



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**POSGRADO EN INGENIERÍA AGRÍCOLA Y USO
INTEGRAL DEL AGUA**

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS SULFATO
REDUCTORAS DEL SUELO INUNDADO EN UN
CULTIVO DE ARROZ**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN INGENIERÍA AGRÍCOLA Y USO
INTEGRAL DEL AGUA**

P R E S E N T A:

WILDER UGARTE OBANDO

CHAPINGO, MÉXICO, SEPTIEMBRE DE 2009



IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS DEL SUELO INUNDADO EN UN CULTIVO DE ARROZ

Tesis realizada por Wilder Ugarte Obando, bajo la dirección del Dr. David Espinosa Victoria., aprobada y aceptada por el Comité Asesor indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN INGENIERIA AGRÍCOLA Y USO INTEGRAL DEL AGUA

COMITÉ ASESOR:

DIRECTOR:


Dr. David Espinosa Victoria



ASESOR:


M.C. Edmundo Robledo Santoyo

ASESORA:


M.C. Hortensia Brito Vega

Chapingo, México, Septiembre de 2009

DEDICATORIA

A mi madre Emma Hilda Ovando Vela, con mucho cariño y respeto por todo su apoyo incondicional.

A mis tíos, Juan Vásquez, Leonor Vásquez, con mucho respeto y cariño por darme fuerzas en los momentos más difíciles para poder lograr este nuevo reto.

GRACIAS desde lo más hondo de mi corazón.

A mis hijos Ricardo y Rodrigo por llenar mi corazón de alegría y por compartir conmigo este logro más.

A toda la familia Saavedra Vásquez por todo ese cariño que siempre tuvo para mi. **MIL GRACIAS.**

A mis grandes amigos, Armando, Hugo, Mario, Jhonny, Wilsón, Cap.Frag.Freddy Vela Toro, Tcnl. Oscar Jaime Hervas, Cap. Balderrama, por todo su apoyo incondicional y sobre todo su amistad.

A mis primas, Wilma, Alicia, Karina, Patricia, Mariela, Rosse Mary, Sulma, Elizabet, Vianet. Por su apoyo incondicional.

A mis primos, Igor, Vladimir, Grobert, Alfredo, Edgar, Jaime, Juan José, Rolando, Hernán, Florián, Ricardo, Lucio, Ludwin, Marco Antonio. Por confiar en que podía lograr este sueño.

A todos mis compañeros del Posgrado a Yam, Miguel Ángel, Humberto, Agustín, Ismael, Esteban, Bonifacio, Norberto. Por todo su apoyo y sobre todo por su amistad.

A la familia Espinoza C. gracias por el apoyo, por tanto cariño y amistad brindada durante todo este tiempo.

A Rosa María y Lidia por todo el apoyo y amistad brindada para la realización de esta tesis.

A todos los técnicos de Laboratorio de Salinidad de la Carrera de Ingeniería en Irrigación en especial a Eduardo y Horacio, por todo el apoyo y amistad brindada para la realización de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Posgrado en Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua por permitirme realizar mis estudios de maestría y por ser parte de su comunidad estudiantil.

A la Secretaria de Relaciones Exteriores de México, por su apoyo a la Ciencia y Tecnología. Por el financiamiento para realizar la maestría.

Al Ministerio de Hacienda-Bolivia, Servicio Nacional de Administración de Personal. Por gestionar las becas al extranjero.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT), a través de Becas Tesis de Posgrado Promoción 2008 por el financiamiento para la realización de esta investigación.

Al Dr. David Espinosa Victoria, por sus apoyos y consejos y por compartir sus conocimientos profesionales de una manera desinteresada para la realización de esta investigación.

Al M.C. Edmundo Robledo Santoyo, por todos sus conocimientos compartidos y por su disposición para la realización de este trabajo de investigación.

A la M.C. Hortensia Brito Vega, por formar parte del presente trabajo en calidad de asesora y por sus valiosas sugerencias.

A todos los profesores del Posgrado de Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua con los cuales tuve el privilegio de tomar cursos por compartir sus conocimientos de manera desinteresada.

A todos mis compañeros del Posgrado de IAUIA, por su apoyo y amistad durante la realización de este trabajo.

A todas las personas que directamente o indirectamente participaron en este trabajo mis más grandes agradecimientos y amistad incondicional.

DATOS BIBLIOGRAFICOS

Wilder Ugarte Obando, nació el 26 de Mayo de 1976, en la ciudad de Cochabamba - Bolivia, inicio sus estudios de bachillerato en el Colegio “Gualberto Villarroel” en el municipio de Punata Departamento de Cochabamba.

Ingresa en el año 1994 a la Universidad Mayor de San Simón de la Ciudad de Cochabamba en donde cursa la carrera de Ingeniería Agrícola con mención en Riegos y Drenaje, egresando el año 2000, Para posteriormente realizar su trabajo de tesis titulado “Evaluación Socioeconómica con Sistema de Información Geográfica del Municipio de Tiquipaya” bajo la dirección del Ing. Javier Burgos, titulándose en el año 2001.

Desde 2001 ha estado vinculado como técnico en hidrogeología, realizando registros eléctricos para pozos de agua en la Empresa de Explotación Hidráulica - Unidad de Explotación de Recursos Hídricos-Cochabamba-Bolivia, Ministerio de Defensa Nacional, COFADENA-Corporación de las Fuerzas Armadas Para el Desarrollo Nacional.

En Enero de 2005, ingresa como docente de la materia de Aguas Subterráneas a la Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias de la Universidad Mayor de San Simón-Cochabamba-Bolivia.

En Agosto de 2006, ingresa al Programa de Maestría del Posgrado de Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua de la Universidad Autónoma Chapingo-México titulándose en Septiembre de 2009.

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS DEL SUELO INUNDADO EN UN CULTIVO DE ARROZ

Wilder Ugarte Obando¹, David Espinosa
Victoria²

RESUMEN

Se identificaron bacterias sulfato reductoras anaerobias estrictas, moderadamente termófilas de un suelo inundado en un cultivo de arroz, que se ubica en Jojutla, Morelos, México (latitud 18°36'53" N y longitud 99°11'43" O, altura 890 m). Esta se encuentra relacionada con *Clostridium scindens* con una similitud cercana al 87%. El análisis y comparación de la secuencia del 16S rRNA de la cepa identificada indicó que pertenece a la familia *Clostridiaceae* del dominio *Bacteria*. La morfología de la colonia es de forma circular de diámetro menor a 0.5 mm, formadora de esporas. Su crecimiento ocurre a temperaturas de 40 a 55°C y la óptima es de 50 °C. El rango de pH se encuentra entre 5 y 8 con un pH óptimo de 7 y crecimiento por debajo de 10 g/L de NaCl. Se purificó una sola cepa, que resultó ser bacilos, gram-positivos. Utilizan S⁰, Na₂ S₂ O₃ *5H₂O, NO₂⁻ y SO₄⁼ como aceptores de electrones y solamente usa D-glucosa como donadores de electrones, también utiliza ya sea fermentando u oxidando los compuestos, gelatina, esculina y urea.

Palabras clave: Identificación de Bacterias Sulfato Reductoras del Suelo Inundado.

1 Tesista

2 Director de tesis

IDENTIFICATION OF SULFATE REDUCING BACTERIA IN A FLOODED RICE CULTIVATION

Wilder Ugarte Obando¹, David Espinosa
Victoria²

ABSTRACT

Sulphate-reducing anaerobic bacteria, moderately thermophilic, were identified in a flooded rice cultivation, which is located in Jojutla, Morelos, Mexico (latitude 18 ° 36'53 "N and longitude 99 ° 11'43" W, elevation 890 m). This is related with *Clostridium scindens* with a similarity close to 87%. The analysis and comparison of 16S rRNA sequencing of the identified strain indicated that it belongs to the family *Clostridiaceae* Bacteria. The morphology of the colonies is of circular shape of diameter less than 0.5 mm, forming spores. Their growth occurs at temperatures from 40 to 55 ° C and the optimum is 50 ° C. The pH range is between 5 and 8 with an optimum pH of 7 and growth below 10 g/L NaCl. A single strain was purified, which turned out to be gram-positive bacilli. They use S⁰, Na₂ S₂ O₃ *5H₂O, NO₂⁻ and SO₄⁼ as electron acceptors and only use D-glucose as electron donors; they also use either fermenting or oxidizing compounds, gelatin, esculin and urea.

Keywords: Identification of Sulfate Reducing Bacteria of the floor Flood.

1 Thesis Autor

2 Thesis Director

ÍNDICE GENERAL

	Pg.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 General	3
2.2 Específicos	3
3. REVISION DE LITERATURA	4
3.1 Los suelos inundados	4
3.1.1 La comunidad microbiana del suelo	4
3.1.2 Reducción de sulfatos	5
3.1.3 El sulfuro de hidrógeno	5
3.2 El árbol filogenético	6
3.3 Organismos procarióticos	7
3.4 El Dominio <i>Archea</i> y <i>Bacteria</i>	7
3.4.1 Bacterias	9
3.4.2 Identificación de bacterias por composición de la pared celular de acuerdo a la tinción de Gram	10
3.4.3 Bacterias sulfato reductoras	10
3.4.3.1 Ciclo del azufre	11

3.5 Ambientes extremos	12
3.6 La ecología y la biotecnología de las bacterias reductoras de sulfato	13
3.6.1 Hábitats de las bacterias sulfato reductoras	13
3.7 Aspectos biotecnológicos de la termofilia	15
3.8 Efectos del pH, temperatura y salinidad sobre el crecimiento de las bacterias sulfato reductoras	16
3.9 Metabolismo del carbono en bacterias sulfato reductoras	17
3.9.1 Reducción desasimilatoria del sulfato	17
3.10 Mecanismos bioenergéticos de la reducción desasimilatoria del sulfato. ..	18
3.11 Degradación de compuestos orgánicos en presencia de sulfato	20
3.11.1 Oxidación completa o incompleta	20
3.11.2 Oxidación del lactato	21
3.11.3 Oxidación de alcoholes primarios, secundarios, dioles y glicerol	22
3.11.4 Oxidación de formato, propionato y azúcares	24
3.11.5 Oxidación de compuestos aromáticos	24
3.11.6 Oxidación de malato succinato y otros ácidos dicarboxílicos	25
3.11.7 Oxidación de aminoácidos	26
3.12 Fermentación de sustratos	26
3.12.1 Fermentación de sustratos orgánicos	27
3.12.2 Fermentación de compuestos inorgánicos del azufre	27
3.13 Reducción del azufre elemental, nitrato y oxígeno	28

3.13.1 Reducción del azufre elemental	28
3.13.2 Reducción desasimilatoria del nitrato	28
3.13.3 Reducción del oxígeno	29
3.13.4 Reducción de metales por bacterias sulfato reductoras desasimilatorias	29
3.14 Filogenia de las bacterias sulfato reductoras	30
3.15 Biodegradación	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS	39
4.1 Descripción del área de estudio	39
4.1.1 Localización geográfica	39
4.1.2 Hidrografía	40
4.1.3 Principales ecosistemas	40
4.1.4 Clima	40
4.2 Colecta de muestras	41
4.2.1 Determinación de producción de H ₂ S	42
4.2.2 Reactivo de cobre	42
4.2.3 Medición de H ₂ S	43
4.3 Medio de cultivo	43
4.4 Solución madre de materiales no termosensibles	44
4.5 Manejo de muestras	44
4.6 Purificación y aislamiento	45

4.6.1 Enriquecimiento	45
4.6.2 Aislamiento	46
4.6.3 Purificación	47
4.7 Extracción de ADN, PCR y secuenciación del gen 16S rRNA	47
4.8 Pruebas fisiológicas	48
4.8.1 Efecto de la temperatura en el crecimiento bacteriano	49
4.8.2 Efecto del pH en el crecimiento bacteriano.....	49
4.8.3 Efecto de la presión osmótica en el crecimiento bacteriano	49
4.9 Sustratos	50
4.9.1 Aceptores de electrones	50
4.10 Características morfológicas	50
4.10.1 Tolerancia al oxígeno	50
4.10.2 Esporulación	51
4.10.3 Tinción de Gram	51
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
5.1 Muestras de lodo	52
5.2 Enriquecimiento	53
5.2.1 Selección de muestras	53
5.2.2 Observaciones al microscopio	55
5.2.3 Aislamiento	55
5.2.4 Purificación	55

5.2.5 Caracterización preliminar	56
5.3 Extracción, PCR y secuenciación	57
5.4 Efecto de la temperatura en el crecimiento de la Cepa 1	58
5.5 Efecto del pH en el crecimiento de la cepa 1	60
5.6 Efecto de NaCl en el crecimiento de la cepa 1	62
5.7 Sustratos	63
5.8 Aceptores de electrones	65
5.9 Tolerancia al Oxígeno	68
5.10 Esporulación	68
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	70
6.1 CONCLUSIONES	70
6.2 RECOMENDACIONES	71
ANEXOS	72
7. LITERATURA CITADA	75

ÍNDICE DE CUADROS

	Pg.
Cuadro 1: Composición de la pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas	10
Cuadro 2: Procesos clave y organismos procariotas en el ciclo del azufre	12
Cuadro 3: Compuestos que pueden ser usados como sustratos para la reducción desasimilatoria del sulfato (Hasen, 1993).....	18
Cuadro 4: Contenido de sulfatos de las cuatro muestras colectadas	53
Cuadro 5: Características morfológicas de las cepas pura	56
Cuadro 6: Clasificación taxonómica de la cepa 1	58
Cuadro 7: Cantidad de solución madre para acidificar o alcalinizar el medio de cultivo	60

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pg.
Figura 1: Árbol filogenético de los seres vivos. http://rdp.cme.msu.edu	6
Figura 2: Árbol filogenético que muestra a los tres dominios http://rdp.cme.msu.edu	8
Figura 3: Árbol filogenético del dominio <i>Bacteria</i> . Construido a partir de las secuencias del RNA ribosómico 16S. http://rdp.cme.msu.edu	9
Figura 4: Ciclo del azufre (Brock, 2004).....	11
Figura 5: Imagen de localización del área de estudio	39
Figura 6: Muestras de lodo	42
Figura 7: Muestra seleccionada	42
Figura 8: Determinación de H ₂ S	43
Figura 9: Determinación de absorbancia	43
Figura 10: Envasado de medio de cultivo	44
Figura 11: Proceso de esterilización	44
Figura 12: Botellas inoculadas	45
Figura 13: Conservación de muestras	45
Figura 14: Tubos de ensaye con medio de cultivo sólido	46
Figura 15: Muestras colectadas	52

Figura 16: Muestra colectada del suelo inundado	53
Figura 17: Gráfica de producción de sulfuro de hidrógeno (Botellas de la muestra J1)	54
Figura 18: Bacilos observados al microscopio 100X en contraste de fase	55
Figura 19: Temperatura, respuesta de la cepa 1	58
Figura 20: Crecimiento de la cepa 1 a diferentes pH's	61
Figura 21: Respuesta de la cepa 1 a la concentración de NaCl	62
Figura 22: Respuesta de la cepa 1 en la galería API 50 CH	64
Figura 23: Respuesta de la cepa 1 en la galería API 20 A	65
Figura 24: Respuesta de crecimiento bacteriano a diferentes aceptores de electrones	66
Figura 25: Respuesta de producción de H ₂ S a diferentes aceptores de electrones	67

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pg.
ANEXO 1: La curva tipo o estándar	74

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias sulfato reductoras reducen los sulfatos a sulfuro de hidrógeno. El proceso de sulfato reducción es una actividad metabólica llevada a cabo por las bacterias sulfato reductoras, las cuales son anaerobias estrictas y requieren la ausencia de oxígeno para su crecimiento.

El interés por el estudio de las bacterias sulfato reductoras ha ido incrementándose en los últimos años debido a sus potenciales aplicaciones biotecnológicas como la formación de precipitados metálicos insolubles durante la biomineralización, así como en la biodesulfurización de gases, procesos biohidrometalúrgicos y su impacto e importancia a nivel ambiental y económico.

Las bacterias sulfato reductoras efectúan una sulfato reducción desasimiladora utilizando principalmente el sulfato como el aceptor terminal de electrones en la oxidación anaerobia de sustratos orgánicos, estas bacterias tienen la capacidad de activar el sulfato y reducirlo a sulfuro de hidrógeno.

El sulfuro de hidrógeno es un compuesto gaseoso, detectado en el aire por el ser humano a una concentración de 0.002 ppm. Biológicamente, es un compuesto activo que se produce principalmente a partir del proceso de la mineralización anaerobia de la materia orgánica denominado sulfato reducción.

Este compuesto es una de las formas inorgánicas del azufre más peculiares que son producidas por las bacterias sulfato reductoras, es una sustancia altamente venenosa, corrosiva, que tiene un olor característico a huevo podrido.

Pero no solo tiene aspectos negativos sino que en los ecosistemas acuáticos es utilizado por varios microorganismos durante su metabolismo y contribuye al mismo tiempo a caracterizar químicamente los sedimentos.

Actualmente, ha surgido un gran interés por el estudio de las distintas especies de bacterias sulfato reductoras que habitan en diferentes ambientes y en concentraciones de presión osmótica alta y en temperaturas elevadas, a sí como también de lugares con pH altamente ácido o alcalino con el fin de determinar sus características peculiares de los microorganismos con el propósito de buscar un uso de las mismas.

Las bacterias sulfato reductoras también participan en las reacciones de fermentación de algunos compuestos y en la degradación de la materia orgánica en ambientes terrestres y acuáticos anaerobios, particularmente aquellas que se encuentran en suelos inundados con agua de riego en cultivo de arroz.

De la misma manera las bacterias sulfato reductoras son las que provocan la corrosión de los metales y también compiten por materia orgánica con las *archeas* metanogénicas en reactores anaerobios.

Pero también tienen sus usos y sus beneficios como por ejemplo, existen géneros capaces de limpiar suelos contaminados por metales pesados y en cuanto a tratamiento de aguas residuales su uso es mucho más extendido.

Las bacterias sulfato reductoras además de su importancia obvia en el ciclo de azufre, son importantes reguladores de una variedad de procesos en los suelos inundados, en la degradación de la materia orgánica y en biodegradación de contaminantes.

2. OBJETIVOS

2.1 General

- Identificar y caracterizar bacterias sulfato reductoras de suelo inundado en un cultivo de arroz.

2.2 Específicos

- Aislar y purificar las cepas bacterianas sulfato reductoras presentes en el suelo inundado en un cultivo de arroz en Jojutla, Morelos.
- Identificar molecularmente a las bacterias sulfato reductoras presentes en el suelo mediante la secuenciación de su ADN.
- Determinar las características fisiológicas, metabólicas y morfológicas de las bacterias sulfato reductoras aisladas del suelo inundado del cultivo de arroz.

3. REVISION DE LITERATURA

3.1 Los suelos inundados

En suelos inundados con agua de riego en un cultivo de arroz existen muchas bacterias anaerobias estrictas reductoras de sulfato, que llevan a cabo la degradación de la materia orgánica y la mayoría están asociadas con bacterias Gram positivas del género *Clostridium*. Es importante considerar que las condiciones anóxicas del suelo inundado favorecen la presencia de bacterias sulfato reductoras (Xin-Zhan *et al.*, 2009).

3.1.1 La comunidad microbiana del suelo

El suelo es un ecosistema que contiene una gran variedad de poblaciones microbianas cuyos miembros representan muchos tipos fisiológicos. Las características químicas, físicas y biológicas de un suelo particular, así como la presencia de las plantas influirán en el número y diversidad de funciones del componente microbiano del mismo. Además, a causa de la naturaleza heterogénea del suelo, varios tipos fisiológicos de organismos serán encontrados en las proximidades cercanas de uno a otro. La comunidad microbiana del suelo es importante por su relación con la fertilidad del mismo y con los ciclos biogeoquímicos de los elementos; además de su uso potencial en aplicaciones ambientales e industriales. De ahí la necesidad de aislar e identificar a los miembros principales y menores de la comunidad microbiana del suelo (Maier, 2000).

3.1.2 Reducción de sulfatos

El azufre es un elemento presente en los suelos que está sujeto a una gran diversidad de reacciones químicas, en las cuales están involucrados numerosos microorganismos. Esto se debe a que el azufre se presenta en diferentes estados de oxidación como son: sulfato (+6), sulfito (+4), tío sulfato (+6), azufre elemental (0), di sulfuro (-1), y el sulfuro (-2) (Brock, 2004).

En forma general puede decirse que los sulfatos son la forma estable del azufre en los suelos aireados, sin embargo estos pueden ser reducidos a sulfuro por los microorganismos cuando las condiciones son favorables para el desarrollo de bacterias anaeróbicas del tipo de *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfuvulgaris*, *Desulfujigas*, y *Desulfatomaculum nitrifican.*, Los sulfatos actúan como aceptores de hidrógeno en las reacciones metabólicas que proveen de energía a estos organismos y dado su carácter anaeróbico, su mayor actividad la realizan en condiciones de potencial redox bajos y en zonas donde el pH se encuentra entre 5.5 y 8.5 (Brock, 2004).

3.1.3 El sulfuro de hidrógeno

El sulfuro de hidrógeno en concentraciones elevadas cancela la incorporación de nutrientes por los vegetales. En suelos inundados como los arrozales y en los cultivos de maíz, se presentan condiciones reductoras.

Si estos suelos son ricos en yeso o si el agua marina tiene acceso, la materia orgánica de las raíces de los vegetales estimula la sulfato reducción, ocasionando la liberación del ácido sulfhídrico que provoca la muerte de las plantas. Los compuestos con fierro presentes en el suelo pueden expulsar el sulfuro de hidrógeno y proteger entonces de esta manera a las plantas (Brock, 2004).

3.2 El árbol filogenético

El árbol filogenético es una estructura matemática, la cual muestra las relaciones evolutivas que hay entre especies las cuales tienen un ancestro común (López, 2006). Hasta 1970, los organismos vivos eran clasificados en dos grupos diferentes de acuerdo al tipo de célula (Figura 1). Los organismos procarióticos y eucarióticos; Sin embargo, Woese (1990) introdujo el uso de la subunidad de rRNA como herramienta filogenética. Muchas bacterias han sido identificadas al secuenciar gen 16S ya que contiene regiones de secuencias altamente conservadas. Lo anterior da la posibilidad de realizar alineamientos con secuencias del gene bank para saber de la similitud o variabilidad de la secuencia en cuestión (Madigan *et al.*, 2004).

Para crear un árbol filogenético se requiere de técnicas de Biología Molecular y de un software para efectos de análisis computarizado. Todas las nuevas secuencias se alinean con secuencias obtenidas en las diferentes base de datos, y luego se generan varios árboles y se selecciona el que mejor se adapta a la información evolutiva (Funk, 1990).

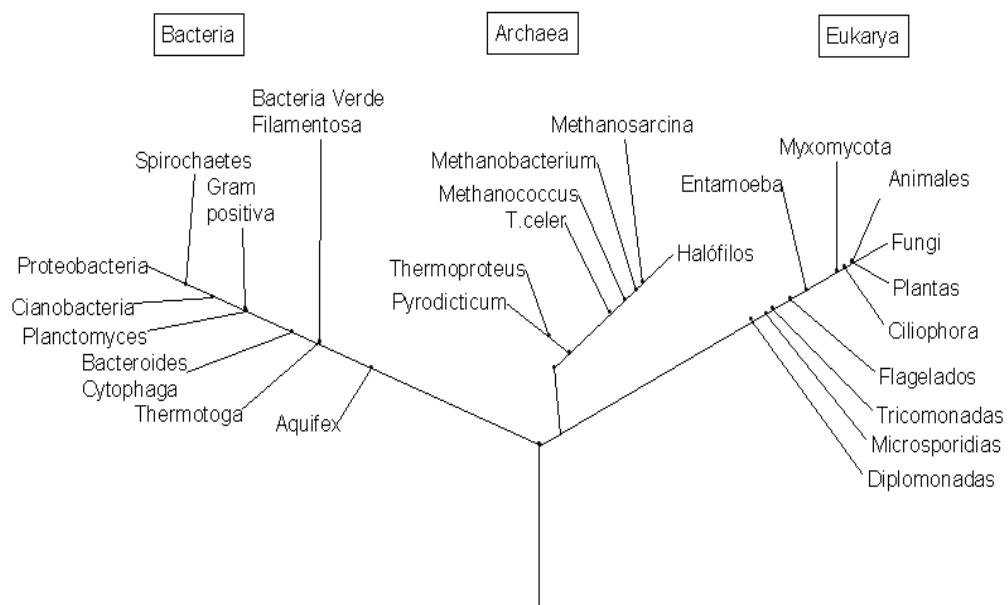


Figura 1: Árbol filogenético de los seres vivos. <http://rdp.cme.msu.edu>

La mayoría de los árboles filogenéticos fueron realizados por diferentes métodos, sin embargo los más utilizados son los que emplean la distancia y la parsimonia. En el primer caso, se hace un recuento de las posiciones que tengan alguna diferencia entre ellas, a partir de los resultados se construye una matriz de distancias que muestra la distancia evolutiva que existe entre dos secuencias, por último se mete un factor de corrección. En el segundo caso, se parte de la premisa de que durante la divergencia evolutiva de dos líneas celulares a partir de un ancestro común solo se produce la mínima cantidad de cambios de secuencia (Funk, 1990).

3.3 Organismos procarióticos

Muchos de los microorganismos, como las bacterias intervienen en los diferentes procesos ambientales que mantienen la vida en el planeta, así como también en los ciclos biogeoquímicos, representando una importante proporción de la biomasa (Whitman *et al.*, 1998). Las bacterias son el grupo con mayor número de especies que existen en la tierra, aproximadamente 10 billones de especies diferentes (Wouse *et al.*, 1990). De acuerdo a los registros solamente se han clasificado el 3% del total de los microorganismo existentes a nivel mundial (Maier, 2000).

3.4 El Dominio *Archea* y *Bacteria*

En la clasificación tradicional de los cinco reinos, los procariotes fueron representados por el reino Monera, Sin embargo, estudios de ARNr y de comparación evolutiva derivaron en dos grupos de organismos procarióticos, las “archeas” y las “eubacterias” los cuales son diferentes entre ellos (Campbell, 1996). En el año 1990, Woese y sus colaboradores propusieron un nuevo taxón de mayor rango, el cual fue designado como *Dominio*, actualmente se reconocen tres dominios: *Archea*, *Bacteria* y *Eukarya* (Figura 2).

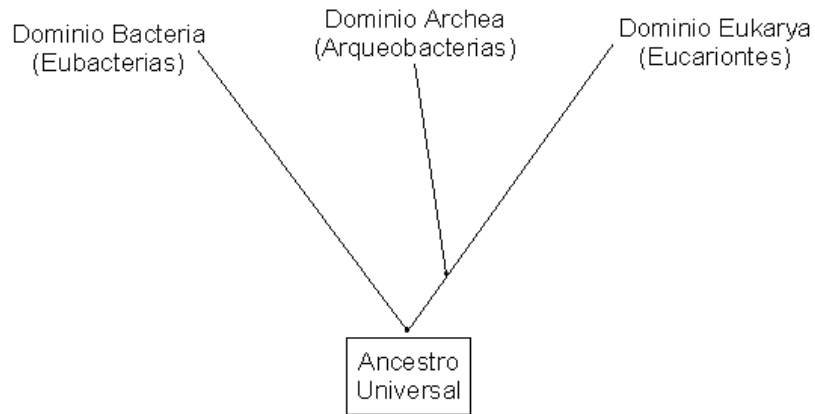


Figura 2: Árbol filogenético que muestra a los tres dominios
<http://rdp.cme.msu.edu>

La comparación de secuencias de RNAr, muestra que las *Archeas* se encuentran más relacionadas filogenéticamente con los *Eukarya* que con el dominio *Bacteria* (Woese et al., 2000), Sin embargo, otros estudios de secuencias de proteínas también revelan que estas son muy parecidas a las del dominio *Bacteria* (Karlin et al., 2002 Gupta, 1998).

En el dominio *Bacteria* se hallan los organismos procarióticos más conocidos, generalmente se conocen como bacterias y existe más información de ellas que de las *Archeas*. Suelen habitar en cualquier tipo de ambiente y tienen una gran importancia ecológica, porque participan activamente en los diferentes ciclos biogeoquímicos, las cuales son encargadas de reciclar los diferentes materiales en el ambiente (Horner-Devine et al., 2003).

La filogenia de las Eubacterias está basada en el análisis del catálogo de nucleótidos que presume la existencia de 17 filas diferentes (Figura 3).

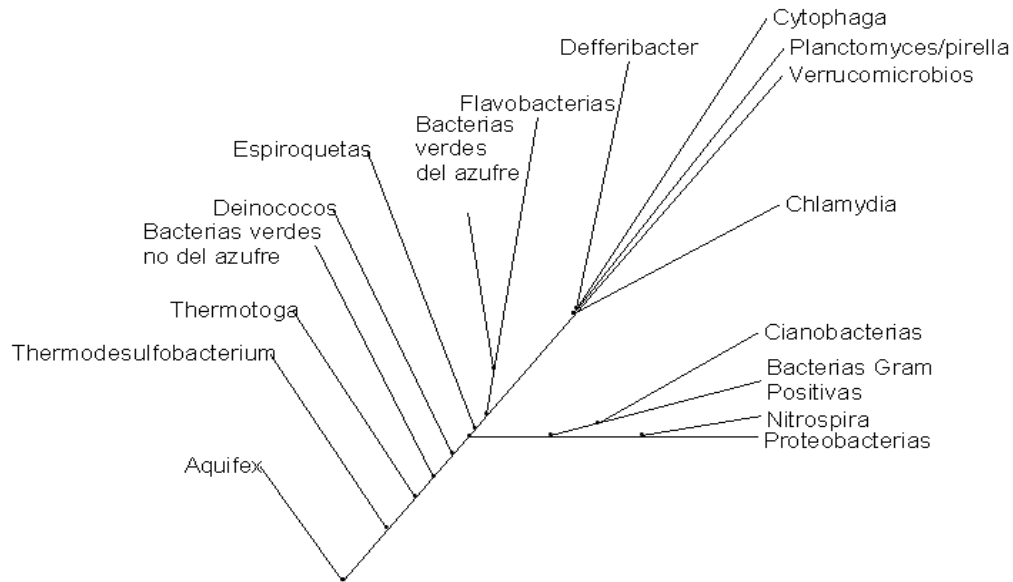


Figura 3: Árbol filogenético del dominio *Bacteria*. Construido a partir de las secuencias del RNA ribosómico 16S. <http://rdp.cme.msu.edu>

3.4.1 Bacterias

La palabra bacteria proviene del griego y significa “bastón pequeño”. Son los organismos procariontes unicelulares más abundantes del planeta. Las formas más comunes son: bacilos, cocos, espiroquetas y vibrios. No poseen núcleo definido ni citoplasma organizado. Poseen una membrana celular que les sirve de protección y da forma al organismo, la cual está compuesta de peptidoglicana que es un polímero de azúcares entrecruzados unidos por polipéptidos, constituyendo un exoesqueleto rígido cuya función principal es evitar la ruptura osmótica, y que envuelve al citoplasma en el cual se encuentran los ribosomas y el material genético (Brock, 2004).

3.4.2 Identificación de bacterias por composición de la pared celular de acuerdo a la tinción de Gram

Un método de identificación de las bacterias es la tinción diferencial de Gram que permite identificar la morfología de la célula bacteriana en cocos y bacilos gram positivos y gram negativos, según la estructura de su pared celular. Gram positivas se tiñen de color violeta y Gram negativas se tiñen de color rosado debido a las diferencias en la composición de su pared celular.

Cuadro 1: Composición de la pared celular de Gram positivas y Gram negativas

Bacterias Gram positivas	Bacterias Gram negativas
Glucopéptidos	Glucopéptido
Proteínas	Lipoproteínas
Ácidos lipoteicoicos	Lipopolisacáridos
Ácidos teicoicos	Fosfolípidos
Ácidos teicurónicos	Proteínas
Polisacáridos	Polisacáridos

La pared celular de las bacterias está formada por peptidoglicana, La diferencia consiste en que la pared celular de las bacterias gram positivas es gruesa debido a que está formada por varias capas de peptidoglicana (aproximadamente 80 al 90%) y de ácido teicoico. Por otro lado, la pared celular de las bacterias gram negativas está formada por una sola capa delgada de péptidoglucana (aproximadamente hasta un 20%), la cual está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos y lipopolisacáridos (Davis *et al.*, 1973).

3.4.3 Bacterias sulfato reductoras

Son aquellas que tienen la facultad de reducir sulfato, sulfito o tiosulfato de manera no asimilatoria, utilizándolos como aceptores de electrones, produciendo como desecho metabólico sulfuro de hidrógeno (Vincke, 2001). El S° y el SO_4^{-2} funcionan como aceptores de electrones en condiciones

anaerobias un gran parte de los géneros, los cuales utilizan compuestos orgánicos como donadores de electrones (Madigan *et al.*, 2004).

3.4.3.1 Ciclo del azufre

Las transformaciones del azufre son complejas, debido a la variedad de estados de oxidación que presenta este elemento y a que algunas de sus transformaciones se producen en cantidades significativas tanto química como biológicamente (Figura 4). Sin embargo, en la naturaleza los más importantes son tres: azufre elemental (0), sulfuro y sulfhidrilo (-2) y sulfato (+6) (Brock, 2004).

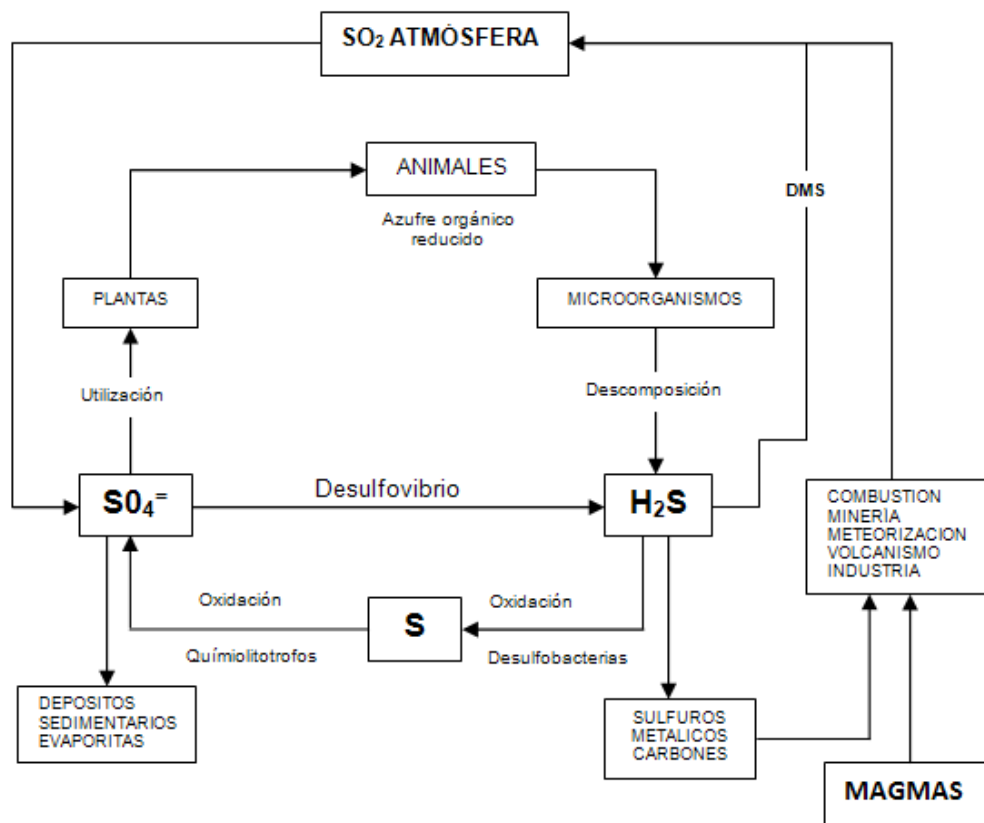


Figura 4: Ciclo del azufre (Brock, 2004)

En nuestro planeta, la mayor parte del azufre se encuentra en sedimentos y rocas en forma de minerales de sulfato (yeso) y minerales de sulfuro (pirita), aun que el mar constituye el reservorio más importante de azufre para la biosfera (Brock, 2004).

Cuadro 2: Procesos clave y organismos procariotas en el ciclo del azufre

Proceso	Organismos
Oxidación de sulfuro/azufre	($\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$)
Aeróbico	Quimiolitotrofos del azufre. (<i>Thiobacillus</i> , <i>Beggiatoa</i> , otros)
Anaeróbico	Bacterias fototróficas rojas y verdes, algunos quimiolitotrofos.
Reducción de sulfato (anaeróbico)	($\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$) <i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfobacter</i> .
Reducción de azufre (anaeróbico)	($\text{S}^0 \rightarrow \text{H}_2\text{S}$) <i>Desulfomonas</i> , muchas <i>Archaea</i> hipertermófilas.
Desproporción de azufre	($\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S} + \text{SO}_4^{2-}$) <i>Desulfovibrio</i> y otros.
Oxidación o reducción de compuestos orgánicos de azufre	($\text{CH}_3\text{SH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S}$) ($\text{DMSO} \rightarrow \text{DMS}$).
Desulfurilación	(Orgánica-S $\rightarrow \text{H}_2\text{S}$) Muchos organismos pueden hacerlo.

El azufre elemental (S^0) es químicamente estable, pero es oxidado con mucha facilidad por las bacterias sulfato reductoras, la oxidación del azufre produce iones de sulfato y de hidrogeno (Brock, 2004).

3.5 Ambientes extremos

La diversidad en ambientes extremos es amplia, entre estos se encuentran fuentes termales, suelos agrícolas inundados, fuentes termales submarinas, hielos del mar Antártico, suelos carbonatados, lagos alcalinos, suelos y manantiales salinos, lagos naturales con una elevada salinidad y manantiales termales (Rossi *et al.*, 2003; Kjeldsen *et al.*, 2007).

Las bacterias sulfato reductoras se encuentran ampliamente distribuidas en ambientes terrestres y acuáticos que se vuelven anóxicos debido a los procesos microbianos de descomposición; éstas son responsables de degradar más del 53% de la materia orgánica presente en estos ambientes (Torres-Alvarado *et al.*, 2006).

3.6 La ecología y la biotecnología de las bacterias reductoras de sulfato

Las bacterias reductoras de sulfato (BSR) son los microorganismos anaerobios que utilizan al sulfato como aceptor terminal de electrones, por ejemplo, la degradación de compuestos orgánicos. Son omnipresentes en hábitats anóxicos, donde tienen un papel importante en el ciclo de carbono y azufre. Las BSR pueden causar un grave problema para las industrias, como la industria petrolera marítima, debido a la producción de sulfuro, que es altamente reactivo, corrosivo y tóxico. Sin embargo, estos organismos también pueden ser benéficos debido a la eliminación de metales pesados y sulfato de flujos de residuos. Las SRB aunque se han estudiado durante más de un siglo, sólo con la reciente aparición de las nuevas técnicas moleculares y genómicas se ha empezado a obtener información detallada sobre su modo de vida (Muyzer *et al.*, 2008).

3.6.1 Hábitat de las bacterias sulfato reductoras

Las BSR están ampliamente distribuidas en ambientes terrestres y acuáticos, la alta actividad metabólica de estos microorganismos es fácilmente reconocida por el oscurecimiento del agua y del sedimento, debido a la precipitación del sulfuro de hierro y por el olor del sulfuro de hidrógeno. El hábitat de mayor permanencia y significancia de las BSR en la naturaleza son sedimentos marinos y pantanos salados así como lagos hipersalinos y termales, debido a su alto contenido de sulfato. Estas también han sido reportadas en hábitat no-salinos como suelos y sedimentos de agua dulce contaminada.

Las BSR han sido detectadas en ambientes contaminados como plantas anaerobias de tratamiento de aguas residuales, residuos de alimentos y plantas de drenaje o alcantarillados. También han sido aisladas de campos de arroz, contenidos de rúmen, digestores ácidos, heces de animales y humanos (Barton, 1995).

En los reservorios de petróleo se han estudiado la microbiología de hábitats subsuperficiales compuesta principalmente por BSR. En estos reservorios la explotación del petróleo se lleva a cabo a través de inundación con agua marina para mantener la presión dentro de ellos, lo cual resulta en la recolecta de una larga fracción de los remanentes de crudo o de crudo absorbido por las rocas también resultando en la disminución de la temperatura alcanzando entre los 50 y 100°C en zonas cercanas al fondo del pozo de inyección. Desde la perspectiva microbiológica, las emulsiones petróleo-agua crean las condiciones favorables para el crecimiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos las cuales generan sustratos para otras bacterias, entre ellas las reductoras de sulfato (Devereux & Stahl, 1993).

Las BSR pueden utilizarse en biorremediación por su capacidad de degradar compuestos como los alcanos. Los alcanos son los mayores componentes de los combustibles de petróleo, el ataque inicial de las cadenas alifáticas es generalmente mediada por minooxigenasas bajo condiciones anaerobias.

Por el contrario, la biodegradación de alcanos bajo condiciones anóxicas es poco conocida. Se ha reportado que cepas de *Desulfovibrio* bajo condiciones de sulfato reducción, degradan alcanos, junto con otras cepas de BRS. Un nuevo tipo de bacteria sulfato reductora fue aislada de un sedimento de la cuenca de Guaymas en el Golfo de California, México con la capacidad de degradar alcanos anaeróbicamente (Mingso & Young, 1999).

Las BSR también se usan en la degradación de los PCBs (Policlorobifenilos), que son compuestos muy tóxicos debido a su alta recalcitrancia que forman parte fundamental de refrigerantes, plásticos e intercambiadores de calor (Sánchez-Fernández, 2003).

3.7 Aspectos biotecnológicos de la termofilia

Los microorganismos termófilos e hipertermófilos son interesantes más allá de razones de biología fundamental. Estos microorganismos ofrecen importantes ventajas en procesos industriales y biotecnológicos, muchos de los cuales funcionan más rápida y más eficazmente a altas temperaturas. Las enzimas de los termófilos son capaces de catalizar reacciones a altas temperaturas y por ser más estables que las de los mesófilos la vida media de estas preparaciones enzimáticas es más prolongada. Por ejemplo, la Taq polimerasa es una enzima termorresistente, de gran importancia en Biología Molecular que fue aislada de termófilo *Thermus aquaticus*.

Esta enzima se usa para la automatización de los pasos repetitivos que tienen lugar en la reacción en cadena de polimerasa (PCR), una técnica muy importante para la amplificación de secuencias específicas de ADN (Brock, 2004).

Los organismos cuyas temperaturas óptimas se sitúan entre 45 y 80°C se llaman termófilos, y aquellos cuyas temperaturas óptimas son superiores a 80°C se llaman hipertermófilos. Estos últimos pueden ser aislados en ambientes calientes como fuentes termales en ebullición y fuentes hidrotermales submarinas que pueden alcanzar temperaturas superiores a 100°C. Los termófilos y los hipertermófilos producen macromoléculas termoestables (Brock, 2004).

La supervivencia de BSR en estos ambientes depende de las capacidades de adaptación a factores biológicos y físico-químicos que son decisivas para el crecimiento y la actividad de un microorganismo; estos factores incluyen la temperatura, pH y salinidad.

3.8 Efecto del pH, temperatura y salinidad sobre el crecimiento de las bacterias sulfato reductoras.

Las BSR crecen mejor sobre condiciones poco alcalinas. El pH es restringido (pH 7.0-7.8) y la tolerancia de los valores oscila entre 5.5 a 9.0. Sin embargo, la reducción desasimilatoria de sulfato ha sido observada en ambientes altamente ácidos, como drenajes mineros y en humedales (Barton, 1995).

Con respecto a la temperatura las BSR mesofílicas crecen mejor entre 28 y 38°C y tienen un límite máximo de temperatura de 45°C. La temperatura óptima para las BSR termofílicas tienen un rango de 56 a 85°C, aproximadamente. La mayoría de estas bacterias termofílicas han sido aisladas de hábitat geotérmicos y aguas de campos de petróleo (Bartón, 1995).

Las BSR son las más representativas de la microflora termofílica de las subsuperficies. A grandes profundidades, donde la temperatura es alta, residen las BSR termofílicas, pero sus propiedades y actividades han sido poco estudiadas (Rozanova *et al.*, 2001).

Las concentraciones de sal son otro factor determinante para las BSR termofílicas, la mayoría de estas han sido aisladas de ambientes marinos con una concentración promedio de 1 a 4% de NaCl, sin embargo, estas bacterias también han sido aisladas de manantiales termales con una concentración de 0.05 a 56 g/L (Barton, 1995; Thevenieau *et al.*, 2007). La mayoría de las BSR que han sido caracterizadas han mostrado una adaptación pobre en condiciones extremas hipersalinas, el reporte más alto in vivo de crecimiento óptimo para especies conocidas es de 10% de salinidad (Kjeldsen *et al.*, 2007).

3.9 Metabolismo del carbono en bacterias sulfato reductoras

La mayor parte de los compuestos utilizados como fuentes de energía por las bacterias sulfato reductoras se presentan resumidos en el (Cuadro 3). Algunos de estos compuestos son usados por muchos microorganismos, mientras que otros han sido identificados como fuentes de energía convenientes para un solo organismos. El crecimiento con polímeros, tal como polisacáridos no han sido observados en estas bacterias. Entre esta variedad de compuestos orgánicos que son utilizados se encuentran los de bajo peso molecular que incluyen ácidos mono y di-carboxílicos, compuestos aromáticos e incluso hidrocarburos. La oxidación de estos compuestos pueden ser completa e incompleta (Rabus *et al.*, 2006).

3.9.1 Reducción desasimilatoria del sulfato

La reducción desasimilatoria del sulfato en BSR es enzimológicamente distinta de la reducción asimilatoria del sulfato que ocurre en plantas verdes, algas y otros grupos, de procariotas.

La reducción desasimilatoria del sulfato en especies de *Desulfovibrio* está ligada al transporte de electrones junto con la fosforilación oxidativa porque la fosforilación a nivel de sustrato es inadecuada para su crecimiento (Fauque & Olliver, 2004).

Cuadro 3: Compuestos que pueden ser usados como sustratos para la reducción desasimilatoria del sulfato (Hasen, 1993).

Tipo de compuesto	Compuesto utilizado
Inorgánicos	Hidrógeno (H ₂), monóxido de carbono (CO).
Hidrocarburos	Alcanos (C12 a C20).
Ácidos monocarboxílicos (Alifáticos)	Acetato, butirato, formato, propionato, ácidos grasos de cadena larga, isobutirato, 2-metilbutirato, 3-metilbutirato, 3-metilvalerato, piruvato, lactato.
Ácidos dicarboxílicos	Fumarato, malato, oxalato, succinato.
Alcoholes	Etanol, metanol, butanol-1, propanol, pentanol-1, isobutanol, propanol-2, butanol-2, etilen glicol (mono, di, tri y tetra). 1,2-propanodiol.
Aminoácidos	Serina, glicina, alanina, cisteína, cistina, valina, treonina, leucina, isoleucina, aspartado, glutamato, fenilalanina.
Azúcares	Fructosa, glucosa, manosa, ramnosa, xilosa.
Compuestos aromáticos	Benzoato, 2,3 y 4-hidroxibenzoato, fenol, p-cresol, catecol, hidroquinonas, 2,4-dihidroxibenzoato, 3,4-dihidroxibenzoato, 2-aminobenzoato, 4-aminobenzoato, aminobenceno, hipurato, ácido nicotínico, fenilacetato, 4-hidroxifenilacetato, 3-fenilpropionato, timetoxibenzoato, vainillina.
Otros	Colina, beina, acetona, dihidroxiacetona, furfural, ciclohexanona, ciclohexanol, ciclohexanocarboxilato.

3.10 Mecanismos bioenergéticos de la reducción desasimilatoria del sulfato

Los mecanismos bioenergéticos de la reducción desasimilatoria del sulfato son tres: la activación de sulfato y su reducción a bisulfito, la reducción del bisulfito a sulfuro y el metabolismo del hidrógeno. En la activación del sulfato y su reducción a bisulfito necesita primero ser activado por el consumo de ATP mediante la intervención de enzimas como la ATP sulfurilasa que forma APS (adenilil sulfato) y PPI (pirofosfato) a partir del sulfato y el ATP, debido a la desfavorabilidad termodinámica de esta reacción se necesita de la intervención

de una segunda enzima, una pirofosfatasa inorgánica, la pirofosfatasa fosfohidrolasa, la cual hidroliza la PPI dando lugar a la formación de 2 Pi. La reducción de APS a AMP y bisulfito, es caracterizada por la APS deductasa presente, en su mayoría, en cepas de *Desulfovibrio* y en Archaeas hipertermofílicas sulfatoreductoras (Fauque & Olliver, 2004).

El proceso de reducción del bisulfito a sulfuro puede llevarse a cabo por dos mecanismos propuestos. El primero involucra la reducción de seis electrones del bisulfito a H₂S en un paso catalizado por el bisulfito reductasa, sin la formación de intermediarios. En el segundo paso, también conocido como la vía del tritionato, el bisulfito es reducido a sulfuro en tres pasos con la formación de intermediarios libres entre el tritionato y el tiosulfato. Este proceso es mediado por los dos tipos de bisulfito reductasas que se han encontrado en BSR, también por la presencia de desulfovirdina desulforubidina encontradas principalmente en los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium*, desulfofusicidina del género termofílico *thermodesulfobacterium* y P-582 del género espora formador *Desulfotomaculum* (Fauque & Olliver, 2004).

Por último, el metabolismo del hidrógeno es un proceso clave debido a la intermediación metabólica del hidrógeno en varios microorganismos. Además, el hidrógeno juega un rol central en la energía del metabolismo de las BSR, su intervención está dada a través de las hidrogenasas, constituidas por proteínas redox muy diversas en su estructura y composición reversible del hidrógeno molecular a protones y electrones, generando potenciales de membrana y gradientes transmembranales de pH con el bombeo de protones a través de la membrana celular (Fauque & Olliver, 2004).

3.11 Degradación de compuestos orgánicos en presencia de sulfato

3.11.1 Oxidación completa o incompleta

Las capacidades metabólicas de las BSR se dividen en dos amplias categorías, aquellos organismos capaces de oxidar completamente compuestos orgánicos a CO_2 y aquellos organismos incapaces de realizar la oxidación completa. Algunas BSR no pueden oxidar sustratos completamente a CO_2 , esta limitación metabólica por lo general refleja la ausencia de la vía para la oxidación del acetil-CoA a CO_2 (Hansen, 1993; Rabus *et al.*, 2006).

Las BSR que realizan la oxidación completa, no siempre oxidan sustratos directamente a CO_2 . La utilización de compuestos orgánicos fácilmente degradables como butirato, lactato o etanol conduce a una producción de acetato y la oxidación a partir de éste puede darse muy lentamente. Esto implica que algunas veces sea necesario que la evaluación de los sustratos producidos durante la oxidación se realice en un periodo de tiempo (Hansen, 1993).

La oxidación completa del grupo acetil CoA a CO_2 por las BSR puede realizarse por medio de dos vías, la vía del ciclo del ácido cítrico y por la vía del monóxido de carbono deshidrogenasa.

La vía del ciclo del ácido cítrico es diferente a la encontrada en la mayoría de los anaerobios, debido a la presencia de una deshidrogenasa α -cetoglutarato que es ferredoxina contraria a una NAD-dependiente, al enlace de membrana de NAD en la malato deshidrogenasa y por una ATP citrato liasa en lugar de un citrato sintasa. La activación del acetato procede a través de la vía de transferencia del grupo CoA del succinil-CoA. La ATP citrato liasa disponible en el organismo permite obtener ATP por fosforilación a nivel de sustrato por la oxidación del acetato a dos CO_2 . Esto puede deberse a una necesidad bioenergética porque se requiere de dos ATP para la activación del sulfato y por

que el rendimiento de ATP por transporte de electrones asociados a la oxidación muy probablemente no excede dos moléculas de ATP. El NAPH generado por la isocitrato deshidrogenasa es reoxidada por una deshidrogenasa-NAPH asociada a la membrana, y la ferredoxina reducida es reoxidada por el NA(D)^+ (Hansen, 1993).

La vía de la monóxido carbono deshidrogenasa no es cíclica pero involucra el clivaje de dos unidades de carbono del grupo metil y del monóxido de carbono y cada uno de estas es oxidadas por vías independientes (Hansen, 1993).

Ambos mecanismos de oxidación proveen la energía requerida para los procesos metabólicos, a partir de sustratos energéticos como alcoholes, aminoácidos, compuestos aromáticos, ácidos dicarboxílicos y lactato, entre otros (Hansen, 1993).

3.11.2 Oxidación del lactato

El lactato es uno de los sustratos más usados para cultivar BSR en estudios bioquímicos. Sin embargo, diferentes organismos descritos en los últimos años son incapaces de crecer sobre este sustrato. Entre estos se encuentran algunas especies de los géneros *Desulfotomaculum*, *Desulfobacter*, *Desulfonema* y *Desulfobacterium* que realizan oxidación completa. Este sustrato clásico es utilizado por la mayoría de las diferentes especies BSR y puede ser oxidado completa e incompletamente (Hansen, 1993; Rabus *et al.*, 2006).

La oxidación del y D-lactato a piruvato es mediado por la lactasa deshidrogenasa independiente de NAD(P)^+ y ocurre principalmente en la membrana celular. En la oxidación incompleta de sustratos orgánicos, el acetyl CoA producido a partir del piruvato es convertido a acetato principalmente por la fosfotransacetilasa y la acetato quinasa. Algunos cálculos energéticos que en *Desulfovibrio Spp* el ATP neto obtenido por la fosforilación a nivel de sustrato en

el crecimiento sobre lactato y sulfato puede ser de cero. Dos moléculas de lactato oxidado por molécula de sulfato pueden presentar un rendimiento de dos moléculas de ATP durante la liberación de acetato vía acetato quinasa. Estas dos moléculas de ATP son consumidas por la activación del sulfato, es decir una por la reacción de ATP sulfurilasa y otra para la regeneración de ADP a AMP (Rabus *et al.*, 2006).

3.11.3 Oxidación de alcoholes primarios, secundarios, dioles y glicerol

El etanol es usado como fuente de energía por muchos microorganismos entre estos miembros del género *Desulfovibrio* y varios representantes de otros géneros como *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium*, *Desulfotomaculum* y también por algunas cepas de *Desulfobacter*. El etanol es donador de electrones y fuente de carbono para las BSR por oxidación completa e incompleta. Así, los alcoholes primarios, metanol, glicerol y dioles también son utilizados para esta función (Hansen, 1993).

Los alcoholes primarios como el 1-propanol y el 1-butanol pueden también actuar como donadores de H_2 para las BSR. La oxidación por especies de *Desulfovibrio* es incompleta así como en algunas especies de *Desulfobulbus* que oxidan incompletamente el 1-propanol a acetato. Por último especies de otros géneros pueden oxidar estos alcoholes (1-propanol y 1butanol) completamente. Lo más probable es que estos alcoholes sean utilizados debido a la poca especificidad de etanol y la acetaldehído deshidrogenasa (Hansen, 1993; Rabus *et al.*, 2006). La utilización de los alcoholes primarios puede llevarse acabo usualmente, cuando está presente en el medio otra fuente de carbono (acetato + CO_2).

El alcohol deshidrogenasa ha sido activado al 100% con etanol, en un 72% con propanol y un 36% con butanol, pero no ha sido activada en presencia de isopropanol (Hansen, 1993).

A diferencia del etanol y de alcoholes primarios, el metanol es un donador de electrones menos común para las BSR y así el crecimiento sobre este es usualmente lento. Sin embargo, el mecanismo de oxidación del metanol es desconocido en la actualidad (Rabus *et al.*, 2006). Solo pocas BSR como *Desulfococcus multivorans* y *D. salexigens* pueden utilizar alcoholes secundarios como el 2-butanol y el 2-propanol (Hansen, 1993). La presencia de sulfato no ejerce efectos considerables sobre la conversión del metanol bajo condiciones mesofílicas. En contraste la presencia de sulfato afecta grandemente la conversión del metanol bajo condiciones termofílicas (Valero *et al.*, 2003).

Con respecto a los dioles el metabolismo de especies de *Desulfovibrio* envuelve generalmente dos procesos, la oxidación inicial del grupo alcohol primario o la deshidratación del diol a un aldehído (Rabus *et al.*, 2006).

Por otro lado, el glicerol es oxidado por especies *Desulfovibrio* a acetato y CO₂ vía glicero-3-fosfato, como por ejemplo, *Desulfovibrio fructosovorans* (Olliver *et al.*, 1988). Mientras que *Desulfovibrio carbinolicus* oxida el glicerol a 3-hidroxipropionato indicando que el glicerol puede ser oxidado completa e incompletamente (Rabus *et al.*, 2006). En la vía metabólica del glicerol actúa el glicerol quinasa, un glicerol 3-fosfato deshidrogenasa y enzimas de la ruta glicolítica a piruvato. El glicerol quinasa también usa dihidroxiacetona como sustrato generando un buen crecimiento de las cepas que utilizan el glicerol como sustrato. La mayor parte de la oxidación del glicerol a 3-hidroxipropionato es iniciada por una deshidratación a 3-hidroxipropanal (Hansen, 1993).

3.11.4 Oxidación de formato, propionato y azúcares

El formato puede ser oxidado por casi todas las especies de *Desulfovibrio*, por algunas especies de *Desulfotomaculum*, *Desulfococcus*, *Desulfobacterium* y *Desulfonema*. En las especies de *Desulfovibrio* la reacción es catalizada por la formato deshidrogenasa y como aceptor de electrones puede utilizar el citocromo C₅₅₃ (Hansen, 1993).

El propionato a diferencia del formato, es un sustrato característico para *Desulfobulbus* y este es oxidado a acetato y CO₂. Varias de las BSR que realizan la oxidación completa también utilizan propionato pero lentamente. *Desulfobulbus* oxida propionato mediante una vía que implica una trascarboxilación de propionil-CoA a metilmalonil-CoA con oxalacetato como donador de electrones (Hansen, 1993).

Sólo pocas especies representantes del género *Desulfovibrio* muestran la capacidad de utilizar azúcares sin embargo, el uso de fructosa en ausencia o presencia de sulfato se ha observado en *D. fructosovorans*, así como se ha reportado la utilización de glucosa en *Desulfotomaculum nigrificans* y *D. salexigens*. De igual forma, se reporta que la utilización de fructosa es mayor que la de glucosa en las BSR (Rabus *et al.*, 2006).

3.11.5 Oxidación de compuestos aromáticos

El rango de compuestos aromáticos que pueden ser degradados por las BSR es amplio. Los mecanismos de degradación de estos compuestos son dos, uno de ellos no implica la destrucción del anillo aromático y el otro incluye la destrucción del anillo aromático para realizar su degradación. Las fuentes naturales de compuestos aromáticos son aminoácidos aromáticos y lignina; otras fuentes pueden ser los compuestos xenobióticos, como la anilina (Hansen, 1993).

La degradación de compuestos aromáticos bajo condiciones anaerobias ha sido estudiada en sedimentos y cultivos enriquecidos de bacterias denitrificantes, metanoarchaeas y BSR, las cuales son capaces de degradar hidrocarburos aromáticos como el tolueno (Rabus *et al.*, 2006).

La vía de degradación anaerobia de compuestos aromáticos que más se conocen es la degradación del tolueno. El bencilsuccinato, ha sido el primer metabolito identificado en el metabolismo del tolueno en cepas de *Desulfobacula toluoica*, y muestra una dependencia sobre la formación del fumarato debido a la presencia de la enzima bencilsuccinato sintasa, una enzima con un radical bencil que ataca el grupo metilo del tolueno en combinación con el fumarato.

La degradación del bencilsuccinato se cree que procede a través de una vía de reacciones análogas a la β -oxidación de la ramificación metil de los ácidos grasos, produciendo benzoil-CoA como un intermediario central. De acuerdo con esta utilización del tolueno por parte de las BSR, estas pueden crecer en benzoato, naftaleno, y del 2-naftoato utilizando la carboxilación como un mecanismo de activación inicial del hidrocarburo aromático bicíclico (Rabus *et al.*, 2006).

3.11.6 Oxidación de malato succinato y otros ácidos dicarboxílicos

Los ácidos carboxílicos son sustratos comunes de completa e incompleta oxidación por las BSR. El crecimiento de esos microorganismos es generalmente más rápido en fumarato y malato que en succinato. Algunas especies utilizan uno o más de estos compuestos, estas diferencias se deben a la falta del sistema de transporte o a la de las enzimas implicadas en la degradación de los compuestos. Los rendimientos de crecimiento sobre succinato, son más bajos que sobre malato, es de suponer debido a que su crecimiento es menor en succinato. La vía de degradación del malato en

especies de *Desulfovibrio* involucra la enzima malato dependiente de NADPH, como la enzima clave en la conversión de malato a piruvato (Rabus *et al.*, 2006).

3.11.7 Oxidación de aminoácidos

La utilización de aminoácidos se reporta principalmente en microorganismos marinos que incluyen algunas especies de *Desulfovibrio*, también se han aislado BSR mesofílicas que utilizan principalmente aminoácidos como *D. aminophilus* (Baena *et al.*, 1998). Uno de los aminoácidos utilizados más frecuentemente es la alanina, que sirve como donador de electrones en varias especies como *Desulfotomaculum ruminis* y *Desulfovibrio salexigens*. La oxidación de L-alanina en cepas de *Desulfovibrio* y en *Desulfotomaculum ruminis*, requieren la acción de la alanina dehidrogenasa dependiente de NAD⁺ (Rabus *et al.*, 2006).

Otros aminoácidos como la serina, glicina y cisteína también son reportados como donadores de electrones en dos especies de *Desulfovibrio*, mientras el glutamato es usado por algunas cepas de *Desulfobacterium* (Rabus *et al.*, 2006).

Las BSR además de presentar la capacidad de oxidar los sustratos anteriormente mencionados como donadores de electrones, pueden tomar estos compuestos en la ausencia del sulfato como aceptor final de electrones, llevando a cabo entonces un proceso de fermentación.

3.12 Fermentación de sustratos

Las BSR pueden utilizar procesos de conservación de la energía diferentes de la reducción desasimilatoria del sulfato; ellas pueden utilizar aceptores de electrones diferentes al sulfato, sulfito o tiosulfato y son capaces de crecer

fermentativamente por dismutación o disproporción de compuestos orgánicos e inorgánicos (Fauque & Olliver, 2004). La dismutación es una reacción en la que dos moléculas de un sustrato idénticas tienen destinos diferentes. Particularmente, una reacción en la que una de las moléculas sustrato se oxida y la otra se reduce (Mathews *et al.*, 2003).

3.12.1 Fermentación de sustratos orgánicos

La capacidad fermentativa de las BSR incluye diferentes sustratos como piruvato, peptona, glicina, serina, treonina, cisteína, malato, lactato, fumarato y casaminoácidos teniendo como productos principales el acetato, dióxido de carbono, hidrógeno y etanol (Fauque & Olliver, 2004).

Los sulfato reductores del género *Desulfovibrio* que no pueden crecer por fermentación de lactato, etanol o colina puede crecer en los sustratos anteriormente mencionados en ausencia de sulfato en cultivos sintróficos con las Archaeas metanogénicas (Fauque & Olliver, 2004).

Así algunas especies de *Desulfovibrio* fermentan malato y fumarato con formación de succinato, acetato y dióxido de carbono. En ausencia de sulfato algunas especies pertenecientes a los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfotomaculum* y *Desulfobulbus*, fermentan piruvato produciendo acetato, dióxido de carbono e hidrógeno (Fauque & Olliver, 2004).

3.12.2 Fermentación de compuestos inorgánicos del azufre

Con el mecanismo de fermentación de compuestos inorgánicos del azufre, las BSR son capaces de conservar la energía para el crecimiento bajo condiciones estrictamente anaerobias por dismutación del sulfito o tiosulfato a sulfato. Las enzimas requeridas para estas dismutaciones son parecidas a las de la sulfato reducción.

Se ha demostrado que durante la fermentación de compuestos inorgánicos del azufre, la formación del sulfato se da a través de la APS reductasa y de la ATP sulfurilasa, pero no por la sulfito oxidoreductasa. El transporte reverso de electrones es necesario para alcanzar la reducción de sulfito o del tiosulfato con los electrones derivados de la APS reductasa (Fauque & Olliver, 2004).

3.13 Reducción de azufre elemental, nitrato y oxígeno

3.13.1 Reducción del azufre elemental

Varios géneros del dominio Archaea y Bacteria pueden obtener energía para su crecimiento por medio de la reducción desasimilatoria del azufre elemental a sulfuro de hidrógeno en un tipo de metabolismos respiratorio. Las bacterias facultativas reductoras del azufre como las BSR, utilizan el azufre elemental como un sustrato respiratorio en ausencia de otros posibles aceptores de electrones como el nitrato, sulfato, sulfito o tiosulfato. Algunas cepas del género *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium* usan el azufre elemental como un aceptor de electrones alternativo debido a la presencia del citocromo c3, que posee la actividad azufre reductasa (Fauque & Olliver, 2004).

3.13.2 Reducción desasimilatoria del nitrato

La reducción desasimilatoria del nitrato o nitrito a aminoácido (proceso también conocido como amonificación) puede funcionar como único proceso de conservación de energía en algunas BSR. El nitrato es reducido a amoníaco (con nitrito como intermediario) por la intervención de la enzima nitrato reductasa que es inducible por nitrito o nitrato, mientras que la nitrito reductasa no. La nitrato reductasa es una enzima periplasmática monomérica con una masa molecular de 74 kDa, que contiene un átomo de molibdeno y un centro (4Fe 4S) por molécula, y su estructura es cristalina.

La nitritoreductasa es un heterooligómero del citocromo c que contiene dos tipos de subunidades de 62 y 19kDa y solo cataliza la reducción de sulfito a sulfuro (Fauque & Olliver, 2004).

3.13.3 Reducción del oxígeno

Las BSR han sido consideradas estrictamente anaerobias, pero se ha demostrado que algunas de ellas pueden tolerar la presencia de trazas de oxígeno molecular. Sin embargo, usualmente las BSR no crecen con el dioxígeno como un aceptor de electrones. Las BSR obviamente contienen oxidasas terminales diferentes a las presentes en microorganismos aerobios. Las sulfato reductoras usan superóxido reductasas como un componente de un proceso oxidativo de protección al estrés que cataliza la reducción en lugar de la dismutación de superóxido a peróxido de hidrógeno. Dos clases de superperóxido reductasas existen en las BSR y contienen uno (neelaredoxina) o dos (rubredoxina oxidorreductasa o desulfoferredoxina) centros de hierro (Fauque & Olliver, 2004).

3.13.4 Reducción de metales por bacterias sulfato reductoras desasimilatorias

Además de su habilidad para usar compuestos del azufre como aceptores de electrones terminales, las BSR han demostrado su capacidad de reducir un amplio rango de metales pesados como cromo (Cr), molibdeno (Mo), selenio (Se), hierro (Fe), tecnecio (Tc), manganeso (Mn), arsénico (As), paladio (Pd) y uranio (U). Por estas habilidades varias BSR pueden considerarse como biorremediadoras de ambientes contaminados por metales pesados. La reducción del metal puede obtenerse no solo por reducción directa cuando el sulfato es sustituido en el medio de cultivo, favoreciendo así la concomitante producción de sulfuro y la precipitación del metal (Fauque & Olliver, 2004).

El uso de metales pesados en lugar de sulfato como un aceptor de electrones por las BSR no está generalmente relacionado con el crecimiento. La reducción directa de metales pesados por las BSR, mediada por la actividad enzimática, ha sido poco estudiada. Sin embargo, se ha encontrado en algunas cepas la presencia de enzimas metalhidrogenasas y también se ha detectado la intervención del citocromo c3 alterado, que por mutagénesis de sitio directo indica que el potencial negativo redox es crucial para la actividad de las metal hidrógenasas. Así, se sugiere que los citocromos y las hidrogenasas de las BSR juegan un papel importante en la reducción de los metales (Fauque & Olliver, 2004).

3.14 Filogenia de las Bacterias Sulfato Reductoras

Las BSR son un grupo bacteriano complejo fisiológicamente, varias propiedades utilizadas para la caracterización general de los microorganismos han sido usadas en su clasificación tradicional. Las más importantes de esas propiedades son: morfología de la célula (forma, tamaño, movilidad, estructuras visibles externas e internas, formación de agregados, diferenciación celular, ultraestructura general), morfología de la colonia (apariencia de células en suspensión y apariencia de las colonias), composición celular (tinción de Gram, contenido de G-C del DNA, materiales de reserva, fisiología (temperatura, pH), metabolismo energético, relaciones con el oxígeno, aceptores de electrones, fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y fuentes de azufre) y ecología (hábitat natural) (Schleifer & Truper, 2006); además de la determinación de la presencia de desulfovirdina y citocromos y la oxidación completa e incompleta del acetato, que son características propias para la clasificación de las BSR (Castro *et al.*, 2000).

Desde hace 25 años las técnicas que involucran el análisis rRNA ó de los genes que codifican para el rRNA (rDNA) han revolucionado la taxonomía de los procariotes.

Las conclusiones de los estudios han permitido ver que los genes del rRNA son altamente conservados debido a su importante rol ribosomal en la síntesis de proteínas. Las moléculas de rRNA reflejan la filogenia de los microorganismos al asumir que su tasa de mutación es muy baja, ya que se encuentran bajo una fuerte presión conservadora (Brock, 2004)

Además, debido a sus moléculas largas, el rRNA contiene información genética considerable que ha sido utilizada como base molecular de las reconstrucciones filogenéticas procariotas. Dos argumentos adicionales son la base para validar esta afirmación, a saber: la transferencia lateral de genes “no ocurre” entre genes rRNA, y la cantidad de evolución o de disimilitud entre secuencias rRNA de un par de organismos es representativo para la variación mostrada por los correspondientes genomas. Si esto es verdad, entonces las variaciones en la cantidad de estructuras primarias rRNA en procariotas se vería reflejado en la cantidad de organismos distantes. Las secuencias 16S rRNA y los análisis de comparación han demostrado tener un alto poder de resolución para la medida del grado de relación entre organismos por encima de nivel de especie (Burgess *et al.*, 2007; Rosselló-Mora & Amann, 2001).

Los análisis de las secuencias rRNA han permitido la organización de las BSR dentro de cuatro grupos filogenéticos, entre los que se encuentran: BSR mesofílicas Gram negativas; BSR esporoformadoras Gram positivas; bacterias termofílicas sulfato reductoras; y las arqueas termofílicas sulfato reductoras. Todos estos grupos se caracterizan por utilizar el sulfato como aceptor terminal de electrones durante la respiración anaerobia. La asignación de especies individuales dentro de grupos apropiados con base en los análisis rRNA es general, un acuerdo al que se ha llegado por taxonomía tradicional, aunque existe algunas excepciones (Castro *et al.*, 2000; Fauque & Ollivier, 2004; Thevenieau *et al.*, 2007).

Las BSR mesofílicas Gram negativas se encuentran dentro de la subclase de las δ -Proteobacterias. Desde el punto de vista en su historia evolutiva la clase δ diverge de otras Proteobacteria en el ancestro común fotótrofo, y los miembros de la subclase delta perdieron probablemente su habilidad fotosintética y se convirtieron en heterotróficas (Castro *et al.*, 2000).

La subclase δ -Proteobacteria incluye las familias Desulfovibrionaceae y desulfobacteriaceae. La familia Desulfovibrionaceae incluye los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium* y la familia Desulfobacteriaceae incluye los géneros *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfomonile*, *Desulfonema*, *Desulfotulus* y *Desulfarculus*. Dentro de esta familia podrían también incluirse con base en los análisis de rRNA los géneros *Desulfobacula*, *Desulfospira*, *Desulfocella*, *Desulfocapsa*, *Desulforhopalus*, entre otros. La mayoría de los miembros de esta familia son mesofílicos; sin embargo existen cinco excepciones, *Desulfacinum infernum*, *D. hydrotermale*, *D. subterraneum*, *Desulfomicrobium thermophilum*, y *Thermodesulforhabdus norvegicus* que registran temperaturas óptimas de crecimiento alrededor de los 60°C (Castro *et al.*, 2000; Devereux & Stahl, 1993; Mori *et al.*, 2003; Thevenieau *et al.*, 2007).

Dentro de la subclase δ -Proteobacteria se encuentra tanto bacterias no sulfato reductoras como bacterias azufre reductoras, y a su vez se dividen en cuatro subgrupos: myxobacteria, bdellovibrios, las BSR desasimilatorias y bacterias sintróficas. Cinco ramas están incluidas dentro de esta subclase *Desulfovibrio*, *Desulfuromonas*, *Desulfobacter*, *Synthrophobacter* y *Desulfurella*. Adicionalmente las bacterias sintróficas comprenden los géneros *Synthrophobacter*, *Desulforhabdus*, *Desulfovirga*, *Desulfacinum* y *Thermodesulforhabdus*. Las relaciones filogenéticas entre las BSR y otros miembros de la subclase delta no se han resuelto, aunque se ha sugerido que Myxobacteria y bdellovibrios pueden representar adaptaciones aeróbicas de un

ancestro anaeróbico de fenotipo azufremetabolizador (Kersters *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2000).

Las BSR esporoformadoras Gram positivas están dentro de las bacterias Gram positivas con bajo contenido de Guanina-Citosina (GC) que son generalmente mesofílicos o moderadamente termofílicos con la capacidad de formar esporas como *Bacillus* y *Clostridium*. A este grupo pertenecen los géneros *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus* y *Thermoacetogenium* (Castro *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2003).

Dentro del orden Clostridiales se han aislado bacterias termofílicas del género *Clostridium* como *Clostridium cellulosi* y *Clostridium thermosaccharolyticum* (Huber & Hannig., 2006; Rainey *et al.*, 1993).

Los microorganismos sulfato reductores del Dominio Archaea están filogenéticamente divididos en tres Géneros: *Archaeoglobus*, *Caldivirga* y *Thermocladium*. Al género *Archaeoglobus* pertenecen la especie *A. fulgidus*, *A. profundus* y *A. veneficus*. La mayor diferencia entre *Archaeoglobus fulgidus* y *A. profundus* es que *A. fulgidus* posee flagelo, es quimiolitótrofa facultativa y produce una pequeña cantidad de metano, mientras que *A. profundus* no posee flagelo, es quimiolitótrofa obligada y no produce metano (Castro *et al.*, 2000).

Mientras al género *Caldivirga* pertenece una sola especie *Caldivirga maquilingensis* y al género *Thermocladium* pertenece la especie *T. modesticus*. Este grupo de organismos exhibe temperaturas óptimas de crecimiento superiores a 80°C (Mori *et al.*, 2003; Hartzell & Reed, 2006; Itoh *et al.*, 1998; Castro *et al.*, 2000).

Dentro del dominio Bacteria hay aproximadamente cuarenta y cuatro géneros de BSR, implicados en la reducción desasimilatoria de sulfato entre estos: *Desulfovibrio*, *Desulfarculus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfobulbus*,

Desulfococcus, *Desulfohalobium*, *Desulfomicrobium*, *Desulfomonile*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*, *Desulfotomaculum*, *Thermodesulfobacterium* (Fauque, 1995; Hartzell & Reed, 2006), *Desulfacinum* (Sievert & Kuever, 2000; Rees et al., 1995; Rozanova et al., 2001), *Desulfarculus* (Kuever et al., 2006), *Desulfatibacillum* (Cravo-Laureau et al., 2004), *Desulfatiferula* (Cravo-Laureau et al., 2007), *Desulfatirhabdium* (Balk et al., 2008), *Desulfobacca* (Oude-Elferink et al., 1999), *Desulfobacula* (Rabus et al., 2000), *Desulfocapsa* (Janssen et al., 1997), *Desulfocella* (Brandt et al., 1999), *Desulfofaba*, *Desulfofrigus* (Knoblauch et al., 1999), *Desulfofustis* (Friedrich et al., 1996), *Desulfoglaeba* (Davidova et al., 2006), *Desulfomusa* (Finster et al., 2001), *Desulfonatronovibrio* (Zhilina et al., 1997), *Desulfonatronum* (Pikuta et al., 1998), *Desulfonauticus* (Audiffren et al., 2003), *Disulfonispora* (Denger et al., 1999), *Desulfopila* (Suzuki et al., 2007), *Desulforegula* (Rees & Patel, 2001), *Desulforhabdus* (Oude-Elferink et al., 1997), *Desulforhopalus* (Isaksen & Teske, 1999), *Desulfospira* (Finster et al., 1997), *Desulfosporosinus* (Stackebrandt et al., 2003), *Desulfovermiculus* (Belyakova et al., 2007), *Desulfovirga* (Tanaka et al., 2000), *Desulfovirgula* (Kaksonen et al., 2007), *Desulfurella* (Bonch-Osmolovskaya et al., 1990), *Desulfurispora* (Kaksonen et al., 2007), *Desulfurobacterium* (L'Haridon et al., 2006) y *Desulfurococcus*, *Thermocladium* y *Caldivirga* (Castro et al., 2000; Fauque & Ollivier, 2004; Itoh et al., 1998, 1999; Hartzell & Reed, 2006).

Estas bacterias crecen sobre un amplio rango de sustratos entre los que se encuentran ácidos orgánicos, alcoholes, aminoácidos y compuestos xénobióticos. Este grupo de bacterias participan activamente en la transformación y reciclaje de materia orgánica en ambientes anaeróbicos, entre las que se encuentran procesos de compostaje y biodegradación de contaminantes policlorados (Castro et al., 2000; Thevenieau et al., 2007).

La degradación anaerobia de la materia orgánica es un proceso complejo que requiere la interacción de diferentes grupos de microorganismos. Cada grupo microbiano funciona en la cadena alimenticia donde el producto metabólico final

de un grupo es el sustrato de otro hasta que la oxidación sea completa. En los hábitats anóxicos el primer grupo de organismos que interviene son los fermentativos que hidrolizan los polímeros de alto peso molecular (Proteínas, polisacáridos, lípidos, ácidos nucleícos) y fermentan su respectivo monómero (aminoácidos, azúcares, ácidos grasos, nucleótidos) a H_2 , CO_2 , acetato, ácidos orgánicos y alcoholes. El acetato, H_2 y CO_2 son reutilizados directamente por las metanoarchaeas. El segundo grupo son las bacterias acetogénicas que clivan los ácidos orgánicos y alcoholes en acetato, H_2 y CO_2 . El tercer grupo de microorganismos está formado por metanoarchaeas que utilizan los productos finales de todos los procesos previos (H_2 , CO_2 , acetato, formato) para producir metano. El cuarto grupo consiste en las BSR quienes compiten con los metanógenos y acetógenos por la disponibilidad de sustratos. La metanogénesis y la reducción desasimilatoria de sulfato son dos procesos terminales de la mineralización anaerobia, y la predominancia de uno de estos procesos depende principalmente de la disponibilidad del sulfato (Reysenbach, 2002).

3.15 Biodegradación

Respecto a la biodegradación de contaminantes aromáticos clorados, las BSR son capaces de utilizar diferentes fuentes de nitrógeno. Diferentes organismos pueden fijar nitrógeno y además usar el nitrógeno de los aminoácidos. Las principales fuentes naturales de compuestos aromáticos son aminoácidos aromáticos y lignina, sus precursores y compuestos de degradación. La degradación de compuestos aromáticos por las BSR se lleva a cabo por su capacidad de romper la estructura aromática del anillo en varios compuestos. Algunas especies de *Desulfotomaculum* convierten el trimetoxibenzoato a trihidroxibenzoato, al igual que algunas especies de *Desulfovibrio* oxidan ciertos sustitutos de benzaldehídos a sus respectivos ácidos benzóicos (Hanzen, 1993).

El proceso de metilación del mercurio es un proceso que involucra el cambio del mercurio en forma inorgánica (Hg^{2+}) a las formas metiladas metilmercurio (CH_3Hg^+) y dimetilmercurio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$) que puede llevarse a cabo por una ruta bioquímica anaerobia involucrando en el uso de la metilcobalamina. Este proceso se realiza principalmente en los sedimentos de las aguas oceánicas y cuerpos de aguas continentales (Verbel & Restrepo, 2002).

Se ha demostrado que *D. desulfuricans* transforma el mercurio a metilmercurio, y esta metilación es mediada por la metilcobalamina (B_{12}) (Barton, 1995).

La metilcobalamina ($\text{CH}_3\text{CoB}_{12}$) transfiere un metilcarbanión (CH_3) al ión mercúrico (Hg^{2+}) para generar $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$. Esta especie es insoluble en el agua y es además altamente volátil, por lo que se difunde en forma rápida a la atmosfera. Una vez en la atmosfera, el dimetilmercurio es fotolizado por la luz ultravioleta para dar Hg_0 y radicales de metilo. Los radicales de metilo pueden unirse a un hidrógeno para producir moléculas de metano o acoplarse a dos de ellos para formar una molécula de etano. Una vez que el metilmercurio es liberado por los microorganismos entra en contacto con la biota acuática a través de una rápida difusión, facilitando la bioacumulación y biomagnificación por las especies de la cadena alimenticia, aumentando los niveles de acumulación y toxicidad en los organismos vivos por lo cual causan un daño ecológico en los ecosistemas (Verbel & Restrepo, 2002).

La producción de sulfuro de hidrógeno está asociada a la degradación de compuestos orgánicos en ambientes anaerobios a través del consumo de aceptores de electrones como el O_2 , NO_3 y SO_4^{2-} , con la formación de H_2O , N_2 , H_2S y CH_4 , respectivamente (Devereux & Stahl, 1993).

Las concentraciones de sulfato en los ecosistemas influyen directamente sobre la actividad metabólica de las BSR y la producción de H_2S . Cuando la concentración de sulfato es alta, productos complejos de fermentación son

oxidados a CO_2 y agua. En condiciones de concentraciones bajas de sulfato, las BSR oxidan lactato usando protones como aceptores de electrones y generan H_2 . Las consecuencias ambientales del crecimiento de las bacterias BSR pueden ser devastadoras. Ellas son las responsables de las muertes masivas de peses, de trabajadores de las alcantarillas por intoxicación con sulfuro de hidrógeno, de la generación de “nieblas tóxicas del amanecer”, y de la muerte de los cultivos de arroz por el agotamiento del oxígeno en los arrozales (Devereux & Stahl, 1993).

Las BSR tienen un impacto en la salud humano en el desarrollo de enfermedades gastrointestinales, por ejemplo *Desulfovibrio desulfuricans* se ha detectado en rumen de oveja y en el intestino humano causando inflamación del colon. Gracias al desarrollo de técnicas de cultivo anaerobias, recientes estudios han reportado que cerca de 50% de la totalidad de los abscesos en hígados piogénicos son causados por bacterias anaerobias sulfato reductoras (Tee *et al.*, 1996).

Los aceros inoxidables austeníticos son ampliamente usados en las industrias química, petroquímica, térmica y nuclear debido a su excelente resistencia a la corrosión, buenas propiedades mecánicas a elevadas temperaturas, además que pueden ser soldados por procesos muy variados.

Debido a su alta ductibilidad y tenacidad, a su elevada resistencia a altas temperaturas y a la corrosión, estos aceros son utilizados en un amplio intervalo de temperatura (-196 y 900°C). Sin embargo, los procedimientos normales de soldadura introducen en el metal la posibilidad a la precipitación de una gran variedad de carburos, lo que trae como consecuencia que el acero sea susceptible a la corrosión, incluida la corrosión inducida por los microorganismos, generando muchas veces daños significativos, que involucran pérdidas cuantiosas a la industria. El papel de los microorganismos en la corrosión de los metales se ha venido incrementando en los últimos años. Este

tipo de corrosión se define como la inducida o promovida por la acción de agentes agresivos producidos por microorganismos. Dentro de estos microorganismos están las bacterias sulfato reductoras, *Desulfotomaculum thermoacetoxidans* las cuales se encuentran frecuentemente implicadas en la corrosión del acero, cobre y aleaciones ferrosas (Figuerola *et al.*, 2008).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Descripción del área de estudio

4.1.1 Localización geográfica

El área de estudio se encuentra en el municipio de Jojutla, que pertenece al estado de Morelos, delimitado entre los $18^{\circ} 36' 53''$ latitud Norte y los $99^{\circ}11' 43''$ de longitud Oeste.

El municipio tiene una superficie de 142.6 km^2 y se encuentra a una altura promedio de 890 m (Figura 5).

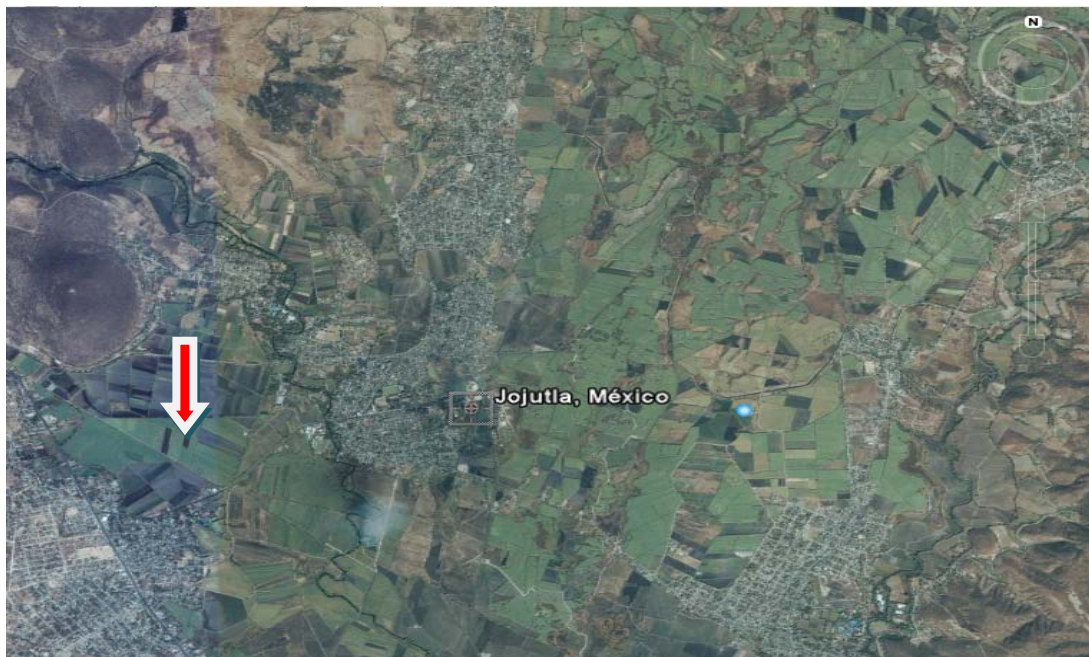


Figura 5: Imagen de localización del área de estudio

4.1.2 Hidrografía

El territorio del municipio de Jojutla lo atraviesan, los Ríos Amacuzac, Yautepec, Apatlaco, Coatlán y Cuautla.

4.1.3 Principales ecosistemas

El municipio tiene una vegetación denominada selva baja caducifolia con vegetación secundaria, compuesta principalmente de casahuate, copal, tepehuaje, pochote, muy escasos ejemplares de palo de Brasil, nopales, huizaches y pastizales.

La fauna se reduce a conejos, tejones, tlacuaches, zorras, mapaches; a últimas fechas se han reproducido garzas blancas, aves migratorias como la paloma de ala blanca, y huilota, aun se pueden ver codornices y cada vez menos, chachalacas. En 1995 se plantaron 38,697 árboles, resultando en 45.662 hectáreas reforestadas

4.1.4 Clima

El clima del municipio es cálido la mayor parte del año, pueden registrarse temperaturas por encima de los 30°C en los meses de Abril, Mayo y Junio, siendo de 27°C en promedio. En Noviembre, Diciembre y Enero se registran las temperaturas más bajas que no son inferiores a los 18°C. La temporada de lluvia regularmente inicia en Junio y se prolonga hasta Septiembre, con una precipitación media anual de 917 mm. (INEGI, 1992).

La actividad principal es la agricultura, entre los cultivos principales esta la caña de azúcar, arroz, maíz, etc.

4.2 Colecta de muestras

Se colectaron cuatro muestras de lodo de la zona, en diferentes terrenos con cultivo de arroz, inundado con agua de riego buscando la zona radicular, prefiriéndose las condiciones anaeróbicas.

Las muestras se colectaron en frascos de vidrio transparente estéril de 500 mL. Para mantener la esterilidad y las condiciones anaeróbicas, al momento de tomar las muestras solo se abrió un poco la tapa y se cerró inmediatamente después de tomar cada muestra.

Las muestras se transportaron al laboratorio de Microbiología de la Biorremediación de la Universidad Autónoma Chapingo.

Para comprobar qué muestra era la más adecuada para el enriquecimiento, se midió la cantidad de sulfatos de cada una de las muestras, utilizando la técnica clásica con un equipo llamado Espectrofotómetro. La determinación de sulfatos es muy importante porque sabemos que el objetivo de la investigación es identificar las bacterias sulfato reductoras, ya que a mayor concentración de sulfatos en el suelo, mayor será la presencia de estas bacterias sulfato reductoras, es por eso el primer paso fue determinar los sulfatos para luego proseguir la siguiente etapa de investigación, que consiste en sembrar las bacterias sulfato reductoras en un medio de cultivo líquido para determinar su crecimiento.

Se seleccionó una muestra de las cuatro que se colectaron, la cual además olía a sulfuro de hidrógeno y tenía mayor cantidad de sulfatos. La muestra fue marcada como Jojutla uno (J1). (Figura 6 y 7).



Figura 6: Muestras de lodo



Figura 7: Muestra seleccionada

4.2.1 Determinación de producción de H_2S

4.2.2 Reactivo de cobre

De acuerdo con Cord-Ruwisch (1985), en un matraz volumétrico, se colocan 200 ml de agua destilada, se agregan 2.9 ml de HCL 50 mM y se afora a 500 mL, por último se ponen 0.6 g de CuSO_4 5 mM agitándose vigorosamente hasta que quedó disuelto. Se almacenó en un frasco color ámbar.

4.2.3 Medición de H₂S

En un tubo de ensaye limpio se ponen 2 mL de reactivo de cobre (Figura 8) y 0.2 mL de la muestra a analizar, y se mide la absorbancia (Figura 9), en un espectrofotómetro (HACH D/R 4000U) a 480 nm. Se toma como blanco un tubo que contenga reactivo de cobre sin muestra a analizar, y los resultados de la absorbancia se comparan en la curva tipo para determinar la cantidad H₂S producido. La curva tipo se realizó con una solución madre anóxica de Na₂S*9H₂O en concentraciones de 0 a 20 mM. (Ver anexo 1).

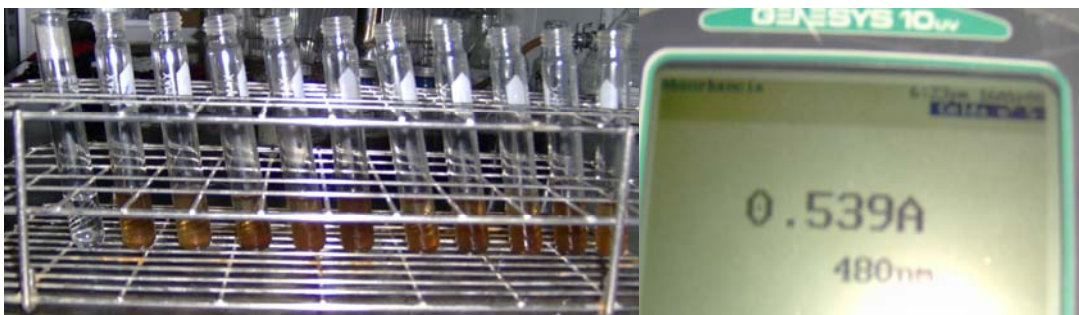


Figura 8: Determinación de H₂S

Figura 9: Determinación de absorbancia

4.3 Medio de cultivo

El medio de cultivo anóxico (Hernandez-Eugenio, 2000) para bacterias sulfato reductoras, que se utilizó a lo largo del experimento, tiene las concentraciones siguientes en g/L: K₂HPO₄, 2; KH₂PO₄, 2; MgCl₂*6H₂O, 0.1; NH₄Cl, 0.1; CaCl₂, 0.1; Na₂S₂O₃*5H₂O, 5; Extracto de levadura, 0.1; Peptona de caseína, 5; Cisteína, 0.5; Resazurina, 0.001.

El medio de cultivo anóxico fue envasado bajo flujo de nitrógeno en botellas serológicas con tapón de caucho y sello de aluminio (Figura 10), seguido de esterilización durante 20 min a temperatura de 120°C (Figura 11). El agente reductor, sulfuro de sodio nona hidratado (Na₂S*9H₂O), se agregó 5% (v/v) en

solución madre al 2% de concentración previamente esterilizada. Y se adiciona al medio de cultivo antes de la inoculación.



Figura 10: Envasado de medio de cultivo Figura 11: Proceso de esterilización

4.4 Solución madre de materiales no termosensibles

La solución madre se preparan bajo flujo de nitrógeno con agua libre de oxígeno y luego fueron envasadas en botellas serológicas y esterilizadas durante 20 minutos a temperatura de 120°C.

Los reactivos que se prepararon fueron los siguientes: $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, NO_3^- , NO_2^- , $\text{SO}_4^{=}$, SO_3^{2-} , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, HCl , Na_2CO_3 .

4.5 Manejo de muestras

Las muestras fueron manejadas con las jeringas esterilizadas y bajo flujo de nitrógeno. Todo el manejo de las muestras se realizó en ambiente estéril desinfectado con alcohol etílico al 70% y flama.

4.6 Purificación y aislamiento

4.6.1 Enriquecimiento

Cuatro enriquecimientos sucesivos se realizaron a partir de las muestras seleccionadas. Los enriquecimientos se hicieron con el inóculo 10% (v/v) se llevaron a cabo aproximadamente cada mes. La cantidad de H_2S se determinó cada día para determinar el momento de realizar la siguiente reinoculación.

Se inocularon diez botellas serológicas de la muestra seleccionada (Figura 12), con lodo colectado al 10% (v/v), del suelo inundado en un cultivo de arroz. Las botellas inoculadas se etiquetaron con los números del uno al diez de la muestra seleccionada (Jojutla 1). Y se conservaron en la estufa a temperatura constante de 56.7 °C (Figura 13), durante tres semanas.

Las reinoculaciones fueron realizadas a partir de los diferentes enriquecimientos. Cada día se midió la cantidad de sulfuro de hidrógeno (H_2S) y las botellas serológicas con mayor cantidad de H_2S fueron seleccionadas para el aislamiento. De las diez botellas se tomo las botellas cinco y siete.



Figura 12: Botellas Inoculadas



Figura 13: Conservación de muestras

Paralelamente se realizaron observaciones al microscopio (Axiostas Plus), en contraste de fases a 100x. La muestra se centrifugó a 10000 rpm durante un minuto y se fijaron a la porta objetos con grenetina para su respectiva observación de las bacterias sulfato reductoras. Todas las observaciones fueron realizadas después de realizar los enriquecimientos.

4.6.2 Aislamiento

Para el aislamiento se aplicó la técnica de tubo rodado (Hungate, 1969), en el medio de cultivo anóxico antes mencionado, adicionado con agar noble Difco a una concentración de 16 g/L. Se envasaron 5 mL de medio de cultivo bajo atmósfera de gas nitrógeno en tubos de ensaye (Figura 14).



Figura 14: Tubos de ensaye con medio de cultivo sólido

A partir del último enriquecimiento se realizó la inoculación en medio sólido en series de diluciones decimales hasta 1×10^{-10} por cada botella seleccionada (Jujutla 1, botellas número cinco y siete). Del último enriquecimiento se prepararon 10 diluciones por cada botella seleccionada. La inoculación se realizó al 10% (v/v) con 0.5 mL de inóculo. Los tubos inoculados se rodaron por

un capa de hielo hasta formar una capa uniforme en su contenido, por último se incubaron en la estufa a 56.7 °C durante las 48 horas.

Las colonias seleccionadas fueron tomadas en condiciones anaerobias y reinoculadas en diluciones sucesivas en medio sólido hasta obtener las cepas puras.

4.6.3 Purificación

Las colonias seleccionadas se transfirieron a tubos con medio de cultivo anóxico líquido haciendo disoluciones en cascada 1×10^{-10} por cada cepa. Incubándose durante 24 horas a temperatura de 56.7 °C.

A partir del último tubo con crecimiento bacteriano se inocularon botellas serológicas con medio de cultivo anóxico estéril. Por la cepa pura se inocularon tres botellas y se dejaron en la estufa a temperatura de 56.7 °C. Para las pruebas posteriores se utilizaron las tres últimas.

Se realizaron varias observaciones al microscopio “Axiostas Plus” a 100X en contraste de fase de cada una de las cepas, para revisar las características de cepas, como movilidad, pureza, número de bacterias y morfología.

4.7 Extracción de ADN, PCR y secuenciación del gen 16S rRNA

La cepa 1 se colocó en 2.5 µL de reactivo Lyse and Go PCR (Thermo Scientific Inc). La suspensión se calentó a 95 °C durante cinco min y centrifugada a 10 000 rpm. Se realizó una dilución del DNA en agua (1:2), posteriormente se tomo 5 µL, al cual se le agrego la mezcla para la amplificación PCR, la cual contenía los reactivos con las siguientes concentraciones: d-NTP, 22 µL; Primer Revers 22 µL; Primer Forward, 22 µL; buffer, 55 µL; Mg Cl₂, 22 µL; Taq polimerasa, 4.4 µL y agua, 100.1 µL; para obtener un volumen final de 247.5 µL.

La reacción de PCR se llevó a cabo durante 31 ciclos a temperatura de 95 °C por dos min, 57 °C por 1 min y 72 °C durante 1 min.

Los productos de la amplificación fueron analizados en un gel de agarosa al 1% por electroforesis.

Los resultados de PCR fueron secuenciados usando los primers 18-MER reverse (5'-GACGGGCGGTGTGTACAA-3') y 17-MER forward (5'-TGCCAGCAGCCGCGGTA-3').

La secuenciación se llevó a cabo usando el kit de secuenciación Big Dye Terminator de Applied BioSystems (USA), los productos de secuenciación se resolvieron en un sistema de secuenciación automatizado el modelo del equipo fue 3730XL de Applied BioSystems (USA).

Las secuenciaciones obtenidas fueron editadas con BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999), y fueron comparadas con la base de datos del Genbank usando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997).

4.8 Pruebas fisiológicas

Los parámetros de velocidad máxima de crecimiento en función a la temperatura, concentración de NaCl y pH se determinaron por medición de la densidad óptica a 580 nm en un espectrofotómetro HACH DR/4000 U. Para la cepa 1 se inocularon tres tubos.

La medición se inicio ocho horas después de la inoculación, cuando el crecimiento bacteriano empieza, y se continuó midiendo cada hora durante diez horas consecutivas.

En el análisis de los resultados se usó la fórmula descrita por Pirt (1975), citado por McKay *et al.*, 1997, para obtener la velocidad máxima de crecimiento bacteriano (V_{max}):

$$V_{max} = \frac{\ln(D_1/D_2)}{T_1 - T_2}$$

Donde:

D_1 y D_2 = Es la densidad óptica inicial y final, respectivamente a 580 nm.

T_1 y T_2 = Es el tiempo inicial y final en horas en que se da el crecimiento bacteriano.

4.8.1 Efecto de la temperatura en el crecimiento bacteriano

La cepa se puso a incubar en distintas temperaturas: 25, 35, 45, 55, 65 y 75 °C y así se determinó el crecimiento de la cepa para esas temperaturas.

4.8.2 Efecto del pH en el crecimiento bacteriano

Al medio de cultivo líquido esterilizado se le agregaron alícuotas de HCl 0.5 N y Na_2CO_3 0.5 N para acidificarlo o alcalinizarlo. Se midió el crecimiento bacteriano a pH de: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

4.8.3 Efecto de la presión osmótica en el crecimiento bacteriano

Al momento de la preparación del medio de cultivo se le añadieron las siguientes concentraciones de NaCl: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 g/L y se procedió a determinar el crecimiento de la cepa.

4.9 Sustratos

Se probaron diferentes tipos de azúcares, ácidos carboxílicos y alcoholes. Para ello se usaron las galerías API (Biomerux) 50 CH y 20 A.

Las galerías API son un sistema estandarizado que permite la identificación de microorganismos que pertenecen a diferentes grupos. La galería API 50 CH está compuesta por cincuenta ensayos bioquímicos destinados al estudio del metabolismo de los carbohidratos y algunos derivados (heterosidos, polialcoholes y ácidos urónicos). Durante la incubación, la fermentación se traduce en un cambio de color. De la misma forma, la galería API 20 A se usa para identificar bacterias Gram positivas anaerobias, pertenecientes a las Entereobacteriaceae, incluye 20 test bioquímicos. Algunos de los azúcares que se probaron fueron glucosa, almidón, galactosa, arabinosa, manitol, xilosa, maltosa, ribosa, fructosa.

4.9.1 Aceptores de electrones

Se probaron seis aceptores de electrones: NO_3^- , NO_2^- , SO_3^- , SO_4^- , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ y S° a una concentración de 1M. Los aceptores de electrones se pusieron en solución a excepción del S° , el cual se aplicó directamente a cada tubo. La concentración final de cada tubo fue de 20 mM.

4.10 Características morfológicas

4.10.1 Tolerancia al oxígeno

Para comprobar si la cepa era tolerante al oxígeno (O_2), se prepararon tubos con medio de cultivo mineral sin resazurina ni cisteína. Después de veinte cuatro horas de la inoculación se revisaron los tubos y aquellos que tenían crecimiento bacteriano se consideraron como tolerantes al oxígeno.

4.10.2 Esporulaci3n

Al final de la fase de crecimiento cada cultivo se sometió a temperatura de 94 °C durante cinco minutos y posteriormente se reinoculó en medio líquido an3xico y luego se conservó durante veinti cuatro horas a una temperatura de 56.7 °C. La presencia de crecimiento bacteriano por turbidez en el tubo de cultivo indic3 espurulaci3n. Los cultivos que presentaron espurulaci3n fueron observados al microscopio en contraste de fases a 100X, para determinar la morfologí de sus esporas.

4.10.3 Tinci3n de Gram

La tinci3n de Gram se realiz3 en el laboratorio Interacci3n Molecular Planta-microorganismo del Colegio de Posgraduados. Esta prueba fue descrita por Christian Gram en 1883, y consiste en realizar un frotis del cultivo en cuesti3n y aplicarle cristal violeta al 1%, seguido de lugol al 1.5% alcohol-acetona en proporciones iguales y al ú ltimo safranina al 0.5 %. Despu3s de que cada reactivo se pone sobre el frotis se espera un minuto aproximadamente y finalmente se enjuaga con agua (Delaat, 1983). Las muestras se observaron bajo un microscopio (Axiotas Plus) a 100X.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Muestras de lodo

Se colectaron cuatro muestras de lodo de suelos inundados con cultivo de arroz de la misma zona pero de diferentes puntos (Figura 15), estas muestras se mantuvieron en un refrigerador a temperatura de 25 °C, durante todo el experimento, y fueron etiquetadas con letras y números desde: J1 hasta la J4. El pH del lugar de muestreo fue de 6.5 y la temperatura promedio en la zona de 27 °C.



Figura 15: Muestras colectadas

5.2 Enriquecimiento

5.2.1 Selección de muestras

De las cuatro muestras colectadas se les determinó la cantidad de sulfato existente en cada una de las muestras, obteniendo los resultados que se observan en el Cuadro 4. Una vez obtenido los resultados de las cuatro muestras, para el enriquecimiento se seleccionó la muestra con mayor contenido de sulfato.

Cuadro 4: Contenido de sulfatos de las cuatro muestras colectadas

Muestra	Cantidad (mg/L)
J1	80.04
J2	56.12
J3	50.31
J4	53.84

La muestra que presentaba la mayor cantidad de sulfato fue la J1, (Figura 16). Para el primer enriquecimiento, de la muestra J1 se inocularon diez botellas serológicas con medio de cultivo anóxico.



Figura 16: Muestra colectada del suelo inundado

Cada día, durante nueve días, se midió la cantidad de sulfuro de hidrógeno (H_2S) producido a las diez botellas inoculadas de la muestra J1, obteniendo los siguientes resultados (Figura 17): Botellas de la muestra Jujutla uno (J1).

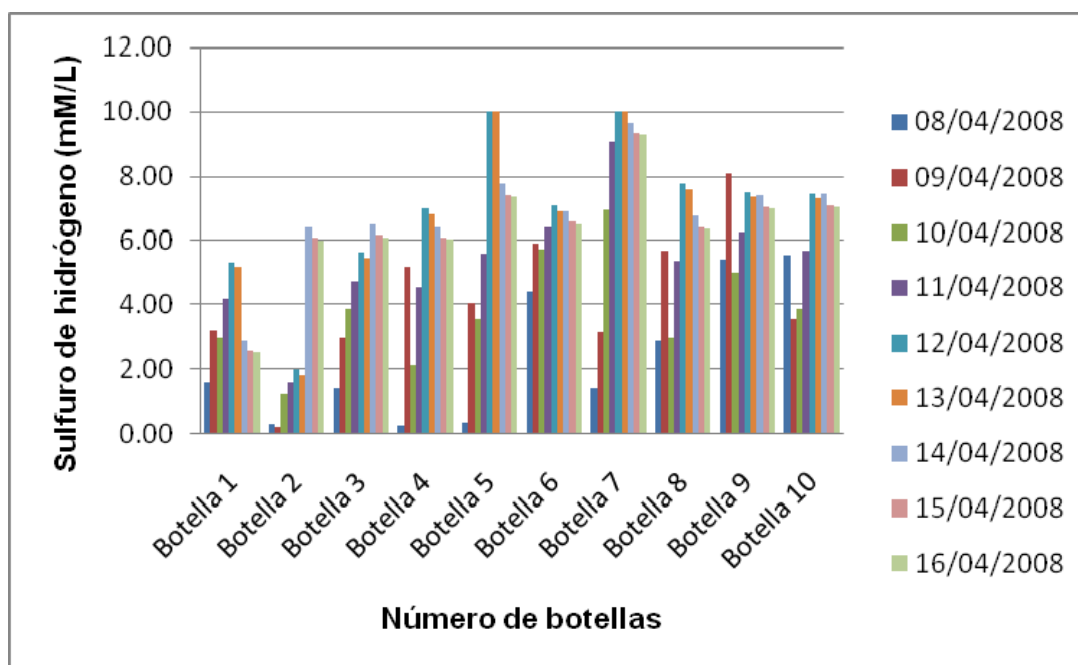


Figura 17: Gráfica de producción de sulfuro de hidrógeno (Botellas de la muestra J1)

En la (Figura 17) se observa la mayor producción de sulfuro de hidrogeno en las botellas cinco y siete, entonces se seleccionaron las dos botellas y a partir de esas dos botellas clasificadas se procedieron las consiguientes reinoculaciones. Las reinoculaciones se hicieron cada diez o quince días hasta llegar a obtener la cepa pura.

5.2.2 Observaciones al microscopio

Después de cada enriquecimiento se realizaron observaciones al microscopio, y se encontraron diferentes tipos de bacterias, por ejemplo bacilos y cocos, la mayoría de las bacterias observadas fueron bacilos que no se agrupan (Figura 18). Según la observación de ambas botellas contenían las mismas características de las bacterias.



Figura 18: Bacilos observados al microscopio 100X en contraste de fase

5.2.3 Aislamiento

En el primer aislamiento se encontraron dos colonias de color blanco y circulares. La mayoría de las colonias aisladas aparecieron a las 24 horas después de la inoculación a partir de la dilución 1×10^{-10} .

5.2.4 Purificación

Se seleccionaron aquellas cepas que fueran diferentes. Se consideró que una cepa estaba pura, cuando en las diez diluciones en el medio sólido se encontró el mismo tipo de colonias y al hacer la observación al microscopio se presentó un solo morfo tipo.

La reinoculación en medio líquido se realizó cuando se cumplieron las condiciones anteriores para evitar una contaminación de las cepas. Se purifico una sola cepa, la cual fue etiquetada con una clave proveniente de la botella serológica de la que se había tomado el inóculo y anexado el número de disolución de la que provenía la cepa hasta que quedo pura, para hacer más sencillo su identificación se le asignó un número (Cepa 1).

5.2.5 Caracterización preliminar

En el Cuadro 7 se muestran las características macroscópicas más destacadas de la cepa purificada.

Cuadro 5: Características morfológicas de la cepa pura

Clave	Número de cepa	Características de la colonia	Morfología (microscopio óptico a 100X)
J1B7J4T8P1	1	Blanca, de forma circular Aprox. < 0.5 mm de diámetro a 48 h	Bacilos largos

Nota: la clave salió de las reinoculaciones sucesivas de donde se obtuvo la cepa pura.

Fardeau *et al.* (2000), reportan que colonias bacterianas de 3 mm de diámetro de un yacimiento de agua, al hacer la observación al microscopio encontraron bacilos de entre 2 y 8 μm parecidos, a los encontrados en esta investigación.

Kim *et al.* (2001), aislaron una bacteria de un arroyo geotermal caliente de la Isla de Java, la cual, presenta características similares a las encontradas en aislamiento, se reporta que la forma de las colonias es circular con un diámetro aproximado de 1 a 2 mm. Son bacilos rígidos de 1 a 3 μm .de largo.

En los ejemplos anteriores las bacterias aisladas pertenecieron a los géneros *Clostridium* y *Thermoanaerobacter*. En todos los casos se observan bacilos que forman colonias circulares, parecidas a las encontradas en esta investigación.

5.3 Extracción, PCR y secuenciación

A partir del producto PCR de la cepa 1, se secuenciaron aproximadamente 801 bases del gen 16S RNAr:

```
GCCTCCGCACGTCACGGGGGCTAGTGACGCTTCCATCCTATATTGACTTTG
CCGCCGAGCTCCAGTCCGGGCGGGCGACTACGCCCTACGTTCTACCGCG
TCTGCTGCCAAAGCCATATTCCGGCAGTCGTGAAGGTGTCGTCGAATAATA
GAACCCTCTTACCCTTGACCCCTGGCTTGGCTGTGAAGAGGTCTGTGCGATA
TTGTACCGCGGCTGCTGGCAAGGGGGCTGTGGGGTTAGGCTTGGTGCGG
TAGCTGTCACCATATCACTACCCAACTGAAGACGACCATGCTGCTGTATC
TGTCTTCCGTTTCCCGAAGGCAAAAATTCTCTGTGAAACTTACATGGAAG
CATGAGTAGGGATGTTCTTGTTCTTTCCATTTAATTAACCCAATCCACCCCC
TGCTTGGGTCGCCCCCATTCCTTTTTTTTATTTTTTACCTAGCGTCCTCCC
CCCCCGGCCGAGTTCATTAAGTTGCGTTACGAAGGCACAACCTCAAAGG
ACAACGATCCCAATTCACATAGTTTACGGTAACTACCAGGGAATCTAATCCT
GTTTGCTCCCCACNCTTTCGCCTTCACGTTTATCTTCGGCCAGCGGGCCCC
TTCCGCCATGNTTCCTTCTATATCTAGAAATGCACCGCTACACAGGAATTCA
CCTCTCCTCATCCACACTCAAGATTGCTAATCCATCCGGACAGGGCAGAGA
TTTCATCTTTACTACAAAACGCCTGCCGCGCCTTACAGCCATTAATATGCTC
CCTCCTACGCGGGAGGCAAA
```

Al comparar la secuencia de ácidos nucleídos de la cepa 1 con las secuencias existentes en el Genbank se encontró que la secuencia más próxima tiene un 87% de similitud con *Clostridium scindens*. En el Cuadro 6 se muestra la clasificación taxonómica de la cepa 1.

Cuadro 6: Clasificación taxonómica de la cepa 1

Dominio	Bacteria
Phylum	<i>Firmicutes</i>
Clase	Clostridia
Orden	Clostridiales
Familia	Clostridiaceae
Género	<i>Clostridium</i>
Especie	<i>Clostridium scindens</i>

5.4 Efecto de la temperatura en el crecimiento de la Cepa 1

La cepa 1 tuvo una temperatura óptima de crecimiento de 50 °C, aunque creció en un intervalo de 40 a 55 °C. Entre 35 y 45 °C presentó su velocidad de crecimiento mayor. A partir de 45 °C el crecimiento bacteriano se estabilizó.

Dado este comportamiento, puede ser considerada como moderadamente termófila (Figura 19).

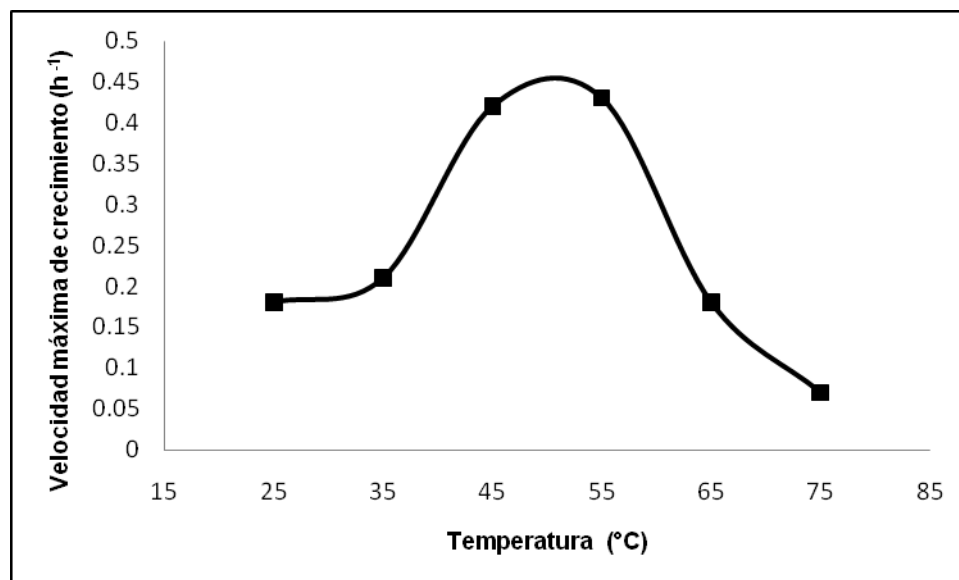


Figura 19: Temperatura, respuesta de la cepa 1

Según Brock (2004), la máxima descomposición de materia orgánica ocurre a entre los 48 y 59°C. Esto se debe a que muchos microorganismos y procesos que ocurren en ambientes calientes e inundados se adaptan a las temperaturas que hay a lo largo de la gradiente térmica.

Reysenbach *et al.*, (2002), reporta que la degradación anaerobia de la materia orgánica es un proceso complejo que requiere la temperatura de 49°C y la interacción de diferentes grupos de microorganismos. Cada grupo microbiano funciona en la cadena alimenticia donde el producto metabólico final de un grupo es el sustrato de otro hasta que la oxidación sea completa.

Según Brock (2004), para que las bacterias de ambientes termofílicos alcancen su máxima velocidad de crecimiento, es necesario que no exista competencia entre ellos por los diferentes nutrientes ya que si hay escasez de algunos nutrientes entonces entran en fase estacionaria antes de alcanzar su máximo crecimiento.

Zavarzina *et al.*, (2000), aislaron *Thermoanaerovibrio velox*, de un géiser en Rusia, la cual presentó un comportamiento similar al de la cepa identificada en este trabajo de investigación. , *T. velox* está considerada como moderadamente termófila pues creció en un intervalo de temperatura de 40 a 65 °C, con un crecimiento óptimo a 60 °C. Las BSR esporoformadoras Gram positivas están dentro de las bacterias Gram positivas con bajo contenido de Guanina-Citosina GC, que son generalmente mesofílicas o moderadamente termofílicas con la capacidad de formar esporas como *Bacillus* y *Clostridium*. A este grupo pertenecen los géneros *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus* y *Thermoacetogenium* (Castro *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2003).

5.5 Efecto del pH en el crecimiento de la cepa 1

El pH afecta la estructura y la actividad de las macromoléculas biológicas dentro de la célula. Al cambiar el pH interno de las células, las macromoléculas se desnaturalizan y el organismo muere. El intervalo de pH al cual crece la bacteria está determinado por la tolerancia de su membrana citoplásmica a la acidez o alcalinidad del ambiente. De la misma manera, si un organismo no se encuentra en su intervalo óptimo de crecimiento la membrana se rompe y las células se lisan. Las BSR crecen mejor sobre las condiciones poco alcalinas, el pH es restringido (pH 7.0 - 7.8) y la tolerancia de los valores oscila entre 5.5 a 9.0. Sin embargo, la reducción desasimilatoria de sulfato ha sido observada en ambientes altamente ácidos, como drenajes mineros y en humedales (Barton, 1995).

El pH inicial del medio de cultivo fue de 6.68 y se utilizaron diferentes cantidades de solución de HCl, 0.5 N para acidificar y Na₂CO₃, 0.5 N para alcalinizar el medio de cultivo (Cuadro 7).

Cuadro 7: Cantidad de solución madre para acidificar o alcalinizar el medio de cultivo

pH	HCL, 0.5 N (mL)	Na ₂ CO ₃ , 0.5 N (mL)
3	0.3	0
4	0.2	0
5	0.15	0
6	0.01	0
7	0	0.3
8	0	0.5
9	0	1
10	0	1.25

De acuerdo a los datos obtenidos durante las mediciones, la cepa no creció a pH de 3, 4, 5, 9 y 10 la razón por la cual el rango de crecimiento fue de 6 a 8.

La grafica muestra que la cepa 1 obtiene su mayor crecimiento en un pH de 7 (Figura 20).

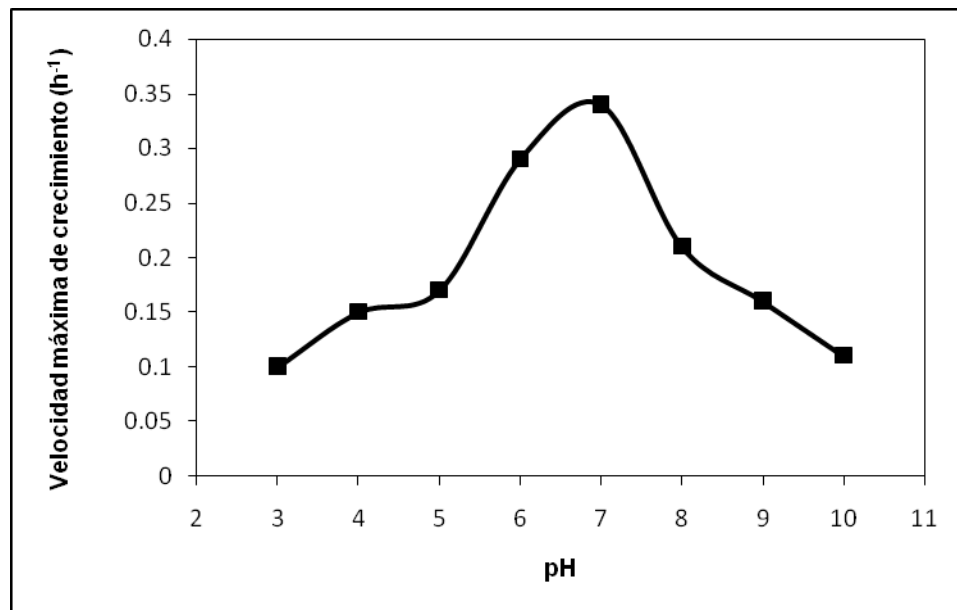


Figura 20: Crecimiento de la cepa 1 a diferentes pH's

Kim *et al.*, (2001), y sus colaboradores reportan que *Thermoanaerobacter yonseiensis* alcanza una velocidad de crecimiento óptimo a pH 6 a 6.5, Moussard *et al.*, (2004), y sus colaboradores aislaron y describieron de una fosa hidrotermal, *Thermodesulfatator indicus* que crece en un intervalo de pH de 6 a 6.7, alcanzando su velocidad máxima de crecimiento a 6.2.

Lebbetter *et al.*, (2007), y sus colaboradores aislaron y caracterizaron de un sistema hidrotermal en Alvord Basin, Oregon, bacterias metabolizadoras de arsénico, estas bacterias podían vivir en un pH de intervalo de 6 a 8, con óptimo de 7.

5.6 Efecto de NaCl en el crecimiento de la cepa 1

La cepa 1 creció por debajo de 10 g/L de NaCl y alcanzó su mejor desarrollo a una concentración de 0 g/L (Figura 21).

Las concentraciones de sal son otro factor determinante para las bacterias sulfato reductoras termofilicas, la mayoría de estas han sido aisladas de ambientes marinos con una concentración promedio de 1 a 4% de NaCl, sin embargo, estas bacterias también han sido aisladas de manantiales termales con una concentración de 0.05 a 56 g/L (Barton, 1995; Thevenieau *et al.*, 2007).

La mayoría de las BSR que han sido caracterizadas han mostrado una adaptación pobre en condiciones extremas hipersalinas, el reporte mas alto *in vitro* de crecimiento optimo para especies conocidas es de 10% de salinidad (Kjeldsen *et al.*, 2007).

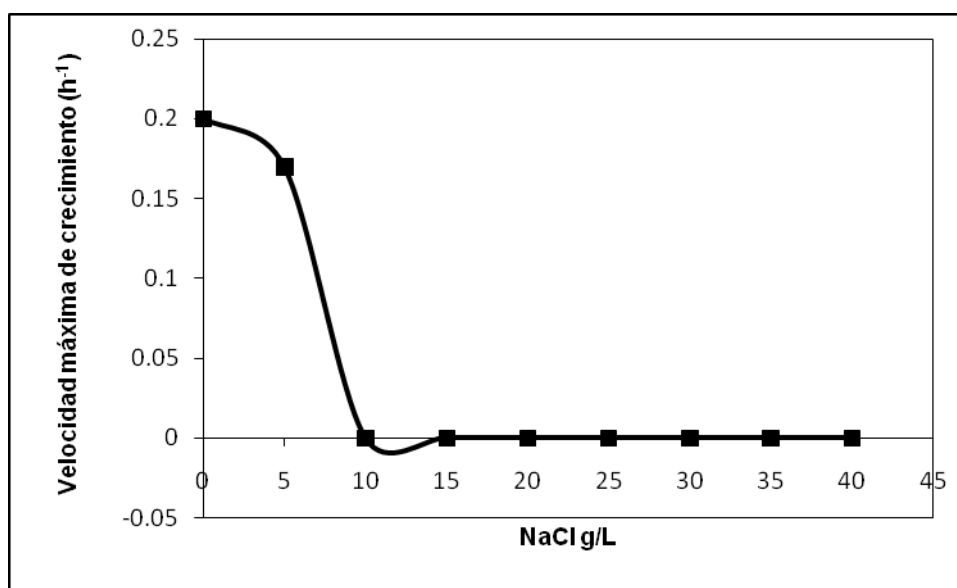


Figura 21: Respuesta de la cepa 1 a la concentración de NaCl

Fardeau *et al.*, (2000), reportaron que *Thermoanaerobacter subterraneus*, se desarrolla bien a concentraciones de 0 g/L de NaCl. También Huber *et al.*, (1998), reportaron que *Thermocrinis ruber* crece a una concentración de NaCl no mayor de 0.4%.

Los resultados encontrados con la cepa 1 concuerdan con lo encontrado , por Qatibi *et al* (1991), quienes aislaron bacterias del género *Desulfobibrio* de un reactor anaeróbico que se desarrollaron muy bien en concentraciones de sal de entre 0 a 10 g/L bajo condiciones anaeróbicas.

5.7 Sustratos

Con los resultados obtenidos mediante el uso de la galería API 50 CH, se encontró que la cepa 1, utiliza D-GLUCosa pero no el resto de los sustratos: GLICerol, ERitritol, D-ARAbinosa, L-ARAbinosa, D-RIBosa, D-XILosa, L-XILosa, D-ADONitol, D-GALactosa, D-FRUctosa, D-MamNosA, L-SorBosA, L-RHAMnosa, DULcitol, INOsitol, D-MANitol, D-SORbitol, Metil- α D-Manopiranosida, Metil- α D-Glucopiranosida, N-AcetilGlucosamina, AMIgdalina, ARButina, ESCulina, citrato férrico, SALicina, D-CELOBiosa, D-MALTosa, D-LACTosa (origen bovino), D-MELibiosa, D-SACarosa, D-TREhalosa, INULina, D-MeLeZitosa, D-RAFinosa, AlmiDón, GLIcóGeno, XiLiToI, GENTiobiosa, D-TURanosa, D-LIXosa, D-TAGatosa, D-FUCosa, L-FUCosa, D-ARabitol, L-ARabitol, GlucoNaTo potásico, 2- CetoGluconato potásico, 5- CetoGluconato potásico.

El compuesto utilizado fue evidenciado por el cambio de color en el respectivo pozo de la galería a las 48 h, como se muestra en la Figura 22.



Figura 22: Respuesta de la cepa 1 en la galería API 50 CH

Según Rabus *et al.*, (2006), la propiedad de utilizar azúcares es propia sólo en pocas especies representantes del género *Desulfovibrio* y en ausencia o presencia de sulfato se ha observado en *D. fructosovorans*. La utilización de glucosa en *Desulfotomaculum nigrificans* y *D. salexigens* también han sido reportada.

En el caso de la galería 20 A se encontró que la cepa 1 utiliza ya sea fermentando u oxidando los siguientes compuestos: gelatina, esculina, urea. En la (Figura 23), se muestra la respuesta de la cepa uno a los diferentes test de esta galería.



Figura 23: Respuesta de la cepa 1 en la galería API 20 A

Según Brisbarre *et al.*, (2003), *Clostridium caminithemale* usa fructosa, galactosa, glucosa, glicerol, maltosa, manosa y ribosa, los cuales son fermentados principalmente en acetato, butirato, propionato y crecimiento mixotrófico en $H_2:CO_2$. No utiliza arabinosa, celobiosa, lactosa, manitol, dulcitol, melibiosa, raffinosa, rhamnosa, almidón, sacarosa, xilosa, sorbitol, lactato, formato, acetato y propionato.

Cook *et al.*, (1996) *Thermoanaerobacter wiegelii*, esta utiliza diferentes tipos de mono, di y polisacáridos, incluyendo: xilosa, lactosa, maltosa, glucosa, pectina, almidón, glicerol, sacarosa, celobiosa, manosa, raffinosa, fructosa, glucosamina, galactosa.

5.8 Aceptores de electrones

Los aceptores de electrones con los que presentó buen crecimiento bacteriano fueron: azufre elemental (S^0), sulfato ($SO_4^{=}$), nitrito (NO_2^-) y tiosulfato ($Na_2 S_2 O_3 \cdot 5H_2O$). Los aceptores de electrones que presentaron la mayor producción de H_2S fueron: azufre elemental, nitrito y tiosulfato. En nitrato (NO_3^-) y en sulfito (SO_3^{-2}), no se presentó crecimiento bacteriano ni tampoco la producción de sulfuro de hidrógeno.

Las Figuras 24 y 25, muestran el comportamiento que tuvo la cepa 1 en los diferentes aceptores de electrones.

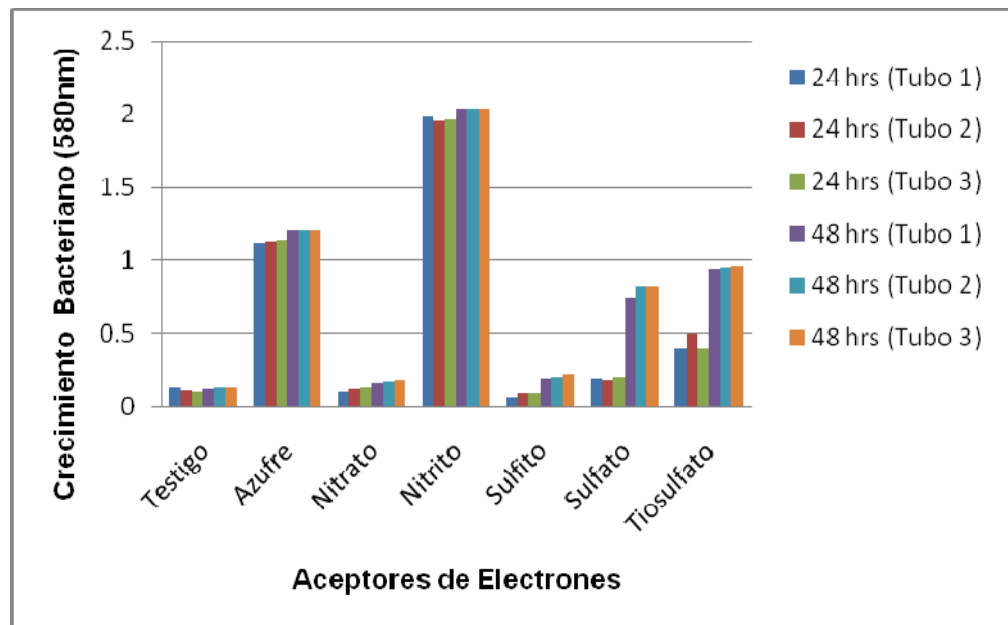


Figura 24: Respuesta de crecimiento bacteriano a diferentes aceptores de electrones

Las bacterias facultativas reductoras del azufre como las bacterias sulfato reductoras, utilizan el azufre elemental como un sustrato respiratorio en ausencia de otros posibles aceptores de electrones como el nitrato, sulfato, sulfito o tiosulfato.

Algunas cepas de los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium* usan el azufre elemental como un aceptor de electrones alternativo debido a la presencia del citocromo c3, que posee la actividad azufre reductasa (Fauque & Olliver, 2004).

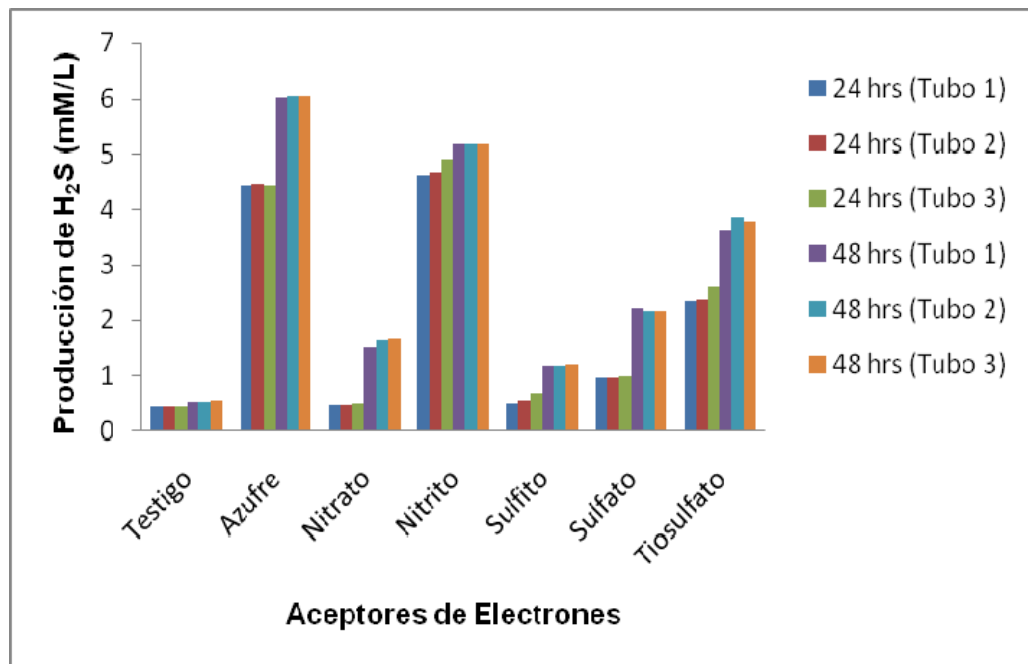


Figura 25: Respuesta de producción de H_2S a diferentes aceptores de electrones

La reducción desasimilatoria del nitrato o nitrito a aminoácido (proceso también conocido como amonificación) puede funcionar como único proceso de conservación de energía en algunas BSR (Fauque & Olliver, 2004).

Seyfried *et al.*, (2002), encontró que *Caloramator viterbensis*, esta bacteria utiliza azufre elemental, nitrato y sulfato en presencia de glicerol.

Posada *et al.*, (2004), reporta de un manantial termo mineral en Colombia, se aislaron 8 cepas de bacterias anaerobias, las cuales no utilizaron como aceptor final de electrones hierro férrico, azufre elemental y sulfato, usando solo tiosulfato.

5.9 Tolerancia al Oxígeno

La cepa 1 resultó no tolerante al oxígeno por lo que no se la clasifica como facultativa sino como anaerobia estricta.

Las bacterias sulfato reductoras han sido consideradas estrictamente anaerobias, pero se ha demostrado que algunas de ellas pueden tolerar la presencia de trazas de oxígeno molecular. Sin embargo, usualmente las BSR no crecen con el dioxígeno como un aceptor de electrones (Fauque & Olliver, 2004).

Stubner *et al.*, (2000) *Desulfotomaculum* que fue detectada y purificada de un suelo inundado en un cultivo de arroz, la cual es incapaz de crecer bajo condiciones de anaerobias.

Oude *et al.*, (1995), reporta que aisló las bacterias *Desulforhabdus amnigenus* que son bacterias sulfato reductoras anaerobias estrictas.

5.10 Esporulación

Es la capacidad de producir una forma de resistencia como es la espora, da una gran ventaja ecológica en un medio como es el suelo donde pueden variar las cifras de humedad y de temperatura entre rangos muy variables. Allí las, formas esporuladas durmientes pueden permanecer durante mucho tiempo, incluso millones de años, hasta que las condiciones sean favorables y puedan germinar de nuevo (Brock, 2004).

La cepa 1 presentó esporulación sus esporas son ovaladas, bajo las condiciones experimentales empleadas en este trabajo de investigación.

Brisbarre *et al.*, (2003), y sus colaboradores aislaron *Clostridium caminithemale* sp. la formación de esporas fue inducida en presencia de oxígeno y vitaminas, sus esporas son ovaladas.

Según (Fauque & Olliver, 2004), la bacterias del género *Desulfotomaculum* son formadoras de esporas.

Bacillus y Clostridium están dentro de las bacterias sulfato reductoras esporoformadoras Gram positivas. A este grupo pertenecen los géneros *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus* y *Thermoacetogenium* (Castro *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2003).

Plugge *et al.*, (2000), reporta que las especies del genero *Clostridium* se agrupan dentro de las Gram positivas, anaerobias y formadoras de esporas.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES

- De los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo de investigación se concluye que en el suelo inundado en un cultivo de arroz existen bacterias sulfato reductoras de la que se aisló y se purificó una cepa.
- La secuenciación parcial del gen 16S rRNA de la cepa aislada correspondió a *Clostridium scindens*, con 87 % de similitud.
- Este trabajo de investigación permite aumentar el conocimiento de la diversidad microbiana de las bacterias sulfato reductoras en los suelos inundados con agua de riego en un cultivo de arroz.
- Se determinaron los parámetros óptimos de crecimiento y se obtuvo como resultado que la cepa uno crece óptimamente a condiciones de 55°C de temperatura, 0 g/L de NaCl y un valor de PH de 7. Es decir que la cepa uno es moderadamente termófila y requiere de valores de pH cercanos a neutro para su crecimiento óptimo. Además es capaz de usar como aceptores de electrones a S^0 , SO_4^{2-} , $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ y también NO_2^- .

6.2 RECOMENDACIONES

- Realizar la secuenciación completa del gen 16S rRNA y la cuantificación del porcentaje de Guanina y Citosina para complementar la información.
- Realizar en el estudio morfológico con microscopio electrónico con el fin de identificar estructuras celulares más a detalle.
- Ampliar el estudio a otras zonas de México con características similares al del suelo inundado con condiciones anaerobias, para encontrar otras especies de bacterias sulfato reductoras.
- Evaluar en futuros estudios las posibles aplicaciones y usos en biotecnología.

ANEXOS

ANEXO 1

La curva tipo o estándar se cálculo de la siguiente manera para determinar la cantidad de sulfuros en mM/L.

Fórmula

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

C1= Concentración 1 en (mM/L)

C2= Concentración 2 en (mM/L)

V1= Volumen 1 en (mL)

V1= Volumen 2 en (mL)

Datos

C2=50 mM/L de Na₂ S*9H₂O

C1= de 0 a 20 Mm/L

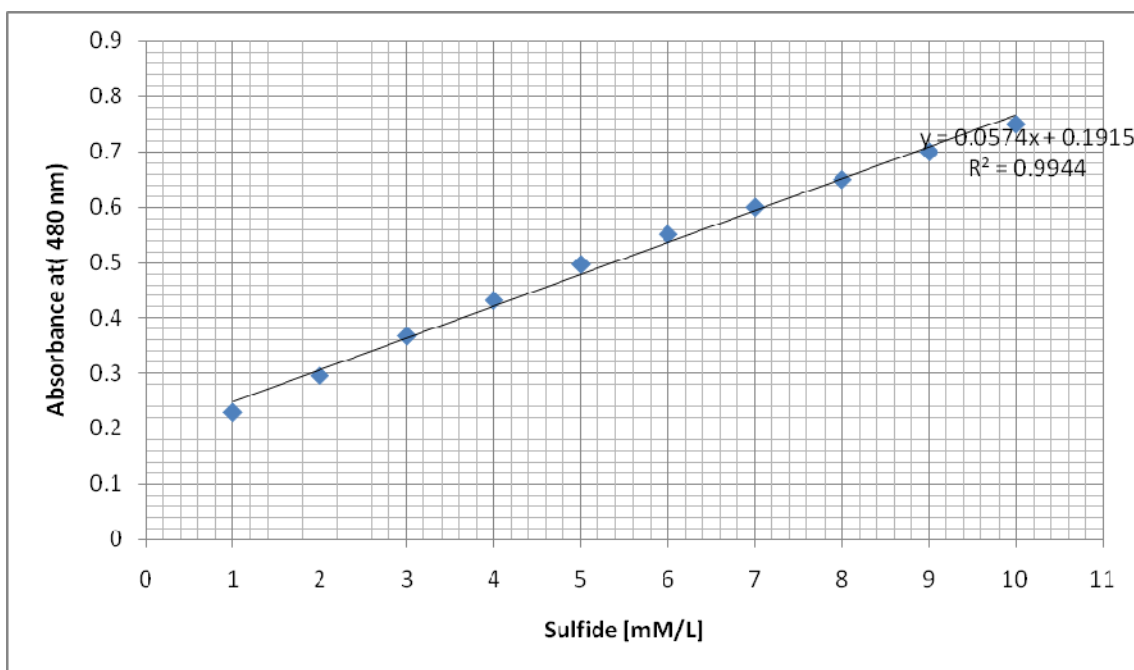
V1=10 ml de H₂O destilada

C1 (mM/L)	V1 (mL)	C2 (mM/L)	V2 (mL)	Volumen real (mL)	Agua destilada (mL)	Solución madre de Na ₂ S*9H ₂ O (mL)
0	10	50	0	10	5	0
1	10	50	0.2	9.8	4.9	0.1
2	10	50	0.4	9.6	4.8	0.2
3	10	50	0.6	9.4	4.7	0.3
4	10	50	0.8	9.2	4.6	0.4
5	10	50	1	9	4.5	0.5
6	10	50	1.2	8.8	4.4	0.6
7	10	50	1.4	8.6	4.3	0.7
8	10	50	1.6	8.4	4.2	0.8
9	10	50	1.8	8.2	4.1	0.9
10	10	50	2	8	4	1
11	10	50	2.2	7.8	3.9	1.1
12	10	50	2.4	7.6	3.8	1.2
13	10	50	2.6	7.4	3.7	1.3
14	10	50	2.8	7.2	3.6	1.4
15	10	50	3	7	3.5	1.5
16	10	50	3.2	6.8	3.4	1.6
17	10	50	3.4	6.6	3.3	1.7
18	10	50	3.6	6.4	3.2	1.8
19	10	50	3.8	6.2	3.1	1.9
20	10	50	4	6	3	2

Datos para graficar la curva tipo o estándar:

Concentración de H ₂ S (mM/L)	Absorbancia (480 nm)
1	0.23
2	0.296
3	0.368
4	0.432
5	0.497
6	0.551
7	0.6
8	0.65
9	0.7
10	0.75

GRÁFICA DE LA CURVA TIPO O ESTÁNDAR



LITERATURA CITADA

Altschul, S.F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) and PSI- BLAST: a new generation of protein data base search programs. *Nucleic Acids Resources*. 25: 389-3402.

Audiffren, C; Cayol, J.L; Joulain, C; Casalot, L; Thomas, P; Garcia, J. L; Olliver, B. (2003) *Desulfonauticus submarinus* gen. nov., sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Microbiol.* 53: 1585-1590.

Baena, S., M. L. Fardeau, M Labat, B. Olliver, J.I. Garcia, and B.K.C. Patel. (1998) *Desulfovibrio aminophilus* sp. nov., novel amino acid egrading and sulfate reducing bacterium from anaerobic wastewater lagoon. *Syst. Appl. Microbiol.* 21:498-504.

Barton, L. Larry; (1995) *Sulfate-Reducing Bacteria*. *Biotechnology Handbook*. New York.

Barton, L. Larry; (1995) *Sulfate-Reducing Bacteria*. *Biotechnology Handbook*. New York.

Barton, L. Larry; (1995) *Sulfate-Reducing Bacteria*. *Biotechnology Handbook*. New York.

Barton, L. Larry;(1995) Sulfate-Reducing Bacteria. Biotechnology Handbook. New York.

Belyakova, E. V; Rozanova, E.P; Borzenkov, I.A; Tourova, T.P; Pusheva, M.A; Lysenko, A. M; Kolganova, T.V. (2007). The new facultatively chemolithoautrophic, moderately halophilic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovermiculus halophilus* gen. nov., sp. nov., isolated from oil field. *Microbiology*. 75:161-171.

Brisbarre, N., Fardeau, M. L., Cueff, V., Cayol, J.L., Barbier, G., Cilia, V., Ravot, G., Thomas, P., Garcia, J.L. Olliver, B. 2003. *Clostridium caminithemale* sp. nov., a slightly halophilic and moderately thermophilic bacterium isolated from an Atlantic deep-sea hydrothermal chimney. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53:1043-1049.

Brock, Biología de los Microorganismos (decima edición), Pearson educación, S.A., Madrid, 2004, 1096 p.

Burgess, A; Wagner, I; Wiegel, J. (2007) Thermal Environments and Biodiversity. *Physiology and Biochemistry of Extremophiles*. 2:13-29.

Campbell, N.A. 1996. Biology. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. Menlo Park, California, USA. 1026p.

Castro, F.H; Williams, N.H; Ogram, A; (2000) Phylogeny of sulphate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol.Ecol.* 31:1-9.

Cook, G.M; Rainey, F.A; Patel, B.K.C; Morgan, H.W. (1996) Characterization of a new obligately anaerobic thermophile, *Thermoanaerobacter wiegelsii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:123-127.

Cord-Ruwisch, R. 1985. A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiology*. 4: 33-36.

Cravo-Laureau, C; Labat, C; Joulain, C; Matheron, R; Hirschler-Rea, A. (2007). *Desulfatiferula olefinivorans* gen. nov., sp. nov., a long-chain n-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2699-2702.

Daumas, S; Cord-Ruwisch, R; Garcia, J.L. (1990) *Desulfotomaculum geothermicum* sp. Nov., a thermophilic, fatty acid-degrading, sulphate-reducing bacterium isolated with H₂ from geothermal ground water. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40:105-106.

Davidova, I.A; Duncan, K.E; Choi, O.K; Suflita, J.M. (2006). *Desulfoglaeba alkanexesdens* gen. nov., sp. nov., an n-alkane-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:2737-2742.

Davis, B. D., Dulbecco, R. 1973. *Microbiology*. Harper International Edition. Maryland, Estados Unidos.

Denger, K; Stackebrandt, E; Cook, A.M. (1999). *Desulfonispora thiosulfatigenes* gen. nov., sp. nov., a taurine-fermenting, thiosulfate-producing anaerobic bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* 49:1599-1603.

Devereux, R; Stahl, A. D.; (1993). *Industrial and environmental activities of sulfate-reducing bacteria*. Ed. Odom and R. Singleton, The sulfate reducing bacteria: contemporary perspectives. Springer-Verlag, New York.

Devereux, R; Stahl, A. D.; (1993). *Industrial and environmental activities of sulfate-reducing bacteria*. Ed. Odom and R. Singleton, the sulfate reducing bacteria: contemporary perspectives. Springer-Verlag, New York.

Fardeau, M.L; Magot, M; Patel, B.K.C; Thomas, P; Garcia, J.L; Olliver, B. (2000) *Thermoanaerobacter subterraneus* sp. nov., a novel thermophile isolated from oilfield water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 2141-2149.

Fauque, G. (1995). Ecology of Sulfate-Reducing bacteria. Plenum Press, New York.

Fauque, G; (1995). Ecology of Sulfate-Reducing Bacteria. Metabolic Diversity. Microbial Diversity Bioprospecting. 17:169-176.

Fauque, G; Olliver, B. (2004) Anaerobes: The Sulfate-Reducing Bacteria as an Example Metabolic Diversity. Microbial Diversity Bioprospecting. 17:169-176.

Figuerola, Y; Camero, S; Prin, J; Requíz. (2008). Evaluación de la corrosión inducida por bacteria sulfato reductora en un acero inoxidable 316L. Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales. 28(1): 60-72.

Finster, K; Liesack, W; Tindall, B.J. (1997). *Desulfospira joergensenii*, gen. nov., sp. nov., a new sulfate-reducing bacterium isolated from marine surface sediment. *Syst. Appl. Microbiol.* 20:201-208.

Finster, K; Thomsen, T.R. Ramsing, N.B. (2001). *Desulfomusa hansenii* gen. nov., sp. nov., a novel marine propionate-degrading, sulfate-reducing bacterium isolated from *Zostera marina* roots. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 51:2955-2961.

Friedrich, A.B; Antranikian, G. (1996) Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order *Thermotogales*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2875-2882.

Funk, V. A., Brooks, D. R. 1990. Phylogenetic systematic as the basis of comparative biology. Smithsonian Institution Press. Washington, D.C. 40p.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Series. 41: 95-98.

Hartzell, P; Reed, W.D; (2006) the Genus *Archaeoglobus*. Prokaryotes 3:82-100.

Hernandez-Eugenio, G., Fardeau, M.-L., Patel, B.K.C., Macarie, H., Garcia, J.-L., Olliver, B. 2000. *Desulfovibrio mexicanus* sp. Nov., a sulfate- reducing bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating cheese wasterwaters. Anaerobe. 6: 305-312.

Horner-Devine, M. C., Carney, K. M., Bohannan B. J. 2003. An ecological perspective on bacterial biodiversity. Proceedings of the national Academy of Sciences. London. 271: 113-122.

Huber & Hannig., 2006; Rainey *et al.*, 1993).Hartzell & Reed, 2006; Itoh *et al.*, 1998.

Hungate, R.E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *In*: J. N. Norris, y D. W. Ribbons Methods in Microbiology. (Eds), pp. 117-132. Academic Press, New York, USA.

INEGI. 1992. Síntesis geográfica del Estado Morelos. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México.

Isaksen, M.F; Teske, A. (1999). *Desulforhopalus vacuolatus* gen. nov., sp. nov., a new moderately psychrophilic sulfate- reducing bacterium with vacuoles isolated from a temperature estuary. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 49:935-936.

Janssen, P.H; Schuhmann, A; Bak, F; Liesack, W. (1997) Disproportionation of inorganic sulfur compounds by the sulfate-reducing bacterium *Desulfocapsa thiozymogenes* gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiol.* 166:184-192.

Jeanthon, C; L'Haridon, S; Cueff, V; Banta, A; Reysenbach, A.L; Prieur, D. (2002). *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* sp nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:765-772.

Kaksonen, A; Spring, S; Shumann, P. Kroppenstedt, R.M; Puhakka, J.A. (2007) *Desulforispora thermophila* gen. nov., sp.nov., a thermophilic, spore-forming sulfate-reducer isolated from a sulfidogenic fluidized-bed reactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:1089-1094.

Karlin, S., Brocchieri L., Campbell, A., Cyert, M. and Mrázek J. 2005. Genomic and proteomic comparisons between bacterial and archaeal genomes and related comparisons with the yeast and fly genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 102 (20): 7309-7314.

Kerstens, K; Vos, P; Gillis, M; Swings, J; Vandamme, P; Stackebrandt, E.(2006) Introduction to the Proteobacteria. *Prokaryotes* 5:3-37.

Kjeldsen, k; Loy, A; Jakobsen, T; Thomsen, T; Wagner, M; Ingvorse, K. (2007) Diversity of sulfate-reducing bacteria from an extreme hypersaline sediment, Great Salt Lake (Utah). *FEMS Microbiol. Ecol* 60:287-298.

Kim, B. C., Grote, R., Lee, D. W., Antranikian, G., and Pyun, Y.R. 2001. *Thermoanaerobacter yonseiensis* sp. nov., a novel extremely thermophilic, xylose-utilizing bacterium that grows at up to 85 °C. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 51: 1539-1548.

Knoblauch, C; Sahm, K; Jorgensen, Bo.B.(1999). Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold Arctic marine sediments: descriptions of *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen.nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., sp.nov. and *Desulfotalea artica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:1631-1643.

L'Haridon, S; Reysenbach, A. L, Tindall, B. J; Schonhert, P; Banta, A; Schumann, P; Gambacorta, A; Stanckebrandt, E; Jeanthan, C. (2006). *Desulforobacterium atlanticum* sp. nov., *Desulforobacterium pacificum* sp.nov. and *Thermodesulfovibrio guaymasensis*.

Lebbetter, R.S., Connon, S.A., Neal, A.I., Dohnalkova, A., and Magnuson, T.S. 2007. Biogenic mineral production by a novel arsenic-metabolizing thermophilic bacterium from the Alvor Basin, Oregon. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 5928-5936.

Lee, Y.J; Dashti, M; Prage, A; Rainey, F.A; Rohde, M; Whitman, W.B; Wiegel, J. (2007). *Thermoanaerobacter sulfurigignens* sp. nov. an anaerobic thermophilic bacterium that reduces 1M Thiosulfate to elemental sulfur and tolerant 90 mM sulfite. *Int. J.Syst. Evo. Microbiol.* 57:1429-1434.

López, G; Guerra, H. (2004) Aislamiento y caracterización de microorganismos reductores de Fe (III) en manantiales termominerales del municipio de Paipa, Boyacá. *Microbiología Industrial*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología, Bogotá. Pág. 63-65.

Madigan, M., Martinko, J. M., Parker, J. 2004. *Biología de los microorganismos* Editorial Pearson Prentice Hall. 1011p.

Maier, M.R., Pepper, L. I., Gerba, PC 2000. *Environmental Microbiology*. Academic Press. 780p.

Mathews, C.K; van Holke, K.E; Ahern, K.G. (2003) Bioquímica. Addison Wesley. 3ra editions. Madrid.

McKay, A.L., Peters, A.C., and Wimpenny, J.W.T. 1997. Determining specific growth rates in different regions of *Salmonella typhimurium* colonies. Letters in Applied Microbiology. 24: 74-76.

Ming So, C; Young, L. Y. (1999) Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. Appl. Environ. Microbiol. 65:2969-2976.

Mori, K; Kim, H; Kakegawa, T; Hanada, S. (2003) A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: *Thermodesulfobacteria* fam. nov., *Thermodesulfobium narugense*, gen. nov., sp. nov., a new thermophilic isolate from a hot spring. Extremophiles 7(4): 283-290.

Moussard H; Haridon, S.L; Tindall, B.J; Banta, A; Schumann, P; Stackebrandt, E; Reysenbach, A.L; Jeanthon, C. (2004) *Thermodesulfatator indicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic chemolithoautotrophic sulfate-reducing bacterium isolated from the Central Indian Ridge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54: 227-233.

Nakagawa, T; Hanada, S; Maruyama, A; Marumo, K; Urabe, T; Fukui, M. (2002). Distribution and diversity of thermophilic sulfate-reducing bacteria within a Cu-Pb-Zn mine (Toyoha, Japan). FEMS Microbiol. Ecol 41:199-209.

Oude-Elferink, S.J.W.H; Akkermans-van Vliet, W.M; Bogte, J.J; Stams, A.J.M. (1999). *Desulfobacca acetoxidans* gen. nov., sp. nov., a novel acetate-degrading sulfate reducer isolated from sulfidogenic granular sludge. Int. J. Syst. Microbiol. 49: 345-350.

Oude-Elferink, S.J.W.H; Mass, R.N; Harmsen, H.J.M; Stams, A.J.M. (1997). *Desulforhabdus amnigenus* gen. nov., sp. nov., a sulfate reducer isolated from anaerobic granular sludge. *Arch. Microbiol.* 164: 119-124.

Pikuta, E.V; Zhilina, T.N. Zavarzin, G.A; Kostrikina, N.A; Osipov, G.A; Rainey, F.A. (1998). *Desulfonatronum lacustre* gen. nov., sp. nov.; a new alkaliphilic sulfate-reducing bacterium utilizing ethanol. *Mikrobiologiya.* 67: 123-131.

Plugge, C.M; Zoetendal, E.G.; Stams, A.J. (2000) *Caloramator coolhaasii* sp. nov., a glutamate-degrading, moderately thermophilic anaerobe. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1155-1162.

Posada, Y., Pachón, L., Agudelo, A., Álvares, E., Díaz, C., Fardeau, M. L., Joulain, C., Olliver, B., Baena, S. 2004. Cuantificación, aislamiento e identificación de comunidades anaerobias amililíticas de un manantial termomineral de Paipa, Boyacá. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 6: 90-100.

Rabus, R; Nordhaus, R; Ludwig, Widdel, F.(2000) Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1444-1451.

Rees, G.N; Patel, B.K.C. (2001) *Desulforegula conservatrix* gen. nov., a longchain fatty acid-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from sediments of a freshwater lake. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1911-1916.

Reysenbach, A. L; Rising, M. (2001) Thermophiles, origin of. *Encyclopedia of Biodiversity.* 5:647-654.

Reysenbach, A.L; Gotz, D; Yernool, D. (2002) Microbial diversity of marine and terrestrial thermal springs. *Biodiversity of Microbial Life.*

Rossi, M; Ciaramella, M; Cannio, R; Pisani, F. M; Moracci, M; Bartolucci, S. (2003). Extremophiles. J. Bacteriol. 185: 3683-3689.

Sánchez-Fernández, E. 2003. Bacterias termófilas. Al límite de lo tolerable. Encuentros en la Biología. 91: 7-8.

Seyfried, M; Lyon, D; Rainey, F.A; Wiegel, J. (2002) *Caloramator viterbensis* sp. nov., a novel thermophilic, glycerol-fermenting bacterium isolated from a hot spring in Italy. Int. J. Syst. Evol. Microbiol 52:1177-1184.

Sievert, S.M; Kuever, J. (2000) *Desulfacinum hydrotermale* sp. nov. a Thermophilic, sulfate-reducing bacterium from geothermally heated sediments near Milos Island (Greece). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 1239-1246.

Stackebrandt, E; Shumann, P; Schuler, E, Hippe, H.(2003) Reclassification of *Desulfotomaculum auripigmentum* as *Desulfosporosinus auripigmenti* corrig. Comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 1439-1443.

Stubner, S., Meuser, K., 2000. Detection of *Desulfotomaculum* in an Italian rice paddy soil by 16s ribosomal nucleic acid analysis. FEMS Microbiology Ecology 34, 73-80.

Suzuki, D; Ueki, A; Amaishi, A; Ueki, K (2007) *Desulfopila aestuarii* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, rod-like, sulphate-reducing bacterium isolated from an estuarine sediment in Japan. Int J. Syst. Evol. Microbiol. 57:520-526.

Tanaka, K; Stackebrandt, E; Tohyama, S; Eguchi, T. (2000). *Desulfovirga adipica* gen. nov., sp. nov., an adipate-degrading, Gram-negative, sulfate-reducing bacterium. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:639-644.

Tee, W; Dyllal, S.M; Woods, W; Eise, D. (1996) Probable New Species of *Desulfovibrio* Isolated from a Pyogenic Liver Abscess. *Journal of Clinical Microbiology*. 34:1760-1764.

Thevenieau , F; Baena, S; Fardeu, M.L; Casalot, L; Ollivier, B; Joulian, C.(2007) Molecular Phylogenetic Exploration of Sulfate-Reducing Bacterium Diversity in a Colombia hot Spring.

Torres-Alvarado, M. R., Fernandez, F., Barriga- Sosa, I. A., Ramírez-Vives, F. 2006. Dinámica de las bacterias anaeróbicas en las fases terminales la mineralización de la materia orgánica en el sedimento de los ecosistemas Carretas-Pereyra y Chantuto-Panzacola. *Hidrobiológica*. 16: 183-196.

Valero, M.V.G; Hulschoff, P; Lettinga, G; Lens, P.N.L. (2003) Effect of NaCl on thermophilic (55°C) methanol degradation in sulfate reducing granular sludge reactors. *Water Research*. 37:2269-2280.

Verbel, J.O; Restrepo, B.J. (2002). El lado gris de la minería del oro: La contaminación con mercurio en el norte de Colombia. Universidad de Cartagena. Alpha Impresores Ltda. Cartagena, Colombia.

Vincke, E., Boon, N. and Verstraete, W. 2001. Analysis of the microbial communities on corroded concrete sewer pipes a case study. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57:776-785.

Woese, C.R. Olsen, G.J., Ibba M., Soll, D. 2000. Aminoacyl-rRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process *Microbiol. Molecular Biology Review*. 64: 202-236.

Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L.1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archea, Bacteria and Eucarya. USA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87:4576-4579.

Xin-Zhan, L; Mei, J; Prosser, Ji-Zhen, H. (2009). Abundance and community structure of sulfate reducing prokaryotes in a paddy soil of southern China under different fertilization regimes. *Int. J. Soil Biology & Biochemistry* 41:687-694.

Zavarzina, D.G., Zhilina, T.N., Tourova, T.P., Kuznetsov, B.B., Kostrikina, N. A., And Bonch-Osmolovskaya, E.A. 2000. *Thermoanaerovibrio velox* sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, organotrophic bacterium that reduces elemental sulfur, and emended description of the genus *thermoanaerovibrio*. *Int. J. of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50:1287-1295.

Zhilina, T.N; Zavarzin, G.A; Rainey, F.A; Pikuta, E.N; Osipov, G.A; kostrikina, N.A. (1997). *Desulfonatronovibrio hydrogenovorans* gen. nov., an alkaliphilic, sulfate-reducing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol* 47(1): 144-149.