especies oxidadoras de especies azufradas, como *D. propionicus* reoxidan los productos de la oxidación incompleta del sulfuro, transfiriendo directamente los electrones al ánodo (si fuesen exoelectrógenas) y regenerando el sulfato de forma simultánea, el cual podrá ser aprovechado nuevamente por las BRS para formar sulfuro. Esto se observa en la Figura I-2, que esquematiza las reacciones involucradas en las CCB. Dichos mecanismos de generación de electricidad en este tipo de dispositivos han sido corroborados en diversos estudios [47, 60, 61].

El descubrimiento de la participación de bacterias oxidadoras del azufre en las CCB ha conducido a una propuesta más innovadora, que consiste en la implementación de CCMs que empleen BRS, ya que algunas de ellas tienen la capacidad tanto de reducir sulfato como de oxidar azufre. Estas celdas tendrían la ventaja de no emplear mediadores artificiales ya que el sulfato fungiría como tal (CCM de segunda generación). La alternativa mencionada se esquematiza en la Figura I-3 [4]. En años subsiguientes la existencia de este mecanismo fue comprobado en CCMs ricas en BRS, alcanzando densidades de corriente de entre 60 y 80 mA m⁻² [58, 62, 63].

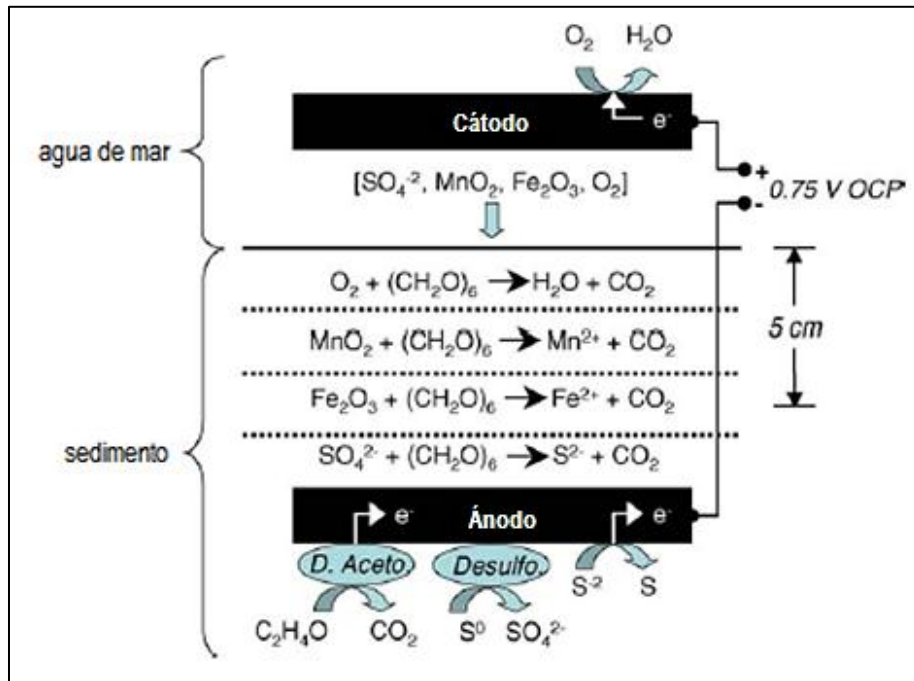


Figura I-2. Esquema de generación de electricidad de una celda de combustible bentónica en el que participan BRS reductoras de sulfato y oxidadoras de azufre [47].

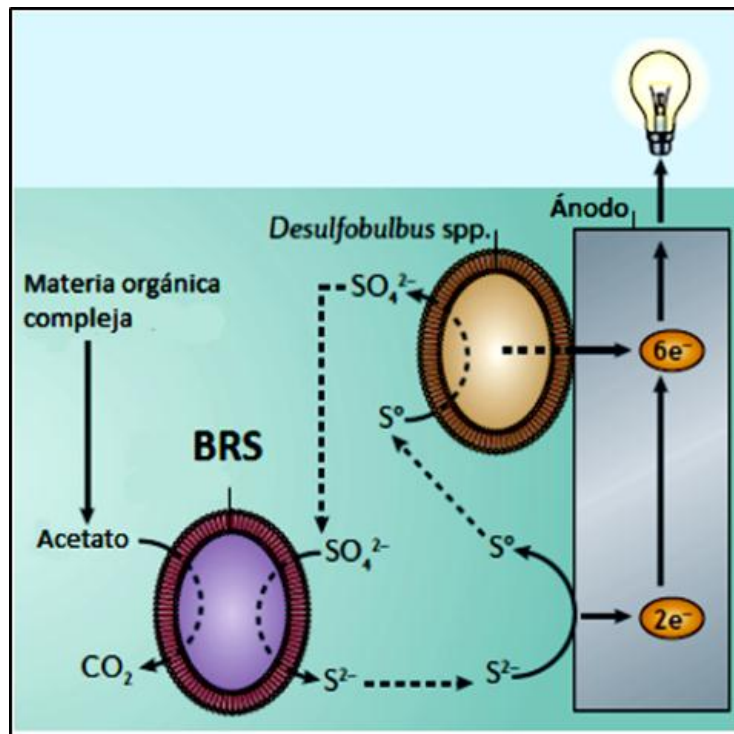


Figura I-3. Esquema de funcionamiento de una celda de combustible microbiana que emplea BRS y bacterias oxidadoras de azufre de forma acoplada [4].

Hasta la fecha se han realizado diversos estudios sobre el uso de BRS en CCMs en el laboratorio, en las que se emplean cultivos de BRS, ya sea axénicos o mixtos, en ocasiones acompañados de otros microorganismos que permitan la disponibilidad de la materia orgánica para las BRS. Por ejemplo, Zhao *et al.* [64] obtuvieron densidades de corriente de 1.3 A m^{-2} al emplear *Desulfovibrio desulfuricans* como inóculo en una CCM tipo PEM con un electrodo de tela de carbón. De igual forma, Ieropoulos *et al.* [65] emplearon un consorcio microbiano dominado por *D. desulfuricans* en un ánodo de acero inoxidable; esta celda, de segunda generación, fue comparada con una de primera generación donde se usó un cultivo puro de *E. coli* y azul de metileno como mediador y una de tercera generación con *Geobacter sulfurreducens*. Como resultado, la celda de segunda generación fue la que presentó mayores densidades de corriente, poder y eficiencia coloumbica (3.17 mA m^{-2} , $45.5 \text{ } \mu\text{W}$, 87.34% , respectivamente). En las celdas de tercera generación, los electrones de la materia orgánica son directamente transferidos al ánodo por los microorganismos, a través de proteínas de membrana cuando microorganismos ricos en citocromos forman una biopelícula sobre el electrodo (como se ha visto en especies de *Shewanella*), o mediante filamentos eléctricamente activos llamados nanowires (encontrados en especies de *Geobacter*). Interesantemente, se ha demostrado que especies de BRS pueden actuar bajo esos dos mecanismos lo que las hace más atractivas para su uso en las CCMs [66-70].

Por otro lado, Kumar *et al.* [71] utilizaron un cultivo mixto de BRS proveniente de un reactor sulfurogénico en una CCM con ánodo de platino soportado sobre carbón, con la que consiguieron una máxima potencia de 16 mW m^{-2} con densidades de corriente de 75.5 mA m^{-2} y un voltaje de 210 mV . Lee *et al.* [72] emplearon un ánodo de tela de carbón inoculado con un cultivo mixto de BRS provenientes del lodo de una planta de tratamiento de aguas. La celda alcanzó una máxima potencia de 255 mW m^{-2} y una eficiencia coloumbica de 17.5% , con remociones de sulfato y demanda química de oxígeno del 84.2 y 24.3% , respectivamente.

El trabajo realizado por Ieropoulos *et al.* [73] resulta particularmente interesante. En dicho trabajo, se empleó como inóculo sedimento proveniente de una planta de tratamiento de aguas y lixiviados de un relleno sanitario como fuente de carbono en una CCM. Los autores reportan potencias de entre 2 y 3 mW m^{-2} en una CCM de 25 mL y de entre 4 y 8 mW m^{-2} en una CCM de 1 L . Tres CCMs de 1 L fueron conectadas en serie y produjeron potencias de entre 4 y 6 mW m^{-2} . Lo que resulta llamativo, es que en las tres

configuraciones empleadas, se observaron incrementos importantes en las potencias producidas al incrementar las concentraciones de sulfato. De igual forma, la potencia decreció drásticamente ($<1 \text{ mW m}^{-2}$) al agregar molibdato en las celdas, un conocido inhibidor de la reducción de sulfato [74]. Estas observaciones llevan a la conclusión de que la reducción de sulfato está relacionada directamente con la obtención de mayores potencias en las CCMs [73].

Cabe mencionar que, además de las vías para la generación de energía expuestas anteriormente, las BRS también están siendo empleadas como biocátodos en celdas de electrólisis microbianas [66, 75, 76], así como para la producción de H_2 por la vía fermentativa [77].

Como se ha visto, en los últimos años el uso de BRS para la producción de energía ha cobrado gran interés. Es por esto que la caracterización de cultivos de BRS para la producción de sulfuro se ha vuelto necesaria. Adicionalmente, el hecho de que las BRS sean capaces de la reoxidación del azufre y la exoelectrogénesis, torna atractivo el cultivo y caracterización de especies de BRS propias de sitios geográficos poco explorados en cuanto a la diversidad de BRS se refiere.

I.2. Diversidad y metabolismo de las bacterias reductoras de sulfato

Las bacterias reductoras de sulfato (BRS) se caracterizan por emplear al sulfato como aceptor final del electrones (SO_4^{2-} donde S^{6+}) [5, 6]. Sin embargo, poseen una gran flexibilidad metabólica, ya que también pueden emplear otros aceptores como el sulfito (SO_3^{2-} donde S^{4+}), tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ donde S^{2+}) y azufre (S^0) [19]. Las reacciones mencionadas ocurren de forma natural en el ciclo biogeoquímico del azufre, donde la actividad de las BRS juega un papel importante (Figura I-4). Además de las especies azufradas, también pueden emplear otros aceptores de electrones tales como nitratos y nitritos, hierro, uranilo, selenato, cromato e inclusive oxígeno, aunque en la mayoría de los casos pierden su capacidad de crecimiento bajo estos mecanismos de respiración [5, 78, 79]. Adicionalmente, son capaces de crecer lentamente mediante la fermentación del lactato mientras se obtiene acetato, CO_2 , CO e H_2 como producto [80]. De igual forma, se ha visto que pueden producir propionato y acetato a partir del lactato, por vía fermentativa [6].

Las BRS son ubicuas de ambientes anóxicos ricos en sulfato y proliferan comúnmente en los sedimentos marinos y lagunares, en especial, aquellos que reciben

1.2.1. Diversidad

Actualmente se han clasificado y caracterizado más de 120 especies de BRS, agrupadas en 35 géneros [79]. Dichos géneros están distribuidos en 7 grupos que incluyen filos y clases de los dominios *Bacteria* y *Archaea* (Figura I-5) [5, 79]. Estas 7 líneas o linajes de BRS han sido establecidas con base en la secuencia nucleotídica del ADN ribosomal 16S, y a su vez están clasificados en cuatro grupos, los cuales se describen a continuación [5, 79, 85, 86]:

1. Gram-positivas mesofílicas: Este grupo se encuentra dentro de la clase δ -proteobacteria (dominio *Bacteria*) y representa el grupo más grande de BSR, en el que se incluyen dos familias: 1) La familia *Desulfovibrionaceae*, que tiene la capacidad de oxidar H_2 (en presencia y ausencia de acetato) y acetato, así como compuestos aromáticos; esta familia incluye los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfohalobium*, *Desulfonatrum*, *Desulfocaldus*. 2) La familia *Desulfobacteriaceae*, que oxida H_2 en presencia de acetato, pero es incapaz de oxidar aromáticos; esta familia incluye a los géneros *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfomonile*, *Desulfonema*, *Desulfobotulus*, y *Desulfoarculus*.
2. Gram-positivas formadoras de esporas. Se distinguen dentro de la clase δ -proteobacteria (dominio *Bacteria*) por la formación de endoesporas. En su mayoría son mesofílicas y termofílicas moderadas. Poseen la habilidad de utilizar ion férrico como aceptor terminal de electrones, además de ser más tolerantes a la presencia de oxígeno. Se encuentran agrupadas con los bacilos y clostridiales. El género más dominante es *Desulfotomaculum*, el cual puede obtener electrones del acetato, anilina, succinato, catecol, indol, nicotinato, fenol, acetona, estearato, entre otros. Este grupo también comprende los géneros *Desulfosporosinus* y *Thermoacetogenium*.
3. Termofílicas. Pertenecen al filo *Nitrospirae* y *Thermodesulfobacteria* (dominio *Bacteria*) e incluyen a *Thermodesulfovibrio yellowstonii* y *Thermodesulfobacterium commune*, respectivamente. Poseen temperaturas óptimas de crecimiento de 65 – 70 °C, las cuales son superiores a las de las especies gram-negativas formadoras de esporas, pero menores a las presentadas por las *Archaeas* termofílicas. Como donadores de electrones utilizan el H_2 y ácidos orgánicos de entre uno y tres átomos de carbono.
4. Archaeas termofílicas. Poseen temperaturas óptimas de crecimiento por encima de los 80°C. Comprenden el filo *Euryarchaeota*, entre las que se encuentran cuatro

especies del género *Archaeoglobus*: *A. fulgidus* (generadora de metano), *A. profundus*, *A. veneficus* y *A. lithotrophicus*; *A. fulgidus* es capaz de crecer a partir de H₂, acetato, lactato y almidón. También incluyen los géneros *Thermocladium* y *Caldivirga* del filo *Crenarchaeota*. En años recientes, se incorporó la familia *Thermodesulfobiaceae*, en la que se encuentra el género *Thermodesulfobium*, que cuenta con la capacidad de oxidar H₂ y CO₂ mediante la respiración de sulfato, tiosulfato, nitrato o nitrito.

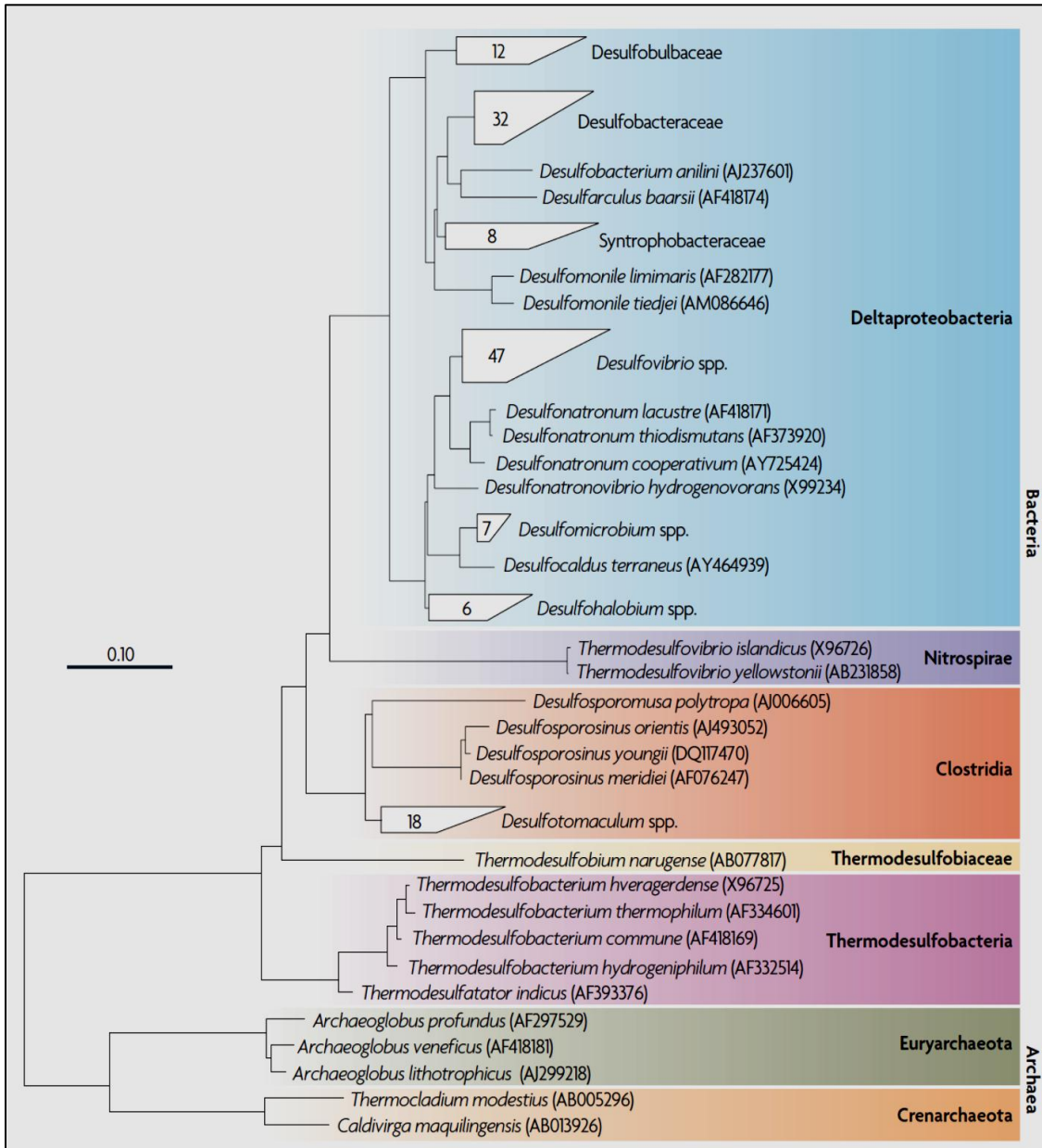


Figura I-5. Diversidad de bacterias reductoras de sulfato según la secuencia nucleotídica del gen RNA ribosomal 16S [5].

1.2.2. Reducción de sulfato por vía desasimilatoria

La reducción del sulfato por vía desasimilatoria es un proceso realizado por las BRS en el cual se incorporan 8 electrones provenientes de la materia orgánica a un ion sulfato, dando sulfuro como producto final [19]. Este proceso de reducción ocurre dentro de la célula y se realiza en tres pasos principales, los cuales son mediados por enzimas [79]. La reducción de sulfato inicia con el transporte del ion sulfato al citoplasma, donde es activado, esto consiste en la transformación del sulfato a un intermediario que es más favorable energéticamente para su reducción: el fosfosulfato de adenosina (APS). El APS es generado por la enzima ATP sulfurilasa que utiliza ATP y sulfato como sustrato y produce pirofosfato como producto secundario. Posteriormente, la APS reductasa incorpora 2 electrones al APS reduciéndolo a sulfito (SO_3^{2-}) y AMP como subproducto. El último paso de la reducción del sulfato es llevado a cabo por la sulfito reductasa desasimilatoria, la cual incorpora 6 electrones al sulfito generado por la APS reductasa, para dar sulfuro (S^{2-}) como producto final, el cual es excretado al ambiente (Figura I-6) [19, 79, 87].

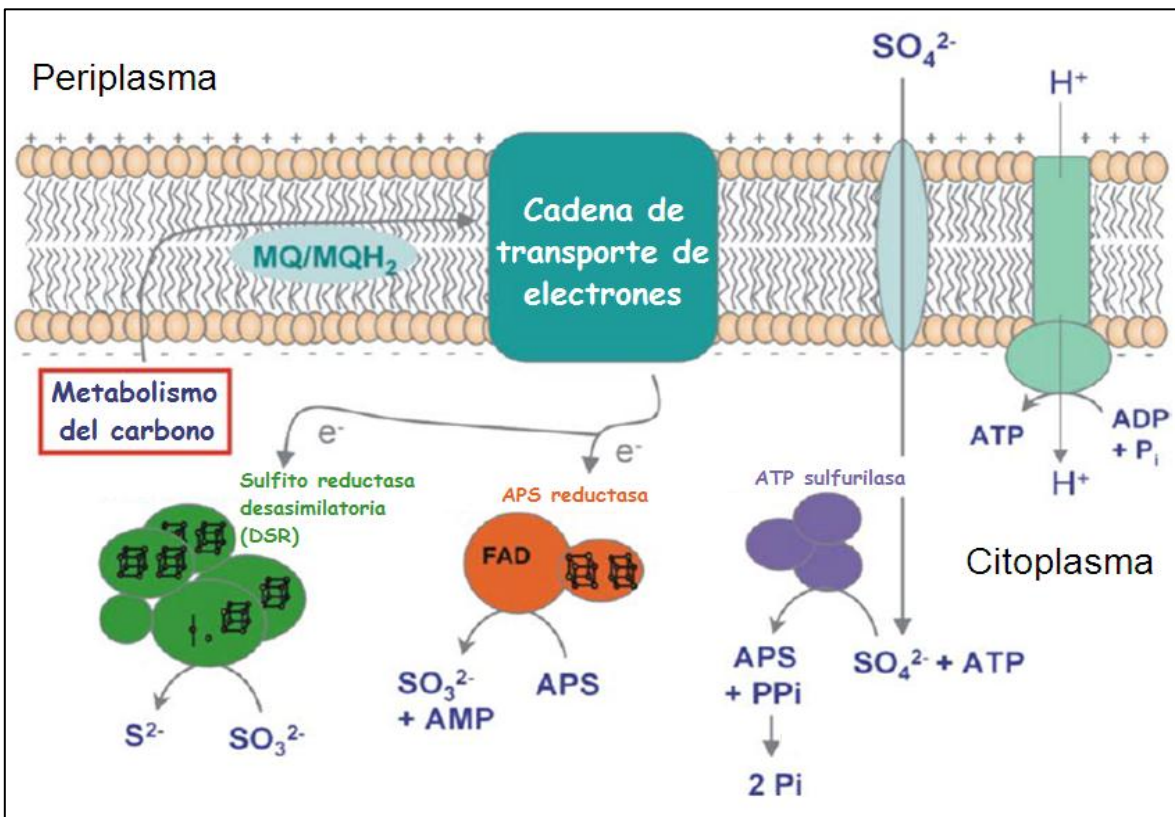


Figura I-6. Reducción de sulfato por vía desasimilatoria en *Desulfovibrio* spp. [87].

La última enzima involucrada en el proceso de reducción de sulfato, la sulfito reductasa desasimilatoria, posee tres subunidades con una estructura $\alpha_2\beta_2$ o $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, grupos Fe-S y utiliza un grupo sirohemo como grupo prostético. En las BRS, los genes que codifican para esta enzima están comúnmente organizados en un operón *dsrABD*, donde *dsrA* y *dsrB* codifican para las subunidades α y β , respectivamente, mientras que el gen *dsrD* codifica para un polipéptido pequeño rico en lisina cuya función específica aún se desconoce [88-91]. Los genes *dsrA* y *dsrB* están presentes en todas las BRS estudiadas hasta el momento y sus secuencias son altamente conservadas, lo que los convierte en excelentes marcadores para la determinación de relaciones filogenéticas. Además, los árboles construidos con estos genes muestran una distribución similar a la observada con el gen ARN ribosomal 16S [92-94].

1.2.3. Metabolismo del carbono y obtención de energía

Algunas BRS, entre las que se encuentran *Desulfovibrio desulfuricans*, *Thermodesulphobacterium commune*, *Desulfobacterium autotrophicus*, *Desulfotomaculum orientis* y *Archaeoglobus profundus*, pueden crecer empleando el hidrógeno (H_2) como única fuente de energía. Este gas es oxidado en el periplasma mediante enzimas con actividad hidrogenasa, de las cuales, cuatro han sido identificadas en *D. vulgaris*: tres [Ni-Fe]-hidrogenasas y una [Fe-Fe]-hidrogenasa. Todas ellas interactúan con un poli-hemocitocromo-c3 (*cytc3*), el *Tpl-c3*, a excepción de la [Ni-Fe]-hidrogenasa II, que interactúa con un segundo tipo de poli-hemo citocromo-c, el *TpII-c3*. Las cuatro hidrogenasas tienen una función muy similar por lo que la supresión de una de ellas no afecta el crecimiento de las BRS. Los electrones transferidos a los citocromos son bombeados al citoplasma mediante un complejo integral de la membrana periplasmática, el cual está asociado con los citocromos hacia el exterior y con una proteína Fe-S en el extremo citoplasmático; se conocen dos de estos en *D. vulgaris*, el complejo *Hmc* y el *Hme*. Al bombear los electrones al citoplasma se produce la acumulación de protones en el periplasma, formando un gradiente que será aprovechado por una ATP sintasa para la generación de energía en forma de ATP (Figura I-6) [87, 95, 96].

Existen muchas BRS que pueden emplear acetato, lactato, otros ácidos orgánicos (incluyendo los de cadena larga), alcoholes, alcanos y ácido benzóico, como única fuente de energía (Tabla I-2). Hasta el momento, los estudios han demostrado que solo el

formato es oxidado en el periplasma (al igual que el H₂), mientras que para el resto de los donadores de electrones, ocurre en el citoplasma [87, 95].

Tabla I-2. Reacciones de oxidación acopladas a la reducción de sulfato.

Reacción	ΔG° (kJ/reacción)
$4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	-151.9
$\text{Acetato}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + \text{HS}^-$	-47.6
$\text{Propionato}^- + 0.75\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{Acetato}^- + \text{HCO}_3^- + 0.75\text{HS}^- + 0.25\text{H}^+$	-37.7
$\text{Butirato}^- + 0.5\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{Acetato}^- + 0.5\text{HS}^- + 0.5\text{H}^+$	-27.8
$\text{Lactato}^- + 0.5\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{Acetato}^- + \text{HCO}_3^- + 0.5\text{HS}^-$	-80.2
$\text{Etanol} + 0.5\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{Acetato}^- + 0.5\text{HS}^- + 0.5\text{H}^+$	-66.4

Tomado de [5, 97]

De entre las fuentes de energía mencionadas, el metabolismo del lactato es el mejor caracterizado. Este hidroxácido es oxidado parcialmente a acetyl-CoA y CO₂ (oxidación incompleta) mediante la lactato deshidrogenasa, provocando la transferencia de los electrones a un cytc₃ oxidado, lo que produce piruvato y un cytc₃ reducido [95]. La energía requerida en esta reacción es suplementada vía transporte de electrones reverso ($\Delta\mu\text{H}^+$) en el ciclo del hidrógeno, donde una ferredoxina citoplasmática reducida forma H₂ mediante la reducción de protones en el periplasma [98]. Después el piruvato formado es oxidado por una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, y es así como se produce el acetyl-CoA y el CO₂ antes mencionado. El H₂ generado en el citoplasma (en el ciclo del hidrógeno) es oxidado por una de las cuatro deshidrogenasas descritas anteriormente; los electrones son aceptados por un cytc₃ oxidado dando lugar a cytc₃ reducido y los protones regresan al periplasma cerrando así el ciclo. Por último, los electrones de los cytc₃ reducidos que se han formado serán empleados para la reducción desasimilatoria del sulfato en el citoplasma, dando lugar a la formación de sulfuro (Figura II-7) [87, 95, 98].

Independientemente del compuesto orgánico que se oxide, se forma acetyl-CoA como producto. Existen especies de BRS que tienen la capacidad de oxidar el acetyl-CoA producido en la oxidación incompleta, produciendo CO₂. Las BRS que poseen esta capacidad son denominadas oxidadoras completas, ya que, a diferencia de las oxidadoras incompletas, aprovechan toda la energía contenida en la fuente de energía. Existen dos rutas metabólicas para la oxidación completa: algunas especies, como *Desulfobacter postgatei*, oxidan el acetyl-CoA mediante el ciclo del ácido cítrico, aunque la mayoría

emplea la ruta acetyl-CoA sintasa oxidativa/monóxido de carbono deshidrogenasa, donde el tetrahidrofolato o la tetrahidrometanoferina fungen como acarreadores de carbono [95].

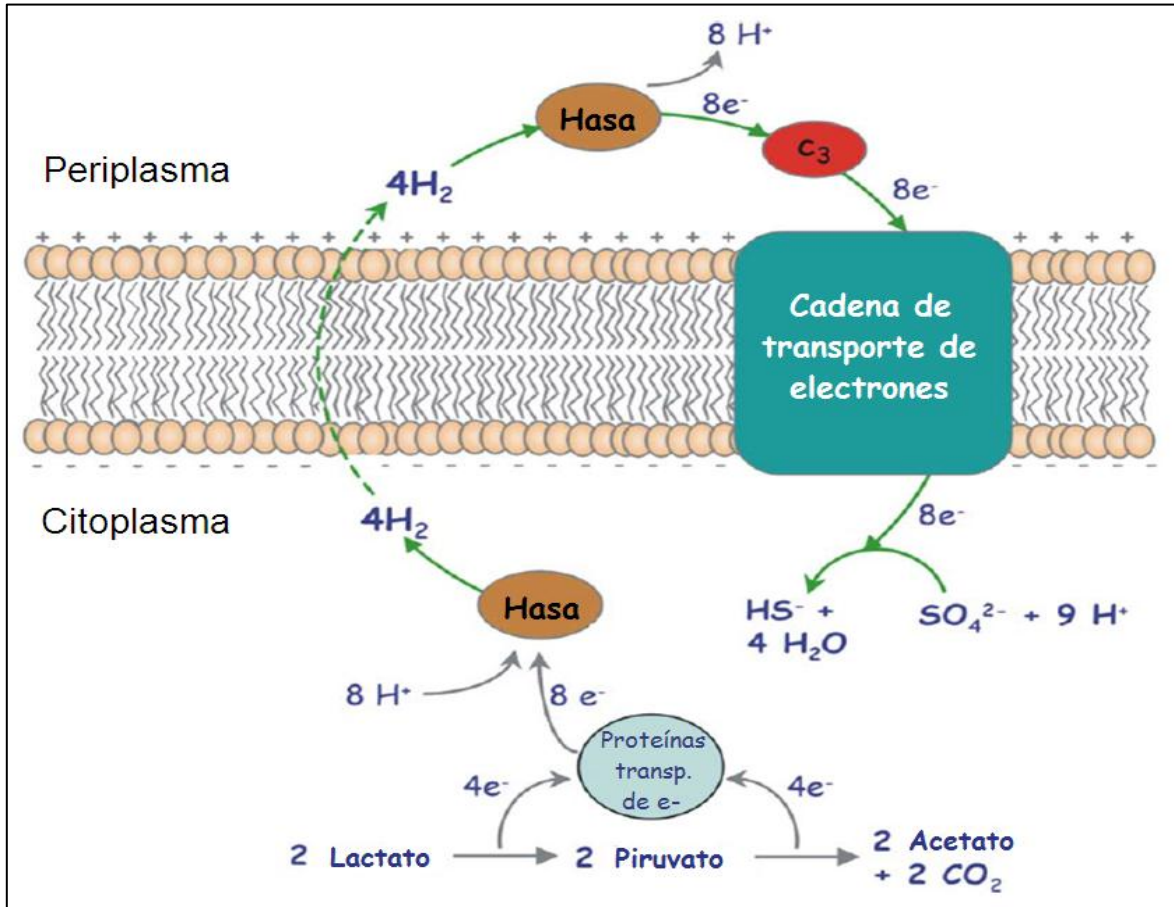


Figura I-7. Metabolismo del lactato acoplado a la reducción de sulfato por vía desasimilatoria en *Desulfovibrio* spp. [87].

Como se ha visto en este capítulo, las BRS son una valiosa herramienta biotecnológica para la generación de energía alternativa a partir de materia orgánica parcialmente digerida. Entre los compuestos orgánicos asimilables por las BRS destacan 1) el lactato, debido a que casi todas las BRS pueden metabolizarlo a expensas de la reducción de sulfato (es la fuente de carbono termodinámicamente más favorable [Tabla I-2]) además de la más estudiada [5, 6, 79], 2) el acetato, por su capacidad para fungir como fuente selectiva para la obtención de BRS que permitan la oxidación completa de la materia orgánica [19], 3) el benzoato, metabolito central en la degradación de compuestos aromáticos (incluyendo hidrocarburos monoaromáticos como el benceno, tolueno,

etilbenceno y xilanos) [99, 100], y 4) el etanol, el alcohol que se produce comúnmente por vía fermentativa, además de ser la segunda fuente de carbono termodinámicamente más favorable para la reducción del sulfato (Tabla I-2) [5, 19, 97]. A pesar de que las cuatro fuentes de carbono mencionadas son comunes en los sedimentos marinos [5, 6, 19], la obtención y caracterización de cultivos sulfurogénicos de origen marino ha sido poco estudiada. También, es importante recordar que en los ambientes costeros es común encontrar proliferación de BRS, siendo más abundante la actividad sulfurogénica en zonas con aportes nutrimentales derivados de la actividad humana [6, 82]. Con base en lo anteriormente expuesto se formularon las siguientes hipótesis.

I.3. Hipótesis

1. Es posible obtener cultivos productores de sulfuro que oxiden lactato, acetato, benzoato y etanol, establecidos a partir de sedimentos marinos de la costa yucateca.
2. Se producirán mayores concentraciones de sulfuro en cultivos mixtos de BRS establecidos en el laboratorio (*in vitro*), conforme mayores sean las concentraciones de sulfuro *in situ* en los sedimentos marinos costeros de los que provienen.

CAPÍTULO II METODOLOGÍA

II.1. Estrategia experimental

Se colectaron muestras de sedimento de tres puertos pertenecientes a Yucatán, México: Sisal, Progreso y Dzilam de Bravo, que poseen actividad antropogénica diferente y que a su vez están caracterizadas con distintas condiciones eutróficas [101]. En cada puerto, se establecieron cinco puntos de muestreo, los cuales se eligieron con base en el potencial de óxido-reducción del sedimento, que como requisito, debía presentar valores adecuados para la proliferación de bacterias reductoras de sulfato (BRS) [79].

El sedimento colectado (15 muestras) se empleó para establecer en el laboratorio cultivos mixtos ricos en bacterias reductoras de sulfato (BRS), empleando un medio selectivo. Se probaron cuatro fuentes de carbono distintas: lactato, acetato, benzoato y etanol, conformando un total de 60 cultivos. La presencia de sulfuro de hidrógeno se comprobará por la aparición de precipitados de sulfuro de hierro (FeS) [102].

Adicionalmente, se seleccionaron tres muestras de sedimento con base en la concentración de sulfuro disuelto presente en el agua intersticial. Estos sedimentos fueron empleados como inóculo para establecer cultivos de BRS, con la finalidad de determinar su potencial para producir sulfuro *in vitro*. Para ello se construyeron cinéticas de producción de sulfuro y se evaluó la actividad reductora de sulfato. Los experimentos fueron realizados por triplicado y se determinó la riqueza y la diversidad de especies mediante el gen marcador *dsrB* [93].

II.2. Descripción de los sitios de colecta

Como ya se mencionó, se eligieron los puertos de Sisal, Progreso y Dzilam de Bravo para realizar la colecta de sedimentos marinos en la zona costera, esto con base en su actividad antropogénica y condición eutrófica. Desde 1999, Herrera-Silveira *et al.* [101, 103] han realizado trabajos de investigación sobre el estado de la calidad del agua en la costa yucateca. Las condiciones tróficas de la costa, determinadas mediante el índice de eutrofización de nutrientes (que considera nutrientes inorgánicos disueltos como amonio, nitrato, nitrito, fosfato, silicato, así como la salinidad, oxígeno disuelto, pH, temperatura y el contenido de clorofila-a), además del estudio de la comunidad

fitoplanctónica, la vegetación marina sumergida, a través de los tres cambios estacionales de la región (secas, lluvias y nortes), han sido considerados por Herrera-Silveira *et al.* [101, 103] para diagnosticar el estado de eutrofización de los ecosistemas de la Península de Yucatán y clasificarlos en tres categorías: 1) en buen estado, 2) en estado regular y 3) en mal estado. Entre los sitios diagnosticados, se encuentran los puertos de Progreso, Sisal y Dzilam de Bravo. Un resumen de cada uno de los sitios se presenta a continuación.

El puerto de Progreso se encuentra al norte del estado de Yucatán (21°16'58" N, 89°39'49" O) en el municipio de Progreso y cuenta con 37,363 habitantes [104]. Es el puerto más importante de entre los 11 puertos con los que cuenta el estado [105], por lo que posee intensa actividad urbana, turística, pesquera y portuaria. Este puerto presenta condiciones mesotróficas [103] y ha sido clasificado como un sitio en mal estado por efecto de la eutrofización cultural [101].

Sisal está ubicado al noroeste del estado de Yucatán (21°09'55" N, 90°01'50" O), cuenta con 1,837 habitantes y pertenece al municipio de Hunucmá [104]. Entre sus actividades productivas están la urbana, portuaria y pesquera, que se desarrollan de forma moderada [101]. De igual forma, se desarrolla la acuicultura, destacando el cultivo de camarón, y en menor medida, las actividades agrícolas y turísticas [106]. En cuanto al estado de la costa, Sisal presenta condiciones mesotróficas [103] y fue clasificado con un estado de eutrofización regular [101].

Dzilam de Bravo se encuentra al noreste de estado de Yucatán (21°23'33" N, 88°53'29" O). Forma parte del municipio que lleva el mismo nombre y cuenta con 2,354 habitantes [104]. A diferencia de los otros dos puertos, carece de actividad turística. Presenta actividad urbana y portuaria, pero sobre todo, pesquera. Es una zona con alta productividad biológica, posee condiciones oligotróficas [103] y fue clasificado como un sitio en buen estado, ya que no ha sido afectado en gran medida por la eutrofización cultural [101].

II.3. Colecta de sedimento

En cada sitio de colecta, se registraron las coordenadas geográficas con un sistema Garmin GPSmap 76CSx. La profundidad del mar se cuantificó con una Ecosonda SpeedTech SM-5. También, se determinó el pH, la temperatura y el potencial de óxido-reducción del agua mediante un Sistema Multiparametro YSI 556.

De igual forma, se colectó sedimento superficial (primeros 40 cm) mediante el uso de una draga mecánica con una capacidad aprox. de 5 L. Inmediatamente, se midió el potencial de óxido-reducción, el pH y la temperatura con dispositivos portátiles marca Extech (ExStikII pH/ConductivityMeter EC500 y ExStikORPMeter RE300). El sedimento fue empaquetado en bolsas de plástico con cierre hermético y colocado en una nevera con hielo para su traslado al laboratorio. Una porción de los sedimentos fue reservada para su caracterización fisicoquímica en el Laboratorio de Química Marina del CINVESTAV-IPN (Unidad Mérida), donde se determinó la concentración de sulfuro disuelto con un electrodo selectivo de iones plata/sulfuro y carbono orgánico total (COT) por la técnica de oxidación con dicromato de potasio en medio ácido y titulación del exceso de oxidante con sulfato ferroso usando difenilamina como indicador [107].

II.4. Obtención de cultivos

Los sedimentos colectados en campo fueron trasladados al laboratorio, donde se mezclaron continuamente bajo un flujo de N₂. Bajo estas condiciones, se transfirieron pequeñas alícuotas a un tubo Hungate con flujo de N₂ hasta completar en la medida de lo posible el volumen del tubo. Después, se sellaron los tubos y se completó el volumen con agua libre de O₂, previamente esterilizada, reducida con tioglicolato y ditionito de sodio y reservadas a 4°C.

Posteriormente, los sedimentos reservados fueron empleados como inóculo en un medio de cultivo selectivo para bacterias reductoras de sulfato (Medio Postgate B modificado por la DSMZ [*Desulfovibrio* medium No. 63], preparado sin extracto de levadura). Como fuente de carbono se usaron DL-lactato de sodio, acetato de sodio, benzoato de sodio y etanol, de manera diferencial. La composición detallada del medio se muestra en el Anexo 1. El manejo de la anaerobiosis se realizó mediante la técnica establecida por Hungate [108]. Los cultivos se realizaron en tubos Hungate de 16 x 125 mm con 10 mL de medio en el interior. La inoculación se realizó de la siguiente forma: se preparó una suspensión 1:1 (m/v) de sedimento en agua anóxica estéril, se homogeneizó y se inyectaron 20 µL de suspensión por mL de medio cultivo. Los cultivos se incubaron en oscuridad a 30°C.

II.5. Cinética de producción de sulfuro

Se seleccionaron sedimentos con tres concentraciones diferentes de sulfuro: alta media y baja. Una vez realizada la selección de sedimentos, se determinó la concentración de sólidos volátiles (SV) en los mismos, mediante la metodología descrita por la APHA [109]. Posteriormente, se inoculó el equivalente a 25 mg de SV L⁻¹ en botellas serológicas de 125 ml con medio de cultivo selectivo para BRS (Medio Postgate B modificado por la DSMZ [*Desulfovibrio* medium No. 63], preparado sin extracto de levadura, ver Anexo 1) empleando DL-Lactato de sodio como fuente de carbono. Como control se emplearon botellas serológicas con medio Postgate B sin inocular. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los controles y los cultivos se mantuvieron en incubación a 30°C en oscuridad durante 14 días, con la finalidad de realizar las cinéticas de producción de sulfuro. Se tomaron muestras de los controles y cultivos por lo menos una vez al día para determinar la concentración de sulfuro disuelto por el método de Cord-Ruwisch [110] (la curva de calibración se muestra en el Anexo 2), en un espectrofotómetro Jenway 6320-D. De igual manera, el pH (ExStickIIExtech), el potencial de óxido-reducción (ExStickExtech) y la concentración de sulfatos (colorímetro Hach DR-890/8051, SulfaVer4 reagent) fueron evaluados periódicamente. También, se cuantificó la concentración de ácidos grasos volátiles (AGVs) por cromatografía de gases (Perkin Elmer Clarus 500 con detector de ionización de flama y columna ECTM- WAX de 30 m de longitud y 0.53 mm de diámetro), utilizando nitrógeno como gas acarreador y temperaturas de operación de 240, 160 y 250 °C para el inyector, horno y detector, respectivamente. La curva de calibración para ácido acético y propiónico (que fueron los AGVs detectados durante este estudio) se presentan en el Anexo 3. La concentración de DL-Lactato de sodio se determinó al principio y final del experimento mediante un kit enzimático para ácido DL-láctico de R-biopharm. Los datos obtenidos fueron empleados para calcular los porcentajes de remoción de lactato y sulfato, así como la tasa de producción de sulfuro (TPS) durante la fase de acumulación, dada en mmol de S²⁻ L⁻¹ h⁻¹ (Ecuación II-1).

$$TPS = \frac{\Delta[S^{2-}]}{\Delta t} \quad (II-1)$$

Al finalizar la cinética, se establecieron subcultivos de 10 mL en tubos Hungate para determinar la presencia de metano, hidrógeno y CO₂ en la cabeza de aire; esto se realizó por cromatografía de gases (Perkin Elmer Clarus 500, equipado con un detector de conductividad térmica y columna Molesieve de 30 m de longitud y 0.53 mm de diámetro), utilizando nitrógeno como gas acarreador; las temperaturas de operación fueron 75, 30 y 200 °C para el inyector, horno y detector, respectivamente. Al finalizar los experimentos, se recuperó la biomasa para el análisis de riqueza y diversidad de BRS de los cultivos tal y como se describe más adelante, en el apartado II.5.2.

II.5.1. Balance de masa y actividad reductora de sulfato

Los datos obtenidos en la cinética de producción sulfuro fueron empleados para calcular los moles de sulfuro y AGVs producidos en cada cultivo, así como los moles de sulfato y lactato consumidos. Estos valores sirvieron para calcular la eficiencia de reducción de sulfato (ERS) (Ecuación II-2), el rendimiento de oxidación de lactato (ROL) (Ecuación II-3), el porcentaje de remoción de sulfato, el porcentaje de remoción de lactato, así como el porcentaje de oxidación completa del lactato alcanzada por los sistemas al concluir el tiempo del ensayo.

$$ERS = \frac{\text{moles de } S^{2-} \text{ producidos}}{\text{moles de } SO_4^{2-} \text{ consumidos}} \quad (\text{II-2})$$

$$ROL = \frac{\text{moles de } S^{2-} \text{ producidos}}{\text{moles de lactato consumidos}} \quad (\text{II-3})$$

II.5.2. Análisis de riqueza y diversidad de especies

La riqueza y diversidad de especies de bacterias reductoras de sulfato presentes en los cultivos se determinó mediante el gen *dsrB*. Los detalles metodológicos se describen a continuación.

II.5.2.1. Recuperación de biomasa

Los cultivos empleados para la cinética de producción de sulfuro fueron centrifugados a 4000 x g durante 15 min a 10°C. La pastilla recuperada fue resuspendida en 25 mL de buffer TE y se dejó en incubación por 30 min a 37 °C. Este proceso se repitió

tres veces. Las pastillas fueron almacenadas a -20°C para posteriormente realizar la extracción del ADN.

II.5.2.2. Extracción de ADN

La pastilla obtenida de 15 mL de cultivo fue resuspendida en 1 mL de buffer de extracción precalentado a 65°C (Buffer de fosfatos [pH=7] 100 mM, Tris-HCl [pH=7] 100 mM, EDTA [pH=8] 100 mM, NaCl 0.7M, CETAB 1% v/v, SDS 2% v/v). Las muestras se pusieron en baño maría a 65°C durante 30 min, agitando manualmente cada 10 min. Se recuperó la fase acuosa después de centrifugar a $9500 \times g/10 \text{ min}/26^{\circ}\text{C}$ y se realizó una extracción con 0.8 volúmenes de cloroformo-isoamílico (24:1). Se centrifugó a $16000 \times g/10 \text{ min}/26^{\circ}\text{C}$ y se recuperó la fase acuosa, a la cual se le adicionó 1 volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (24:24:1) y se centrifugó nuevamente. Después, se precipitó el ADN de la fase acuosa con 0.6 volúmenes de isopropanol durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavó la pastilla con etanol al 70% y una vez seca, se resuspendió en $300 \mu\text{L}$ de Buffer TE. Se agregó 0.7% v/v de RNAasa A y se incubó por una hora a 37°C . Posteriormente, se agregaron 0.46 volúmenes de acetato de potasio frío y se incubó durante una hora a -20°C . Se centrifugó a $16000 \times g/20 \text{ min}/4^{\circ}\text{C}$ y se recuperó el sobrenadante, el cual fue precipitado con isopropanol (0.6 vol.) durante una hora a -20°C . Se lavó la pastilla con etanol al 70% y una vez seca, se resuspendió en agua ultrapura en cantidad suficiente para obtener absorbancias a 260 nm por debajo de las 1.2 unidades (entre 50 y $60 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). Los extractos se observaron en un gel de TAE–agarosa al 0.8% (40 mM Tris–HCl [pH = 7], 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA [pH 8.0]) con bromuro de etidio (10mg/ml) para la tinción y visualización del ADN. El gel se corrió en buffer TAE 1X a 75 mV durante 30 min y se observó en un fotodocumentador (Enduro GDS Gel Documentation System). De igual forma, se cuantificaron los extractos y se analizó su pureza en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoScientific).

II.5.2.3. Amplificación del gen *dsrB*

Se realizó una amplificación por PCR punto final, utilizando cebadores específicos para la región codificante de la subunidad β de la sulfito reductasa (*dsrB*), que tiene un tamaño de aprox. 350 pb: DSRp2060F (5'-CAACATCGTYCAYACCCAGGG-3') y DSR4R (5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3') [91, 93]. La reacción se realizó a un volumen de $50 \mu\text{L}$, conteniendo las siguientes concentraciones finales: $2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de templado de ADN, buffer

de PCR 1X (Invitrogen) y $MgCl_2$ 2 mM (Invitrogen), 100 μM de dNTPs (Bioline), 0.4 μM de cada cebador (Invitrogen), 0.5 U μL^{-1} de ADN polimerasa sintetizada y purificada en el laboratorio y 2% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma). El perfil cíclico fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94.5°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94.5°C por 1 min, alineamiento a 56°C por 1 min y elongación a 72°C por 1 min, y una fase de elongación final a 72°C por 10 min (Bio-Rad T100 ThermalCycler). Los amplicones se separaron mediante electroforesis en gel de TAE-agarosa al 1% (40 mM Tris-HCl [pH = 7], 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA [pH 8.0]) con 10 mg mL^{-1} de bromuro de etidio, usando TAE 1X como buffer de corrida, bajo un voltaje constante de 75 mV durante 30 min. Al término se observó mediante un fotodocumentador (Enduro GDS Gel DocumentationSystem). Se usó un marcador molecular de 1 Kb (Invitrogen) para calcular el tamaño de los fragmentos.

II.5.2.4. Separación del gen *dsrB* por EGGD

Los amplicones obtenidos fueron separados mediante una electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (EGGD). Para lograr esto, fue necesaria la adición por PCR de una pinza de guaninas y citosinas de 40 pb de longitud. La reacción se preparó tal y como se describió en el apartado anterior, con la única diferencia de que se utilizó un cebador GC+DSRp2060F, que contiene pinza mencionada (GC-DSRp2060F 5'-CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCAACATCGTYCAYA CCCAGGG-3') [93]. El perfil cíclico fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94.5°C por 1 min, seguida de 11 ciclos de desnaturalización a 94.5°C por 1 min, alineamiento con "touchdown" de 66°C a 56 °C ($\Delta T = -1^\circ C$ ciclo $^{-1}$) por 1 min y elongación a 72°C por 1 min, para continuar con 20 ciclos de desnaturalización a 94.5°C por 1 min, alineamiento a 56°C por 1 min y elongación a 72°C por 1 min, seguidos de una elongación final a 72°C por 10 min (Bio-Rad T100 ThermalCycler). Los productos obtenidos fueron purificados con una matriz de óxido de silicio, con la finalidad de remover los dímeros de PCR y poder cuantificar adecuadamente el ADN.

La EGGD se realizó en un gel de poliacrilamida al 8% con un gradiente desnaturalizante de entre 40 y 70% (100% de desnaturalizante contienen: urea 7 M y 40% de formamida). Los amplicones fueron separados mediante un DCode Universal Mutation Detection System (BioRad). En los pocillos del gel, se cargaron 3000 ng de ADN de cada muestra. Se usó TAE 1X como buffer de corrida, a una temperatura de 60°C y 120 V

durante 15 h. Al término, el gel fue teñido durante 45 min en un baño con buffer con una solución 3X de Gel Red (Biotium) en TAE 1X. Por último, el gel se fotografió en un fotodocumentador MiniDoc Imaging System (BioRad).

II.5.2.5. Análisis de bandas del gen *dsrB*

La imagen obtenida por EGGD fue analizada con el software QuantityOne mediante el cual se determinó el número de bandas por carril. Posteriormente, se construyó una matriz binaria de presencia y ausencia de bandas con ayuda de las distancias relativas de migración obtenidas. La matriz se empleó como entrada para el Programa NTSYs pc (versión 2.2), y así generar el índice de Jaccard, con base en el cual se construyó un dendograma mediante el algoritmo UPGMA.

De igual forma, se calculó la intensidad de cada banda con el software Quantity One (BioRad). Esta se define como el área bajo la curva densitométrica de una banda. Las intensidades calculadas se emplearon para determinar el índice de diversidad general de Shannon-Weaver (H) mediante la fórmula que se muestra más adelante, donde n_i corresponde a la intensidad de banda, y N , corresponde a la sumatoria de las intensidades de todas las bandas obtenidas por carril [111]:

$$H = - \sum \left(\frac{n_i}{N} \right) \log \left(\frac{n_i}{N} \right)$$

II.6. **Análisis estadístico**

Todos los juegos de datos fueron sometidos a una prueba de normalidad de Anderson-Darling. Los datos paramétricos fueron sometidos a análisis de varianza y a la prueba de comparación de promedios de Tukey, en caso de haber encontrado diferencias significativas. Los datos no paramétricos fueron sometidos al análisis de comparación de medianas de Kruskal-Wallis; en caso de haber hallado diferencias significativas se analizaron todas parejas de datos por la prueba de Mann-Whitney. Los grupos de datos obtenidos mediante las pruebas de comparación de medias y medianas se señalan con letras, las cuales se muestran como superíndices, inmediatamente después de los datos de tendencia central y dispersión a lo largo del texto; los juegos de datos marcados con la misma letra no presentan diferencias significativas entre si y viceversa. Las pruebas de correlación empleadas a lo largo de este trabajo corresponden a la prueba de correlación

de Pearson y de Spearman, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente. Todos los análisis se realizaron con el programa Minitab17 con un intervalo de confianza de 0.05.

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. Colecta de sedimentos

La posición geográfica de los sitios de colecta, los datos colectados en campo para agua y sedimentos, así como la concentración de sulfuro disuelto y carbono orgánico total (COT) en el sedimento, se muestran en las Tablas III-1, III-2 y III-3, que corresponden a los puertos de Progreso, Sisal y Dzilam de Bravo, respectivamente. En las figuras III-1, III-2 y III-3 se muestran imágenes de los sedimentos colectados en cada uno de los puertos mencionados.

Tabla III-1. Caracterización de agua y sedimento en Progreso.

Sitio	PA	PB	PC	PD	PE
Coordenadas	21°19.135' N 89°41.044' O	21°20.254' N 89°40.455' O	21°17.117' N 89°41.833' O	21°18.983' N 89°40.167' O	21°19.050' N 89°41.850' O
Profundidad (m)	7.0	8.0	2.8	6.4	3.3
<i>Sedimento</i>					
T (°C)	29.4	30.2	27.6	26.0	27.6
pH	7.96	7.66	6.90	6.63	7.6
E _h (mV)	-107	-166	-361	-368	-306
Sulfuro (mg L ⁻¹)	28.98	129.75	F.R.	102.19	31.27
COT (%)	0.90	2.85	4.62	2.43	1.07
<i>Agua</i>					
T (°C)	29.13	29.70	26.46	25.63	26.46
pH	8.58	8.67	8.97	8.86	8.87
E _h (mV)	-44	-42	-100	-49	-51

Los nombres de los sitios indican el Puerto de colecta (primera letra) y el punto de muestreo (segunda letra): Progreso punto A (PA), Progreso punto B (PB), Progreso punto C (PC), Progreso punto D (PD), Progreso punto E (PE). E_h: potencial redox respecto a hidrógeno; COT: carbono orgánico total. F.R: fuera de rango por encima del límite de detección.

Tabla III-2. Caracterización de agua y sedimentos en Sisal.

Sitio	SA	SB	SC	SD	SE
Coordenadas	21°10.100' N 90°02.817' O	21°09.917' N 90°03.17' O	21°09.850' N 90°02.950' O	21°09.600' N 90°02.883' O	21°09.617' N 90°02.733' O
Profundidad (m)	4.1	2.3	1.7	2.5	2.8
<i>Sedimento</i>					
T (°C)	28.8	30.3	30.5	31.3	31.2
pH	7.88	6.66	6.75	6.78	6.83
E _h (mV)	28	-279	-251	-256	-273
S ²⁻ (mg L ⁻¹)	0.824	F.R.	469	636	f.r.
COT (%)	0.38	3.28	1.92	4.00	2.81
<i>Agua</i>					
T (°C)	28.96	28.99	29.19	29.06	29.54
pH	8.49	8.37	8.42	8.21	7.88
E _h (mV)	-28	-45	-57	-72	-45

Los nombres de los sitios indican el Puerto de colecta (primera letra) y el punto de muestreo (segunda letra): Sisal punto A (SA), Sisal punto B (SB), Sisal punto C (SC), Sisal punto D (SD), Sisal punto E (SE). E_h: potencial redox respecto a hidrógeno; COT: carbono orgánico total. F.r: fuera de rango por encima del límite de detección.

Tabla III-3. Caracterización de agua y sedimentos en Dzilam de Bravo.

Sitio	DA	DB	DC	DD	DE
Coordenadas	21°23.883' N 88°53.333' O	21°24.050' N 88°52.850' O	21°23.867' N 88°53.917' O	21°23.700' N 88°52.983' O	21°17.583' N 88°53.833' O
Profundidad (m)	1.8	1.4	1.5	1.0	0.8
<i>Sedimento</i>					
T (°C)	28.2	28.3	27.0	29.3	29.36
pH	7.6	7.58	7.47	7.29	7.43
E _h (mV)	-90	-162	-110	-238	-44
S ²⁻ (mg L ⁻¹)	0.00	0.10	0.05	0.09	0.07
COT (%)	0.94	1.6	1.02	5.56	1.94

Los nombres de los sitios indican el Puerto de colecta (primera letra) y el punto de muestreo (segunda letra): Dzilam de Bravo punto A (DA), Dzilam de Bravo punto B (DB), Dzilam de Bravo punto C (DC), Dzilam de Bravo punto D (DD), Dzilam de Bravo punto E (DE). E_h: potencial redox respecto a hidrógeno; COT: carbono orgánico total.

Tabla III-3. Caracterización de agua y sedimentos en Dzilam de Bravo (Continuación).

Sitio	DA	DB	DC	DD	DE
<i>Agua</i>					
T (°C)	26.42	26.51	27.05	27.34	27.21
pH	8.18	8.14	8.01	7.94	8.31
E _h (mV)	-6	-8	-21	-10	-27

Los nombres de los sitios indican el Puerto de colecta (primera letra) y el punto de muestreo (segunda letra): Dzilam de Bravo punto A (DA), Dzilam de Bravo punto B (DB), Dzilam de Bravo punto C (DC), Dzilam de Bravo punto D (DD), Dzilam de Bravo punto E (DE). E_h: potencial redox respecto a hidrógeno; COT: carbono orgánico total.

La temperatura y el pH de todos los sedimentos colectados fluctuaron entre los 26 y 31 °C y las 6.5 y 8.5 unidades de pH, respectivamente. En los sedimentos del puerto de Progreso, se registró una temperatura promedio de $28.2 \pm 1.7^{\circ}\text{C}^{\text{a}}$ y un pH de $7.4 \pm 0.6^{\text{a}}$ unidades. En el puerto de Sisal, se obtuvo una temperatura de $30.42 \pm 1.00^{\circ}\text{C}^{\text{a}}$ y un pH de $6.98 \pm 0.51^{\text{a}}$ unidades, y en Dzilam de Bravo, se registraron $28.43 \pm 0.97^{\circ}\text{C}^{\text{a}}$ y $7.47 \pm 0.13^{\text{a}}$ unidades de pH. No se hallaron diferencias significativas entre puertos de colecta para los parámetros mencionados.

Por otro lado, los potenciales más reductores se obtuvieron en los sedimentos de Progreso ($-262 \pm 118^{\text{a}}$ mV), seguidos de los obtenidos en Sisal ($-206 \pm 131^{\text{a}}$ mV), mientras que en Dzilam de Bravo se obtuvieron los potenciales menos reductores ($-129 \pm 74^{\text{a}}$ mV). A pesar de que parece existir una diferencia entre los potenciales redox encontrados en cada puerto, no se encontraron diferencias significativas entre éstos durante el análisis estadístico; lo anterior es consecuencia de la variabilidad de los datos, ya que se obtuvieron desviaciones estándar grandes con respecto a la media. Cabe mencionar que, en los tres puertos estudiados, se hallaron sedimentos dentro del rango de potenciales de óxido reducción aptos para la proliferación de bacterias reductoras de sulfato (BRS), que va desde los 100 a los -400 mV [79].

También, se encontró que el carbono orgánico total (COT) fue de $2.37 \pm 1.51^{\text{a}}$, $2.48 \pm 1.39^{\text{a}}$ y $2.21 \pm 1.92\%^{\text{a}}$, para los sedimentos colectados en Progreso, Sisal y Dzilam de Bravo, respectivamente, sin diferencias significativas entre sí.

En cuanto a la concentración de sulfuro, Progreso y Sisal presentaron diferencias significativas en comparación con Dzilam de Bravo. De tal manera, que los sedimentos colectados de los puertos clasificados con condiciones de eutrofización mesotróficas (Progreso y Sisal) presentaron mayor concentración de sulfuro *in situ* ($73.1 \pm 50.9^{\text{a}}$ y



Figura III-1. Sedimentos colectados en Progreso.

368.61 ± 329.27^a mg L⁻¹), con respecto a las encontradas en Dzilam de Bravo (0.06 ± 0.04^b mg L⁻¹), clasificado con condiciones oligotróficas. Esto es consecuencia de que la actividad reductora de sulfato suele potenciarse en sitios con aportes nutrimentales secundarios y actividad antropogénica prominente [6, 81, 82].

Con respecto a la columna de agua, se encontró que la temperatura fue de 27.5 ± 1.8^a , 29.148 ± 0.236^a y 26.91 ± 0.42^a °C, para Progreso, Sisal y Dzilam de Bravo, sin diferencias estadísticas entre sí. El pH del agua fue significativamente más alcalino en

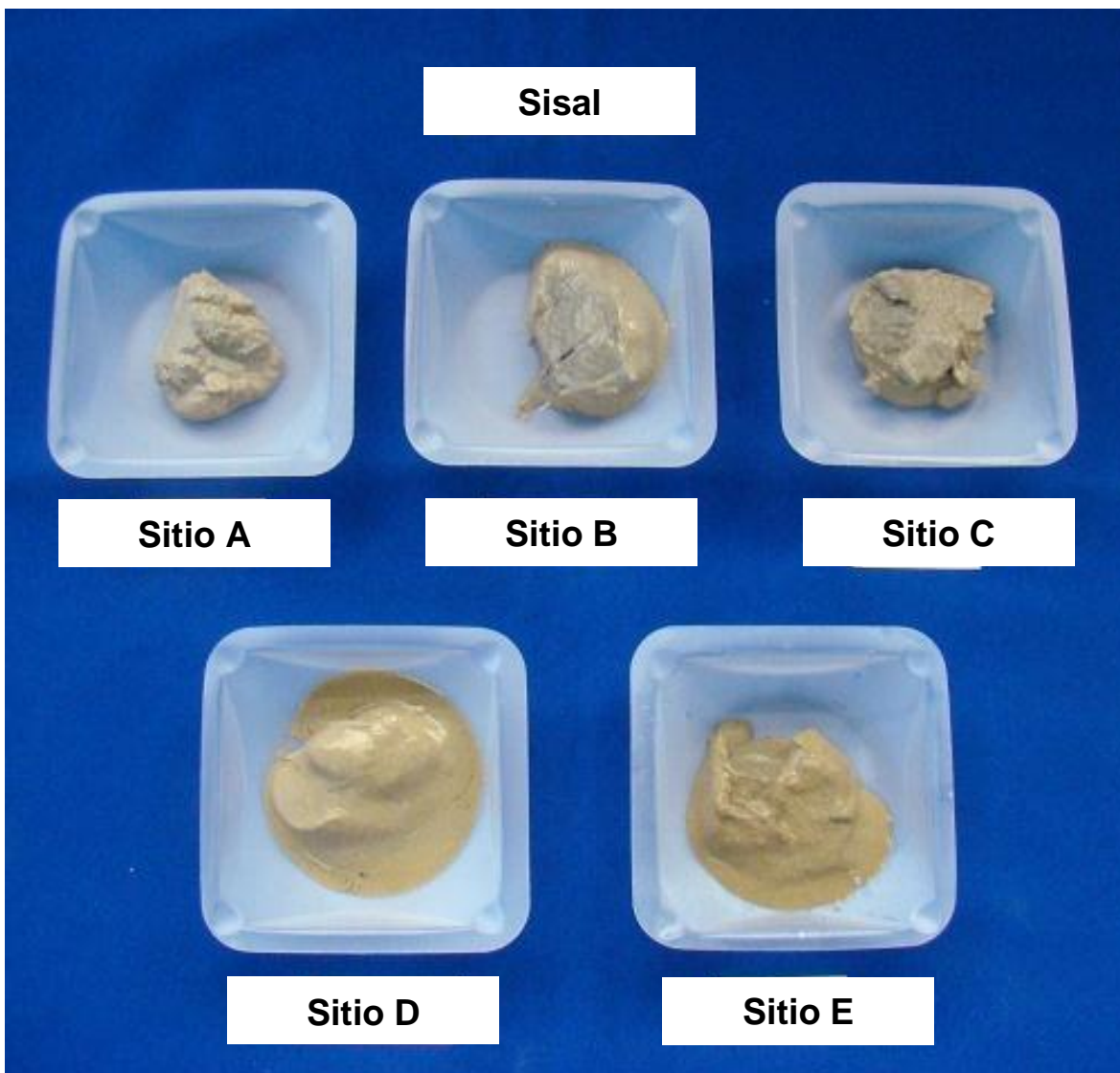


Figura III-2. Sedimentos colectados en Sisal.

Progreso (8.79 ± 0.16^a unidades) en comparación con Sisal y Dzilam de Bravo (8.27 ± 0.24^b y 8.12 ± 0.15^b). Por otro lado, los intervalos de potencial de redox oscilaron entre los -42 y -100 mV en Progreso, entre los -28 y -72 mV en Sisal, y los -6 y -27 mV en Dzilam de Bravo, con medias de -58 ± 24^b , -49 ± 16^b y -14 ± 9^a , respectivamente. El análisis estadístico indicó que los potenciales redox del agua en Dzilam de Bravo son significativamente menos reductores que los hallados en Progreso y Sisal. Lo anterior puede deberse a las bajas concentraciones de sulfuro en los sedimentos de Dzilam de Bravo, ya que este compuesto mantiene los potenciales reductores de la columna de agua, al difundirse desde el sedimento hacia la superficie [112].

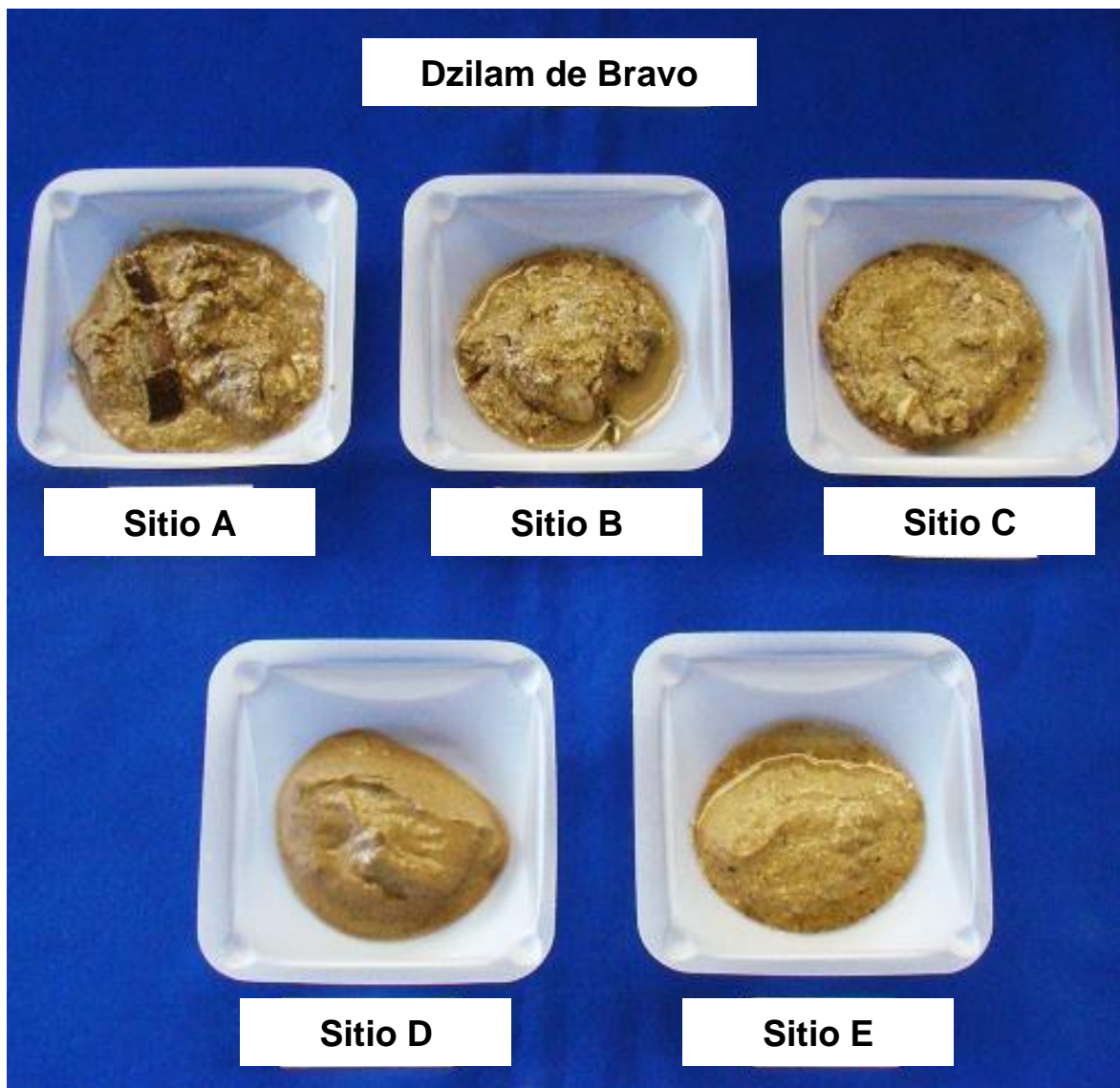


Figura III-3. Sedimentos colectados en Dzilam de Bravo.

III.2. Obtención de cultivos productores de sulfuro

La mayoría de los cultivos establecidos mostraron tener capacidad para producir sulfuro, lo cual se corroboró por la presencia de precipitados de sulfuro de hierro (FeS). Los cultivos del sitio A del puerto de Sisal (SA), no prosperaron al emplear etanol y benzoato como fuentes de carbono. El sedimento colectado en este sitio (SA) presentó un potencial de óxido-reducción de 28 mV, valor que se encuentra dentro del rango de potencial redox para la proliferación de BRS (100 – -400mV). Sin embargo, fue el único sedimento que presentó un potencial oxidante, lo que puede repercutir en una menor

incidencia de este tipo de microorganismos [79, 112]. De esta manera, el sedimento SA únicamente presentó producción de sulfuro a partir de lactato y acetato, por lo que se le consideró como el inóculo que mostró menor adaptabilidad a las diferentes fuentes de carbono.

Durante el monitoreo de los cultivos, se observó que todos los cultivos constituidos a partir de los sedimentos colectados tuvieron la capacidad de producir sulfuro a expensas de la oxidación del lactato. Los precipitados de FeS (color negro intenso) aparecieron en las primeras 48 h de incubación.

De forma similar, todos los cultivos establecidos en acetato produjeron sulfuro. La aparición de los precipitados de FeS en estos cultivos fue más lenta en comparación con el lactato, ya que ocurrió entre las 48 y 96 h de incubación. Lo anterior es consistente con lo reportado por Nevatalo *et al.* [49], donde el acetato presentó tasas de consumo más lentas en comparación con el lactato y el etanol. En el presente estudio se observó producción de sulfuro en todos los cultivos donde se empleó acetato, lo cual confirma que en todos los sedimentos colectados existen BRS con capacidad para realizar la oxidación completa. Este tipo de bacterias poseen potencial para su aprovechamiento para la producción de energía renovable ya que su presencia en los cultivos permite mayores tasas de oxidación de la materia orgánica y mejores rendimientos de sulfuro (Tabla I-2).

Con respecto al benzoato, se apreció una producción de sulfuro más lenta en comparación con las demás fuentes utilizadas. Lo anterior se deduce a partir de la coloración negra tenue que se observó dentro de las 48 y 96 h de incubación. Dicha coloración se tornó más intensa en los días subsiguientes, en los cultivos correspondientes a Progreso (excepto PD) y Sisal. Los cultivos de Dzilam de Bravo así como el cultivo establecido a partir de PD conservaron la coloración tenue durante los 14 días de incubación, lo que sugiere que dichos cultivos tienen menor capacidad para producir sulfuro a expensas de la oxidación del benzoato. El retraso en la aparición de sulfuro al emplear un grupo arilo como fuente de carbono en comparación con el lactato también fue observado por Pawłowska-Ćwiąg y Pado [113]. Cabe mencionar que la oxidación del benzoato no es una de las capacidades más comunes halladas entre las BRS. Hasta la fecha, de entre las más de 120 especies de BRS conocidas, tan solo cerca de una decena de especies oxidantes de benzoato han sido formalmente identificadas [113-120]. Es por esto que la identificación genética de las especies de BRS presentes en los cultivos donde se observó oxidación de benzoato es de particular interés.

Para el caso del etanol, se obtuvieron resultados muy similares a los observados en lactato. Como ya se expuso, todos los cultivos establecidos en etanol fueron positivos para la producción de sulfuro, excepto cuando se usó el sedimento SA como inóculo. En ellos, se observó formación abundante de FeS dentro de las primeras 48 h de incubación.

En las Figuras III-4, III-5 y III-6 se muestran las fotografías tomadas a todos los cultivos al final del periodo de incubación (14 días). Con base en los resultados obtenidos, se puede concluir que la colección de sedimentos presentada en este trabajo es apta para la obtención de cultivos productores de sulfuro con la capacidad de la oxidación de por lo menos cuatro fuentes de carbono: lactato, acetato, benzoato y etanol. De esta manera, los cultivos obtenidos son un reservorio de especies de BRS de la región con potencial para producir energía en forma de sulfuro a partir de la degradación de la materia orgánica. Dichos cultivos poseen un alto valor biotecnológico, no solo por su capacidad para producir energía, sino que también destaca el hecho de que hasta el momento no existen reportes de BRS cultivables que provengan de la costa yucateca. Esto resulta interesante ya que existe la posibilidad de hallar nuevas especies de BRS con potencial para la generación de energía en los cultivos obtenidos en este trabajo.

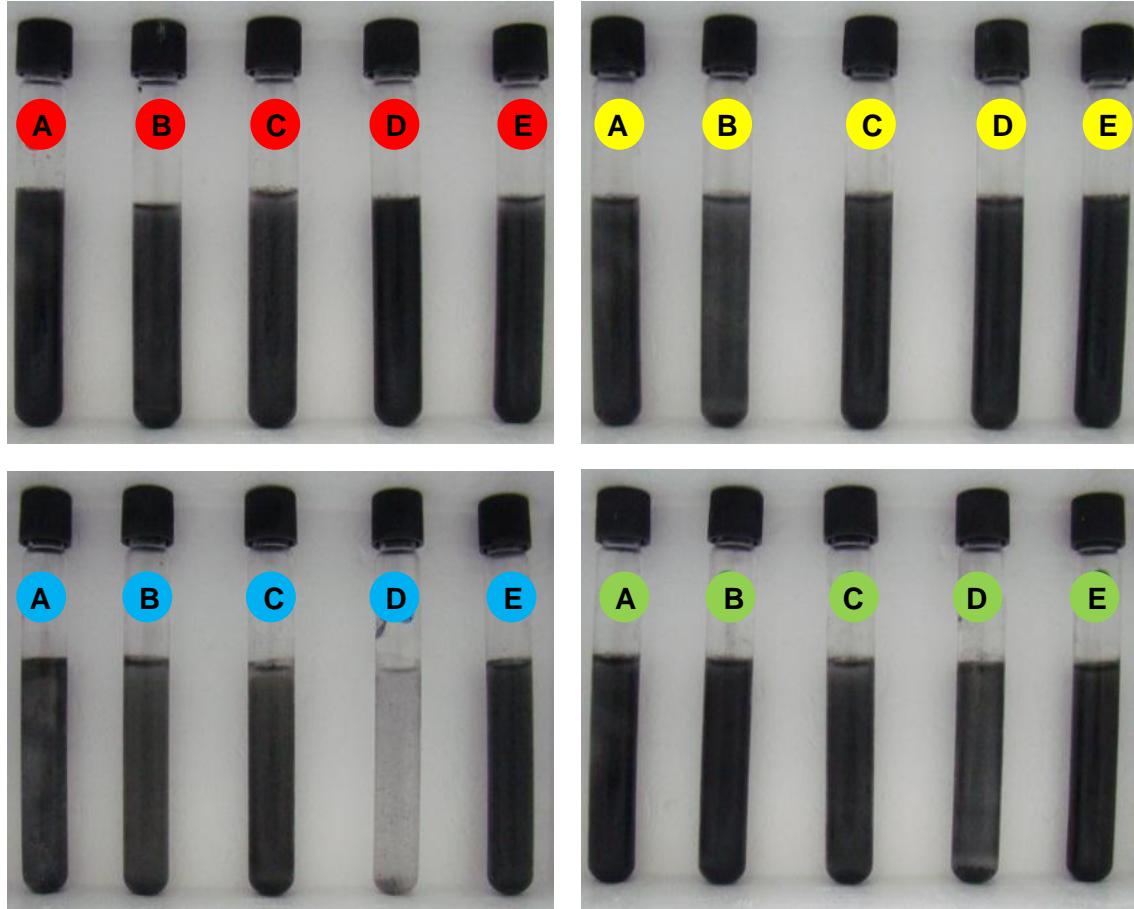


Figura III-4. Cultivos productores de sulfuro establecidos en lactato (rojo), acetato (amarillo), benzoato (azul) y etanol (verde) a partir de sedimentos marinos costeros colectados en el puerto de Progreso.

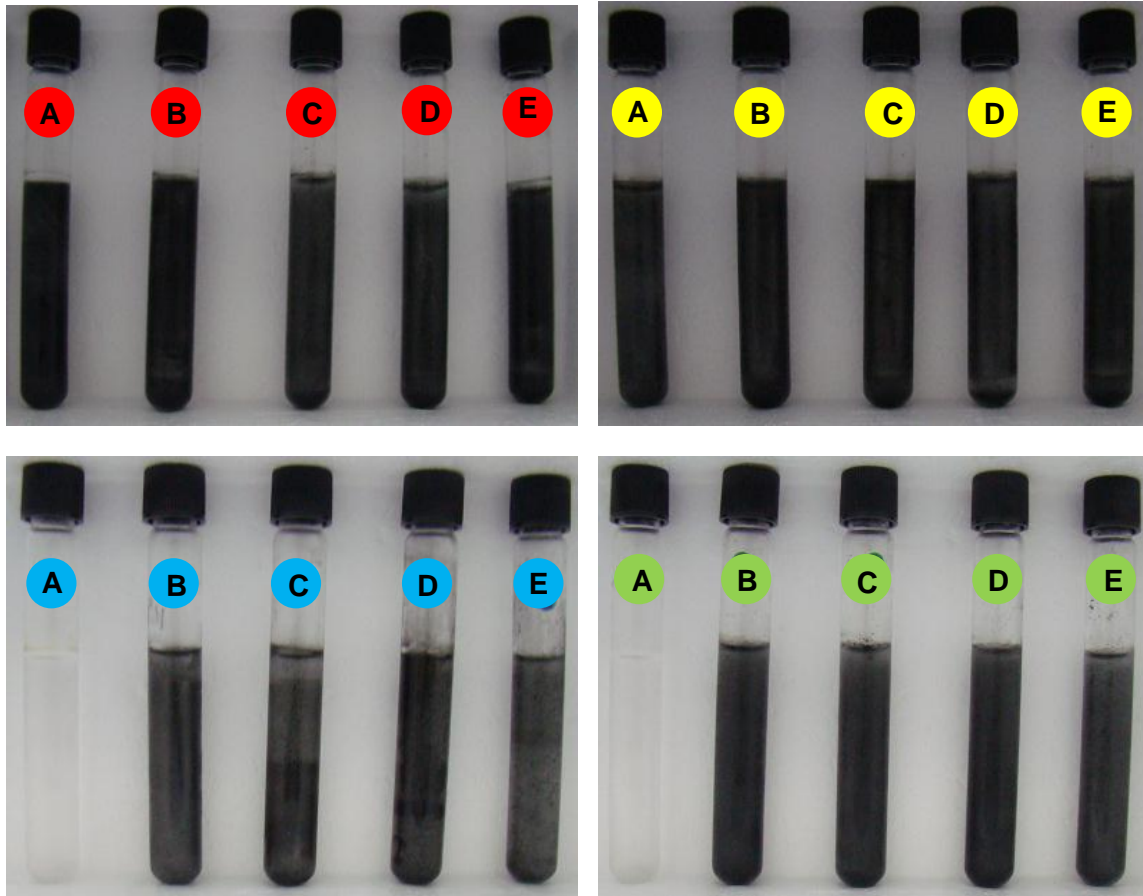


Figura III-5. Cultivos productores de sulfuro establecidos en lactato (rojo), acetato (amarillo), benzoato (azul) y etanol (verde) a partir de sedimentos marinos costeros colectados en el puerto de Sisal.

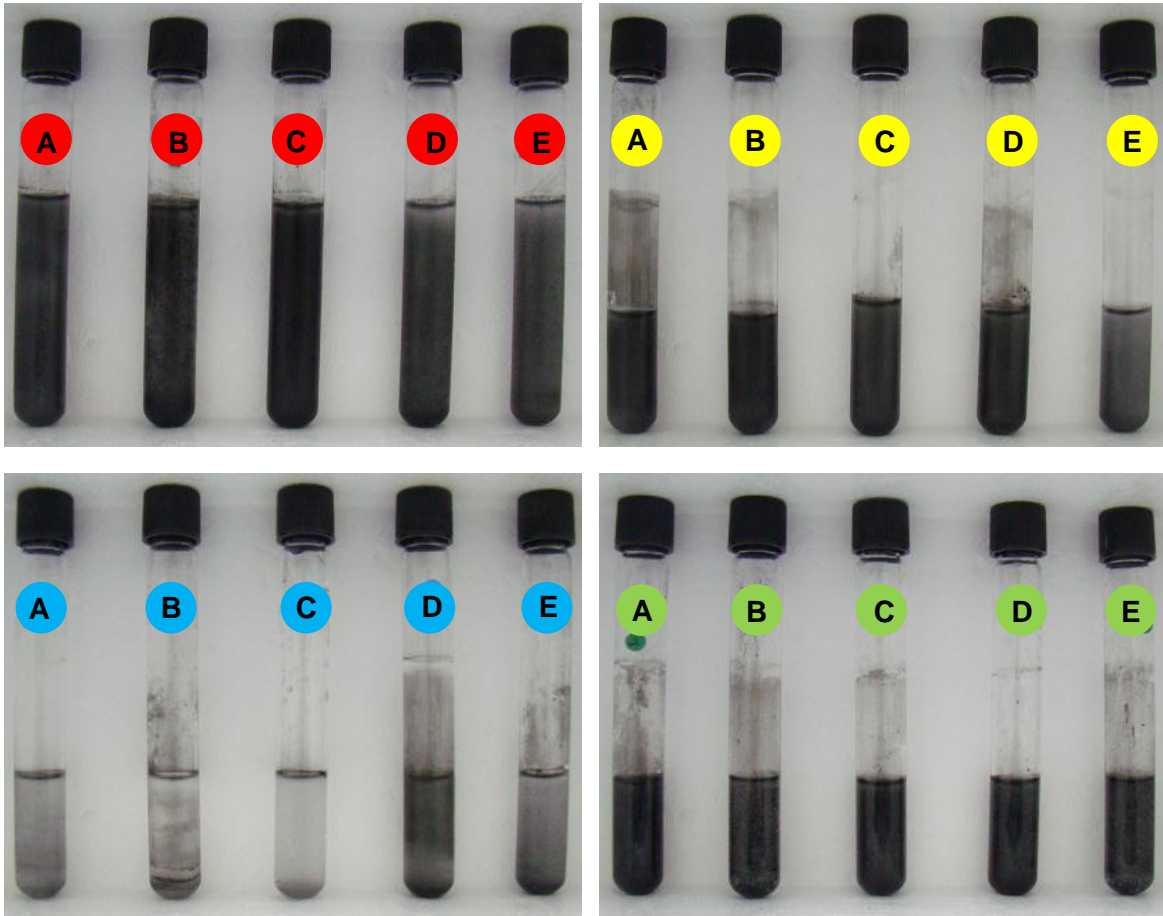


Figura III-6. Cultivos productores de sulfuro establecidos en lactato (rojo), acetato (amarillo), benzoato (azul) y etanol (verde) a partir de sedimentos marinos costeros colectados en el puerto de Dzilam de Bravo.

III.3. Cinética de producción de sulfuro

Con base en la concentración de sulfuro *in situ*, se seleccionaron tres sedimentos para ser empleados como inóculo en el medio de cultivo Postgate B y caracterizar la cinética de producción de sulfuro. El potencial de óxido-reducción del sedimento y la columna de agua fueron considerados, buscando que fuese lo más reductor posible. Los sedimentos de Dzilam de Bravo fueron descartados ya que presentaron concentraciones de sulfuro del orden micromolar (Tabla III-3), lo cual fue significativamente menor en comparación con las concentraciones encontradas en Progreso y Sisal, que fueron del orden milimolar. De esta forma, se eligieron sedimentos de los siguientes sitios: 1) el sitio D de Progreso (PD), que presentó una concentración de sulfuro de 102 mg L^{-1} y un potencial redox de -368 mV (Tabla III-1); 2) el sitio C de Sisal (SC), con 469 mg L^{-1} y -251 mV , y 3) el sitio D de Sisal (SD), con 636 mg L^{-1} y -256 mV (Tabla III-2). Una vez seleccionados, se determinó la concentración de sólidos volátiles (SV). En la tabla III-4 se presenta un resumen de los datos de cada sedimento. Como ya se mencionó en la metodología, se preparó una suspensión de sedimento en agua que se usó para inocular 25 mg de SV L^{-1} en 125 mL de medio de cultivo. Los cultivos y el control se evaluaron por triplicado, por lo que los datos que se presentarán en adelante corresponden a los valores de tendencia central de la totalidad de las réplicas, a menos que se señale lo contrario.

Tabla III-4. Sedimentos seleccionados como inóculo para la producción de sulfuro.

Sitio de colecta	Progreso sitio D (PD)	Sisal sitio C (SC)	Sisal sitio D (SD)
Clave	PD-102	SC-469	SD-636
Sulfuro disuelto			
mg L^{-1}	102.19	469.00	636.00
mM	3.21	14.66	19.84
E_h (mV)	-368	-251	-256
Sólidos volátiles (mg g^{-1})	24.63 ± 0.33	29.82 ± 0.56	26.68 ± 0.45
E_h columna de agua (mV)	-49	-57	-72

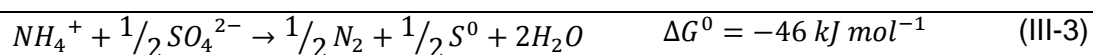
III.3.1. Cinética del cultivo PD-102.

Los datos de la cinética del cultivo PD-102 se resumen en la Figura III-7, donde no se observó producción de sulfuro durante las primeras 109 h. La fase de acumulación de sulfuro ocurrió entre las 109 y 115 h, con una tasa de producción de sulfuro (TPS) de 0.25

$\pm 0.35 \text{ mmol S}^{2-} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. A partir de las 115 h, el sulfuro incrementó paulatinamente de $2.88 \pm 0.93 \text{ mM}$ hasta alcanzar la concentración máxima ($4.65 \pm 1.06 \text{ mM}$) a las 231 h, momento en el que el sistema alcanzó su fase estacionaria, en el que la concentración de sulfuro permaneció estable, alrededor de $4.32 \pm 0.40 \text{ mM}$.

El pH se mantuvo cercano al valor neutro durante todo el experimento y su comportamiento no presentó diferencias significativas con respecto al control. Por su parte, el potencial redox tendió a la oxidación antes de producirse sulfuro en el sistema, pero decayó a $-315 \pm 10.93 \text{ mV}$ al aparecer el sulfuro y se mantuvo en ese valor durante el resto del ensayo. Esto contrasta con lo observado en el control, donde el potencial fluctuó alrededor de los $-141 \pm 46.70 \text{ mV}$ a lo largo del experimento y presentó una tendencia positiva, lo que señala que el sistema tiende a oxidarse en ausencia de actividad biológica.

Por otro lado, se encontró un decremento significativo en la concentración de sulfato entre las 43 y 63 h (19.54%), bajando hasta $12.85 \pm 0.60 \text{ mM}$. Cabe destacar que no se observó producción concomitante de sulfuro, lo que significa que el sulfato consumido no se redujo completamente. Fdz-Polanco *et al.* [121-123] encontraron una remoción simultánea de sulfato y amonio en varios sistemas anaerobios para el tratamiento de vinazas, con un pH cercano a las 8 unidades. Los autores propusieron que este fenómeno ocurre debido a la oxidación del amonio a expensas de la reducción de sulfato, involucrando el acoplamiento del proceso anammox (oxidación de amonio a expensas de la reducción de nitrito), el cual es susceptible de ocurrir en el medio utilizado, que contiene 18.59 mM de amonio en forma de cloruro de amonio. El mecanismo de reacción propuesto por Fdz-Polanco *et al.* [121] es el siguiente:



El acoplamiento de dichas reacciones resulta en un proceso termodinámicamente favorable, que teóricamente ocurriría a un potencial redox estándar de entre -330 y -360 mV [121], sin embargo, el grupo de Fdz-Polanco registró potenciales redox de alrededor de -430 mV . Zhao *et al.* [124] han reportado también éste proceso, observando remoción simultánea de sulfato y amonio al emplear agua residual sintética para alimentar un

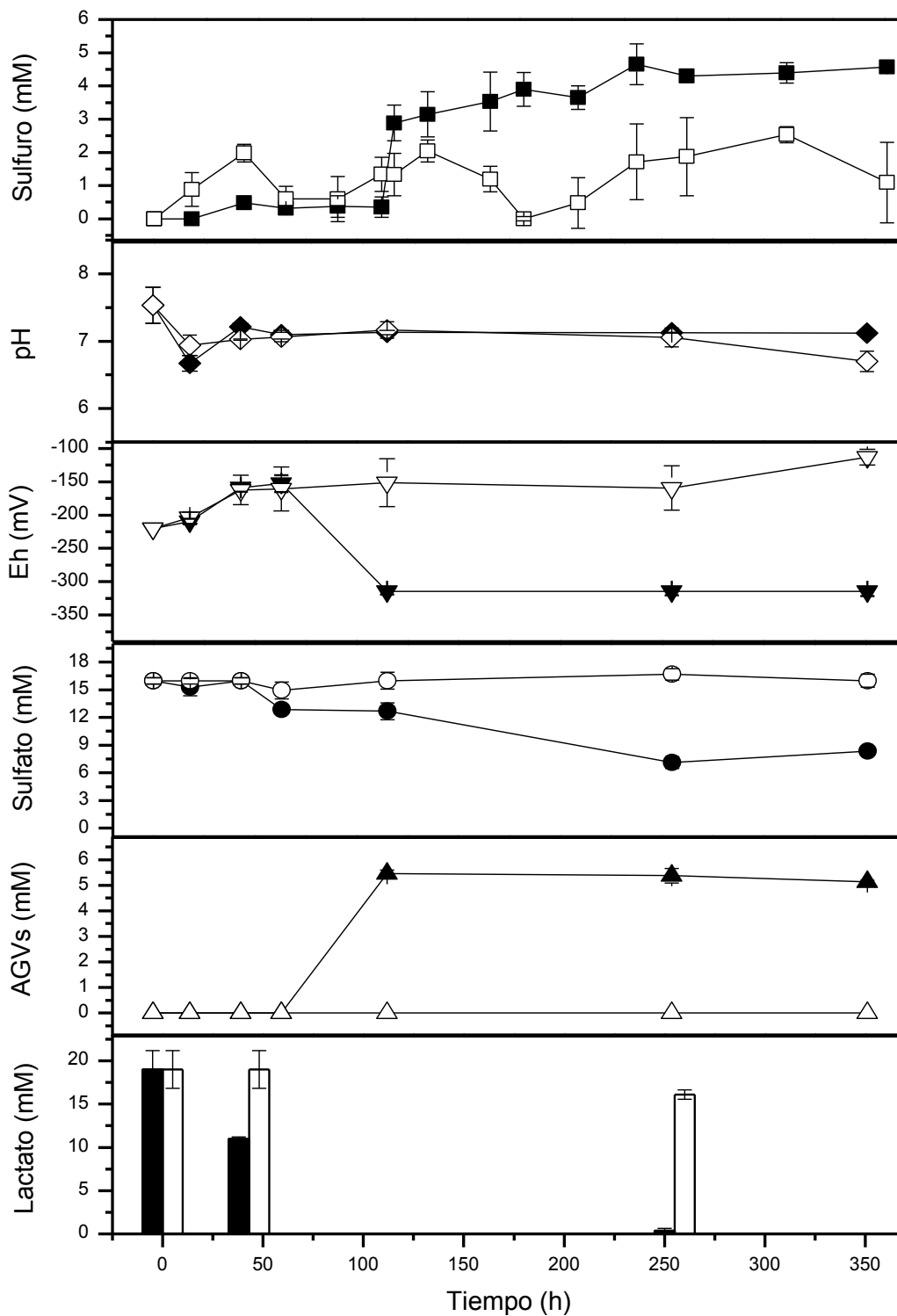


Figura III-7. Cinética de producción de sulfuro, pH y Eh, consumo de sulfato, producción de ácidos grasos volátiles (AGVs), y consumo de lactato del cultivo PD-102. Los símbolos negros indican los valores obtenidos en el cultivo; los símbolos blancos, los del control.

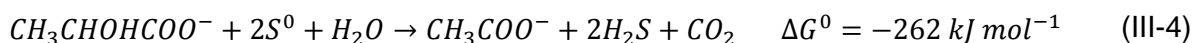
inóculo sulfurogénico. Obtuvieron un pH cercano a 8, así como concentraciones marginales de sulfuro y una acumulación significativa de azufre (correspondiente al 89% del sulfato consumido). A diferencia de lo observado por el grupo de Fdz-Polanco, Rikmann *et al.* [125] obtuvieron potenciales oxidantes cercanos a los 100 mV, demostrando que el proceso puede ocurrir en un amplio rango de potenciales redox, el cual depende en su mayoría de la concentración de sulfuro alcanzada. Así, el sulfato consumido en PD-102 entre las 43 y 63 h pudo ser transformado a sulfuro por la vía mencionada, a un potencial redox intermedio (alrededor de -300 mV) en relación con lo reportado por Rikmann y colaboradores, así como Fdz-Polanco y colaboradores.

Otros mecanismos de reacción han sido propuestos además del descrito por el grupo de Fdz-Polanco, poniendo de manifiesto que la oxidación de amonio y la reducción de sulfato acoplada al proceso anammox puede remover materia orgánica de forma concomitante. También se ha sugerido que la formación de azufre se da por una vía más compleja, donde el sulfato es reducido hasta sulfuro, el cual es rápidamente oxidado a azufre, ya sea por actividad biológica o química [124-126].

La oxidación-reducción de amonio y sulfato acoplado al proceso anammox ha sido reportada por varios autores y ha sido atribuida a la acción de microorganismos del género *Planctomycetes*, así como de especies pertenecientes a *Bacillus*, *Bacteroides*, *Paenibacillus*, y *Staphylococcus*, y de la especie *Anammoxoglobus sulfate* [125, 127]. Adicionalmente, cabe mencionar que existe evidencia de que el proceso mencionado ocurre en los sedimentos marinos de zonas tropicales, por lo que los microorganismos necesarios para que se lleve a cabo pudieron existir en el inóculo empleado [126].

Entre las 63 y 115 h no existió consumo significativo de sulfato, lo que llama la atención debido a que la fase de acumulación de sulfuro se comportó de forma exponencial entre las 109 y 115 h, con una acumulación de 2.88 ± 0.93 mM. Lo anterior resulta interesante, ya que el consumo de sulfato observado inicialmente fue de 3.12 unidades de concentración, indicando que la especie de azufre semi-reducida (probablemente azufre) producida durante las 43 y 63 h, fue empleada en un 92.31% para la formación del sulfuro entre las 109 y 115 h. Este valor (92.31%) representa la eficiencia de reducción de sulfato (ERS) hallada entre las 43 y 115 h. A las 115 h, se observó acumulación de 5.46 ± 0.23 mM de ácido acético en el sistema, que fue el único AGV encontrado. La concentración de acético se mantuvo estable por el resto del experimento, con una concentración promedio de 5.32 ± 0.17 mM. Lo anterior indica que la formación

de sulfuro está acoplada a la oxidación incompleta del lactato. Como se muestra a continuación, este proceso es termodinámicamente favorable cuando el azufre funge como agente oxidante:



Sin embargo, la acumulación de acético en el sistema fue superior a la teórica, ya que se esperaba una relación acético/sulfuro de 0.5, pero se obtuvo una relación de 1.9 ± 0.62 (115 h). Esto indica que existe la mayor parte del acético encontrado en el sistema fue generado por vía fermentativa (acetogénesis). El mismo fenómeno se aprecia en el trabajo de Zhao *et al.* [124], donde la relación acético/sulfuro para la reducción de sulfato fue superior al valor teórico como consecuencia de la actividad fermentativa.

Entre las 115 y 255 h, la concentración de sulfato presentó un decremento importante, disminuyendo de 12.67 ± 1.59 a 7.12 ± 1.08 mM, lo que coincide con la acumulación de sulfuro observada en dicho periodo. Sin embargo, aunque el decremento en la concentración de sulfato fue de 5.55 unidades, la cantidad de sulfuro acumulada fue de 4.30 ± 0.25 mM, lo que corresponde a un consumo de sulfato del 43.80% y una eficiencia de reducción de sulfato (ERS) del 77.48% para el intervalo de tiempo mencionado, lo que significa que el 22.52% del sulfato consumido fue reducido a una especie distinta del sulfuro (probablemente azufre) en dicho intervalo de tiempo. Adicionalmente, se esperaría que el cambio respecto al tiempo en la concentración de sulfuro fuese igual en magnitud al cambio en la concentración de sulfato, sin embargo las pendientes calculadas fueron de 0.0153 ($R^2 = 1$) para el sulfuro y de -0.0397 ($R^2 = 1$) para el sulfato. Esto significa que el sulfato se consumió 2.59 veces más rápido en comparación con la producción de sulfuro, en el periodo mencionado. Lo anterior es evidencia de que la reducción de sulfato se está llevando a cabo a través de un intermediario azufrado semi-reducido (X), cuya velocidad de producción es más rápida que su velocidad de consumo ($k_1 > k_2$):



Aunque el sulfuro es el mejor candidato como especie intermediaria en la Ecuación III-5, hay que tomar en cuenta que el sulfito es también un posible intermediario, a pesar

de no haber encontrado reportes sobre su acumulación en digestores anaerobios. En el Anexo 4 se muestran los cálculos correspondientes.

A partir de las 231 h, cuando se estabilizó la producción de sulfuro, el sulfato permaneció estable (7.73 ± 0.86 mM), alcanzando una remoción total del 48.40% del sulfato presente en el sistema durante todo el experimento. Como era de esperarse, la concentración de sulfato en el control permaneció estable a lo largo de todo el ensayo (15.78 ± 1.24 mM).

Al igual que con el sulfato, se encontró un consumo de lactato no asociado directamente a la producción de sulfuro. Esto se observó durante las primeras 43 h, en las cuales se detectó una disminución del 42.26% en la concentración de lactato, esto es, de 19.00 ± 3.76 a 10.97 ± 0.39 mM), tiempo en el cual no se detectó acumulación de sulfuro en el sistema. El hecho de no haber encontrado AGVs en el sistema en dicho periodo sugiere que el lactato se oxidó completamente o que fue transformado a etanol. Esto último es posible debido a que la fermentación de lactato a etanol resulta termodinámicamente favorable y a que el potencial redox hallado en el sistema a las 43 h (-159 ± 11.02 mV) es similar al teórico requerido para que se lleve a cabo la reacción (-138 mV). Este proceso ha sido atribuido a microorganismos del género *Clostridium* y *Bacteroides* en digestores sulfurogénicos [128]:



El consumo de lactato asociado a la actividad reductora de sulfato sucedió entre las 50 y 250 h, momento en el que la concentración disminuyó de 10.97 ± 0.39 a 0.36 ± 0.47 mM, lo cual corresponde a la remoción del 96.72% del lactato presente al iniciar la producción de sulfuro, que equivale al 55.84% del lactato presente al inicio del experimento. Así, la remoción total de lactato alcanzada por el sistema durante todo el experimento fue del 98.10%, del cual, el 28.54% fue oxidado de forma incompleta y se acumuló en forma de ácido acético en el sistema al final del ensayo. En cuanto al control, no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de lactato encontradas a lo largo del experimento, por lo que se concluye que no existió remoción de lactato en el mismo.

III.3.2. Cinética del cultivo SC-469

Los datos obtenidos para el cultivo SC-469 se muestran en la Figura III-8, donde no se observó aparición de sulfuro durante las primeras 63 h. La fase de acumulación de sulfuro ocurrió entre las 63 y 161 h, con una TPS de $0.21 \pm 0.07 \text{ mmol S L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La producción de sulfuro se estabilizó a partir de las 161 h, permaneciendo constante a una concentración de $11.44 \pm 1.00 \text{ mM}$. La concentración máxima de sulfuro se detectó a las 351 h y fue de $12.84 \pm 2.52 \text{ mM}$.

El pH se mantuvo entre las 6 y 8 unidades a lo largo del experimento. Inicialmente, se observó una tendencia hacia la acidificación durante las primeras 115 h, momento en el que el pH disminuyó paulatinamente, de 7.53 ± 0.46 a 5.86 ± 1.72 unidades. Esto coincide con la acumulación simultánea de AGVs en el sistema, que en ese momento, llegó a su punto máximo, como se discutirá más adelante. Después de las 115 h, el pH presentó un incremento hasta alcanzar casi las 8 unidades justo al mismo tiempo en el que se elevó la concentración de sulfuro en el cultivo. Dicho comportamiento se atribuye a la alcalinidad producida durante la sulfurogénesis, debido a la generación de iones bicarbonato como producto secundario [129].

El potencial redox presentó el mismo comportamiento que el control durante las primeras 43 h, con tendencia a la oxidación y sin diferencias significativas en dicho periodo. Entre las 43 y 63 h, se observó una caída desde los -118 a los -278 mV en el sistema SC-469, mostrando diferencias significativas en comparación con el control. Dicho decremento de potencial resulta llamativo ya que el sulfuro no había aparecido y no se observó consumo de sulfato en ese momento, lo que sugiere que la reducción del potencial fue ocasionada por la generación de una especie química no-azufrada y reducida en el sistema. Con la aparición de sulfuro, el potencial redox decayó hasta los $-344 \pm 8.02 \text{ mV}$, y se mantuvo estable por el resto del ensayo, en un promedio de $350 \pm 6.15 \text{ mV}$ entre las 115 y 351 h.

Por otra parte, en la Figura III-8, se observa que a las 63 h parece iniciar el consumo de sulfato, sin embargo, el análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre la concentración de sulfato a las 43 y 63 h en el cultivo, ni entre la concentración de sulfato a las 63 h en el cultivo y el control. El consumo de sulfato fue significativo entre las 63 y 115 h, tiempo en el que la concentración decayó hasta $6.08 \pm 0.30 \text{ mM}$, lo que representa un consumo del 61.93%. En dicho intervalo de tiempo la eficiencia de reducción de sulfato (ERS) fue de 86.92% y el 13.08% del sulfuro consumido

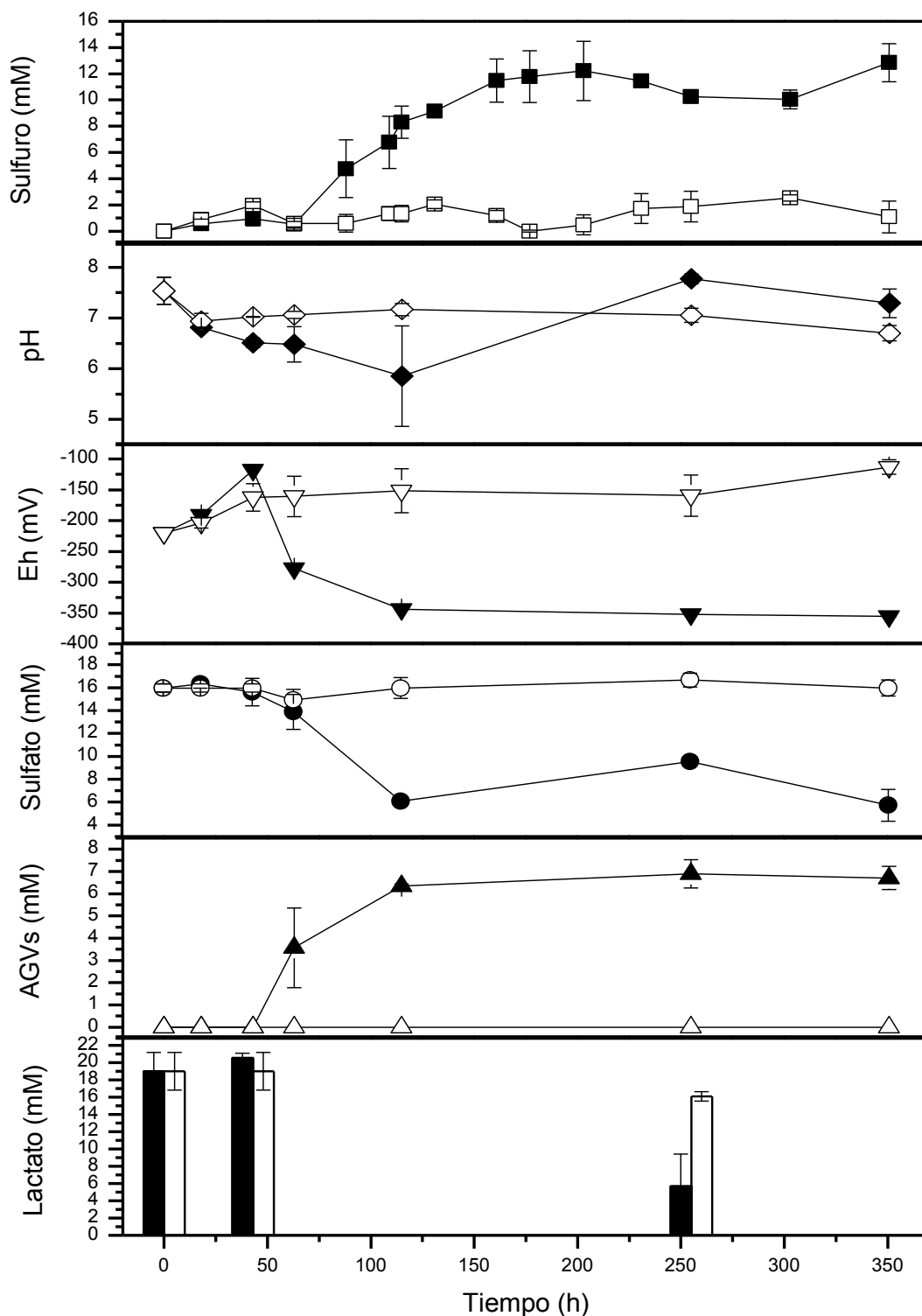


Figura III-8. Cinética de producción de sulfuro, pH y Eh, consumo de sulfato y producción de ácidos grasos volátiles (AGVs), y consumo de lactato del cultivo SC-469. Los símbolos negros indican los valores obtenidos en el cultivo; los símbolos blancos, los del control.

observada en la concentración de sulfato entre las 115, 255 y 351 h no fue significativa, así la concentración promedio de sulfato entre las 115 y 351 h fue de 7.12 ± 2.11 mM.

Es importante destacar que la fase de acumulación de sulfuro tuvo una mayor duración que la fase de consumo de sulfato, ocurriendo la primera entre las 63 y 161 h, y la segunda entre las 63 y 115 h. Adicionalmente, se esperaría que las pendientes de ambas fases fuesen iguales en magnitud y contrarias en dirección, sin embargo, las pendientes calculadas fueron de 0.1104 ($R^2 = 0.9578$) y de -0.1362 ($R^2 = 0.9899$), respectivamente. De esta forma, el consumo de sulfato ocurrió 1.23 veces más rápido que la producción de sulfuro para el periodo mencionado, repitiéndose el comportamiento observado en PD-102 y descrito en la Ecuación III-5, donde el intermediario posiblemente sea el azufre, cuya reducción a sulfuro ocurre mediante la Ecuación III-4.

En cuanto a los AGVs, solamente se detectó la presencia de ácido acético, la cual se hizo visible entre las 43 y 63 h, esto es, antes de que apareciera el sulfuro, presentando una concentración de 3.57 ± 3.11 mM. Mientras la producción de sulfuro se comportaba de forma exponencial (entre las 63 y 115 h), la concentración se incrementó a 6.35 ± 0.14 mM y se mantuvo en un promedio de 6.65 ± 0.27 mM desde las 115 h hasta el final del ensayo. La relación acético/sulfuro obtenida a las 115 h fue de 0.33 ± 0.36 . Esta fue calculada tomando en cuenta el ácido acético acumulado entre las 63 y 115 h, que corresponde a un aumento de 3.08 ± 3.11 unidades de concentración. La relación obtenida está por debajo del valor teórico basado en la Ecuación III-4, hecho que sugiere el consumo de acético, ya sea por la actividad de las BRS con capacidad de oxidación completa o por las bacterias metanogénicas.

En cuanto al lactato, se encontró que la mayor parte había sido removida, ya que se registró una concentración de 5.67 mM al finalizar el ensayo, en contraste con los 19.00 ± 3.76 mM iniciales, lo que representa un consumo del 70.16%.

Debido a que no hubo consumo de lactato durante las primeras 43 h y a que se observó una acumulación de acético a las 63 h, se sabe que la oxidación de lactato tuvo inicio entre las 43 y 63 h. Como se mencionó anteriormente, durante dicho periodo el consumo de sulfato resultó marginal y el potencial se hizo más reductor. Todo esto ocurrió antes de la producción de sulfuro, lo que indica que a partir de las 43 h inició un proceso de fermentación acetogénica que fue superado por la reducción de sulfato a partir de las 63 h, momento en el que inició la generación de sulfuro en el sistema.

Estas observaciones son un indicador de que durante las primeras horas del cultivo existió una competencia por los sustratos disponibles entre diversos grupos microbianos provenientes del sedimento. Según lo reportado en la literatura, es común que dicha competencia se da entre las BRS, las bacterias acetogénicas y las bacterias metanogénicas, todas ubicuas en los sedimentos marinos costeros. Ésta se da de tres formas: 1) entre las bacterias acetogénicas no reductoras de sulfato y las BRS por el lactato, 2) entre las bacterias metanogénicas acetoclásticas y las BRS con capacidad de oxidación completa por el acetato y 3) entre las BRS con capacidad de emplear H_2/CO_2 como fuente de energía/carbono y las bacterias metanogénicas hidrogenotróficas por el hidrógeno [5, 19, 130, 131].

Se sabe que existió actividad metanogénica en el cultivo debido a que se detectó presencia de metano en la cabeza de aire, como se detallará más adelante. Esto es importante ya que la producción de metano pudo ser responsable de la caída del potencial redox a las 63 h, cuando aún no se acumulaba el sulfuro. Al respecto, se espera que la actividad metanogénica suceda a la sulfurogénica, según lo descrito en la literatura clásica en referencia a los sistemas abiertos (como en los sedimentos costeros) [132, 133]. Sin embargo, hay evidencia de que esto no ocurre de forma obligatoria en los sistemas cerrados. Zhao *et al.* [128, 134], así como el grupo de Fdz-Polanco [122], han reportado la coexistencia de las tres actividades microbianas en reactores sulfurogénicos alimentados con diversas fuentes de carbono, entre las que se encuentra el lactato, con valores de pH y potencial redox similares a los encontrados en este experimento. Inclusive, Zhao *et al.* [134] publicaron un trabajo donde se observa que la actividad metanogénica precede a la sulfurogénica durante el arranque del reactor, la cual es desplazada después de 5 días, momento en el que inicia la remoción de sulfato y la producción de sulfuro.

También, es importante mencionar que se detectó hidrógeno durante el análisis de gases de la cabeza de aire, el cual se genera como producto secundario durante la acetogénesis, que puede ser llevada a cabo tanto por bacterias acetogénicas no reductoras de sulfato como por BRS con capacidad para la oxidación incompleta. Con respecto a lo anterior, se ha reportado que *Desulfovibrio vulgaris* presenta un periodo fermentativo antes de iniciar la reducción de sulfato, en el que el lactato es fermentado a acetato, y como consecuencia se acumula hidrógeno en el sistema; el gradiente de protones generado durante la fermentación acetogénica es aprovechado para la

producción de ATP vía ATP sintasa localizada en la membrana periplasmática. Dicho ATP es necesario para que se realice la activación de sulfato vía ATP sulfurilasa y la reducción de sulfato a sulfuro se lleve a cabo [80]. Por otro lado, Walker *et al.* [135] observaron que el hidrógeno generado por las BRS como producto de la fermentación del lactato es utilizado por las bacterias metanogénicas hidrogenotróficas como sustrato para la producción de metano; a su vez, las bacterias metanogénicas regulan la concentración de hidrógeno en el medio, manteniéndola en niveles que permiten que las BRS continúen en estado fermentativo, hasta que se propicien las condiciones necesarias para iniciar la reducción de sulfato. Esto demuestra que la actividad metanogénica ocurre antes que la sulfurogénica y es indicativo de las relaciones sintróficas existentes entre las BRS y las bacterias metanogénicas. En este sentido, Meyer *et al.* [136] reportaron que las bacterias metanogénicas aprovechan el formato acumulado en el periplasma de las BRS para generar metano y que inclusive existe una transferencia directa de electrones entre células de estos dos géneros, lo cual se logra a través del acoplamiento de lanzaderas de electrones (electron shuttles en inglés) localizadas en las membranas celulares. Sin embargo, un estudio mucho más detallado sería necesario para dilucidar las relaciones sintróficas que pudieron ocurrir en SC-469 entre las bacterias metanogénicas y las BRS.

III.3.3. Cinética del cultivo SD-636

El cultivo SD-636 no presentó producción de sulfuro durante las primeras 63 h. Pasadas las 63 h, inició la acumulación de sulfuro en el sistema, comportándose de forma exponencial entre las 63 y 131 h (Figura III-9), con una TPS fue de $0.11 \pm 0.01 \text{ mmol S L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La fase estacionaria de producción de sulfuro tuvo lugar a partir de las 131 h, en la que se alcanzó una concentración de sulfuro promedio de $7.09 \pm 0.38 \text{ mM}$. La producción máxima se registró a las 131 h y fue de $7.6 \pm 1.50 \text{ mM}$. Así mismo, es importante señalar que se registró un decremento en la concentración de sulfuro al inicio de la fase estacionaria (Figura III-9). Este efecto indica que el sulfuro fue reoxidado, tarea que comúnmente es realizada por las bacterias oxidadoras de sulfuro, pertenecientes a géneros como *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thiobacillus* y *Thiomicrospira*, y que transforman en sulfuro a azufre [19, 130]. El azufre formado es susceptible de ser reducido nuevamente a sulfuro por bacterias reductoras del azufre [137].

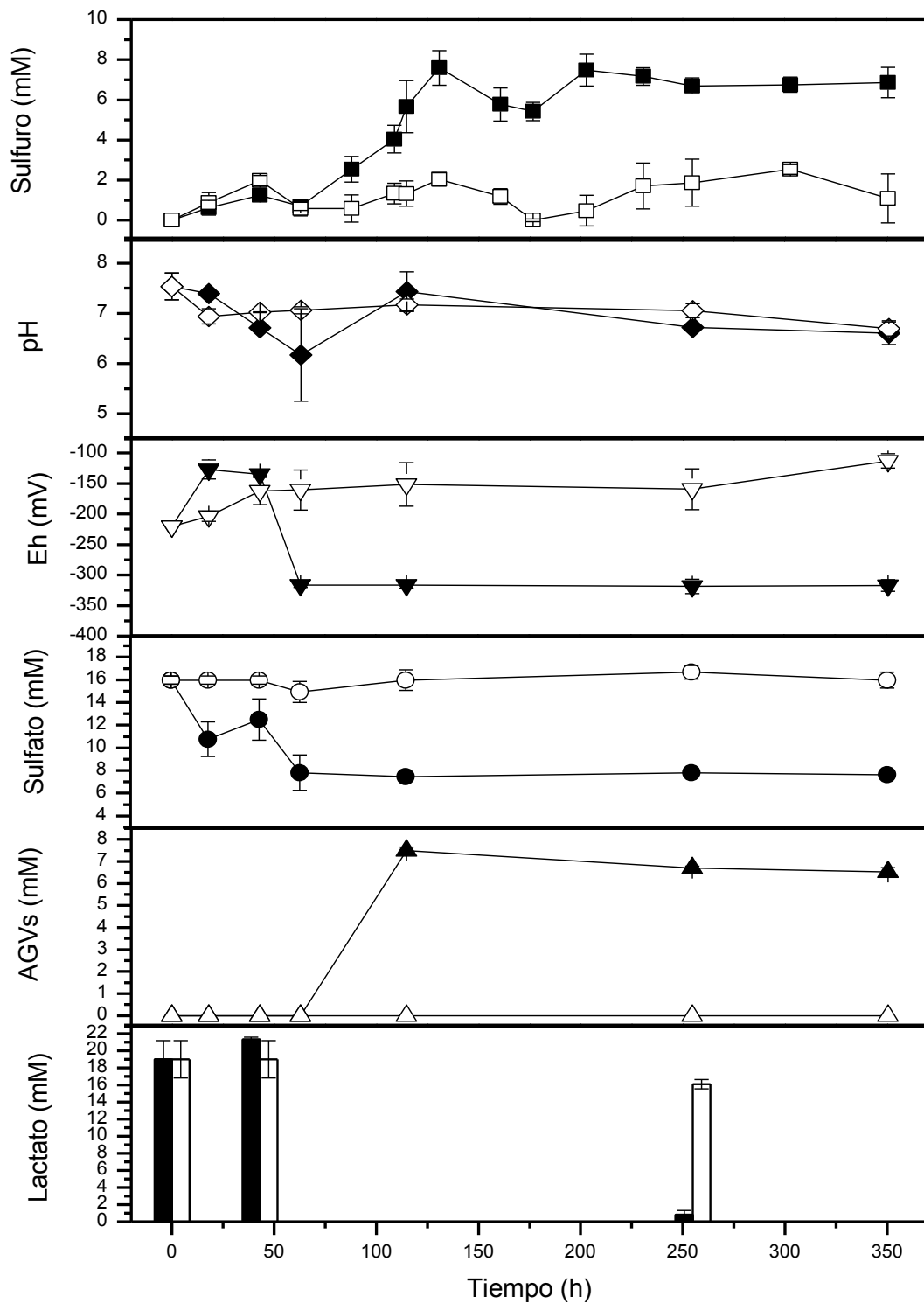


Figura III-9. Cinética de producción de sulfuro, pH y Eh, consumo de sulfato y producción de ácidos grasos volátiles (AGVs), y consumo de lactato del cultivo SD-636. Los símbolos negros indican los valores obtenidos en el cultivo; los símbolos blancos, los del control.

Por otro lado, el pH se comportó de forma similar a SC-469, presentando un decremento antes de la aparición del sulfuro en el sistema. Dicho decremento se hizo más pronunciado a las 63 h, alcanzando las 6.17 ± 1.60 unidades. En contraste con SC-469, no se observó acumulación de AGVs al momento en el que el pH decreció. El pH del sistema se estabilizó durante la sulfurogénesis, a las 115 h, y se mantuvo en un promedio de 6.92 ± 0.45 durante el resto del ensayo.

El potencial redox tendió a la oxidación durante las primeras 18 h. Sin embargo, entre las 18 y 43 h se registró un ligero decremento que no resultó estadísticamente significativo. En las 10 horas siguientes el potencial decayó de forma más pronunciada de -135 ± 4.73 a las 43 h hasta -316 ± 6.66 mV a las 63 h. Esto ocurrió antes de la aparición de sulfuro, lo que coincide con lo observado en SC-469. Como ya se abordó anteriormente, este comportamiento sugiere la formación de algún compuesto reducido no-azufrado, probablemente metano. El potencial redox promedio hallado durante la fase estacionaria de producción de sulfuro que de -315 ± 1.07 mV.

En contraste con lo observado en PD-102 y SC-469, el consumo de sulfato inició inmediatamente, haciéndose notorio entre las 0 y 18 h. A las 63 h, la concentración de sulfato había decrecido hasta 7.81 ± 2.71 mM, valor que se mantuvo estable durante el resto del ensayo, con una concentración promedio de 7.68 ± 0.17 mM. Esto resulta interesante, ya que durante la formación de sulfuro, ocurrida entre las 63 y 131 h, no se detectó consumo de sulfato alguno, puesto que para ese momento su concentración ya se había estabilizado en 7.68 ± 2.71 mM. Lo anterior sugiere que el sulfato consumido antes de las 63 h fue reducido para dar lugar a otra especie azufrada, la cual fue reducida hasta sulfuro después de las 63 h (lo que pudo darse mediante la Ecuación III-3 y la Ecuación III-4). Solamente bajo dicho supuesto es posible explicar la aparición de sulfuro sin existir consumo simultáneo de la única fuente de azufre presente en el medio: el sulfato. Este comportamiento fue observado en los tres cultivos (ver Ecuación III-5), pero en SD-636 se hace más evidente y se pone de manifiesto que la reducción del intermediario azufrado semi-reducido hasta sulfuro es la reacción limitante en el sistema, en cuanto a la producción de sulfuro se refiere.

En cuanto a los AGVs, se observó una acumulación al iniciar la producción de sulfuro, esto es, entre las 63 y 115 h. A diferencia de PD-102 y SC-469, en el cultivo SD-636 se observó formación de ácido propiónico, cuya concentración fue menor que la concentración de ácido acético encontrada (Figura III-10). La velocidad de acumulación

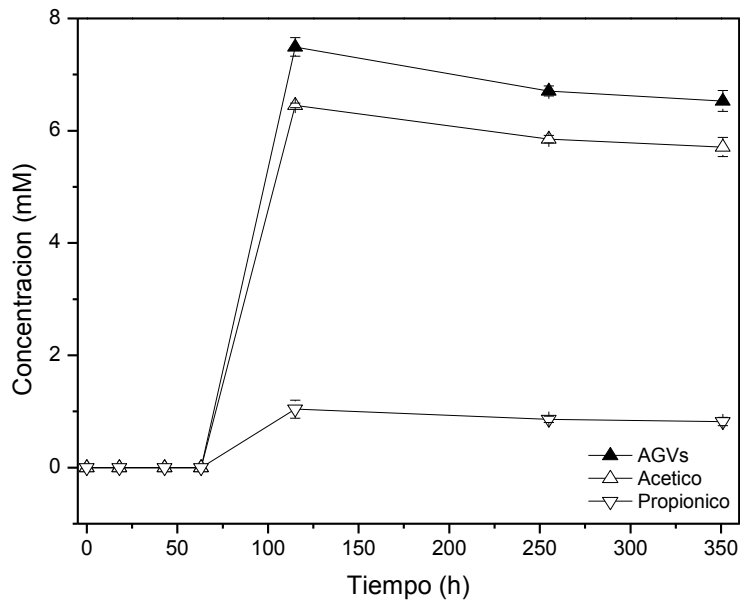


Figura III-10. Ácidos grasos volátiles (AGVs) totales, ácido acético y ácido propiónico del cultivo SD-636.

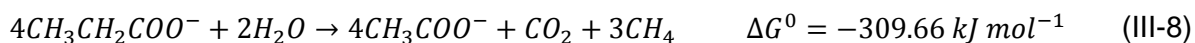
de ácido acético fue de $0.12 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, que fue mucho mayor que la velocidad de acumulación de ácido propiónico $0.02 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, de tal forma que la velocidad de acumulación de AGVs fue de $0.14 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Después de las 115 h se estabilizó la producción de AGVs, manteniéndose relativamente constante, con un promedio de $6.91 \pm 0.51 \text{ mM}$. Sin embargo, el análisis de varianza arrojó resultados significativos al comparar la concentración de AGVs a las 115 h contra las 255 h, que fue de 7.49 ± 0.29^a y 6.71 ± 0.15^b mM, respectivamente. Lo anterior es interesante, ya que es el único cultivo donde el consumo de AGVs se hizo visible. Se realizaron análisis de varianza para las concentraciones de acético y propiónico por separado entre las 115 y 255 h, y se encontraron diferencias significativas para el primero (115 h: 6.45 ± 0.07^a y 255 h: 5.85 ± 0.12^b mM), pero no para el segundo (115 h: 1.04 ± 0.28^a y 255 h: 0.86 ± 0.10^a mM). Esto significa que el decremento observado en la concentración de AGVs en el sistema se debió a la disminución en la concentración de acético, y no en la de propiónico.

La generación de ácido propiónico en los sistemas sulfurogénicos ha sido reportada en la literatura [128, 134, 138, 139] y su formación se atribuye a microorganismos del genero *Clostridium* y *Bacteroides*. El mecanismo de reacción que se ha propuesto está dado por la siguiente ecuación [128, 140]:



Sin embargo, las relaciones molares halladas en SD-636 no coinciden con dicho mecanismo de reacción (Ecuación III-7), ya que la acumulación de ácido acético fue significativamente mayor a la de propiónico. Esto es de esperarse ya que el ácido propiónico sirve como sustrato a las bacterias metanogénicas para la formación de metano (Ecuación III-8 y III-9) [141, 142] (el cual fue detectado en la cabeza de aire durante el análisis de gases); también, sirve como sustrato a las bacterias reductoras de sulfato, así como a las bacterias reductoras de azufre [5, 131]. Se ha reportado que la oxidación del ácido propiónico acoplada a la reducción de azufre puede darse tanto de manera incompleta (Ecuación III-10) [137] como completa (Ecuación III-11) [143].



Lo anterior concuerda con la relación molar AGVs/sulfuro encontrada en este cultivo, que fue de 0.99 ± 0.11 mM, indicando que hubo un excedente de AGVs con base en la relación molar descrita de la Ecuación III-4, que fueron generados por vía fermentativa (Ecuación III-7). Con respecto al lactato, no se registró consumo durante las primeras 43 h de incubación, pero a las 255 h éste había sido removido en un 95.46%.

III.3.4. Producción de sulfuro *in vitro* vs. concentración de sulfuro *in situ*

Las cinéticas de producción de sulfuro de los tres cultivos, PD-102, SC-469 y SD-636, así como del control, se presentan nuevamente en la Figura III-11. Como se expuso en la sección anterior, PD-102 presentó la mayor velocidad de producción de sulfuro

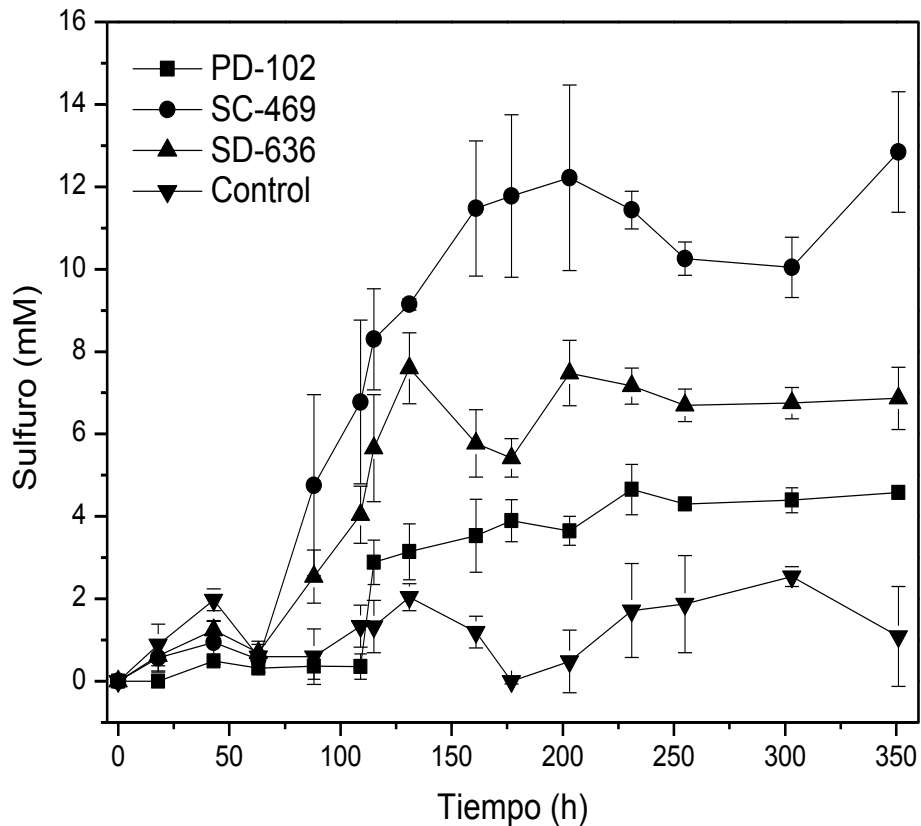


Figura III-11. Cinética de producción de sulfuro de los cultivos PD-102, SC-469 y SD-636 contra el control.

durante la fase de acumulación, seguido de SC-469 y SD-636. A pesar de que, aparentemente, la velocidad disminuye conforme aumenta la concentración de sulfuro hallada en los sedimentos, no se hallaron diferencias significativas entre las velocidades encontradas en los tres cultivos.

Por otra parte, PD-102 fue el primer cultivo en alcanzar la fase estacionaria de producción de sulfuro (115 h) con una concentración de sulfuro estable en $4.31 \pm 0.40^{\circ}$ mM. A pesar de que en este cultivo el sulfuro se estabilizó más rápidamente, fue el que presentó una menor producción. SD-636 alcanzó la fase estacionaria a las 131 h, con una concentración de sulfuro intermedia en comparación con los otros cultivos, que fue de

7.09 ± 0.38^b mM. SC-469 fue el último cultivo en alcanzar la fase estacionaria (161 h), pero produjo concentraciones de sulfuro superiores en comparación con el resto de los cultivos (11.44 ± 1.00^a mM).

La velocidad específica de formación de sulfuro fue calculada para cada uno de los cultivos, siendo de 9.95 ± 13.97^a mol de S^{2-} g SV^{-1} h $^{-1}$ para PD-102, así como de 8.45 ± 2.69^a y 4.27 ± 0.42^a mol de S^{2-} g SV^{-1} h $^{-1}$ para SC-469 y SD-636, respectivamente. Las velocidades obtenidas no mostraron diferencias significativas entre sí en el análisis de varianza, pero esto está influenciado por la dispersión de los datos, que fue muy grande en PD-102. Por esto, se realizó un análisis de varianza entre las velocidades específicas de SC-469 y SD-636, sin incluir a PD-102, y se observaron diferencias marginales entre sí (p-valor = 0.08).

En el control, se observaron absorbancias correspondientes a poco más de 1 mM de sulfuro, después de las 100 h de incubación (1.54 ± 0.78^d mM), así también se presentó turbidez en el medio de cultivo y una coloración gris en el precipitado. Sin embargo, no se observó formación de FeS, por lo que estos efectos no fueron atribuidos a la actividad biológica.

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre las concentraciones de sulfuro alcanzadas en fase estacionaria, por PD-102, SC-469 y SD-636, así como con la concentración equivalente a las absorbancias registradas en el control. Esto significa que la concentración final de sulfuro que se obtuvo fue dependiente del sedimento utilizado como inóculo. Sin embargo, en los resultados obtenidos no se observó una concordancia entre la producción de sulfuro *in vitro* y la cantidad de sulfuro hallada *in situ*. Esto se debe a que probablemente, en los experimentos no se alcanzó el mismo estado estacionario en el que se encontraba el sistema costero donde los sedimentos fueron colectados. La R de correlación de Pearson obtenida fue de 0.556, con un p-valor de 0.625.

Por otra parte, con base en los resultados obtenidos, se ha observado que es posible producir sulfuro a partir de BRS de sedimentos marinos costeros, con concentraciones finales similares a las halladas por Ieropoulos *et al.* [73] (desde 1 hasta 10 mM) en diversas celdas de combustible microbianas inoculadas con sedimentos de una planta de tratamiento. Por otro lado, Dar *et al.* [131] emplearon un reactor sulfurogénico (también inoculado con sedimentos de una planta de tratamiento) en el que obtuvieron concentraciones de sulfuro similares a las obtenidas en SD-363 (7.09 ± 0.38^b

mM). Cabe destacar que en este trabajo se consiguieron concentraciones mayores que en los estudios mencionados (11.44 ± 1.00^a mM en SC-469), lo que apunta al hecho de que las BRS de sedimentos marinos costeros son competentes para la producción de sulfuro —y por lo tanto, para la producción de energía renovable— de la misma forma que lo son las BRS provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales.

III.3.5. Balance de masa y evaluación de la actividad reductora de sulfato

Las concentraciones de sulfuro, sulfato, AGVs y lactato registradas en PD-102, SC-469 y SD-636 (Figuras III-7, III-8 y III-9) se emplearon para realizar los balances de masa de cada cultivo. Las cantidades netas de sustratos consumidos y producto sirvieron para determinar la eficiencia de la reducción de sulfato (ERS), el rendimiento de oxidación de lactato (ROL), en porcentaje de remoción de lactato y sulfato, así como el porcentaje de oxidación completa. Los resultados se muestran en la Tabla III-5.

Tabla III-5. Balance de masa y evaluación del desempeño de los cultivos PD-102, SC-469 y SD-636.

	PD-102	SC-469	SD-636
<i>Balance de masa</i>			
Sulfuro producido (mmol)	0.54 ± 0.0045^a	1.45 ± 0.2077^b	0.84 ± 0.0909^c
Sulfato consumido (mmol)	1.03 ± 0.0940^a	1.26 ± 0.1638^a	1.07 ± 0.0251^a
Lactato consumido (mmol)	2.33 ± 0.0581^a	1.67 ± 0.8058^a	2.27 ± 0.1066^a
AGVs producidos (mmol)	0.67 ± 0.0160^a	0.83 ± 0.0265^b	0.83 ± 0.0245^b
<i>Evaluación del desempeño del cultivo</i>			
ERS (%)	52.98 ± 4.68^a	115.18 ± 8.19^b	78.54 ± 7.98^c
ROL (mmol S ²⁻ /mmol C ₃ H ₅ O ₃ ⁻)	0.23 ± 0.0066^a	1.13 ± 0.8238^b	0.37 ± 0.0588^c
Remoción de sulfato (%)	51.62 ± 4.71^a	63.04 ± 8.21^a	53.62 ± 1.26^a
Remoción de lactato (%)	98.13 ± 2.45^a	70.18 ± 33.93^a	95.73 ± 4.49^a
Porcentaje de oxidación completa (%)	71.44 ± 0.55^a	38.34 ± 37.14^b	63.57 ± 1.63^b

AGVs: Ácidos grasos volátiles. ERS: Eficiencia de reducción de sulfato. ROL: Rendimiento de oxidación de lactato. Letras diferentes indican diferencias significativas halladas mediante las pruebas de comparación de promedios de Tukey y Kruskal-Wallis/Mann-Whitney.

Como ya era de esperarse, se encontraron diferencias significativas entre la masa de sulfuro promedio acumulada en los cultivos, siendo SC-469 el que presentó mayor acumulación, seguido de SD-636 y PD-102 (1.45 ± 0.2077^b , 0.84 ± 0.0909^c y $0.54 \pm$

0.0045^a mmoles, respectivamente). En contraste, la masa de sulfato consumida no presentó diferencias entre cultivos, lo mismo que la remoción de sulfato alcanzada por los sistemas, que fue de 51.62 ± 4.71%^a, 63.04 ± 8.21%^a y 53.62 ± 1.26%^a, para PD-102, SC-469 y SD-636. Así, la mayor eficiencia de reducción de sulfato (ERS) fue encontrada en SC-469 (115.18 ± 8.19%^b), seguida de SD-636 (78.54 ± 7.98%^c) y PD-102 (52.98 ± 4.68%^a). Como se puede ver el valor hallado en SC-469 se encuentra ligeramente por encima del teórico, lo cual se atribuye al sulfato presente en el inóculo, ya que las concentraciones de sulfato en los sedimentos marinos y estuarinos alcanza los 25 mmoles por litro de agua intersticial [82, 112, 144-146]. De esta forma, se consideró que SC-469 presentó conversiones de sulfato ideales, mientras que SD-636 presentó eficiencias intermedias y PD-102 las más bajas, es decir, SC-469 transformó todo el sulfato consumido a sulfuro, mientras que en SD-636 y PD-102, parte del sulfato consumido permaneció como el intermediario semi-reducido ya mencionado (21.46 ± 7.98% y 47.02 ± 4.68%, respectivamente).

Al igual que la remoción de sulfato, la remoción de lactato no mostró diferencias estadísticas entre cultivos. El mayor porcentaje de remoción de lactato fue alcanzado en PD-102, que fue de 98.13 ± 2.45%^a, le siguió SD-696 con un porcentaje de 95.73 ± 4.49^a. SC-469 fue el cultivo que presentó la remoción más baja (70.18 ± 33.93^a). Es importante destacar que el lactato removido fue inversamente proporcional a la ERS y a la masa de sulfuro encontrada en los sistemas indicando que existió una competencia entre la actividad fermentativa y la reducción de las especies azufradas a expensas del lactato.

El rendimiento de oxidación de lactato en relación a la producción de sulfuro (ROL) encontrado en PD-102 fue el más bajo (0.23 ± 0.0066^a mmol S²⁻/mmol C₃H₅O₃⁻), lo que significa que la mayor parte del lactato fue empleada para una actividad distinta a la reducción del sulfato y a la reducción de la especie azufrada semi-reducida que actúa como intermediario en la producción de sulfuro. De esta manera, PD-102 se caracterizó por la remoción de lactato por vía fermentativa, que pudo ser oxidado completamente o transformado a etanol. Acorde a esto, PD-102 es el sistema que presentó el mayor porcentaje de oxidación completa (71.44 ± 0.55%^a) y la menor acumulación de AGVs (0.67 ± 0.0160^a mmoles). Sin embargo, esto debe tomarse con reservas debido a que es posible que parte del lactato haya sido convertido en etanol (Ecuación III-6), el cuál no fue considerado en este estudio. SD-636 presentó un ROL superior a PD-102, con un valor de 0.37 ± 0.0588^c mmol S²⁻/mmol C₃H₅O₃⁻, así como un porcentaje de oxidación completa

más bajo (63.57 ± 1.63^b). SC-469 presentó el ROL más elevado, siendo éste de 1.13 ± 0.8238^b mmol S^{2-} /mmol $C_3H_5O_3^-$, así como el porcentaje de oxidación completa más bajo (38.34 ± 37.14^b). Durante el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre los tres cultivos los ROL obtenidos y el porcentaje de oxidación completa no mostró diferencias entre SC-469 y SD-636 y PD-102 se clasificó en un grupo aparte. Esto concuerda con la acumulación de AGVs en los tres sistemas, que fue clasificado de la misma forma (ver Tabla III-5).

Con base en el presente análisis, se determinó que SC-469 es el cultivo que presentó una mayor capacidad para dirigir el flujo de electrones del lactato hacia la formación de sulfuro, seguido de SD-636 y PD-102, caracterizándose el último por desviar la mayor parte de los electrones del lactato hacia una actividad distinta de la reducción de especies azufradas. Esto concuerda con las ERS y la cantidad de sulfuro acumulado en los sistemas, que fue mayor en SC-469, seguido de SD-636 y PD-102.

III.3.6. Análisis de gases

Como se expuso en las secciones III.3.2 y III.3.3, se observaron caídas en el potencial de óxido reducción antes de la aparición de sulfuro en el medio de cultivo en SC-469 y SD-636. Esto se atribuyó a la presencia de metano debido a que las bacterias metanogénicas son comunes en los sedimentos marinos y compiten por los mismos sustratos que las BRS [5, 6]. A su vez, se observó consumo de lactato y producción de acetato en PD-102 y SC-469, respectivamente, durante las fases de adaptación. Lo anterior confirma que existe actividad microbiana diferente a la reducción de sulfato en los cultivos. Con la finalidad de corroborar lo expuesto anteriormente, se analizó el gas producido por PD-102, SC-469 y SD-636.

Como resultado, se encontró metano en todos los cultivos, a excepción de una unidad experimental de PD-102. Los picos de intensidad de señal correspondientes a metano aparecieron en un tiempo de retención de 4.3 min. El área bajo la curva de cada pico fue calculada y se empleó para cuantificar el metano de forma indirecta. En general, la intensidad de señal fue muy pequeña en PD-102 (12.87 ± 12.03^b unidades de área), en comparación con SC-469 y SD-636 (1648.91 ± 406.42^a y 1429.58 ± 182.98^a unidades de área, respectivamente). El análisis estadístico agrupó a estos dos últimos cultivos (grupo a), ya que no presentaron diferencias significativas entre sí, pero si las mostraron al

compararse contra PD-102 (grupo b). Las áreas promedio para cada cultivo se muestran en la Figura III-12.

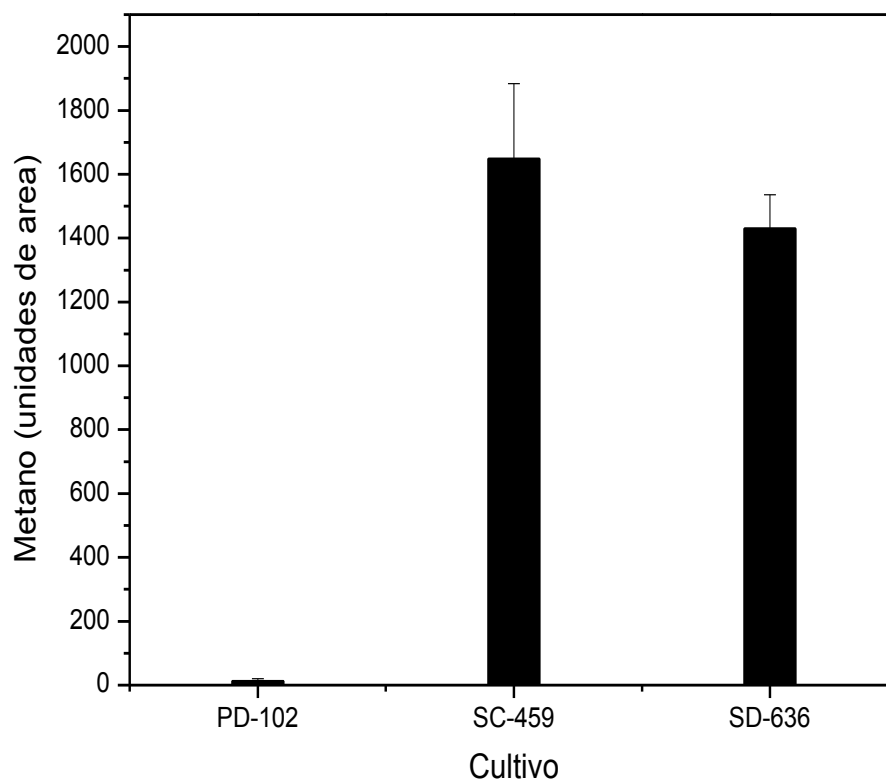


Figura III-12. Intensidad de señal de metano hallada por cromatografía de gases en los cultivos PD-102, SC-459 y SD-636.

Por otro lado, como era de esperarse, en todos los cultivos se encontraron intensidades de señal correspondientes a CO_2 . Además, cabe señalar que se encontraron picos correspondientes a hidrógeno en SC-469. Esto resulta trascendental, ya que se ha reportado que las BRS producen altas concentraciones de sulfuro cuando usan H/CO_2 como fuente de carbono, en comparación con otras fuentes como el lactato, butirato, propionato, acetato y formato [7].

En este estudio se ha encontrado suficiente evidencia de que además de la proliferación de las BRS en los cultivos, existió otro tipo de actividad microbiana incluyendo al menos la metanogénesis y la fermentación, sin embargo, la secuenciación del gen correspondiente al RNA ribosomal 16S de los cultivos PD-102, SC-469 y SD-636 es necesaria para poder corroborar dichas aseveraciones.

Como se vio en la sección correspondiente a las cinéticas de sulfuro, los microorganismos no sulfurogénicos que coexisten en los cultivos pueden competir por los sustratos disponibles y mermar los rendimientos de sulfuro, cosa que fue evidente en PD-102. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que algunos de estos grupos microbianos podrían tener una influencia positiva sobre la producción de sulfuro. Por ejemplo, es posible que el potencial necesario para la reducción de sulfato haya sido generado por la presencia de especies de azufre parcialmente reducidas en SC-469 y SD-636. De igual manera, no puede pasarse por alto la presencia de metano en estos dos cultivos, que fueron los de mayor capacidad sulfurogénica.

III.3.7. Análisis de riqueza y diversidad de especies de BRS

La biomasa de todas las unidades experimentales empleadas para PD-102, SC-469 y SD-636, se procesaron para la extracción de ADN de la microbiota. El ADN de los extractos mostró una degradación aparente (Figura III-13), sin embargo, éste fue perfectamente adecuado para amplificar el gen de interés. Los extractos nucleicos presentaron una pureza apropiada, ya que las relaciones de absorbancia 260/280 fueron cercanas a 1.8, y las de 260/230, superiores a 2 (Tabla III-6).

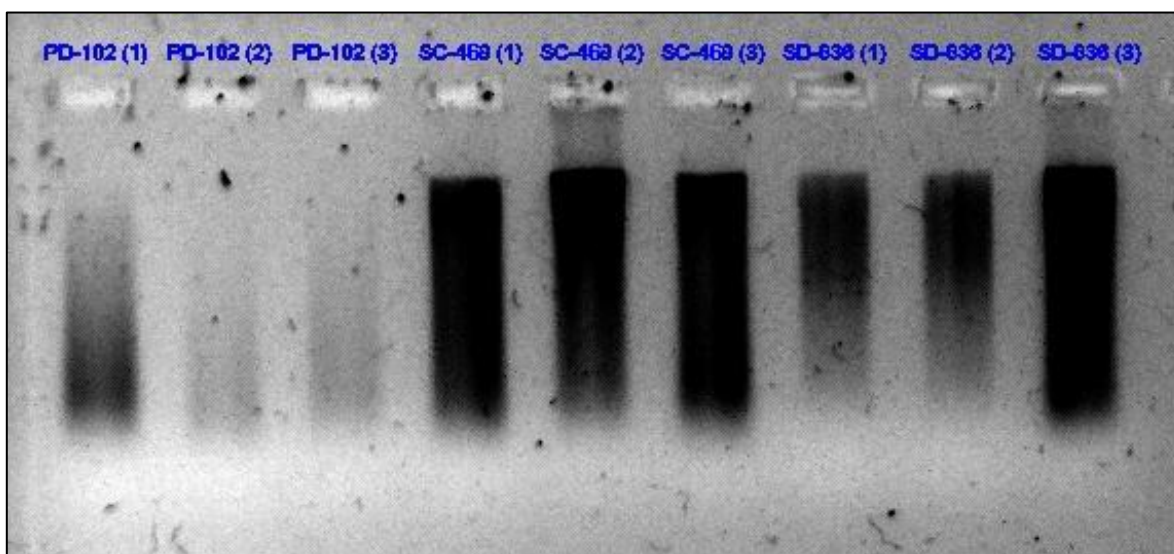


Figura III-13. Extractos de ADN obtenidos de los cultivos empleados para las cinéticas de producción de sulfuro de PD-102, SC.469 y SD-636.

Los extractos de ADN fueron empleados como templado para amplificar el gen *dsrB*. Los amplicones obtenidos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura III-14). Como resultado, se logró amplificar un fragmento de aprox. 350 pb en todas las reacciones. Es importante señalar que la amplificación del fragmento correspondiente al gen *dsrB* corrobora de forma directa la presencia de las BRS en todos los cultivos (PD-102, SC-469 y SD-636).

Tabla III-6. Pureza del ADN extraído de PD-102, SC-469 y SD-636.

Muestra	Repetición	A_{260nm}/A_{280nm}	A_{260nm}/A_{230nm}
PD-102	1	1.82	1.81
	2	1.95	5.36
	3	1.94	4.82
SC-469	1	1.89	3.15
	2	1.84	1.83
	3	1.86	2.84
SD-636	1	1.88	2.86
	2	1.91	4.50
	3	2.01	3.22

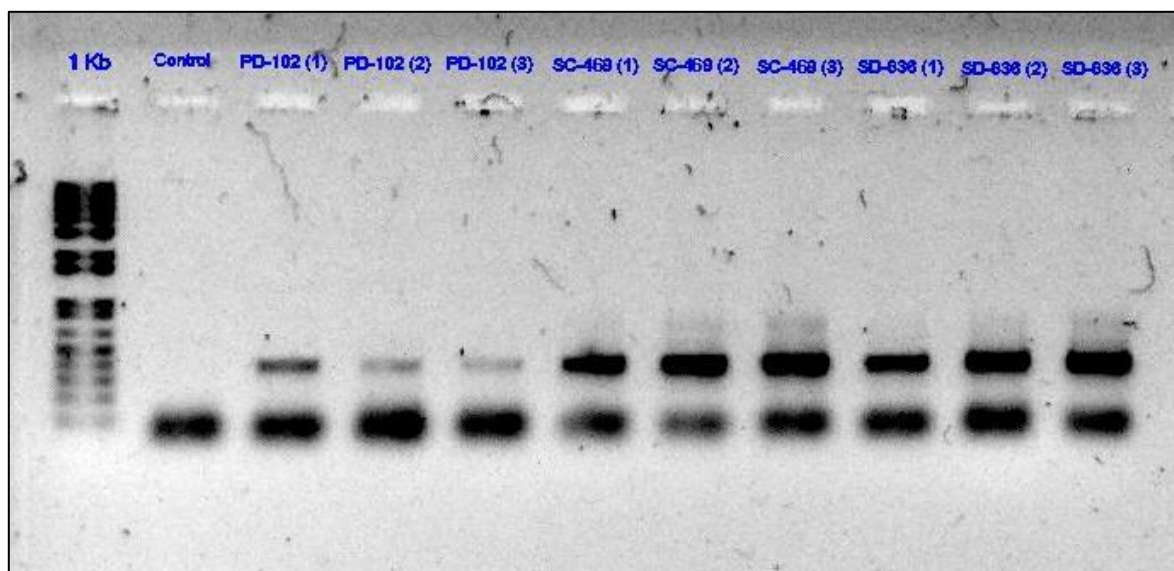


Figura III-14. Amplificación del gen *dsrB* a partir de ADN metagenómico de PD-102, SC-469 y SD-636. Control negativo. 1 Kb: marcador de peso molecular (Invitrogen).

En la amplificación, además del fragmento de interés, se observó la formación de dímeros en todas las reacciones, incluyendo al control. Ante esto, se aplicaron diversas estrategias para reducir la dimerización, tales como: 1) la disminución de la concentración de cebadores y $MgCl_2$; 2) el incremento de la temperatura de desnaturalización; 3) la aplicación de “touchdown” en el curso de la amplificación; y 4) el uso de DMSO en la reacción de PCR. Sin embargo, la disminución de los dímeros fue mínima, aunque el uso de DMSO produjo un incremento en el rendimiento de la PCR y permitió la amplificación los extractos nucleicos que no habían mostrado amplificación. La presencia de dímeros en el producto de PCR, impedía la adecuada cuantificación por espectrofotometría del producto de interés, por lo que fueron removidos mediante la purificación del producto de PCR con óxido de silicio (sílica). En la figura III-15, se muestra el efecto del tratamiento con sílica en la remoción de dímeros en los productos de PCR, donde se usó como templado una muestra de ADN de *Desulfovibrio vulgaris*.

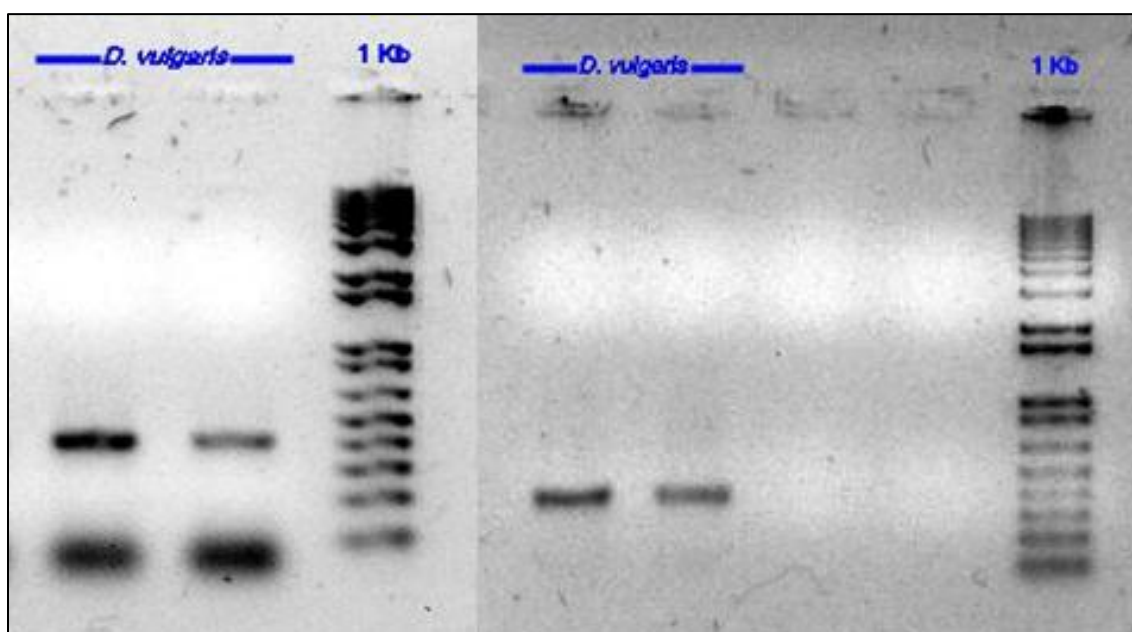


Figura III-15. Efecto de la purificación de amplicones del gen *dsrB* para la remoción de dímeros de PCR. A la izquierda dos productos de PCR obtenidos a partir del ADN de *D. vulgaris*. A la derecha, los mismos productos después de la purificación con sílica. 1 Kb: marcador de peso molecular de Invitrogen.

Después de su purificación, los amplicones del gen *dsrB* obtenidos a partir de PD-102, SC-469 y SD-636 fueron cuantificados. Posteriormente, fueron usados como templado en una segunda PCR, con el fin de adicionar la pinza de guaninas y citosinas, lo cual se consiguió con éxito (Figura III-16). Durante la estandarización de la segunda PCR, se observó que la ausencia de dímeros (removidos por purificación) en el templado aumentó el rendimiento del amplicón de interés y la cantidad de dímeros formados durante la reacción fue mínima (Figura III-17).

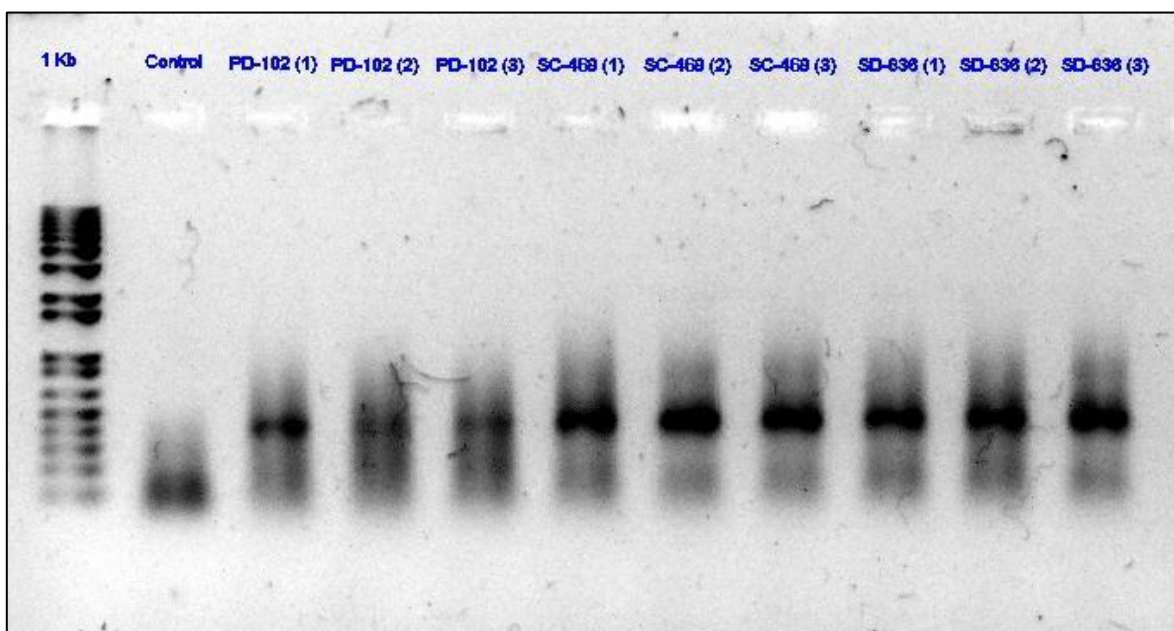


Figura III-16. Adición de pinza de guaninas y citosinas al gen *dsrB* (gen GC+*dsrB*) obtenido a partir del ADN correspondiente a los cultivos PD-102, SC-469 y SD-636. Control negativo. 1 Kb: marcador de peso molecular de Invitrogen.

Los amplicones de la Figura III-16 se purificaron con sílica nuevamente, y fueron cuantificados. 3000 ng de cada muestra fueron separados mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante de urea y formamida (60 – 70%) (Figura III-17). La imagen del gel fue sometida a un análisis densitométrico, mediante el software QuantityOne, para identificar el número de bandas y calcular la distancia de migración relativa de cada una de ellas. De esta manera, cada valor de distancia relativa obtenido se considera una Unidad Operacional Taxonómica (OTU, por sus siglas en inglés) de BRS en particular. Bajo esta premisa, se construyó una matriz binaria con base en la presencia o ausencia de las OTUs encontradas en cada una de las muestras (Tabla II-7).

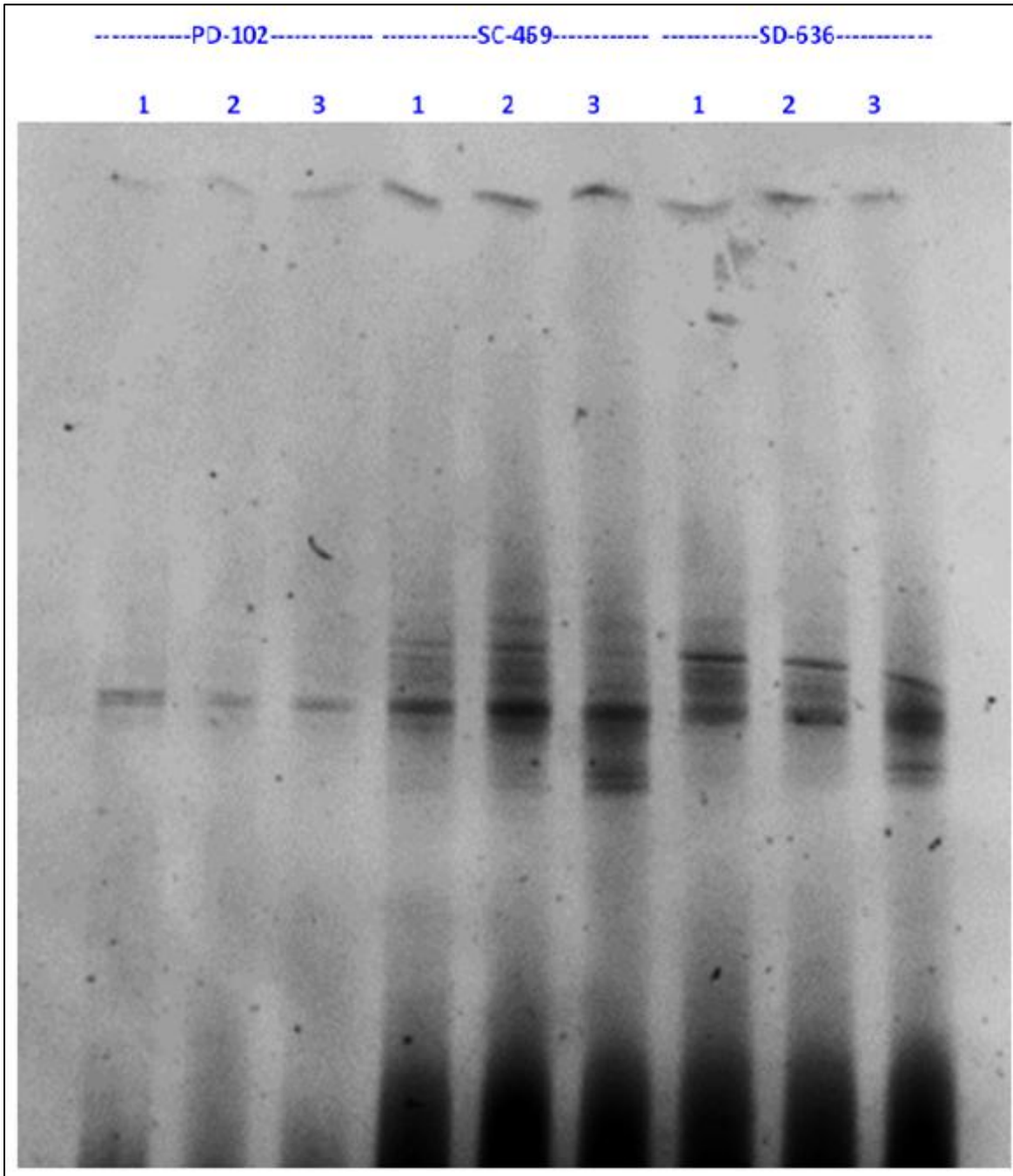


Figura III-17. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante de urea-formamida (60 – 70%) realizada a los fragmentos del gen GC + *dsrB* obtenidos a partir del ADN de los cultivos PD-102, SC-469 y SD-636.

Tabla III-7. Número de bandas, distancia relativa y matriz de patrón de bandeo.

OTU	Distancia relativa	PD-102			SC-469			SD-636		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	0.065	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	0.402	0	0	0	1	1	1	1	1	0
3	0.424	0	0	0	0	1	1	1	1	1
4	0.444	0	0	0	1	1	0	0	0	1
5	0.455	0	0	0	1	1	1	1	1	0
6	0.462	0	0	0	0	0	1	0	0	0
7	0.475	0	0	0	1	1	1	1	1	1
8	0.498	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	0.513	1	1	1	1	0	0	0	0	0
10	0.548	0	0	0	1	1	1	1	1	1
11	0.555	0	0	0	0	0	0	0	0	1
12	0.563	0	0	0	1	1	1	0	0	0

Los números debajo del nombre de los cultivos indican el número de unidad experimental. La matriz binaria de 0 y 1, se refiere a la presencia o ausencia del OTU en las unidades experimentales.

Doce bandas fueron detectadas con diferentes distancias de migración relativas mismas que corresponden a la detección de 12 OTUs en la totalidad de las unidades experimentales. Como se observa en la Tabla III-7, las OTUs 1 y 8 estuvieron presentes en todos los cultivos. En contraste, las OTUs 6 y 11 solo se encontraron en la unidad experimental 3 de SC-469, y en la unidad experimental 3 de SD-636, respectivamente. Cabe señalar que las OTUs 2, 3, 4, 5, 7, y 10, se detectaron en los cultivos inoculados con los sedimentos colectados en Sisal. Las OTUs 7 y 10 destacan por haber sido detectadas en todas las unidades experimentales de SC-469 y SD-636. La OTU número 9 se encontró en todas las unidades experimentales de PD-102, y en la unidad experimental 1 de SC-469. De esta forma, se puede determinar que todas las OTUs encontradas en PD-102, fueron halladas en al menos una unidad experimental inoculada con sedimento de Sisal. Sin embargo, la OTU 9 es más representativa de los cultivos establecidos a partir del sedimento de Progreso. Interesantemente, la OTU número 12 fue detectada únicamente en SC-469, que fue el cultivo que mostró la mayor actividad reductora de sulfato, así como las mayores concentraciones de sulfuro *in vitro*.

La matriz de presencia y ausencia de OTUs (Tabla III-7) sirvió para construir una matriz de distancia genética mediante el índice de Jaccard; esta última se utilizó para construir el dendograma que se muestra en la Figura III-18. En éste, se encontró que los tres perfiles de bandeo obtenidos en PD-102 fueron idénticos, cosa que se puede apreciar a simple vista en la matriz de la Tabla III-7. Como se observa en el dendograma (Figura III-18), los cultivos inoculados con sedimentos de Sisal (SC-469 y SD-636) presentaron perfiles de bandeo más similares entre sí, y se agruparon aparte de los cultivos inoculados con el sedimento colectado en Progreso (PD-102). Dentro del grupo de Sisal, se observa que la unidad experimental 3 de SD-636 tuvo un patrón de bandas distintivo con respecto a todas las demás; esto era de esperarse ya que fue el único cultivo de Sisal en el que no se detectó a las OTUs 2 y 5, además de que fue en único en presentar a la OTU 11. Las otras dos unidades experimentales del cultivo SD-636 (1 y 2) presentaron perfiles de bandeo idénticos (ver Tabla II-7), lo que se reflejó en el dendograma. Con respecto a SC-469, se encontró que la unidad experimental 3 mostró mayor similitud con las unidades experimentales 1 y 2 de SD-636 y no con sus réplicas, contrariamente a lo que se esperaba. Así, las réplicas 1 y 2 de SD-636 se agruparon en un solo clado junto con la réplica 3 de SC-469, mientras que las unidades experimentales 1 y 2 de SC-469 se agruparon en otro clado, denotando una mayor similitud entre sus perfiles de bandeo.

Los resultados encontrados indicaron que no siempre es posible obtener repetibilidad en la comunidad de BRS que se establece en el cultivo, aun cuando se empleó el mismo inóculo. Si bien se consiguió la repetibilidad en las tres unidades experimentales de PD-102, sólo dos réplicas de SD-636 fueron iguales. Esto es aún más notorio en las unidades experimentales correspondientes a SC-469, donde ninguna de las comunidades fue idéntica; sin embargo, dos de sus réplicas presentaron comunidades de BRS muy similares, pero la tercera fue más parecida a las comunidades de SD-636 (1 y 2). Esto explica lo observado en la Figura III-11, donde la varianza en la concentración de sulfuro disuelto en SC-469, fue mayor en comparación con los otros dos cultivos (PD-102 y SD-636). Lo anterior pudo haber sido influenciado por la metodología empleada para la inoculación de los cultivos, puesto que la fracción inoculada, representa entre el 0.002 y 0.005% del volumen total de las muestras de sedimento colectadas, afectando así la repetibilidad.

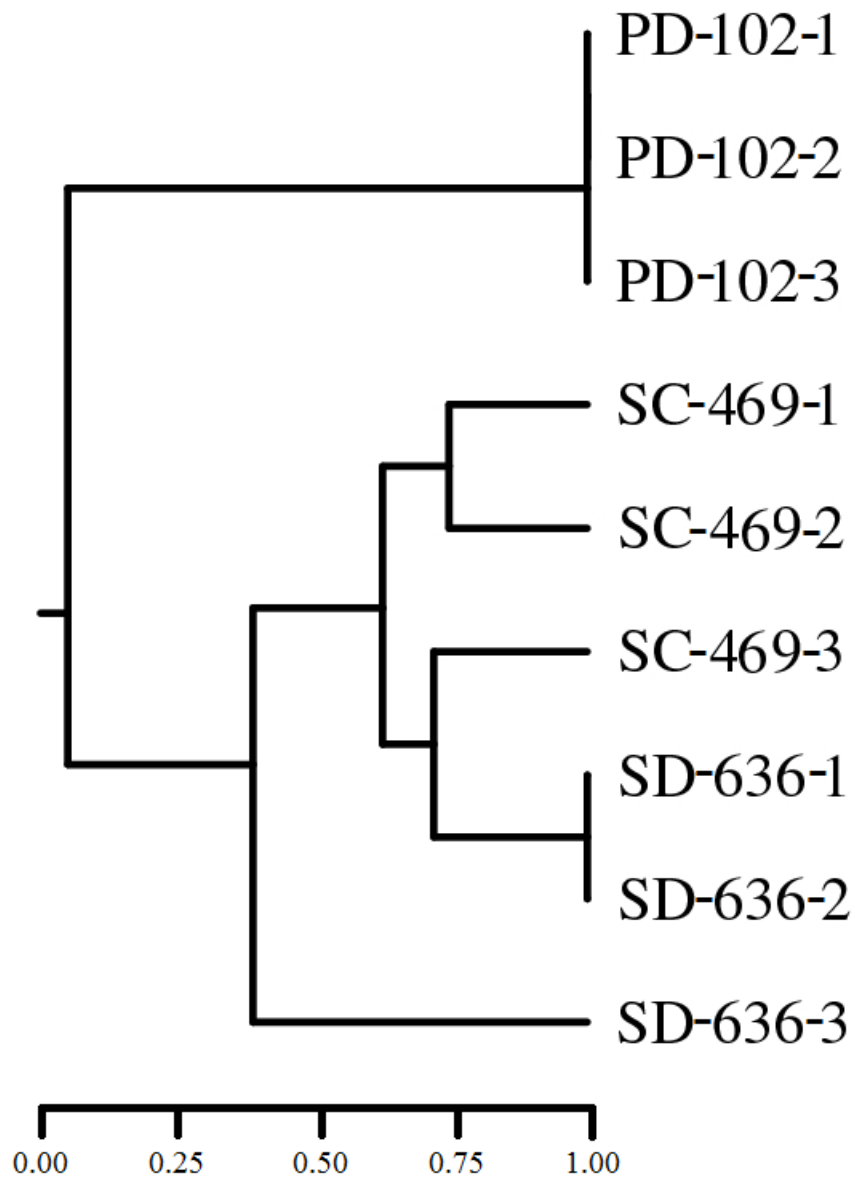


Figura III-18. Dendrograma construido a partir de los perfiles de bandeo del gen GC+*dsrB* obtenidos por EGGD.

La matriz de la Tabla III-7 se empleó para determinar la riqueza (S) de OTUs encontrada en cada cultivo (Tabla III-8). Como resultado, se encontró que la riqueza de especies fue significativamente mayor en SC-469, con una riqueza de BRS promedio de 9 ± 0.00^a OTUs, seguida de SD-636 y PD-102, con riquezas de 7 ± 0.00^b y 3 ± 0.00^c OTUs, respectivamente.

Los valores de riqueza, así como las concentraciones de sulfuro *in vitro* obtenidas en SC-469, SD-636 y PD-102 durante la fase estacionaria (11.44 ± 1.00^a , 7.09 ± 0.38^b y 4.32 ± 0.40^c mM, respectivamente), indican que la riqueza de especies es directamente proporcional a la concentración de sulfuro en los cultivos (Figura III-19). Esto se comprobó al encontrar una fuerte correlación entre la riqueza de BRS y la concentración de sulfuro *in vitro* (Spearman, $\rho = 1.00$).

Tabla III-8. Riqueza de BRS en los cultivos PD-102, SC-469 y SD-636.

	PD-102			SC-469			SD-636		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Riqueza (S)	3	3	3	9	9	9	7	7	7

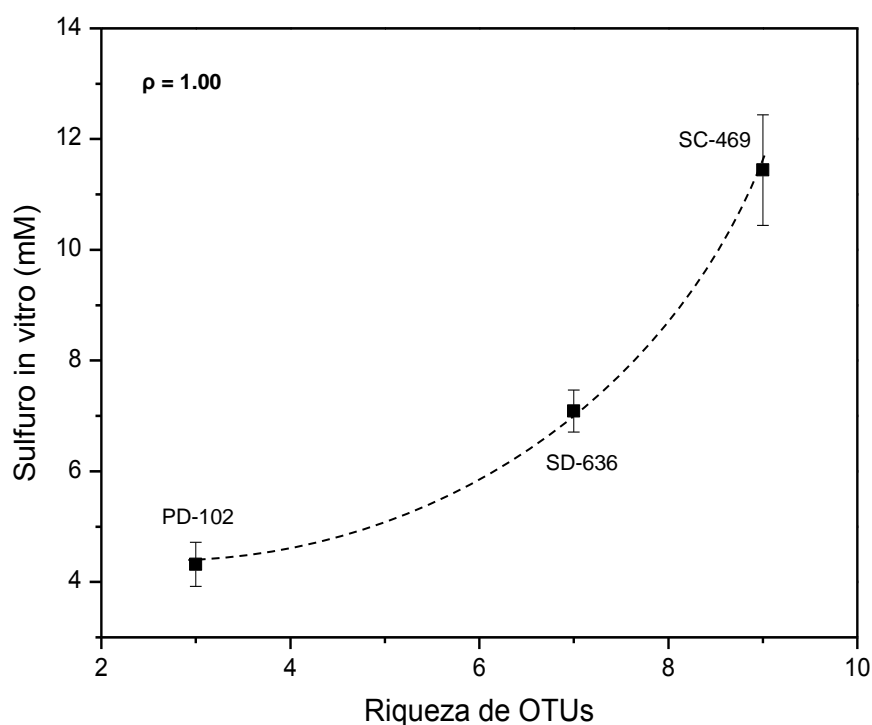


Figura III-19. Gráfica de correlación entre la concentración de sulfuro alcanzada *in vitro* contra la riqueza de OTUs detectadas mediante EGGD del gen GC+dsrB en los cultivos PD-102, SC-469 y SD-636.

Por último, los perfiles densitométricos de cada muestra corrida en el EGGD se emplearon para calcular mediante el índice de Shannon-Weaver, la diversidad de la comunidad de BRS en cada uno de los cultivos. Los resultados obtenidos fueron 0.87 ± 0.08^b , 1.47 ± 0.14^a y 1.43 ± 0.16^a , para PD-102, SC-469 y SD-636, respectivamente. Los resultados indicaron que no existieron diferencias entre la diversidad de los cultivos establecidos a partir del sedimento de Sisal (SC-469 y SD-636), pero éstos sí mostraron diferencias respecto a los de Progreso (PD-102). Se encontró una correlación entre la diversidad de los cultivos y la concentración de sulfuro producido *in vitro*, pero no fue tan fuerte como para el caso de la riqueza de especies (Figura III-20).

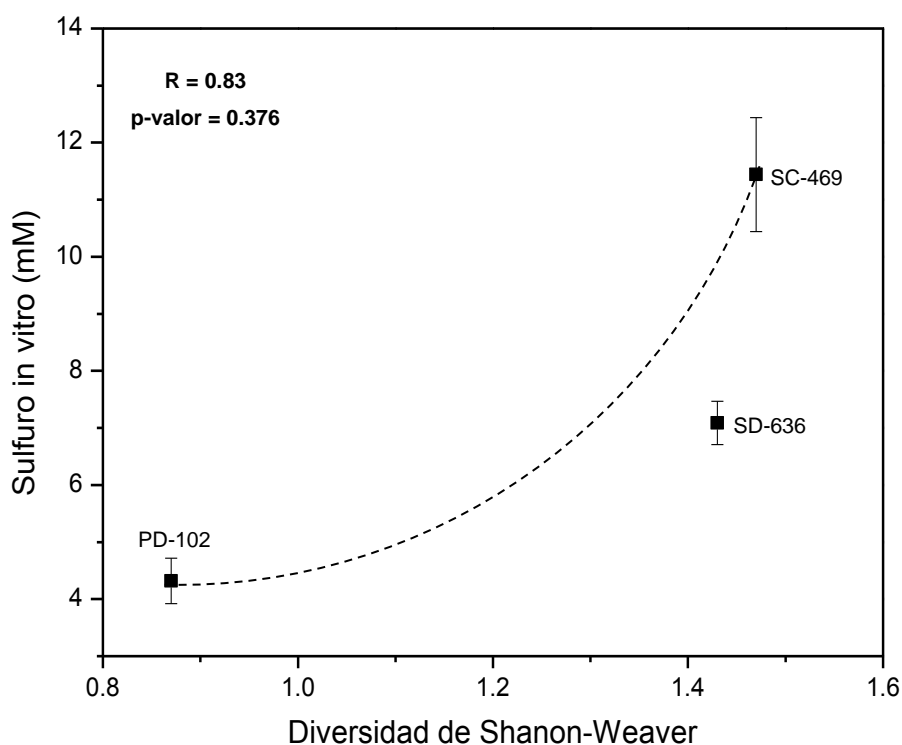


Figura III-20. Gráfica de correlación entre la producción de sulfuro *in vitro* contra la diversidad de Shannon-Weaver encontrada en los cultivos PD-102, SC-469 y SD-636.

A lo largo de este capítulo, se observó que los sedimentos marinos obtenidos de la costa yucateca pueden ser empleados exitosamente para la obtención de consorcios microbianos ricos en BRS, los cuales poseen potencial para la generación de energía renovable por su capacidad de producir sulfuro a expensas del sulfato y de la oxidación

de diversas moléculas orgánicas. Esto último, les confiere también el potencial para ser empleados en procesos de remediación de aguas (remoción de materia orgánica y sulfato). A pesar de que las BRS de sedimentos marinos y lagunares han sido ampliamente descritas en la literatura, en la región, son escasos los trabajos dedicados a esta cuestión. Entre ellos, son más comunes los trabajos realizados en ambientes de agua dulce [147, 148] en comparación con los realizados en ambientes salobres [149]. Hasta el momento, no se han encontrado reportes referentes a BRS de sedimentos marinos propios de la costa yucateca. En el contexto mundial, existen cuantiosas publicaciones en relación a las BRS de sedimentos marinos, pero la mayoría de ellos posee un enfoque ecológico y biogeoquímico [112, 150-153], siendo pocos los trabajos dedicados al estudio de la sulfurogénesis. Sin embargo, como ya se expuso en el Capítulo I, existen un sinnúmero de reportes acerca de ésta, realizados a partir de sedimentos de plantas de tratamiento de aguas residuales, con fines de biorremediación. En su mayoría, dichos reportes centran su atención en la eficiencia de la reducción de sulfato así como en la capacidad de remoción de contaminantes, y aunque el uso de herramientas moleculares para la comprensión del proceso sulfurogénico es la tendencia desde hace algunos años, no hay muchos reportes al respecto [144, 154, 155]. En este trabajo, fue posible caracterizar la producción de sulfuro a partir de sedimentos marinos costeros mediante el análisis de sustratos y productos, pero adicionalmente, el análisis del gen *dsrB* permitió obtener información relevante. Así, se encontraron indicios de que la productividad de sulfuro tiene una estrecha relación con la diversidad de especies de BRS que logran establecerse en los cultivos, siendo éste el primer reporte en su tipo, ya que no se han encontrado en la literatura trabajos que hagan referencia al papel de la diversidad de BRS en los cultivos sulfurogénicos.

CONCLUSIÓN

Durante el trabajo realizado, se establecieron cultivos sulfurogénicos a partir de sedimentos marinos costeros propios de Yucatán. Esto se logró empleando lactato, acetato, benzoato y etanol como fuente de carbono, lo que pone de manifiesto que en la costa yucateca existe potencial biotecnológico para la generación de energía renovable en forma de sulfuro, esto a partir de la oxidación de diferentes sustratos orgánicos por parte de las bacterias reductoras de sulfato. De esta forma, los cultivos obtenidos en este estudio son candidatos potenciales para el desarrollo de procesos que contribuyan a la sustitución de los combustibles fósiles así como al control y remediación de residuos de forma simultánea.

Si bien durante la caracterización de los cultivos sulfurogénicos no se observó correlación entre la concentración de sulfuro *in situ* de los sedimentos empleados como inóculo y la concentración de sulfuro producida *in vitro*, los resultados obtenidos sugieren que la actividad reductora de sulfato y la producción de sulfuro están influenciadas fuertemente por la riqueza de especies de BRS que logran establecerse en el cultivo, así como por la competencia y posible sinergia entre los microorganismos presentes. Esto último debido a que se encontró una correlación entre la riqueza de especies de BRS y la capacidad de los mismos para dirigir el flujo de electrones del lactato hacia la formación de sulfuro. Así mismo, se determinó que la velocidad de producción de sulfuro y el tiempo en el que se alcanza la fase estacionaria están dados por la velocidad de reducción de una especie azufrada semi-reducida que funge como intermediario en la reducción del sulfato hasta sulfuro.

PERSPECTIVAS

Con base en lo observado a lo largo de este estudio, se recomienda que en trabajos futuros la caracterización de los cultivos sulfurogénicos se realice de forma más detallada. Para esto se debe considerar la cuantificación de otras especies azufradas además del sulfato y el sulfuro, tales como azufre, sulfito, tiosulfito y tritionato [137], así como la cuantificación de etanol, nitrógeno total y nitrógeno amoniacal. También, se sugiere intensificar la frecuencia de las mediciones, de tal forma que los datos que se obtengan permitan el modelado de las cinéticas de sulfuro, así como la realización de balances de masa más precisos. Cabe mencionar que la extracción y análisis de ácidos nucleicos (ADN y ARN) en momentos cruciales como la fase de adaptación y la fase exponencial, así como de los sedimentos empleados como inóculo sería de gran interés, ya que, en conjunto con las recomendaciones anteriores, se obtendrían herramientas para una mejor comprensión de los cultivos sulfurogénicos. Desde luego, para lograr lo antes mencionado, será necesario trabajar con mayores volúmenes de cultivo. En este mismo sentido, sería recomendable realizar una caracterización más detallada de los sedimentos, incluyendo la cuantificación de sulfato y la difracción de rayos X, con la finalidad de hacer inferencias entre la interacción de las especies químicas acarreadas en el inóculo y los reactantes y productos involucrados en los sistemas sulfurogénicos.

De igual forma, se sugiere identificar genéticamente a los distintos grupos microbianos que estuvieron presentes en los cultivos PD-102, SC-469 y SD-636, lo que puede lograrse mediante la amplificación y secuenciación del gen ARN ribosomal 16S a partir de los extractos nucleicos obtenidos en este trabajo.

Así también, es importante caracterizar el comportamiento de los cultivos estudiados en este trabajo, al ser aplicados en las celdas de combustible microbianas o en reactores sulfurogénicos destinados para la producción de energía.

Adicionalmente, queda por realizar la amplificación del gen *dsrB* en los cultivos que se establecieron en las cuatro fuentes de carbono (lactato, acetato, benzoato y etanol), para posteriormente obtener los perfiles de bandeado por EGGD, así como identificar genéticamente a las bacterias reductoras de sulfato propias de cada cultivo, y realizar un análisis diferencial. Dicha información es importante ya que puede ser una directriz para la selección y aislamiento de especies de interés (nuevas o conocidas), así

como para conocer las aplicaciones biotecnológicas de los cultivos o simplemente para enriquecer la información presentada en esta tesis.

REFERENCIAS

1. Demirbas, A., *Hydrogen Sulfide from the Black Sea for Hydrogen Production*. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, 2009. **31**(20): p. 1866 – 1872.
2. Rabaey, K. y W. Verstraete, *Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation*. Trends Biotechnol, 2005. **23**(6): p. 291-8.
3. Baeg, J.O., *A novel nanoscale semiconductor photocatalyst for solar hydrogen production*. SPIE Newsroom, 2008. **Noviembre 17**: p. 2 - 4.
4. Lovley, D.R., *Bug juice: harvesting electricity with microorganisms*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(7): p. 497-508.
5. Muyzer, G. y A.J. Stams, *The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(6): p. 441-54.
6. Gibson, G.R., *Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria*. Journal of Applied Bacteriology, 1990. **69**(6): p. 769-797.
7. Azabou, S., T. Mechichi, y S. Sayadi, *Sulfate reduction from phosphogypsum using a mixed culture of sulfate-reducing bacteria*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2005. **56**(4): p. 236-242.
8. Padilla-Sotelo, L.S., *La población en la región costera de México en la segunda mitad del siglo X*. Investigaciones Geográficas (Mx), 2000(41): p. 81 - 95.
9. Caso, M., I. Pisanty, y E. Ezcurra, *Diagnóstico Ambiental del Golfo de México*. Vol. I. 2004: SEMARNAT, INECOL. 84.
10. EIA. *Energy Information Administration*. 2014 [cited 2010 Agosto]; Available from: <http://www.eia.gov/>.
11. Chu, S. y A. Majumdar, *Opportunities and challenges for a sustainable energy future*. Nature, 2012. **488**(7411): p. 294 - 303.
12. IPCC. *Intergovernmental Panel on Climate Change*. 2014 [cited 2014 Agosto]; Available from: www.ipcc.ch/.

13. Shafiee, S. y E. Topal, *When will fossil fuel reserves be diminished?* Energy Policy, 2009. **37**(1): p. 181-189.
14. Drapcho, C.M., N.P. Nhuan, y T.H. Walker, *Biofuels Engineering Process Technologies*. 2008: The McGraw-Hill companies, Inc.
15. Lee, S.K., et al., *Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels*. Current Opinion in Biotechnology, 2008. **19**(6): p. 556-563.
16. Rittmann, B.E., *Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms*. Biotechnol Bioeng, 2008. **100**(2): p. 203-12.
17. Rabaey, K., et al., *Microbial fuel cells for sulfide removal*. Environ Sci Technol, 2006. **40**(17): p. 5218-24.
18. Chen, K.Y. y J.C. Morris, *Oxidation of aqueous sulfide by oxygen* Environ Sci Technol, 1976(6): p. 529 - 537.
19. Madigan, M.T., J.M. Martinko, y P. J., *Brock, Biología de los microorganismos*. 10a ed. 2006: Prentice-Hall.
20. Jameson, E., et al., *Sulfidogenesis and selective precipitation of metals at low pH mediated by Acidithiobacillus spp. and acidophilic sulfate-reducing bacteria*. Hydrometallurgy, 2010. **104**(3-4): p. 488-493.
21. Gerardi, M.H., *Introduction*, in *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. 2003, John Wiley & Sons, Inc. p. 1-10.
22. Moletta, R., *Winery and distillery wastewater treatment by anaerobic digestion*. Water Sci Technol, 2005. **51**(1): p. 137-44.
23. Gerardi, M.H., *Bacteria*, in *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. 2003, John Wiley & Sons, Inc. p. 11-16.
24. Valdez-Vazquez, I. y H.M. Poggi-Varaldo, *Hydrogen production by fermentative consortia*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2009. **13**(5): p. 1000-1013.
25. Gerardi, M.H., *Biogas*, in *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. 2003, John Wiley & Sons, Inc. p. 73-76.

26. Chen, Y., J.J. Cheng, y K.S. Creamer, *Inhibition of anaerobic digestion process: A review*. Bioresource Technology, 2008. **99**(10): p. 4044-4064.
27. Colleran, E. y S. Pender, *Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of sulphate-containing wastewaters*. Water Sci Technol, 2002. **45**(10): p. 231-5.
28. Vilela, R.S., M.H.R. Zamariolli Damianovic, y E. Foresti, *Removing organic matter from sulfate-rich wastewater via sulfidogenic and methanogenic pathways*. Water Science & Technology, 2014. **69**(8): p. 1669-1675.
29. Li, J., et al., *Biological sulfate removal from acrylic fiber manufacturing wastewater using a two-stage UASB reactor*. J Environ Sci (China), 2012. **24**(2): p. 343-50.
30. Hilton, M.G. y D.B. Archer, *Anaerobic digestion of a sulfate-rich molasses wastewater: Inhibition of hydrogen sulfide production*. Biotechnology and Bioengineering, 1988. **31**(8): p. 885-888.
31. Chaiprapat, S.P., Pireeporn; Boonsawang, Piyarat; Karnchanawong, Seni, *Sulfidogenesis in Pretreatment of High-Sulfate Acidic Wastewater Using Anaerobic Sequencing Batch Reactor and Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor*. Environmental Engineering Science, 2011. **28**(8): p. 597 - 604.
32. Coetser, S.E., et al., *Chemical characterisation of organic electron donors for sulfate reduction for potential use in acid mine drainage treatment*. Biodegradation, 2006. **17**(2): p. 169-79.
33. Martins, M., et al., *Biological sulphate reduction using food industry wastes as carbon sources*. Biodegradation, 2009. **20**(4): p. 559-67.
34. Karnachuk, O.V., S.Y. Kurochkina, y O.H. Tuovinen, *Growth of sulfate-reducing bacteria with solid-phase electron acceptors*. Appl Microbiol Biotechnol, 2002. **58**(4): p. 482-6.
35. Villasmil, W. y A. Steinfeld, *Hydrogen production by hydrogen sulfide splitting using concentrated solar energy – Thermodynamics and economic evaluation*. Energy Conversion and Management, 2010. **51**: p. 2353 - 2361.
36. USEPA. *US Environmental Protection Agency*. 2014 [cited 2014 Agosto]; Available from: <http://www.epa.gov/>.

37. Zaman, J. y A. Chakma, *Production of hydrogen and sulfur from hydrogen sulfide*. Fuel Processing Technology, 1995. **41**(2): p. 159-198.
38. Petrov, K., et al., *An assessment of electrolytic hydrogen production from H₂S in Black Sea waters*. International Journal of Hydrogen Energy, 2011. **36**(15): p. 8936-8942.
39. Apte, S.K., et al., *Quantum confinement controlled solar hydrogen production from hydrogen sulfide using a highly stable CdS_{0.5}Se_{0.5}/CdSe quantum dot-glass nanosystem*. Nanoscale, 2014. **6**(2): p. 908-915.
40. Habermann, W. y E.H. Pommer, *Biological fuel cells with sulphide storage capacity*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1991. **35**(1): p. 128-133.
41. Lee, J., et al., *Use of acetate for enrichment of electrochemically active microorganisms and their 16S rDNA analyses*. FEMS Microbiol Lett, 2003. **223**(2): p. 185-91.
42. Logan, B.E. y J.M. Regan, *Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells*. Trends in Microbiology, 2006. **14**(12): p. 512-518.
43. Lovley, D.R., *Electromicrobiology*. Annu Rev Microbiol, 2012. **66**: p. 391-409.
44. Sharma, V. y P.P. Kundu, *Biocatalysts in microbial fuel cells*. Enzyme and Microbial Technology, 2010. **47**(5): p. 179-188.
45. Shukla, A.K., et al., *Biological fuel cells and their applications*. Current Science, 2004. **87**(4): p. 455 - 468.
46. Winfield, J., I. Ieropoulos, y J. Greenman, *Investigating a cascade of seven hydraulically connected microbial fuel cells*. Bioresour Technol, 2012. **110**: p. 245-50.
47. Lowy, D.A., et al., *Harvesting energy from the marine sediment-water interface II. Kinetic activity of anode materials*. Biosens Bioelectron, 2006. **21**(11): p. 2058-63.
48. Tender, L.M., et al., *Harnessing microbially generated power on the seafloor*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(8): p. 821-5.
49. Nealson, K.H., *Geomicrobiology: Sediment reactions defy dogma*. Nature, 2010. **463**(7284): p. 1033 - 1034.

50. Reimers, C.E., et al., *Microbial fuel cell energy from an ocean cold seep*. *Geobiology*, 2006. **4**(2): p. 123-136.
51. Bond, D.R., et al., *Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments*. *Science*, 2002. **295**(5554): p. 483-5.
52. Holmes, D.E., et al., *Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments*. *Microb Ecol*, 2004. **48**(2): p. 178-90.
53. Kim, J.R., et al., *Electricity generation and microbial community analysis of alcohol powered microbial fuel cells*. *Bioresource Technology*, 2007. **98**(13): p. 2568-2577.
54. Pisciotta, J.M., et al., *Enrichment of microbial electrolysis cell biocathodes from sediment microbial fuel cell bioanodes*. *Appl Environ Microbiol*, 2012. **78**(15): p. 5212-9.
55. Ateya, B.G., F.M. AlKharafi, y A.S. Al-Azab *Electrodeposition of Sulfur from Sulfide Contaminated Brines*. *Electrochemical and Solid-State Letters*, 2003. **6**(9): p. C137-C140.
56. Eaktasang, N., et al., *Control of malodorous hydrogen sulfide compounds using microbial fuel cell*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2013. **36**(10): p. 1417-25.
57. El-Shamy, A., et al., *Electrochemical Oxidation of Hydrogen Sulfide in Polluted Brines Using Porous Graphite Electrodes under Geothermal Conditions*. *Chemical Sciences Journal*, 2010. **CSJ-10**.
58. Sun, M., et al., *Microbial communities involved in electricity generation from sulfide oxidation in a microbial fuel cell*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010. **26**(2): p. 470-476.
59. Holmes, D.E., D.R. Bond, y D.R. Lovley, *Electron Transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe(III) and Graphite Electrodes*. *Appl Environ Microbiol*, 2004. **70**(2): p. 1234 - 1237.
60. Lovley, D.R., *Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches*. *Curr Opin Biotechnol*, 2006. **17**(3): p. 327-32.
61. Reimers, C.E., et al., *Substrate Degradation Kinetics, Microbial Diversity, and Current Efficiency of Microbial Fuel Cells Supplied with Marine Plankton* *Appl Environ Microbiol*, 2007. **73**(21): p. 7029 - 7040.

62. Lee, D.J., X. Liu, y H.L. Weng, *Sulfate and organic carbon removal by microbial fuel cell with sulfate-reducing bacteria and sulfide-oxidising bacteria anodic biofilm*. *Bioresour Technol*, 2014. **156**: p. 14-9.
63. Sun, M., et al., *Microbe-Assisted Sulfide Oxidation in the Anode of a Microbial Fuel Cell*. *Environmental Science & Technology*, 2009. **43**(9): p. 3372-3377.
64. Zhao, F., et al., *Activated carbon cloth as anode for sulfate removal in a microbial fuel cell*. *Environ Sci Technol*, 2008. **42**(13): p. 4971-6.
65. Ieropoulos, I.A., et al., *Comparative study of three types of microbial fuel cell*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005. **37**(2): p. 238-245.
66. Cordas, C.M., et al., *Electroactive biofilms of sulphate reducing bacteria*. *Electrochimica Acta*, 2008. **54**(1): p. 29-34.
67. Heidelberg, J.F., et al., *The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough*. *Nat Biotechnol*, 2004. **22**(5): p. 554-9.
68. Pfeffer, C., et al., *Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances*. *Nature*, 2012. **491**(7423): p. 218-21.
69. Schroder, U., *Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency*. *Phys Chem Chem Phys*, 2007. **9**(21): p. 2619-29.
70. Wan, Y., et al., *Electron transfer from sulfate-reducing bacteria biofilm promoted by reduced graphene sheets*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2012. **30**(1): p. 12-15.
71. Kumar, K.S., et al., *Comparision of variable resistance and linear sweep voltammetry methods for characterizing a mediator-less single chamber microbial fuel cell loaded with sulfate reducing biocatalysts*, 2011, The Méxican Hydrogen Society: XI International Hydrogen Congress.
72. Lee, D.J., C.Y. Lee, y J.S. Chang, *Treatment and electricity harvesting from sulfate/sulfide-containing wastewaters using microbial fuel cell with enriched sulfate-reducing mixed culture*. *J Hazard Mater*, 2012. **243**: p. 67-72.
73. Ieropoulos, I., A. Galvez, y J. Greenman, *Effects of sulphate addition and sulphide inhibition on microbial fuel cells*. *Enzyme Microb Technol*, 2013. **52**(1): p. 32-7.

74. Liu, J. y H.H.P. Fang, *Effects of molybdate on sulfate reduction and benzoate degradation*. Journal of Environmental Engineering, 1997(Septiembre): p. 949 - 953.
75. Coma, M., et al., *Biocatalysed sulphate removal in a BES cathode*. Bioresource Technology, 2013. **130**(0): p. 218-223.
76. Croese, E., et al., *Analysis of the microbial community of the biocathode of a hydrogen-producing microbial electrolysis cell*. Appl Microbiol Biotechnol, 2011. **92**(5): p. 1083-93.
77. Martins, M. y I.A.C. Pereira, *Sulfate-reducing bacteria as new microorganisms for biological hydrogen production*. International Journal of Hydrogen Energy, 2013. **38**(28): p. 12294-12301.
78. Elias, D.A., et al., *Periplasmic cytochrome c3 of Desulfovibrio vulgaris is directly involved in H2-mediated metal but not sulfate reduction*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(1): p. 413-20.
79. Thauer, R.K., E. Stackebrandt, y A.W. Hamilton, *Energy metabolism and phylogenetic diversity of sulphate-reducing bacteria*, in *Sulphate-Reducing Bacteria: Environmental and Engineered Systems*, L.L. Barton y W.A. Hamilton, Editores. 2007. p. 1 - 38.
80. Voordouw, G., *Carbon Monoxide Cycling by Desulfovibrio vulgaris Hildenborough*. Journal of Bacteriology, 2002. **184**(21): p. 5903-5911.
81. Abirami, G. y K. Kathiresan, *Sulphate Reducing Bacteria in Mangrove Environment and their Ecological and Economic Significance: A Review*. Journal of Biotechnological Sciences, 2013. **1**(2): p. 114 - 126.
82. Torres-Alvarado, M.d.R., et al., *Dinámica de las bacterias anaeróbicas en las fases terminales de la mineralización de la materia orgánica en el sedimento de los ecosistemas Carretas-Pereyra y Chantuto-Panzacola* Hidrobiológica, 2006. **16**(2): p. 183 - 196.
83. Gagnon, C., A. Mucci, y É. Pelletier, *Vertical distribution of dissolved sulphur species in coastal marine sediments*. Marine Chemistry, 1996. **52**(3-4): p. 195-209.

84. Reimers, C.E., et al., *Harvesting energy from the marine sediment--water interface*. Environ Sci Technol, 2001. **35**(1): p. 192-5.
85. Castro, H.F., N.H. Williams, y A. Ogram, *Phylogeny of sulfate-reducing bacteria*(1). FEMS Microbiol Ecol, 2000. **31**(1): p. 1-9.
86. Mori, K., et al., *A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: Thermodesulfobiaceae fam. nov., Thermodesulfobium narugense, gen. nov., sp. nov., a new thermophilic isolate from a hot spring*. Extremophiles, 2003. **7**(4): p. 283-90.
87. Matias, P.M., et al., *Sulphate respiration from hydrogen in Desulfovibrio bacteria: a structural biology overview*. Prog Biophys Mol Biol, 2005. **89**(3): p. 292-329.
88. Hittel, D.S. y G. Voordouw, *Overexpression, purification and immunodetection of DsrD from Desulfovibrio vulgaris Hildenborough*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2000. **77**(3): p. 271-80.
89. Larsen, O., T. Lien, y N.K. Birkeland, *Dissimilatory sulfite reductase from Archaeoglobus profundus and Desulfotomaculum thermocisternum: phylogenetic and structural implications from gene sequences*. Extremophiles, 1999. **3**(1): p. 63-70.
90. Larsen, O., T. Lien, y N.K. Birkeland, *A novel organization of the dissimilatory sulfate reductase operon of Thermodesulfurhabdus norvegica verified by RT-PCR*. FEMS Microbiology Letters, 2001. **203**(81 - 85).
91. Wagner, M., et al., *Phylogeny of Dissimilatory Sulfite Reductases Supports an Early Origin of Sulfate Respiration*. Journal of Bacteriology, 1998. **180**(11): p. 2975 - 2982.
92. Dar, S.A., J.G. Kuenen, y G. Muyzer, *Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(5): p. 2325-30.
93. Geets, J., et al., *DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria*. J Microbiol Methods, 2006. **66**(2): p. 194-205.

94. Klein, M., et al., *Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes*. J Bacteriol, 2001. **183**(20): p. 6028-35.
95. Andreae, M.O. y W.A. Jaeschke, *Sulphur cycling on the continents : wetlands, terrestrial ecosystems, and associated water bodies*, in *Sulphur Cycling on the Continents: Wetlands, Terrestrial Ecosystems and Associated Water Bodies*, R.W. Howarth, et al., Editores. 1992: Ney York. p. 32 - 69.
96. Rabus, R. y A. Strittmatter, *Functional genomics of sulphate-reducing prokaryotes*, in *Sulphate-Reducing Bacteria: Environmental and Engineered Systems*, L.L. Barton y A.W. Hamilton, Editores. 2007. p. 117 - 140.
97. Nevatalo, L.M., et al., *Biological hydrogen sulfide production in an ethanol-lactate fed fluidized-bed bioreactor*. Bioresour Technol, 2010. **101**(1): p. 276-84.
98. Odom, J.M. y H.D. Peck, Jr., *Hydrogenase, electron-transfer proteins, and energy coupling in the sulfate-reducing bacteria Desulfovibrio*. Annu Rev Microbiol, 1984. **38**: p. 551-92.
99. Chakraborty, R. y J.D. Coates, *Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons*. Appl Microbiol Biotechnol, 2004. **64**(4): p. 437-46.
100. Johnson, S.J., et al., *Contribution of anaerobic microbial activity to natural attenuation of the "B" in BTEX*, in *Geoenvironmental Engineering: Geoenvironmental Impact Management*, N.R. Yong y H.R. Thomas, Editores. 2001, Thomas Telford: Gran Bretaña. p. 582.
101. Herrera-Silveira, J., et al., *Eutrofización costera en la Península de Yucatán*, in *Diagnóstico ambiental del Golfo de México.*, M. Caso-Chávez, I. Pisanty, y E. Ezcurra, Editores. 2004, Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático: México. p. 821 - 848.
102. Cao, J.-y., et al., *Influence of Mg²⁺ on the growth and activity of sulfate reducing bacteria*. Hydrometallurgy, 2009. **95**(1–2): p. 127-134.
103. Herrera-Silveira, J.A., et al., *Coastal water quality assessment in the Yucatan Peninsula: management implications*. Ocean & Coastal Management, 2004. **47**(11–12): p. 625-639.

104. INEGI. *Instituto Nacional de Estadística y Geografía*. 2014 [cited 2014 Agosto]; Available from: www.inegi.org.mx/.
105. API. *Administración Portuaria Integral de Progreso, Yucatán*. 2014 [cited 2014 Agosto]; Available from: www.puertosyucatan.com/.
106. SEMARNAT. *Secretaría de Medio ambiente y Recursos Naturales*. 2014 [cited 2014 Agosto]; Available from: www.semarnat.gob.mx/.
107. Buchanan, J.B., *Methods for the study of marine benthos*. 2nd ed. Vol. 3. 1984: Blackwell scientific publications.
108. Hungate, R.E., *A roll tube method for strict anaerobes*, in *Methods in microbiology*, N.a.D.W. Ribbons, Editor. 1969, Academic Press Inc. : New York. p. 117 - 132.
109. (APHA), A.P.H.A., *Standard Methods of Water and Wastewater*, 1996, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation publication.: Washington D.C.
110. Cord-Ruwisch, R., *A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria*. *Journal of Microbiological Methods*, 1985. **4**(1): p. 33-36.
111. Boon, N., et al., *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*, 2002. **39**(2): p. 101-12.
112. Jorgensen, B.B., *The Sulfur Cycle of a Coastal Marine Sediment (Limfjorden, Denmark)*. *Limnology and Oceanography*, 1976. **22**(5): p. 814 - 832.
113. Pawlowska-Cwiek, L. y R. Pado, *The role of benzoate secreted by Desulfotomaculum acetoxidans DSM 771 in sulfate uptake*. *Acta Biochim Pol*, 2005. **52**(4): p. 797-802.
114. An, T.T. y F.W. Picardal, *Desulfocarbo indianensis gen. nov., sp. nov., a benzoate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from water extracted from a coal bed*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014. **64**(Pt 8): p. 2907-2914.

115. Bak, F. y F. Widel, *Anaerobic degradation of phenol and phenol derivatives by Desulfobacterium phenolicum sp. nov.* Archives of Microbiology, 1986(46): p. 177 - 180.
116. Cord-Ruwisch, R. y J.L. Garcia, *Isolation and characterization of an anaerobic benzoate-degrading spore-forming sulfate-reducing bacterium, Desulfotomaculum sapomandens sp. nov.* FEMS Microbiology Letters, 1985. **29**(3): p. 325 - 330.
117. Kuever, J., et al., *Isolation and characterization of a new spore-forming sulfate-reducing bacterium growing by complete oxidation of catechol.* Archives of Microbiology, 1993. **159**(3): p. 282-288.
118. Schnell, S., F. Bak, y N. Pfennig, *Anaerobic degradation of aniline and dihydroxybenzenes by newly isolated sulfate-reducing bacteria and description of Desulfobacterium anilini.* Arch Microbiol, 1989. **152**(6): p. 556-63.
119. Szewzyk, U. y B. Schink, *Degradation of hydroquinone, gentisate, and benzoate by a fermenting bacterium in pure or defined mixed culture.* Archives of Microbiology, 1989(151): p. 541 - 545.
120. Tasaki, M., et al., *Isolation and characterization of a thermophilic benzoate-degrading, sulfate-reducing bacterium, Desulfotomaculum thermobenzoicum sp. nov.* Archives of Microbiology, 1991. **155**(4): p. 348-352.
121. Fdz-Polanco, F., et al., *Combining the biological nitrogen and sulfur cycles in anaerobic conditions.* Water Sci Technol, 2001. **44**(8): p. 77-84.
122. Fdz-Polanco, F., et al., *Simultaneous organic nitrogen and sulfate removal in an anaerobic GAC fluidised bed reactor.* Water Sci Technol, 2001. **44**(4): p. 15-22.
123. Fernandez, N., et al., *Use of activated carbon and natural zeolite as support materials, in an anaerobic fluidised bed reactor, for vinasse treatment.* Water Sci Technol, 2001. **44**(4): p. 1-6.
124. Zhao, Q.I., W. Li, y S.J. You, *Simultaneous removal of ammonium-nitrogen and sulphate from wastewaters with an anaerobic attached-growth bioreactor.* Water Sci Technol, 2006. **54**(8): p. 27-35.

125. Rikmann, E., et al., *Sulfate-reducing anaerobic ammonium oxidation as a potential treatment method for high nitrogen-content wastewater*. Biodegradation, 2012. **23**(4): p. 509-524.
126. Schrum, H.N., et al., *Sulfate-reducing ammonium oxidation: A thermodynamically feasible metabolic pathway in subseafloor sediment*. Geology, 2009. **37**(10): p. 939-942.
127. Liu, S., et al., *Application of anaerobic ammonium-oxidizing consortium to achieve completely autotrophic ammonium and sulfate removal*. Bioresource Technology, 2008. **99**(15): p. 6817-6825.
128. Zhao, Y., N. Ren, y A. Wang, *Contributions of fermentative acidogenic bacteria and sulfate-reducing bacteria to lactate degradation and sulfate reduction*. Chemosphere, 2008. **72**(2): p. 233-42.
129. Costa, M.C. y J.C. Duarte, *Bioremediation of Acid Mine Drainage Using Acidic Soil and Organic Wastes for Promoting Sulphate-Reducing Bacteria Activity on a Column Reactor*. Water, Air, and Soil Pollution, 2005. **165**(1-4): p. 325-345.
130. Atlas, R.M. y R. Bartha, *Ecología microbiana y microbiología ambiental*, 2001, Pearson Education.
131. Dar, S., et al., *Competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008. **78**(6): p. 1045-1055.
132. Rittmann, B.E. y P.L. McCarty, *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*, 2001, Mcgraw hill
133. Stumm, W. y J.J. Morgan, *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*. 3a ed. 1995: Wiley.
134. Zhao, Y.G., A.J. Wang, y N.Q. Ren, *Effect of sulfate absence and nitrate addition on bacterial community in a sulfidogenic bioreactor*. J Hazard Mater, 2009. **172**(2-3): p. 1491-7.
135. Walker, C.B., et al., *Functional responses of methanogenic archaea to syntrophic growth*. ISME J, 2012. **6**(11): p. 2045-2055.

136. Meyer, B., et al., *Flexibility of syntrophic enzyme systems in Desulfovibrio species ensures their adaptation capability to environmental changes*. J Bacteriol, 2013. **195**(21): p. 4900-14.
137. Rabus, R., T. Hansen, y F. Widdel, *Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes*, in *The Prokaryotes*, M. Dworkin, et al., Editores. 2006, Springer New York. p. 659-768.
138. Oyekola, O.O., R.P. van Hille, y S.T.L. Harrison, *Study of anaerobic lactate metabolism under biosulfidogenic conditions*. Water Research, 2009. **43**(14): p. 3345-3354.
139. Gallegos-García, M., L.B. Celis, y E. Razo-Flores, *Competencia por sustrato durante el desarrollo de biomasa sulfatorreductora a partir de un lodo metanogénico en un reactor UASB*. Revista internacional de contaminación ambiental, 2010. **26**(2): p. 109 - 117.
140. Kuchta, R.D. y R.H. Abeles, *Lactate reduction in Clostridium propionicum. Purification and properties of lactyl-CoA dehydratase*. J Biol Chem, 1985. **260**(24): p. 13181-9.
141. Mah, R.A., et al., *Methanogenesis from Propionate in Sludge and Enrichment Systems*, in *Microbiology and Biochemistry of Strict Anaerobes Involved in Interspecies Hydrogen Transfer*, J.-P. Bélaich, M. Bruschi, y J.-L. Garcia, Editores. 1990, Springer US. p. 99-111.
142. Gerardi, M.H., *Methane-forming Bacteria*, in *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. 2003, John Wiley & Sons, Inc. p. 17-29.
143. Finster, K. y F. Bak, *Complete Oxidation of Propionate, Valerate, Succinate, and Other Organic Compounds by Newly Isolated Types of Marine, Anaerobic, Mesophilic, Gram-Negative, Sulfur-Reducing Eubacteria*. Applied and Environmental Microbiology, 1993. **59**(5): p. 1452-1460.
144. Gunnarsson, L.Å.H. y P.H. Rönnow, *Interrelationships between sulfate reducing and methane producing bacteria in coastal sediments with intense sulfide production*. Marine Biology, 1982. **69**(2): p. 121-128.

145. Mazumdar, A., et al., *Pore-water chemistry of sediment cores off Mahanadi Basin, Bay of Bengal: Possible link to deep seated methane hydrate deposit*. Marine and Petroleum Geology, 2014(49): p. 162 - 175.
146. Glombitza, C., et al., *Sulfate reduction controlled by organic matter availability in deep sediment cores from the saline, alkaline Lake Van (Eastern Anatolia, Turkey)*. Frontiers in Microbiology, 2013. **4**.
147. Socki, R.A., E.J.C. Perry, y C.S. Romanek, *Stable isotope systematics of two cenotes from the northern Yucatan Peninsula, Mexico*. Limnology and Oceanography, 2002. **47**(6): p. 1808-1818.
148. Stoessell, R.K., Y.H. Moore, y J.G. Coke, *The Occurrence and Effect of Sulfate Reduction and Sulfide Oxidation on Coastal Limestone Dissolution in Yucatan Cenotes*. Ground Water, 1993. **31**(4): p. 566-575.
149. Castel González, S.E., *Análisis de las comunidades microbianas asociadas a tapetes hipersalinos de la laguna rosada de Uaymitun, Yuacatán, México.*, in *Centro de Biotecnología Genómica 2010*, Instituto Politécnico Nacional: Reynosa, Tamaulipas, México. p. 131.
150. Dhillon, A., et al., *Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(5): p. 2765-72.
151. Dunnette, D.A., D.P. Chynoweth, y K.H. Mancy, *The source of hydrogen sulfide in anoxic sediment*. Water Research, 1985. **19**(7): p. 875 - 884.
152. Plugge, C.M., et al., *Metabolic Flexibility of Sulfate-Reducing Bacteria*. Frontiers in Microbiology, 2011. **2**: p. 81.
153. Shao, D., et al., *Effects of sulfate reducing bacteria and sulfate concentrations on mercury methylation in freshwater sediments*. Sci Total Environ, 2012. **424**: p. 331-6.
154. Dar, S.A., et al., *Analysis of Diversity and Activity of Sulfate-Reducing Bacterial Communities in Sulfidogenic Bioreactors Using 16S rRNA and dsrB Genes as Molecular Markers*. Applied and Environmental Microbiology, 2007. **73**(2): p. 594-604.

155. Zhao, Y.G., A.J. Wang, y N.Q. Ren, *Effect of carbon sources on sulfidogenic bacterial communities during the starting-up of acidogenic sulfate-reducing bioreactors*. *Bioresour Technol*, 2010. **101**(9): p. 2952-9.

ANEXO 1

POSTGATE B (*Desulfovibrio* Medium No. 63) MODIFICADO

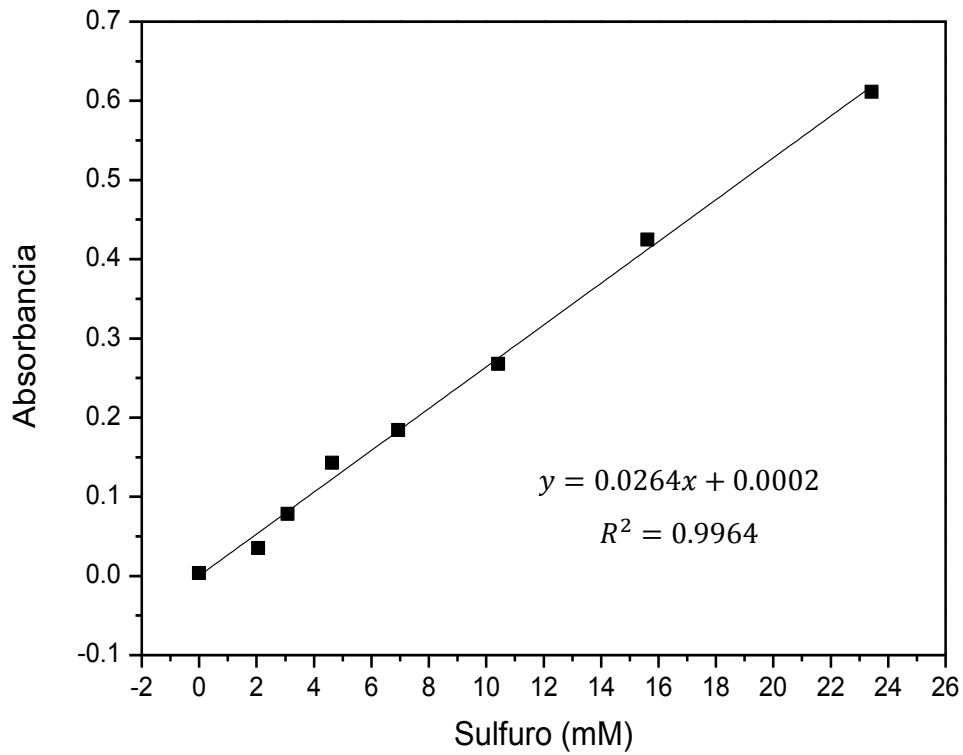
La composición del medio de cultivo se describe a continuación:

Nombre	Reactivo	Cantidad
Solución A	K ₂ HPO ₄	0.50 g/L
	NH ₄ Cl	1.00 g/L
	NaSO ₄	1.00 g/L
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	0.10 g/L
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	2.00 g/L
	NaCl	10.00 g/L
Fuente de carbono	DL-Lactato-Na	2.00 g/L
	Acetato-Na	2.58 g/L
	Benzoato-Na	1.47 g/L
	Etanol	1.05 g/L
Indicador de pH/E	Resazurina	1.00 mL/L
Indicador de formación de sulfuro	FeSO ₄ x 7H ₂ O	0.50 g/L
Agentes reductores	Tioglicolato-Na	0.10 g/L
	Ác. ascórbico	0.10 g/L
	Ditionito-Na	1µL/mL
Regulador de pH	NaOH	Indefinido

ANEXO 2

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICACIÓN DE SULFURO DISUELTO POR EL MÉTODO DE CORD-RUWISCH

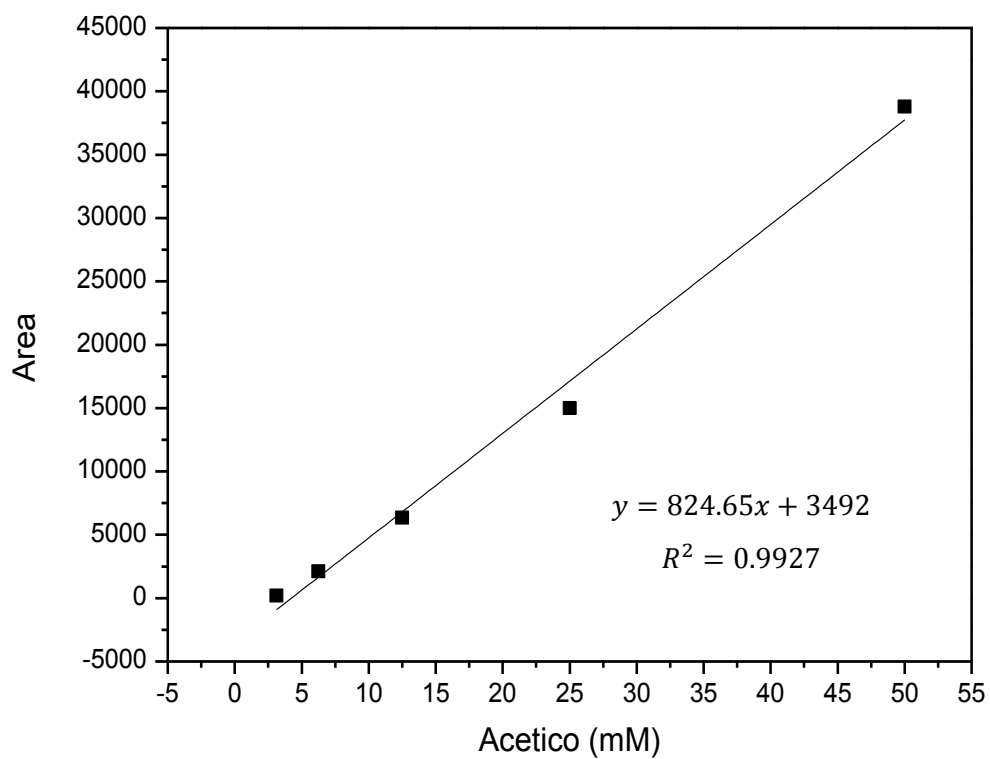
Concentración de sulfuro		Réplicas			Promedio
mM	mg/L	x1	x2	x3	
23.43	749.72	0.625	0.635	0.574	0.611
15.62	499.81	0.406	0.457	0.411	0.425
10.41	333.21	0.282	0.263	0.258	0.268
6.94	222.14	0.231	0.158	0.164	0.184
4.63	148.09	0.150	0.109	0.170	0.143
3.09	98.73	0.065	0.064	0.106	0.078
2.06	65.82	0.025	0.038	0.042	0.035
0.00	0.00	0.004	0.000	0.007	0.004



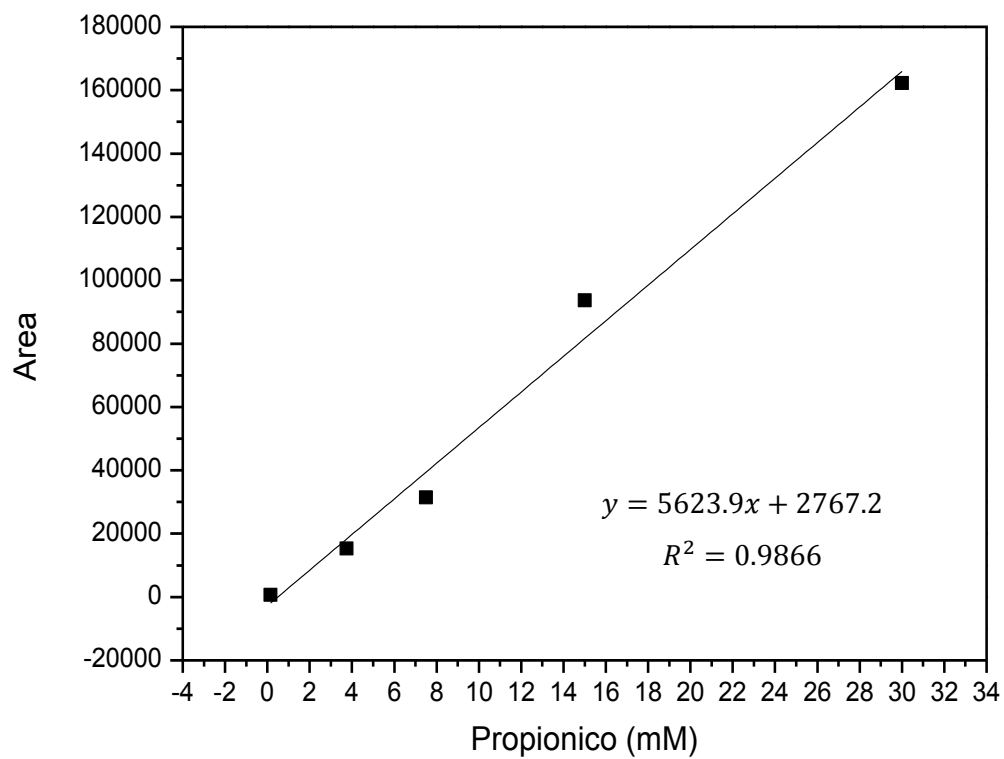
ANEXO 3

CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO Y ÁCIDO PROPIÓNICO

Concentración de ácido acético (mM)	Área bajo la curva
3.123	182.85
6.25	2101.55
12.5	6354.05
25	14986.15
50	38801.08

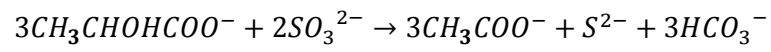


Concentración de ácido propiónico (mM)	Área bajo la curva
0.15	681.105853
3.75	15325.1064
7.5	31385.5463
15	93694.6595
30	162268.36



ANEXO 4

REACCIÓN DE REDUCCIÓN DE SULFITO A EXPENSAS DE LA OXIDACIÓN COMPLETA DEL LACTATO



$$\Delta G^\circ = -372.36 \text{ kJ mol}^{-1}$$

$$E^\circ = -321.28 \text{ mV}$$

Relación teórica acético/sulfuro = 1.5