



Universidad Autónoma Metropolitana

Casa abierta al tiempo

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

CBS

**CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE BACTERIAS  
REDUCTORAS DE TIOSULFATO, AISLADAS DE  
POZOS PETROLEROS**



COORDINACIÓN DE SERVICIOS  
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**P R E S E N T A :**

**B.E. ELIZABETH MIRANDA TELLO**

MÉXICO, D.F.

JULIO 2001



Casa abierta al tiempo

# UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

## SOLICITUD DE REGISTRO

FECHA DE SOLICITUD  
18-07-01

NOMBRE COMPLETO <b>ELIZABETH MIRANDA TELLO</b>		MATRICULA <b>99180951</b>
---	--	------------------------------

UNIDAD <b>IZTAPALAPA</b>	DIVISION <b>C.B.S.</b>	TRIMESTRE	REGISTRO DE: <b>IDONEA COMUNICACION ( ) DISERTACION PUBLICA ( )</b>
-----------------------------	---------------------------	-----------	--

POSGRADO <b>DOCTORADO ( )</b>			<b>MAESTRIA (XX)</b>	<b>ESPECIALIZACION ( )</b>
----------------------------------	--	--	----------------------	----------------------------

EN: <b>BIOLOGIA EXPERIMENTAL</b>	AREA DE CONCENTRACION:
-------------------------------------	------------------------

DENOMINACION DE LA DISERTACION O IDONEA COMUNICACION DE RESULTADOS  
**"CARACTERIZACION FILOGENETICA DE BACTERIAS REDUCTORAS DE TIOSULFATO AISLADAS DE POZOS PETROLEROS".**

SINODALES: DRA. FLORINA RAMIREZ VIVES DR. PEDRO OSTOA SALOMA DR. DIDIER ALAZARD	PRESIDENTE SECRETARIO VOCAL	<b>225711</b>
--	-----------------------------------	---------------

ASESOR(ES):  
**DR. OSCAR ARMANDO MONROY HERMOSILLO**  
**DR. JULIO CESAR CARRERO SANCHEZ**

FECHA DE PRESENTACION <b>26 DE JULIO DEL 2001</b>	HORA <b>11:30 A.M.</b>	LUGAR <b>SALA DE CONSEJO DIVISIONAL DE C.B.S. /S-210</b>
--	---------------------------	---

ALUMNO  
*Elizabeth Miranda Tello*

COORDINADOR DE ESTUDIOS  
*[Signature]*

SECRETARIA ACADEMICA  
*[Signature]*

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA  
 UNIDAD IZTAPALAPA  
 Casa abierta al tiempo  
*[Signature]*

ALUMNO

COORDINACION DE SISTEMAS ESCOLARES

## *Dedicatoria*

*Dedico el presente trabajo a mis hermanos y hermanas (Juan Carlos, José Raúl, Laura, Francisco Javier, Claudia, Alejandra y Luis Gerando), a mi padre Juan Miranda, a mis hermanos políticos y a mis 20 sobrinos, por el apoyo y solidaridad recibidos en los momentos difíciles y por lo poco o mucho que hemos crecido juntos.*

*A Horacio Raúl, Marco Iván y Erich Ilich, por compartir su infancia conmigo.*

*A los compañeros de la Maestría en Biología Experimental, generación 1999-2000 (Alfonso<sup>2</sup>, Bernardo, Bertha, Cármen, Dolores, Javier, Norma, Pilar y Rocío), por los buenos tiempos que pasamos juntos.*

*A Enrique Lozano, por todo el cariño, el amor y la solidaridad en los momentos difíciles, y por aceptarme como soy.*

*Al Dr. Didier Alazard, por su valiosa ayuda para mi desarrollo profesional.*

*A los ideales, que nunca mueren y que poco a poco se harán realidad: Liberté,<sup>4</sup> Egalité,<sup>5</sup> Fraternité.<sup>6</sup>*

*Sobre todo, dedico este trabajo a la memoria de mis seres queridos, que me dejaron valiosas enseñanzas y con quienes volveré a reunirme al final de este viaje en la vida, a quienes no hace falta nombrar en un papel, cuando los nombro en mi mente todo el tiempo.*

---

*El presente trabajo fue realizado en los siguientes laboratorios:*

- *Laboratorio de microbiología anaerobia y tratamiento de aguas residuales. Departamento de Biotecnología. **Universidad Autónoma Metropolitana.***
- *Laboratorio de microscopía electrónica. Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental (CENICA). **Universidad Autónoma Metropolitana.***
- *Laboratorio de inmunología. Departamento de inmunología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. **Universidad Nacional Autónoma de México.***
- *Laboratorio de Bioprocesos. **Instituto Mexicano del Petróleo.***

*Bajo la dirección de la Dra. Florina Ramírez Vives y la asesoría del Dr. Pedro Ostoa Saloma y del Dr. Oscar Monroy Hermosillo.*

*Contó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT, a través de la beca-crédito número 137895 y del Instituto Mexicano del Petróleo a través del Fondo de investigación con Instituciones de Educación Superior (FIES-97-10-VI).*

*Recibió para su buen término, la valiosa asesoría de la M en C. Claudia Suárez<sup>\*</sup>, de la M en C. Gloria López<sup>\*</sup>, de la Dra. Guadalupe Hernández<sup>\*\*</sup>, del Dr. Didier Alazard<sup>\*\*</sup>, del Dr. Julio César Carrero<sup>†</sup>, del Dr. Pablo Damián Matsumura<sup>††</sup> y del Dr. José Sepúlveda<sup>†††</sup>.*

*\*Laboratorio de Bioprocesos del Instituto Mexicano del Petróleo. \*\* Laboratoire de Microbiologie. IRD (LMI). Université de Provence. France. †Laboratorio de Inmunología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. ††Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. ††† CENICA.*

---

En ambientes como los sedimentos marinos, las chimeneas hidrotérmicas, los geisers, los lagos termales y los pozos petroleros, coexiste una variedad de microorganismos con capacidad metabólica para habitar a elevadas temperaturas y altas concentraciones de sal. En los pozos petroleros marítimos, una vez que se van agotando las reservas, es frecuente que se inyecte agua de mar para mantener la presión adecuada de extracción. El agua de mar contiene concentraciones variables de los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{HCO}_3^-$  entre otros. En los sedimentos marinos habitan una gran cantidad de microorganismos, que llevan a cabo de manera continua el ciclo de óxido-reducción del azufre. Se tiene conocimiento de que a mayor profundidad el azufre es preferentemente reducido, mientras que en las capas más superficiales es fácilmente oxidado. En la última década varios investigadores han relacionado la presencia de ciertas bacterias anaerobias nativas de sedimentos marinos, con la corrosión causada en ductos petroleros, ya que metabólicamente reducen dos compuestos básicos; el sulfato y el tiosulfato de sodio produciendo ácido sulfhídrico, un compuesto altamente corrosivo.

En el presente trabajo se describe el aislamiento e identificación bioquímica y molecular de tres cepas de bacterias anaerobias, con capacidad para llevar a cabo la reducción del tiosulfato de sodio en presencia de peptona de caseína como fuente de carbono, e hidrógeno como fuente de energía. Las muestras de su procedencia fueron colectadas de pozos petroleros marítimos de la Zonda de Campeche en el Golfo de México. El trabajo se dividió en cuatro partes fundamentales: aislamiento, purificación, caracterización fisiológica y caracterización filogenética.

En la parte de aislamiento, se trabajaron técnicas anaerobias para bacterias mesofílicas y termofílicas, ya que si bien los pozos petroleros se clasifican dentro de los ambientes extremos, se ha reportado que una gran cantidad de microorganismos mesofílicos encuentran condiciones adecuadas para subsistir en ellos.

En la caracterización fisiológica se consideraron parámetros importantes como la tinción de Gram, temperatura, salinidad y pH óptimos de crecimiento; así como la capacidad de metabolizar diferentes fuentes de carbono y el funcionamiento óptimo con diferentes aceptores de electrones, para poder dar una primera clasificación de las bacterias aisladas.

Para la caracterización filogenética se emplearon técnicas de clonación molecular con el objetivo de descifrar la secuencia del gene 16S rDNA, con lo que se logró la ubicación de las tres cepas en géneros específicos.

Las tres cepas aisladas presentaron la característica en común de crecer con peptona de caseína como fuente de carbono e hidrógeno como fuente de energía, pero presentaron diferencias en su capacidad para crecer sobre otros substratos como: alcoholes, ácidos orgánicos, azúcares, ácidos grasos volátiles, sales de ácidos orgánicos, etc. Utilizaron el tiosulfato de sodio como aceptor de electrones reduciéndolo a  $\text{H}_2\text{S}$ . Dos de ellas además redujeron el sulfato de sodio y ninguna fue capaz de reducir el azufre elemental ni el dimetil sulfóxido. Las dos cepas que utilizan el sulfato mostraron similitudes fisiológicas y acercamiento filogenético con el género *Desulfovibrio*, y la cepa que únicamente creció en presencia de tiosulfato, con el género *Petrotoga*.

---

# Índice General

---

<i>Índice General</i> .....	I
<i>Índice de Figuras</i> .....	IV
<i>Índice de Tablas</i> .....	VI
<i>Abreviaturas</i> .....	VII
<i>Glosario</i> .....	VIII

## Capítulo 1

<b>1. INTRODUCCION</b> .....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Microbiología del petróleo .....	2
1.2.1 Los sedimentos marinos y su contacto con los pozos petroleros .....	4
1.2.2 El ciclo biogeoquímico del azufre .....	4
1.2.3 La desviación del tiosulfato .....	6
1.2.4 Clasificación de bacterias que reducen compuestos de azufre .....	7
1.3 Clasificación fisiológica .....	10
1.3.1 Técnicas desarrolladas para el estudio de anaerobios .....	10
1.3.2 Herramientas para la identificación de microorganismos .....	11
1.4 Clasificación filogenética .....	13
1.4.1 Fundamento .....	13
1.4.2 Herramientas para la clasificación de organismos vivos .....	14
1.5 Justificación .....	16
1.6 Objetivos .....	17
1.7 Hipótesis .....	17

## Capítulo 2.

<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	18
2.1 Diseño experimental .....	18
2.2 Obtención y propagación de muestras .....	19
2.2.1 Medio de propagación .....	19
2.2.2 Enriquecimientos del medio .....	20
2.3 Selección de muestras .....	21
2.3.1 Cuantificación de H <sub>2</sub> S disuelto .....	21
2.4 Aislamiento .....	22
2.4.1 Método de tubo rodado .....	22
2.4.1.1 Bacterias Mesofílicas .....	22
2.4.1.2 Bacterias Termofílicas .....	23
2.4.2 Selección de colonias .....	24
2.4.3 Evaluación de pureza .....	24

2.5	<i>Caracterización fisiológica</i> .....	25
2.5.1	<i>Tinción de Gram – Microscopía de contraste de fases</i> .....	25
2.5.2	<i>Microscopía electrónica</i> .....	26
2.5.3	<i>Temperatura óptima</i> .....	27
2.5.4	<i>Salinidad óptima</i> .....	27
2.5.5	<i>pH óptimo</i> .....	28
2.5.6	<i>Determinación de la enzima catalasa</i> .....	28
2.5.7	<i>Donadores de electrones – fuentes de carbono</i> .....	28
2.5.8	<i>Aceptores de electrones</i> .....	29
2.6	<i>Caracterización filogenética</i> .....	30
2.6.1	<i>Extracción y purificación de DNA Total</i> .....	30
2.6.2	<i>Amplificación de la subunidad ribosomal 16S (16S rDNA)</i> .....	30
2.6.3	<i>Clonación</i> .....	31
2.6.3.1	<i>Inserción al plásmido pMOSBlue</i> .....	31
2.6.3.2	<i>Transformación en células competentes y replicación del plásmido</i> .....	31
2.6.3.3	<i>Extracción del plásmido</i> .....	32
2.6.4	<i>Secuenciación</i> .....	32
2.7	<i>Manejo de datos</i> .....	33
 <b>Capítulo 3.</b>		
3	<b>RESULTADOS</b> .....	34
3.1	<i>Selección de muestras</i> .....	34
3.2	<i>Cepa MET-2</i> .....	34
3.2.1	<i>Aislamiento</i> .....	34
3.2.2	<i>Caracterización fisiológica</i> .....	37
3.2.2.1	<i>Tinción de Gram</i> .....	37
3.2.2.2	<i>Microscopía electrónica</i> .....	37
3.2.2.3	<i>Temperatura óptima</i> .....	38
3.2.2.4	<i>Salinidad óptima</i> .....	39
3.2.2.5	<i>pH óptimo</i> .....	40
3.2.2.6	<i>Determinación de la enzima catalasa</i> .....	41
3.2.2.7	<i>Donadores de electrones – fuentes de carbono</i> .....	41
3.2.2.8	<i>Aceptores de electrones</i> .....	42
3.2.3	<i>Caracterización filogenética</i> .....	43
3.2.3.1	<i>Extracción - purificación y amplificación de DNA total</i> .....	43
3.2.3.2	<i>Secuencia del 16S rDNA</i> .....	43
3.2.3.3	<i>Arbol filogenético</i> .....	47
3.3	<i>Cepa MET-12</i> .....	48
3.3.1	<i>Aislamiento</i> .....	48
3.3.2	<i>Caracterización fisiológica</i> .....	49
3.3.2.1	<i>Tinción de Gram</i> .....	49
3.3.2.2	<i>Temperatura óptima</i> .....	50
3.3.2.3	<i>Salinidad óptima</i> .....	51
3.3.2.4	<i>pH óptimo</i> .....	52
3.3.2.5	<i>Determinación de la enzima catalasa</i> .....	53

3.3.2.6	<i>Donadores de electrones – fuentes de carbono</i> .....	53
3.3.2.7	<i>Aceptores de electrones</i> .....	54
3.3.3	<i>Caracterización filogenética</i> .....	55
3.3.3.1	<i>Extracción - purificación y amplificación de DNA total</i> .....	55
3.3.3.2	<i>Secuencia del 16S rDNA</i> .....	55
3.3.3.3	<i>Arbol filogenético</i> .....	57
3.4	<i>Cepa MET-82</i> .....	58
3.4.1	<i>Aislamiento</i> .....	58
3.4.2	<i>Caracterización fisiológica</i> .....	60
3.4.2.1	<i>Tinción de Gram</i> .....	60
3.4.2.2	<i>Microscopía electrónica</i> .....	60
3.4.2.3	<i>Temperatura óptima</i> .....	61
3.4.2.4	<i>Salinidad óptima</i> .....	62
3.4.2.5	<i>pH óptimo</i> .....	63
3.4.2.6	<i>Determinación de la enzima catalasa</i> .....	64
3.4.2.7	<i>Donadores de electrones – fuentes de carbono</i> .....	64
3.4.2.8	<i>Aceptores de electrones</i> .....	65
3.4.3	<i>Caracterización filogenética</i> .....	66
3.4.3.1	<i>Extracción - purificación y amplificación de DNA total</i> .....	66
3.4.3.2	<i>Secuencia del 16S rDNA</i> .....	66
3.4.3.3	<i>Arbol filogenético</i> .....	71
 <b>Capítulo 4.</b>		
4.	<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b> .....	72
5.	<b>REFERENCIAS</b> .....	80

# Índice de Figuras

---

## Capítulo 1.

Figura 1.1 Yacimiento de petróleo en una trampa subterránea .....	2
Figura 1.2 Ciclo de óxido-reducción del azufre.....	5
Figura 1.3 Transformaciones del tiosulfato en sedimentos marinos.....	6
Figura 1.4 Géneros representativos de BRTS no sulfato reductoras .....	9
Figura 1.5 Árbol filogenético universal.....	14
Figura 1.6 Estructura del plásmido pMOSBlue .....	15

## Capítulo 2.

Figura 2.1 Diagrama de flujo del diseño experimental.....	18
Figura 2.2 Elaboración del medio de cultivo anaerobio.....	20
Figura 2.3 Curva de calibración para detección de H <sub>2</sub> S disuelto.....	21
Figura 2.4 Formación de colonias en tubo rodado, sobre agar y gelrite.....	23
Figura 2.5 Traslado de colonias a medio líquido.....	24
Figura 2.6 Microscopio óptico de contraste de fases Olympus BH-2.....	26
Figura 2.7 Representación gráfica de la velocidad de crecimiento específico .....	33

## Capítulo 3.

Figura 3.1 Cuantificación de H <sub>2</sub> S primera propagación muestra 1 .....	35
Figura 3.2 Cuantificación de H <sub>2</sub> S segunda propagación .....	35
Figura 3.3 Cuantificación de H <sub>2</sub> S tercera propagación .....	36
Figura 3.4 Microscopía electrónica, cepa MET-2.....	37
Figura 3.5 Crecimiento a diferentes temperaturas .....	38
Figura 3.6 Temperatura óptima.....	38
Figura 3.7 Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl .....	39
Figura 3.8 Salinidad óptima.....	39
Figura 3.9 Crecimiento a diferentes valores de pH .....	40
Figura 3.10 pH óptimo.....	40
Figura 3.11 Crecimiento con diferentes aceptores de electrones .....	42
Figura 3.12 Producción de H <sub>2</sub> S con diferentes aceptores de electrones .....	42
Figura 3.13 Extracción y amplificación de DNA total .....	43
Figura 3.14 Secuenciación del producto de PCR .....	44
Figura 3.15 Árbol filogenético de la cepa MET-2 .....	47
Figura 3.16 Cuantificación de H <sub>2</sub> S primera propagación muestra 12 .....	48
Figura 3.17 Cuantificación de H <sub>2</sub> S segunda propagación .....	48
Figura 3.18 Cuantificación de H <sub>2</sub> S tercera propagación .....	49
Figura 3.19 Microscopía óptica, cepa MET-12 .....	49
Figura 3.20 Crecimiento a diferentes temperaturas .....	50
Figura 3.21 Temperatura óptima.....	50
Figura 3.22 Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl .....	51
Figura 3.23 Salinidad óptima.....	51
Figura 3.24 Crecimiento a diferentes valores de pH .....	52
Figura 3.25 pH óptimo.....	52

<i>Figura 3.26</i>	<i>Crecimiento con diferentes aceptores de electrones</i>	54
<i>Figura 3.27</i>	<i>Producción de H<sub>2</sub>S con diferentes aceptores de electrones</i>	54
<i>Figura 3.28</i>	<i>Extracción y amplificación de DNA total</i>	55
<i>Figura 3.29</i>	<i>Secuenciación del producto de PCR</i>	55
<i>Figura 3.30</i>	<i>Árbol filogenético de la cepa MET-12</i>	57
<i>Figura 3.31</i>	<i>Cuantificación de H<sub>2</sub>S primera propagación muestra 82</i>	58
<i>Figura 3.32</i>	<i>Cuantificación de H<sub>2</sub>S segunda propagación</i>	58
<i>Figura 3.33</i>	<i>Cuantificación de H<sub>2</sub>S tercera propagación</i>	59
<i>Figura 3.34</i>	<i>Microscopía electrónica, cepa MET-82</i>	60
<i>Figura 3.35</i>	<i>Crecimiento a diferentes temperaturas</i>	61
<i>Figura 3.36</i>	<i>Temperatura óptima</i>	61
<i>Figura 3.37</i>	<i>Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl</i>	62
<i>Figura 3.38</i>	<i>Salinidad óptima</i>	62
<i>Figura 3.39</i>	<i>Crecimiento a diferentes valores de pH</i>	63
<i>Figura 3.40</i>	<i>pH óptimo</i>	63
<i>Figura 3.41</i>	<i>Crecimiento con diferentes aceptores de electrones</i>	65
<i>Figura 3.42</i>	<i>Producción de H<sub>2</sub>S con diferentes aceptores de electrones</i>	65
<i>Figura 3.43</i>	<i>Extracción y amplificación de DNA total</i>	66
<i>Figura 3.44</i>	<i>Secuenciación del producto de PCR</i>	67
<i>Figura 3.45</i>	<i>Árbol filogenético de la cepa MET-82</i>	71

#### **Capítulo 4.**

<i>Figura 4.1.</i>	<i>Rutas de la degradación anaerobia de materia orgánica por BRS</i>	73
--------------------	--	----

# Índice de Tablas

---

## Capítulo 1.

Tabla 1.1 Estados de oxidación del azufre y formas en las que se presenta en la naturaleza .....	5
--	---

## Capítulo 2.

Tabla 2.1 Condiciones iniciales de las muestras.....	19
Tabla 2.2 Tratamientos a los que fueron sometidas las muestras.....	20
Tabla 2.3 Fuentes de carbono utilizadas como donadores de electrones.....	29
Tabla 2.4 Programa de corrimiento para la amplificación por PCR.....	30

## Capítulo 3.

Tabla 3.1 Colonias seleccionadas para aislamiento cepa MET2 .....	36
Tabla 3.2 Crecimiento de la cepa MET-2 con diferentes fuentes de carbono .....	41
Tabla 3.3 Comparación de secuencias parciales .....	45
Tabla 3.4 Colonias seleccionadas para aislamiento cepa MET12 .....	49
Tabla 3.5 Crecimiento de la cepa MET-12 con diferentes fuentes de carbono .....	53
Tabla 3.6 Comparación de secuencias parciales .....	56
Tabla 3.7 Colonias seleccionadas para aislamiento cepa MET82 .....	59
Tabla 3.8 Crecimiento de la cepa MET-82 con sulfato y diferentes substratos .....	64
Tabla 3.9 Crecimiento de la cepa MET-82 con tiosulfato y diferentes substratos.....	64
Tabla 3.10 Comparación de secuencias parciales .....	68

## Capítulo 4.

Tabla 4.1 Comparación de características entre Petrotogales y la cepa MET-12.....	76
Tabla 4.2 Comparación de las características entre <i>D. gabonensis</i> y MET 82 .....	78
Tabla 4.3 Comparación de las características de las cepas aisladas .....	79

## Abreviaturas

---

[ ]	<i>Concentración</i>
BRS	<i>Bacterias Reductoras de Sulfato</i>
BRTS	<i>Bacterias Reductoras de Tiosulfato</i>
DNTP's	<i>Desoxinucleósidos tri-fosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)</i>
DTT	<i>Ditrioteitol</i>
E <sub>D</sub>	<i>Distancia evolutiva</i>
EDTA	<i>Acido etilen-diamino tetra-acético</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>Peróxido de Hidrógeno</i>
H <sub>2</sub> O <sub>red</sub>	<i>Agua reducida</i>
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	<i>Agua destilada</i>
IPTG	<i>Isopropil-β-d-tiogalacto piranosido</i>
mM	<i>Milimolar</i>
μ <sub>máx</sub>	<i>Velocidad de crecimiento específico</i>
NLS	<i>N-Lauril sarcosinato</i>
PCR	<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>
RNasa	<i>Ribonucleasa</i>
SDS	<i>Dodecil sulfato de sodio</i>
Tris-HCl	<i>Amortiguador Tris-acetato-EDTA</i>
TAE	<i>Tris-hidroximetil-aminometano</i>
LB	<i>Medio Luria-Bertrani</i>
X-gAL	<i>5-Bromo-4-Cloro-3-indolyl-β-D-galactosido</i>

## Glosario

---

- **Aceptor de electrones.** *Compuesto que es reducido en una reacción metabólica de óxido-reducción.*
- **Bacteria sésil.** *Bacteria que vive dentro de una biopelícula.*
- **Bacteria planctónica.** *Bacteria de vida libre, que vive en la fase acuosa y que no está asociada a una biopelícula.*
- **Biopelícula.** *Asociación de microorganismos anclados a una superficie.*
- **Cepa.** *Población celular descendiente de una única célula.*
- **Clonación molecular.** *Aislamiento e incorporación de un fragmento de DNA en un vector (fago o plásmido) donde puede ser replicado.*
- **Consortio.** *Agrupamiento espacial de células bacterianas dentro de una biopelícula, en la cual diferentes especies están fisiológicamente coordinadas unas con otras, con el fin de llevar a cabo transformaciones químicas más eficientes.*
- **Donador de electrones.** *Compuesto desde el cual derivan los electrones en una reacción metabólica de óxido-reducción, lo cual resulta en la oxidación del donador.*
- **Especie.** *En procariotas, colección de cepas estrechamente relacionadas, pero lo bastante distintas de las otras cepas como para ser reconocidas como una unidad diferente.*
- **Fase de latencia.** *Período inmediato a la ionoculación de una población y previo al crecimiento*
- **Fase estacionaria.** *Período en el que cesa el ciclo de crecimiento de una población*
- **Fase exponencial.** *Período en el que el crecimiento del número de individuos de una población es exponencial*
- **Fenotipo.** *Características observables de un organismo*
- **Fermentación.** *Conjunto de reacciones catabólicas que producen ATP, en las cuales los compuestos orgánicos sirven tanto de donadores primarios como de aceptores finales de electrones, produciéndose ATP por fosforilación a nivel de sustrato.*

- **Filogenia.** Ordenamiento de las especies en taxones superiores y construcción de cladogramas basados en relaciones evolutivas.
- **Fotótrofo.** Organismo que obtiene su energía de la luz
- **Fuerza protón - motriz.** Estado energético de una membrana, creado por la expulsión de protones a través de la acción de una cadena transportadora de electrones.
- **Gene.** Unidad hereditaria, segmento de DNA que codifica una determinada proteína, cadena polipeptídica un tRNA o un rRNA.
- **Género.** Grupo taxonómico de especies relacionadas.
- **Genoteca.** Colección de fragmentos clonados de DNA, que contienen en conjunto los genes del genoma completo de un organismo.
- **Halófilo extremo.** Organismo cuyo crecimiento depende de altas concentraciones de NaCl (>10%).
- **Halotolerante.** Organismo que crece en presencia de NaCl, aunque no es esencial para su desarrollo.
- **Hidrocarburo.** Sustancia aceitosa de color oscuro formada de hidrógeno y carbono principalmente.
- **Inóculo.** Material usado para iniciar un cultivo microbiano.
- **Microorganismo hidrocarbonoclástico.** Microorganismo capaz de metabolizar los hidrocarburos del petróleo
- **Plásmido.** Elemento genético extracromosómico bacteriano, que no es esencial para el crecimiento de la célula
- **Potencial redox (Eo').** La tendencia inherente de un compuesto para actuar como donador o como aceptor de electrones, su medida se expresa en voltios (v).
- **Quimiolitótrofo.** Organismo que obtiene su energía de la oxidación de compuestos inorgánicos.
- **Quimioorganótrofo.** Organismo que obtiene su energía de la oxidación de compuestos orgánicos.
- **Reducción asimilatoria del sulfato.** Síntesis de compuestos orgánicos que contienen azufre a partir del sulfato.

- **Reducción desasimilatoria del sulfato.** *Uso del sulfato como el aceptor final de electrones con la generación de sulfuro de hidrógeno.*
- **Reducción desproporcionada.** *Rotura de un compuesto en dos nuevos, de los cuales uno está oxidado y otro reducido.*
- **Secuencia signatura.** *Conjunto de oligonucleótidos cortos, característicos de un determinado grupo (o grupos) de organismos.*
- **Sintrofia.** *Crecimiento simultáneo de dos o más poblaciones, que dependen del metabolismo interespecies; de tal modo que los productos de la especie A sirven como sustratos para la especie B.*
- **Substrato.** *Substancia que utiliza un microorganismo como fuente de carbono o energía para crecer.*

## 1.1 Antecedentes

El inicio de la microbiología anaerobia se dio en 1857 con los estudios de Luis Pasteur sobre la conversión del azúcar a ácido láctico, en los que describe a la **fermentación** como la consecuencia de la vida sin el aire. Cuatro décadas más tarde en 1895 Beijerinck describe por primera vez a las **bacterias reductoras de sulfato (BRS)** y hace importantes aportaciones a la microbiología anaerobia, iniciando toda una escuela de estudio hacia las fermentaciones y los procesos metabólicos de tales bacterias.

En los años 80 se encontró que había BRS que llevaban a cabo la reducción de varios compuestos oxidados del azufre incluido el tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ), un intermediario del ciclo del azufre en sedimentos marinos. Sin embargo, en la década pasada se encontraron en ambientes subterráneos, marítimos, chimeneas hidrotérmicas y pozos petroleros poblaciones de bacterias reductoras de tiosulfato (**BRTS**) fermentativas, mesofílicas o termofílicas que no reducen el sulfato y que pertenecen a diversos géneros.

En efecto, la capacidad de reducir tiosulfato se ha observado en microorganismos ubicados en ambos dominios **Bacteria y Archaea**. En el primero de ellos tenemos a las bacterias reductoras de sulfato (*Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Thermodesulfovibrio*), a la familia *Thermotogaceae* (géneros *Thermotoga*, *Petrotoga*, *Fervidobacterium*, *Thermosipho*, *Geotoga*) y los géneros *Dethiosulfovibrio*, *Thermoanaerobacter* y *Thermoanaerobacterium*. Mientras que en el Dominio *Archaea* tenemos que los géneros que llevan a cabo esta conversión metabólica son: *Thermoproteus*, *Pyrodictium*, *Pyrobaculum*, *Archaeoglobus*, etc. (Ravot *et al.*, 1996).

Importantes estudios se han realizado para describir a los microorganismos presentes en ambientes petroleros que pueden llevar a cabo la reducción del tiosulfato. En 1995, Ravot *et al.*, describieron la reducción de tal compuesto como una característica fisiológica importante que llevan a cabo miembros del orden *Thermotogales*, incluida la cepa *Thermotoga* *SERB-2665* aislada de un campo petrolero. Mas tarde en 1997, Fardeau *et al.*, estudiaron la utilización de aminoácidos por *Thermoanaerobacter brockii* en presencia de tiosulfato o *Methanobacterium sp*, como aceptores de electrones. En el mismo año Magot *et al.*, lograron aislar de un pozo petrolero situado en el Congo, una bacteria reductora de tiosulfato que en condiciones experimentales "*in vitro*" es capaz de producir biocorrosión de 4mm por año, a la que llamaron *Dethiosulfovibrio peptidovorans* y que constituyó la primera evidencia de la participación de una BRTS en la corrosión del acero.

## 1.2. Microbiología del petróleo

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos que contiene cientos de compuestos formados con nitrógeno, azufre, oxígeno y átomos metálicos. En teoría se sabe que el petróleo es el resultado de un complejo proceso físico-químico en el interior de la tierra, en el que debido a la presión y las altas temperaturas, se produce la descomposición de enormes cantidades de materia orgánica que se convierten en aceite y gas. Esa materia orgánica está compuesta fundamentalmente por el fitoplancton y el zooplancton marinos, al igual que por materia vegetal y animal, todo lo cual se depositó en el pasado en el fondo de los grandes lagos y en el lecho de los mares. Algunos hidrocarburos son compuestos alifáticos, en los que los átomos de carbono están unidos en cadenas abiertas, y que varían mucho en cuanto a longitud de cadena, grado de ramificación y número de dobles enlaces. Otra clase de hidrocarburos, contienen un anillo aromático y pueden ser considerados como derivados del benceno (Madigan *et al.*, 1998).

El petróleo se encuentra en el interior de formaciones llamadas trampas que están constituidas por una capa de marga, arcilla u otro terreno impermeable. Su extracción está sujeta al empuje de agua y presión de gas; en todo caso, el petróleo se encuentra ocupando los espacios de las rocas porosas principalmente de areniscas y calizas, siendo algo así como el agua que empapa una esponja. No existen lagos de petróleo, por lo que cuando se extrae, es falso que queden enormes espacios vacíos en el interior de la tierra<sup>1</sup> (figura 1.1). Los hidrocarburos que componen el petróleo pueden ser gases de bajo peso molecular o líquidos y sólidos de peso molecular más elevado, los cuales pueden ser degradados por un grupo diverso de bacterias y hongos aerobios o anaerobios facultativos, llamados **microorganismos hidrocarbonoclasticos**. En la última década se reportaron más de 100 especies que pueden llevar a cabo esta función, de las cuales 22 son bacterias y el resto son hongos. Todos ellos se distribuyen ampliamente en suelo, agua de mar y agua dulce (Atlas, 1992).



Figura 1.1. Yacimiento de petróleo en una trampa subterránea.<sup>1</sup>

Dependiendo del tipo de hidrocarburo (alifático o aromático), se obtienen productos fácilmente degradables para otros organismos. Entre los microorganismos degradadores de hidrocarburos alifáticos, encontramos: *Methalococcus*, *Methylobacter*, *Methylosinus*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Nocardia* y *Flavobacterium*; los cuales degradan cadenas de 1 a 10 ó incluso más carbonos. Mientras que, entre los microorganismos degradadores de hidrocarburos aromáticos encontramos: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Candida*, *Rhodotoura* y *Sporobolomyces* (Atlas, 1992).

El paso inicial en la biodegradación de hidrocarburos, está dado por la oxidación del sustrato por oxigenasas, para lo cual se requiere O<sub>2</sub> molecular. Las oxigenasas son enzimas que catalizan la incorporación del oxígeno en compuestos orgánicos. Existen dos tipos: las dioxigenasas, que catalizan la incorporación en la molécula de ambos átomos de oxígeno (O<sub>2</sub>); y las monooxigenasas, que catalizan la transferencia de uno solo. Las condiciones aerobias, son necesarias para esta ruta de oxidación, pero la disposición de O<sub>2</sub> en el suelo, sedimentos y acuíferos, está limitada dependiendo del lugar (Madigan *et al.*, 1998).

Entre los intermediarios del metabolismo de los hidrocarburos aromáticos tenemos: catecol, tolueno, triptofano, fenol, benceno, salicilato, antraceno, gentísico y manderato; estos compuestos al ser degradados biológicamente, dan origen a ácido pirúvico, acetil Co-A, acetaldehído, ácido succínico, y CO<sub>2</sub> (entre otros), que son compuestos fáciles de degradar por otros microorganismos, incluyendo bacterias anaerobias. La degradación de hidrocarburos completos del petróleo por microorganismos anaerobios, ocurre a bajas tasas y su significado ecológico es minoritario (Atlas, 1992).

Varios géneros de bacterias anaerobias se han encontrado en ambientes petroleros, entre las que tenemos: *Desulfovibrio*, *Dethiosulfovibrio*, *Thermotoga*, *Petrotoga*, etc., cuya aportación está limitada a la producción de compuestos reducidos de azufre, y la degradación de compuestos de bajo peso molecular, productos del metabolismo de microorganismos degradadores del petróleo.

### ***1.2.1. Los sedimentos marinos y su contacto con los pozos petroleros***

Durante la extracción del petróleo en plataformas marinas, es frecuente que se inyecte agua de mar cuando los pozos van agotando sus reservas, para mantener la presión y optimizar la producción. El agua de mar contiene concentraciones variables de NaCl, que dependiendo del lugar pueden alcanzar hasta los 200g/l o más. Los principales iones que contiene son:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{HCO}_3^-$ . El agua de inyección se mezcla con el agua de formación que existe en la reserva. El agua de formación originalmente está presente en los poros de las rocas previo a la explotación del petróleo y es rica en ácidos orgánicos tales como acetato, propionato y butirato, junto con bajas concentraciones de sulfatos. Luego de que el agua de inyección irrumpa, se produce en el pozo petrolero una mezcla de agua de mar rica en sulfato y agua de formación, rica en ácidos orgánicos y ácidos grasos, de los cuales el acetato es más abundante y es un intermediario en la degradación de otros substratos por diferentes microorganismos (Taylor, 1992; Beeder *et al.*, 1995).

Lo anterior indica que una gran parte de los microorganismos encontrados pueden ser introducidos en el sistema petrolero durante la inyección de agua, debido a que en muchos casos las características de estos son similares a las encontradas en microorganismos de otros ambientes (*Thermotogales*, *Petrotogales*, *Desulfovibrios*, *Thermoanaerobiales*, etc.).

### ***1.2.2. El ciclo biogeoquímico del azufre y microorganismos que participan***

El azufre es un componente de la biosfera que constituye alrededor del 1% del peso seco de los organismos. Es un elemento esencial para el crecimiento de plantas y animales; puede existir en forma de gas, líquido o sólido; de manera soluble o insoluble; es el octavo elemento más abundante en el sistema solar y décimo cuarto a nivel planeta tierra (Dick, 1992).

El azufre es un elemento importante para los microorganismos, porque se requiere para una gran variedad de actividades metabólicas, como la síntesis de cisteína, metionina, biotina, ácido lipoico, pirofosfato de tiamina, CoenzimaA y S-adenosilmetionina. Además es importante por los estados variables de oxidación (-2, 0, +2, +4, +6) que adquiere debido a los procesos químicos y biológicos que lo interconvierten de manera significativa. Los estados de oxidación del azufre, se muestran en la tabla 1.1; sin embargo sólo tres de éstos son importantes en la naturaleza: -2, 0, +6 (Barton, 1992; Hao *et al.*, 1996).

Tabla 1.1. Estados de oxidación del azufre, y formas en las que está presente en la naturaleza.

Estado de oxidación	Compuestos
-2	R-SH; HS <sup>-</sup> ; H <sub>2</sub> S
0	S <sup>0</sup>
+2	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ; S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup>
+4	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ; SO <sub>2</sub>
+6	SO <sub>3</sub> ; SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>

En los sedimentos marinos, se desarrolla una gran variedad de bacterias que llevan a cabo de manera activa el ciclo biogeoquímico del azufre. Algunas de las transformaciones se pueden llevar a cabo en ambientes óxicos y anóxicos, los cuales albergan desde cianobacterias hasta bacterias *fototróficas* y *quimiolitótroficas* del azufre. En condiciones óxicas o aerobias el SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> se convierte por una *reducción asimilatoria* a SH<sup>-</sup>, el cual es aprovechado por las bacterias como precursor de proteínas; o bien, puede transformarse por una *reducción desasimilatoria* hasta H<sub>2</sub>S, el cual es liberado al medio ambiente. Por otro lado, el H<sub>2</sub>S, puede ser oxidado hasta azufre elemental, y éste a su vez puede ser reoxidado hasta SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. En condiciones anóxicas o anaerobias el SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> cumple el mismo ciclo hasta llegar a H<sub>2</sub>S. Pero además, se puede llevar a cabo una óxido-reducción simultánea de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ↔ H<sub>2</sub>S; y desde azufre elemental pueden ocurrir dos cosas: una reducción desasimilatoria a H<sub>2</sub>S o una oxidación en microaerofilia a SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (figura 1.2) (Madigan *et al*, 1998).

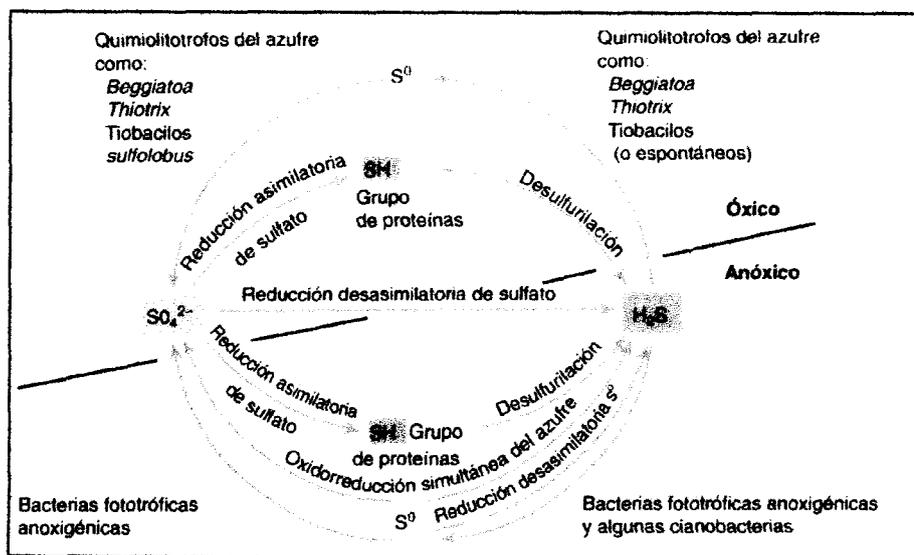
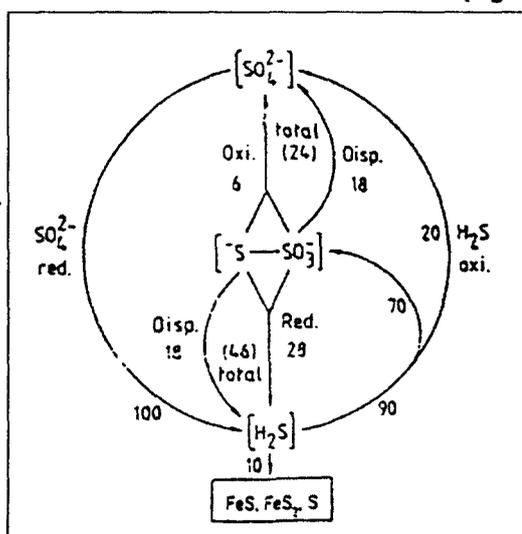


Figura 1.2. Ciclo de óxido-reducción del azufre y microorganismos que participan (Madigan, *et. al*, 1998).

### 1.2.3. La desviación del tiosulfato

Las concentraciones de tiosulfato en sedimentos marinos y de agua fresca se piensa que son bajas (<1-10 $\mu$ M) debido a la gran cantidad de bacterias que lo transforman en presencia de sustratos orgánicos. Dentro del ciclo biogeoquímico del azufre en sedimentos marinos, se ha observado que del 68 al 78% del producto de oxidación inmediato del sulfuro ( $\text{HS}^-$ ) se transforma a tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ); el cual puede a su vez ser modificado biológicamente por tres procesos: 1) Reducción por BRS y BRTS en presencia del aceptor de electrones adecuado ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{HS}^- + 2\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ), 2) Oxidación en microaerofilia por bacterias quimiolitótrofas (*Thiobacillus spp*) ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + 8 \text{FeOOH} + 14 \text{H}^+ \rightarrow 2\text{SO}_4^{2-} + 8\text{Fe}^{2+} + 11 \text{H}_2\text{O}$ ) y 3) Dismutación o *reducción desproporcionada* ausencia de ambos (sustrato orgánico y aceptor de electrones) ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{S}$ ) (Jørgensen, 1990; Jørgensen *et al.*, 1991; Ravot *et al.*, 1995). Aunque los tres procesos ocurren de manera constante en todas las capas del sedimento marino, la oxidación y la dismutación disminuyen mientras que la reducción aumenta con la profundidad del sedimento. La desviación del tiosulfato es importante para acoplar la ruta oxidativa y reductiva del ciclo del azufre y para la regulación del flujo de electrones en los sedimentos, en capas superficiales hacia sulfato y en capas profundas hacia sulfuro.(Jørgensen, 1990; Ravot *et al.*, 1995).

La reducción del sulfato hasta  $\text{H}_2\text{S}$  puede ocurrir en un 100%. El  $\text{H}_2\text{S}$  puede ser oxidado en un 90% con oxígeno para producir  $\text{SO}_4^{2-}$  y en un 10% con hierro para producir  $\text{FeS}$  o  $\text{FeS}_2$ . La oxidación del  $\text{H}_2\text{S}$  en tiosulfato ocurre en un 70%. El tiosulfato puede ser dismutado en  $\text{SO}_4^{2-}$  o bien en  $\text{H}_2\text{S}$  en un 36%, pero además puede ser reducido a  $\text{H}_2\text{S}$  en un 28%, o bien puede ser oxidado a  $\text{SO}_4^{2-}$  en un 6% (figura 1.3).



**Figura 1.3.** Transformación del tiosulfato en sedimentos marinos, seguida con azufre marcado ( $\text{S}^{35}$ ), donde se aprecian las vías que puede seguir el compuesto y su conexión en el ciclo del azufre. (Jørgensen, 1990).

#### 1.2.4. Clasificación de bacterias que reducen compuestos de azufre

##### Bacterias reductoras de azufre elemental

Cinco géneros bacterianos son capaces de llevar a cabo la reducción del azufre elemental hasta sulfuro de hidrógeno: *Desulfuromonas*, *Desulfobacter*, *Desulfotomaculum*, *Wolinella* y *Campylobacter*. A diferencia de éstos dos últimos, los tres primeros son capaces de crecer sobre acetato como única fuente de carbono orgánico oxidándolo hasta CO<sub>2</sub>; aunque todos reducen azufre elemental a sulfuro, sólo *Desulfobacter* y *Desulfotomaculum* tienen además la capacidad de reducir compuestos oxidados del azufre como sulfato y tiosulfato (Widdel y Pfennig, 1984).

##### Bacterias reductoras de sulfatos (BRS)

El ion sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) es un anión universal presente de manera natural en los océanos, en el agua de lluvia de áreas metropolitanas y en consecuencia en las aguas de drenaje; es no volátil, no tóxico y químicamente estable, su reducción no ocurre en la naturaleza bajo condiciones ambientales normales. Muchos organismos como plantas superiores, algas, hongos e incluso bacterias, usan sulfato como una fuente de azufre para la biosíntesis, pero la capacidad de usar sulfato como un aceptor de electrones para procesos generadores de energía está restringido a las BRS, descritas por primera vez en 1895 por Beijerinck (Hao *et al.*, 1996).

Las **BRS** son un grupo importante de anaerobios que obtienen energía por la oxidación de substratos orgánicos, removiendo átomos de H<sub>2</sub> de éstos y usando sulfato como el principal aceptor de electrones. Muchas de ellas pueden usar además el tiosulfato, sulfito o azufre elemental (Lien y Beeder, 1997) y unas cuantas usan nitrato o fumarato (Ollivier *et al.*, 1994). Cuando una BRS utiliza un compuesto azufrado como aceptor de electrones el producto final es sulfuro de hidrógeno el cual excreta al medio ambiente.

Las BRS generalmente son **quimioorganótrofas** que usan compuestos orgánicos de bajo peso molecular, tales como ácidos orgánicos (lactato, piruvato, formato y malato), ácidos grasos volátiles (acetato, propionato, butirato), alcoholes (butanol, etanol, metanol, propanol) y azúcares (glucosa, fructosa) (Hao *et al.*, 1996; Ollivier *et al.*, 1994). En algunos casos degradan compuestos orgánicos específicos tales como indol, fenol, catecol, caproato, heptanoato, octanoato, estearato, etc., (Beeder *et al.*, 1995). Otro tipo de BRS creciendo en cultivos mixtos tienen la propiedad de degradar glicerol (Qatibi *et al.*, 1998). Solo unas cuantas BRS crecen de manera autotrofa con H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> como única fuente de carbono (Oude *et al.*, 1995).

Un gran número de BRS pueden reducir el sulfato de manera desasimilatoria, a la vez que el sulfito, tiosulfato u otro compuesto con azufre oxidado puede servir como aceptor de electrones. Los géneros representativos de este tipo son *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfococcus*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfotomaculum*, *Desulfosarcina* y *Desulfonema* (Widdel y Pfennig, 1984).

La reducción bacteriana de sulfato es un importante proceso de mineralización de materia orgánica en ambientes anóxicos, especialmente en sistemas marinos e hipersalinos. En ecosistemas hipersalinos que contienen grandes cantidades de sulfato abundan los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium* y *Desulfonema*, los cuales crecen óptimamente en rangos de 1-4% de NaCl. (Ollivier *et al.*, 1994). Otras como *Desulfotomaculum halophilum*, crecen a un óptimo de 6% (Tardy-Jaquenod *et al.*, 1998) y otras más, como *Desulfovibrio halophilus* y *D. salexigens* crecen con 10% y 12% de NaCl respectivamente (Ollivier *et al.*, 1994).

Se ha observado que existen BRS que sobreviven a la exposición del O<sub>2</sub> por unos cuantos días reduciéndolo eventualmente a agua. Este proceso puede ser una respiración verdadera cuando se acopla a la conservación de energía. En especies de *Desulfovibrio* se encuentran varios sistemas oxígeno-reductores como por ejemplo en *D. vulgaris* y *D. desulfuricans* donde la reducción del O<sub>2</sub> se acopla a la translocación protónica y conservación de ATP; en esas especies la fracción periplásmica (que contiene hidrogenasa y citocromo C<sub>3</sub>) cataliza la reducción del O<sub>2</sub>. En *D. gigas* una rubredoxin-oxidasa citoplasmática fue identificada como una oxidasa terminal reductora de O<sub>2</sub> (Danenbergh *et al.*, 1992; Cypionka, 2000).

### **Bacterias reductoras de tiosulfato (BRTS)**

La capacidad de reducir tiosulfato se ha observado en bacterias anaerobias de ambos dominios. En el dominio *Bacteria* encontramos géneros representativos como: *Thermotoga*, *Thermoanaerobacter*, *Thermosipho*, *Fervidobacterium*, *Anaerobaculum*, *Dethiosulfovibrio*, *Thermoanaerobium* y una gran cantidad de BRS. En el Dominio *Archaea* encontramos géneros representativos como *Thermoproteus*, *Pyrodictium*, *Pyrobaculum*, *Haloanaerobium* y *Archaeoglobus* (figura 1.4) (Ravot *et al.*, 1995).

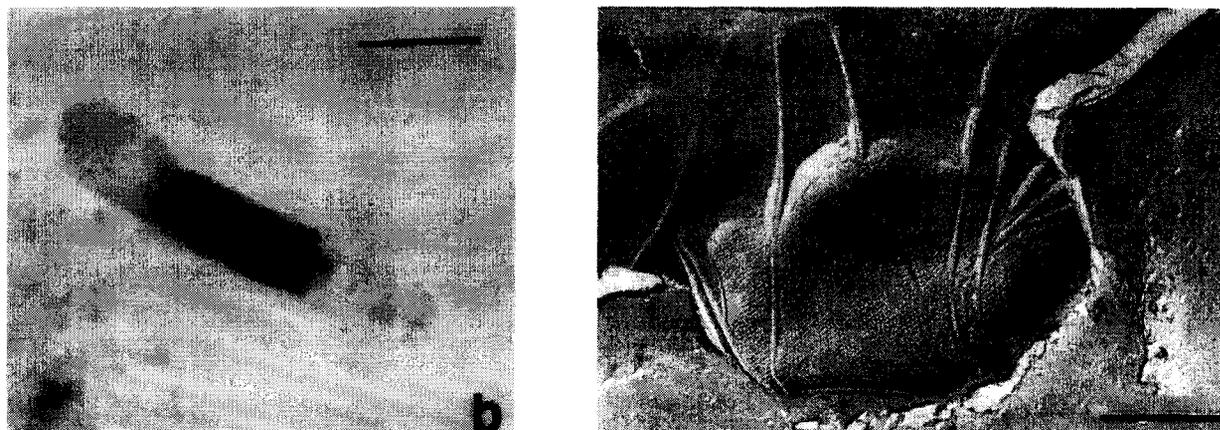
Dentro de las BRTS no sulfato reductoras, se encuentra la familia *Thermotogaceae*, que comprende cinco géneros: *Fervidobacterium*, *Thermotoga*, *Thermosipho*, *Geotoga* y *Petrotoga*. El género *Thermotoga*, tiene varias especies: *T. maritima*, *T. neapolitana*, *T. thermarum*, *T. subterranea*, *T. hypogea* y *T. elfii*. Todos son bacilos de tamaño variable que presentan estructuras características llamadas "toga"; crecen a temperaturas óptimas de 65-75°C; pH óptimo de 7.5 y se han encontrado en pozos petroleros y chimeneas hidrotérmicas. Durante la fermentación de la glucosa, en ausencia de

tiosulfato, producen acetato, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, y solamente utilizan tiosulfato como aceptor de electrones. El género *Petrotoga* tiene dos especies: *P. mobilis* y *P. miotherma*, que son bacilos de tamaño variable con "toga"; crecen a temperaturas óptimas de 55-60°C; reducen tiosulfato y azufre elemental en sulfuro de hidrógeno y requieren de extracto de levadura para su crecimiento (Fardeau *et al.*, 1997 b; Hubert *et al.*, 1990; Jannasch *et al.*, 1988; Jeanthon *et al.*, 1995; Lien *et al.*, 1998 b; Ravot *et al.*, 1995).

El género *Thermoanaerobacter*, comprende 4 especies: *T. Brockii*, *T. ethanolicus*, *T. finnij* y *T. thermohidrosulfuricus*. Todas las especies muestran capacidad de oxidar H<sub>2</sub> en presencia de tiosulfato. En ellas se observó que el rendimiento celular y la velocidad de crecimiento se ven favorecidos en presencia de tiosulfato, lo cual sugiere que se llevan a cabo reacciones más favorables energéticamente y mayor generación de ATP por fosforilación a nivel de sustrato (Fardeau *et al.*, 1993; Fardeau *et al.*, 1994).

*T. Brockii* fermenta serina, oxida leucina, isoleucina y valina sólo en presencia de tiosulfato, reduciéndolo a sulfuro de hidrógeno. Lo anterior sugiere que *T. Brockii* puede ser de significado ecológico en ambientes hidrotérmicos, en el recambio de aminoácidos (Fardeau *et al.*, 1997a). Pero en general, los miembros de este género se caracterizan por oxidar péptidos y aminoácidos en presencia de tiosulfato (Faudon *et al.*, 1995). *Spirochaeta smaragdinae* es un anaerobio obligado aislado de un pozo petrolero en el Congo que crece de manera óptima con 5% de sales, a 37°C y pH 7. Es capaz de utilizar una amplia gama de carbohidratos y extracto de levadura como donadores de electrones; reduce tiosulfato y azufre elemental a H<sub>2</sub>S (Magot *et al.*, 1997b).

La primera evidencia que se tuvo de la participación de una BRTS no sulfato reductora en la corrosión de ductos petroleros en el Congo, es *Dethiosulfovibrio peptidovorans*, la cuál produjo en cultivo puro "*in vitro*" una corrosión evaluada en 4mm por año. Son bacterias anaerobias que crecen a 42°C, a pH 7, 3% de NaCl y utilizan el tiosulfato como aceptor de electrones produciendo H<sub>2</sub>S (Magot *et al.*, 1997a).



**Figura 1.4 .** Géneros representativos de Bacterias Reductoras de Tiosulfato. Izquierda, *Thermotoga subterranea* mostrando la característica toga de exopolímeros que la rodea (Jeanthon *et al.*, 1995). Derecha, *Pyrodictium abyssi*.

### 1.3 Clasificación fisiológica

#### 1.3.1 Técnicas desarrolladas para el estudio de anaerobios

En 1857 Luis Pasteur profesor de química de la Universidad de Lille, publicó un artículo que puede ser visto como el trabajo que marca el inicio de la microbiología anaerobia. En este manuscrito presenta el resultado de sus estudios sobre la conversión del azúcar a ácido láctico y en una breve frase menciona: **"La fermentación es la consecuencia de la vida sin el aire"**. Cuatro décadas más tarde, en 1895, Beijerinck describe por primera vez a las bacterias reductoras de sulfatos (BRS) y hace importantes aportaciones a la microbiología anaerobia introduciendo el concepto de: "enriquecimiento", el cual consiste en el uso de sustratos selectivos que permiten el óptimo crecimiento de poblaciones anaerobias. Las técnicas de enriquecimiento llegaron a ser ampliamente usadas por Barker, quien abrió toda una escuela de estudio hacia las fermentaciones y la degradación de aminoácidos por las bacterias anaerobias.

En 1969 Hungate comenzó el estudio de anaerobios en el rúmen y tubo digestivo de termitas. Desarrolló procedimientos para preparar medio de cultivo con potencial de reducción muy bajo y logró mantener esas condiciones de manera aséptica durante las transferencias, logrando reproducir un entorno muy parecido al hábitat natural de tales microorganismos para poder cultivarlos cuantitativamente.

La extensión de Balch (1976) a la técnica de Hungate que utiliza una atmósfera presurizada, fue ampliamente aceptada y en las manos de Stetter y Zilling una década después, abrían un campo de estudio para adentrarse en el mundo de los anaerobios termofílicos de ambientes extremos. Sin embargo, la mayor contribución en tecnología para el estudio de anaerobios estrictos fue hecha por Aranki y Freter en los años 70, con el desarrollo de la cámara anaerobia, equipada con catalizadores de oxígeno y esclusas de aire. La cámara era llenada con la mezcla de gases deseada y las técnicas microbiológicas habituales podían llevarse a cabo en su interior sin ningún problema.

Muchos anaerobios facultativos podían crecer sobre cajas Petri incubadas dentro de dicha cámara, pero para anaerobios estrictos (*Methanoarqueas*) que requerían un potencial de reducción por debajo de los  $-330\text{mV}$  se construyeron las jarras anaerobias (Madigan *et al.*, 1998; Wolfe, 1999).

### *1.3.2 Herramientas para la identificación de microorganismos*

#### *Tinción de Gram*

El microscopio de contraste de fases, hace notar las diferencias de contraste entre las células y el medio que las rodea. Se fundamenta en el hecho de que las células poseen diferente índice de refracción que el medio, y por lo tanto producen un desvío en los rayos de luz que las atraviesan.

Con el objeto de incrementar el contraste y facilitar la observación de las muestras, se utilizan tinciones. La técnica de Gram es la tinción diferencial más importante usada en microbiología, según la cual las bacterias pueden dividirse en dos grandes grupos: Gram positivas (+) y Gram negativas (-). Su fundamento se basa en las diferencias que presentan las paredes celulares de cada grupo. Las Gram (+), tienen conformada su pared celular hasta con 90% de peptidoglucano (formado por dos derivados de azúcares y un pequeño grupo de amino ácidos); mientras que en las Gram (-) éste compuesto constituye sólo alrededor del 10%. (Madigan *et al.*, 1998).

#### *Microscopía electrónica*

El microscopio electrónico de barrido se diseñó para el estudio de superficies sólidas a alta resolución. Presenta un embobinado deflector cuya función es barrer con un haz de electrones las muestras a observar. Como resultado se generan electrones secundarios retrodispersos y rayos X que son registrados mediante detectores específicos. Utiliza un gran número de señales que provienen de la interacción de los electrones con la superficie de la muestra, las cuales nos permiten obtener mayor información sobre la orientación cristalina, la composición química, la estructura magnética o el potencial eléctrico (Yacamán y Reyes, 1995).

#### *Temperatura*

Se sabe que la tierra tiene alrededor de 4.600 millones de años, y la primera prueba de vida microbiana se obtuvo a partir de rocas de hace 3.600 millones de años; la tierra primitiva era anóxica y mucho más caliente que la actual, es por ello que dentro del grupo de microorganismos extremófilos, las bacterias termofílicas son las más ampliamente estudiadas. Se ha reportado la existencia de bacterias hipertermófilas que crecen en forma óptima por arriba de los 100°C gracias a que producen moléculas estables al calor, incluídas ciertas enzimas. De estos microorganismos se han aislado y caracterizado proteasas, celulasas, pululanasa y xilanasas con alta capacidad termoestable que reciben el nombre de extremozimas, atractivos biocatalizadores que encuentran cada día más aplicaciones industriales (Madigan *et al.*, 1998; Zamos *et al.*, 1991; Wiegel y Ljungdahl, 1981).

### Salinidad

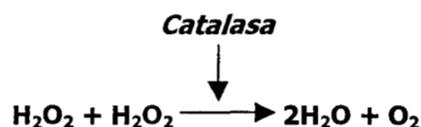
Los ecosistemas salinos muestran una gran variedad en composición iónica, concentración total de sales y pH. Varios lagos como el Big Soda Lake y el Soap Lake en la gran cuenca al oeste de los Estados Unidos, tienen rangos de salinidad de 8.9 – 10% y son altamente alcalinos con rangos de pH de 9.0 a 10.0. En contraste, el Great Salt Lake, el Mar Muerto, y la cuenca Orca en el Golfo de México, tienen contenidos de sal por arriba del 20%, con valores de pH de 7.0. Las bacterias halófilas que crecen en estos ecosistemas se clasifican en tres grupos basándose en sus requerimientos de NaCl: 1) halófilas ligeras, crecen con 2 a 5 % de NaCl (0.34 a 0.85 M); 2) halófilas moderadas, crecen con 5 a 20 % de NaCl (0.85 a 3.4 M); 3) halófilas extremas, crecen más rápidamente con 20 a 30 % de NaCl (3.4 a 5.1M). Las bacterias halófilas son de interés industrial, porque a nivel biotecnológico se estudia la producción de antibióticos, carotenos, osmorreguladores y surfactantes, a partir de éstas (Ollivier *et al.*, 1994; Magot *et al.*, 1997a).

### pH

Cada organismo tiene un rango de pH, dentro del cual es posible su crecimiento y normalmente posee un pH óptimo bien definido. Las bacterias cuyo pH óptimo de crecimiento está entre 6 y 8 se conocen como neutrófilas, las especies que pueden crecer a pH inferior a 2 se conocen como acidófilas, mientras que aquellas que viven a pH óptimo por arriba de 10 se conocen como alcalófilas (Madigan *et al.*, 1998).

### Determinación de la enzima catalasa

Los microorganismos aerobios poseen enzimas como la catalasa, la peroxidasa y la superóxido dismutasa, que participan en la eliminación o neutralización de radicales tóxicos de oxígeno, que incluyen el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) producidos durante el proceso de reducción del oxígeno hasta agua durante la respiración. La reacción que lleva a cabo la enzima catalasa para transformar el peróxido de hidrógeno se muestra a continuación:



### Fuentes de carbono

Los procesos del crecimiento celular implican al menos 2000 reacciones bioquímicas. A su vez algunas de estas reacciones implican transformaciones de energía, síntesis de pequeñas moléculas y de cofactores y coenzimas necesarios para las reacciones enzimáticas. Las reacciones principales de la síntesis celular son la construcción de macromoléculas (DNA, RNA y proteínas) a partir de monómeros (Madigan *et al.*, 1998).

## 1.4 Clasificación filogenética

### 1.4.1 Fundamento

El concepto de cronómetro molecular fue introducido en 1965 por Emile Zuckerkand y Linus Pauling, quienes se referían a la secuencia de aminoácidos y nucleótidos, (aislados de diferentes organismos) que al ser alineadas y comparadas, permitían evaluar de manera general sus similitudes (Madigan *et al.*, 1998).

La similitud de las secuencias es una medida de las relaciones evolutivas entre los organismos. A partir de esas similitudes, actualmente se pueden construir diagramas filogenéticos (árboles) con ayuda de técnicas automatizadas y rápidas, que permiten clasificarlos dentro de un contexto evolutivo. Los puntos de ramificación o nodos de un árbol, indican tiempos a los cuales dos grupos divergen de un ancestro común. El método para construir árboles filogenéticos se conoce como el método de matriz de distancias; en donde se alinean dos secuencias, y se calcula una **distancia evolutiva** ( $E_D$ ); registrando (en computadora) el número de diferencias entre ambas (Corpet, 1988; Noll, 1992).

La matriz generada a partir de la comparación de secuencias, se analiza en un programa para la construcción de árboles filogenéticos, a partir de las medidas de  $E_D$ . Todas las posibilidades de ramificación se analizan, y se disponen las longitudes de las ramificaciones para ajustar los datos de la mejor manera. La  $E_D$  que separa a dos organismos, es directamente proporcional a la longitud total de las ramas que los separan. El análisis por computadora de las secuencias, ha revelado que existen oligonucleótidos cortos característicos de un determinado grupo de organismos, a los que se les ha llamado **secuencias signatura**. Se han identificado signaturas que definen cada uno de los tres dominios primarios. De igual forma, se han detectado signaturas que definen los taxones principales dentro de cada dominio (Madigan *et al.*, 1998).

Carl Woese y colaboradores han analizado las secuencias de la pequeña subunidad ribosomal del RNA (16S) aislada de cientos de organismos, para establecer sus relaciones de parentesco (Noll, 1992). El Árbol Filogenético Universal, construido a partir de la comparación de las secuencias de los RNA ribosómico 16S y 18S conocidas hasta 1998 muestra tres dominios que comprenden a todos los seres vivos *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya* (figura 1.5).

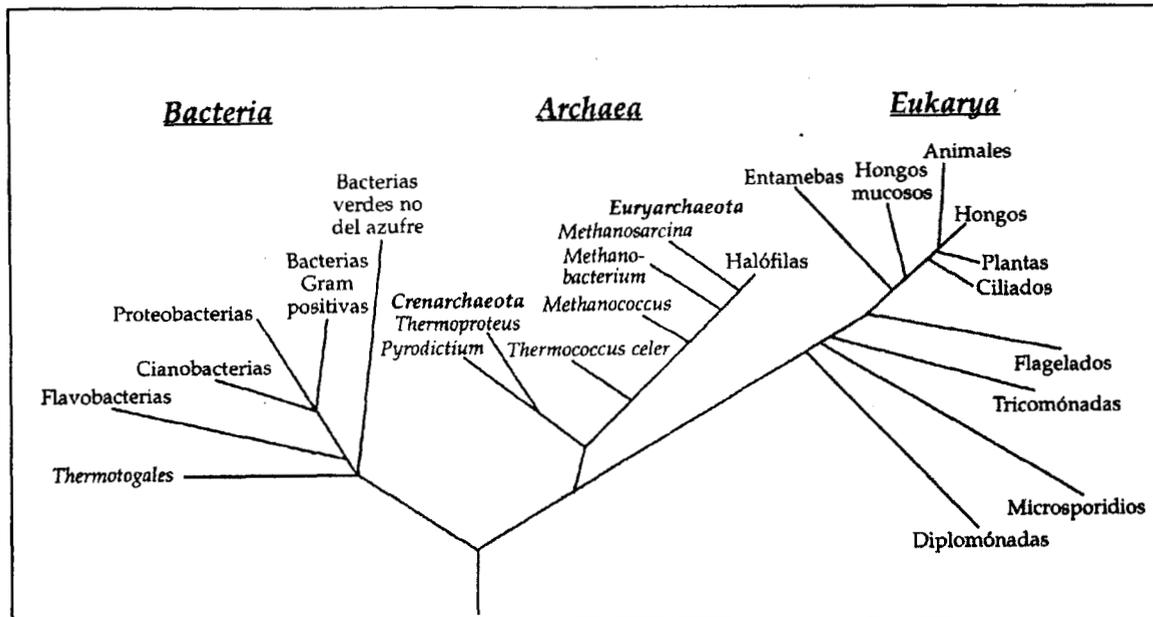


Figura 1.5. Árbol filogenético universal, construido a partir de la comparación de las secuencias de los RNA ribosómico 16S y 18S. Se observan los tres dominios de seres vivos: *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya* (Madigan *et al.*, 1998).

La raíz del árbol, indica un punto en el tiempo en el que toda la vida existente del planeta, compartía un ancestro común. La evolución inicial a partir del antepasado universal tomó dos direcciones, la del dominio *Bacteria* y la opuesta de los *Archaea* y *Eukarya*. Mas tarde éstos dos se separaron para producir dos linajes principales.

El dominio *Archaea*, es el que se ramifica más cerca de la raíz, por lo que se concluye que comprende al grupo de organismos más primitivo (menos evolucionado). El dominio *Eukarya* es tan antiguo como los otros dos, por tanto en la tierra antigua, hubo especies de *Eukarya* sin organúlos, que compartían un pasado común con las otras dos líneas evolutivas. Ninguno de los organismos que viven actualmente es primitivo. Todas las formas de vida que existen son organismos modernos, bien adaptados, y que han tenido éxito en sus nichos ecológicos (Madigan *et al.*, 1998).

#### 1.4.2. Herramientas para la identificación de organismos vivos

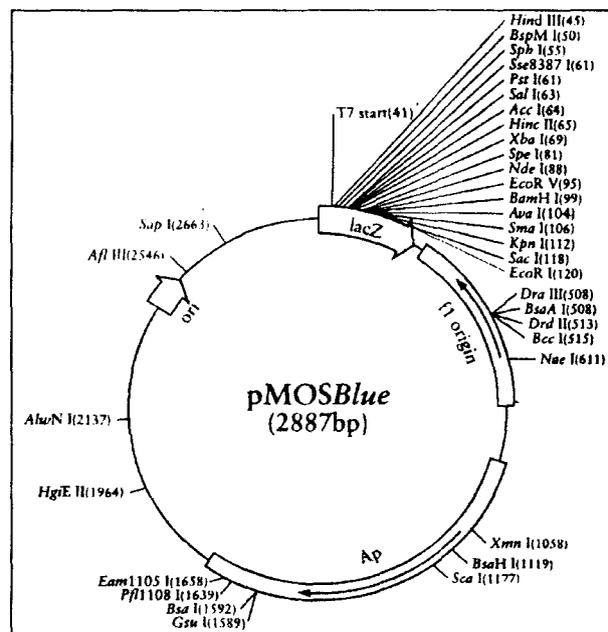
La genética molecular ha hecho posible el desarrollo de sofisticados procedimientos para el aislamiento, manipulación y expresión del material genético. La clonación molecular es una técnica de la ingeniería genética que implica el aislamiento, purificación y replicación de fragmentos específicos de DNA, que permiten la localización, caracterización y manipulación de genes y de sus productos.

La clonación molecular se divide en varios pasos: **1)** Aislar y fragmentar el DNA del que se parte; que puede ser DNA genómico total o DNA sintetizado por la reacción en

cadena de la polimerasa. **2)** Unir los fragmentos de DNA a un vector de clonación con la DNA ligasa. **3)** Introducir, mantener y amplificar el vector de clonación con el DNA insertado en un organismo hospedador (generalmente bacterias) **4)** Detectar y purificar la clona deseada y **5)** Amplificar las células hospederas que contengan la clona deseada para el aislamiento y estudio del gene clonado. Existen múltiples vectores de clonación (plásmidos, bacteriófagos, cósmidos, etc.) (Lewin, 1994).

La mayoría de los plásmidos son vectores naturales que además de llevar los genes requeridos para su propia replicación, llevan otros genes que confieren propiedades importantes a sus hospedadores. Los plásmidos son muy útiles como vectores de clonación, ya que son de pequeño tamaño y se replican rápidamente, lo que facilita su aislamiento y manipulación. Son circulares, lo que hace que su DNA sea más estable durante el aislamiento, además su origen de replicación es independiente del funcionamiento de la célula, de tal forma que pueden haber numerosas copias dentro de la misma y por último, presentan marcadores seleccionables como los genes de resistencia a antibióticos, que facilitan la detección y selección de las clonas transformadas (Lewin, 1994).

Un ejemplo de plásmido de clonación se muestra en la figura 1.6. El plásmido pMOSBlue, es relativamente pequeño (2,887 pb) y puede ser amplificado de 1000 – 3000 veces dentro de una célula hospedera, es fácil de aislar en la forma superenrollada, se conoce su secuencia completa y los sitios en los que pueden actuar enzimas de restricción además posee un gene que le confiere resistencia a la ampicilina.



**Figura 1.6.** Estructura del plásmido pMOSBlue un típico vector de clonación y sus principales características. La flecha indica la dirección de replicación del DNA a partir del origen.

## 1.5. Justificación

En los ambientes petroleros cohabitan microorganismos poco comunes entre los que encontramos termófilos, anaerobios, fermentadores, homoacetógenos, metanógenos y en general aquellos reductores de compuestos de azufre (Cayol *et al.*, 1995).

En la naturaleza existen bacterias capaces de reducir las formas oxidadas del azufre tales como el sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y el tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ). Las bacterias reductoras de sulfato **BRS** se conocen por su capacidad para reducir sulfato, sulfito, tiosulfato, etc., mientras que las bacterias reductoras de tiosulfato **BRTS** no sulfato reductoras, se reportaron por su capacidad para reducir tiosulfato y azufre elemental.

Las BRTS no sulfato reductoras, se han localizado en ambientes extremos de salinidad (10 a 100 g/l), temperatura (40 a 100 °C) y presión (1 a 200 atm), en anaerobiosis estricta a grandes profundidades, en chimeneas hidrotérmicas, pozos petroleros y suelos contaminados. Si bien, algunas BRTS son de interés en la industria por sus enzimas termoestables, en el ámbito petrolero se consideran un riesgo potencial, por su contribución a los procesos de corrosión en ductos y pozos. *Dethiosulfovibrio peptidovorans*, aislada de un pozo petrolero situado en el Congo, produjo en condiciones de laboratorio "in vitro", una corrosión de 4mm por año y fue la primera evidencia de la participación de una BRTS no sulfato reductora en la corrosión del acero (Magot *et al.*, 1997a; Madigan *et al.*, 1998).

A lo largo del territorio nacional, la paraestatal PEMEX mantiene en operación un sistema de ductos terrestres de 54 mil kilómetros para el transporte de petróleo crudo, gas natural, gas amargo, gas dulce, gasolina, diesel y otros productos refinados; cuenta además con 2 mil kilómetros en zonas submarinas. No obstante el avance tecnológico, un 41% de los accidentes en tuberías de conducción de hidrocarburos se deben a problemas de corrosión. Los fluidos que son transportados contienen importantes cantidades de  $\text{H}_2\text{S}$  y la corrosión asociada a la presencia de este compuesto, es considerada como un grave problema.

Si bien, diversos investigadores plantean que el problema de la corrosión es el resultado de la transformación biológica del  $\text{H}_2\text{S}$  a ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) por bacterias sulfooxidantes; el  $\text{H}_2\text{S}$  por sí mismo bajo condiciones anaerobias causa la despolarización del hierro y provoca corrosión puntual; aunado a esto, su fuerte tendencia a precipitar iones metálicos como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , y  $\text{Mn}^{2+}$ , forma sales altamente insolubles (Hao *et al.*, 1996; Maka y Cork, 1992).

En el Instituto Mexicano del Petróleo, se llevan a cabo estudios multidisciplinarios enfocados a la búsqueda de soluciones ante este grave problema, que se basan en la instalación de estaciones de campo, para llevar a cabo análisis de la diversidad microbiana con ingeniería genética, caracterización metalúrgica, electroquímica de procesos, elaboración de sustancias inhibitoras y biocidas. Sin duda, la explotación de nuevos yacimientos situados a profundidades de 500 a 3000m en el Golfo de México, demandará materiales con mejores propiedades mecánicas y mayor resistencia a la corrosión por  $\text{H}_2\text{S}$ .

## ***1.6. Objetivos***

### **General**

Aislar, identificar y clasificar bacterias reductoras de tiosulfato (BRTS), presentes en pozos petroleros mexicanos.

### **Particulares**

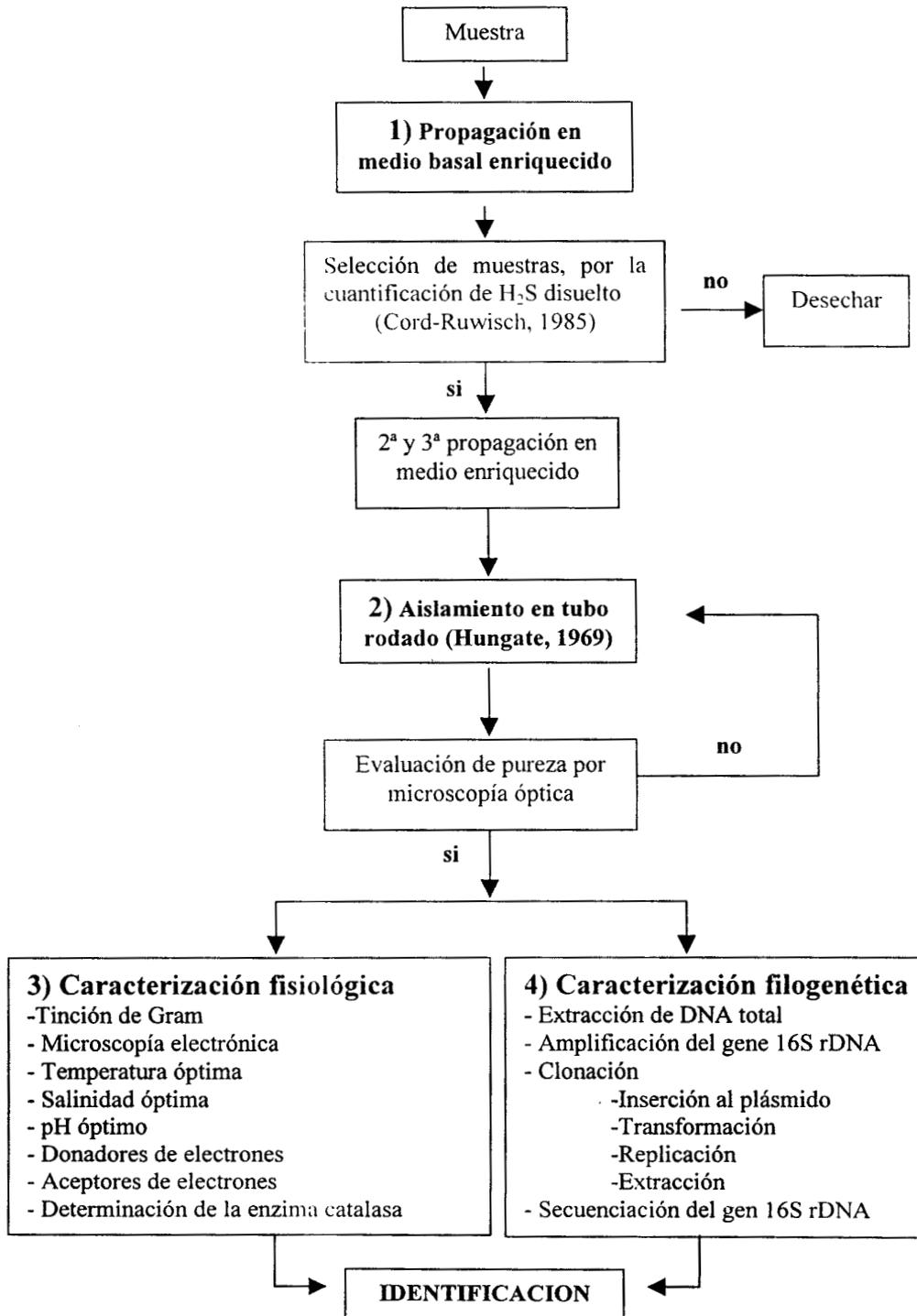
- Aislar BRTS de pozos petroleros del Golfo de México.
- Identificar las cepas aisladas morfológica y fenotípicamente.
- Clasificar las cepas aisladas e identificadas filogenéticamente.

## ***1.7 Hipótesis***

La producción de sulfuro de hidrógeno en un cultivo axénico con una fuente de carbón orgánica y tiosulfato de sodio como aceptor final de electrones, es indicativo de la presencia de bacterias reductoras de tiosulfato.

## 2.1 Diseño experimental

La figura 2.1, muestra el diseño experimental planteado para el desarrollo de este proyecto.



**Figura. 2.1.** Diagrama de flujo que muestra el diseño experimental planeado, para cumplir el objetivo principal de este trabajo en cuatro partes fundamentales: propagación, aislamiento, caracterización fisiológica y caracterización filogenética.

## 2.2 Obtención y propagación de muestras

Se trabajaron 16 muestras colectadas de oleoductos y contenedores de agua de formación y agua de batería de pozos petroleros ubicados en el Golfo de México (Tabla 2.1). Todas fueron transferidas para su crecimiento bajo diferentes condiciones de temperatura y salinidad.

Tabla 2.1. Características de las muestras y condiciones en las cuales se observó crecimiento desde el inicio.

Muestra	Procedencia	T ° C	NaCl (g/l)	Naturaleza
1	Pozo SamIII	35	30	Sedimento acuoso
2	Cunduacán	35	1	Crudo
3	Iride	35	1	Crudo
4	1103	80	15	Sedimento acuoso
5	Batería SamIII	80	15	Sedimento acuoso
6	M2pozo 38	35	1 y 15	Sedimento acuoso
7	M2 pozo 38b	35	30	Sedimento acuoso
8	Batería Carrizo	35	15	Sedimento acuoso
9	21-D carr	35	1 y 15	Sedimento acuoso
10	Sep. Samaría II	35	30	Sedimento acuoso
11	Agua de sep.	35	30	Sedimento acuoso
12	21-D	60	30	Sedimento acuoso
13	21-D	60	15	Sedimento acuoso
14	Pozo ABK 56	35	30	Sedimento acuoso
15	Agua Bat Sam III	35	30	Sedimento acuoso
16	Batería carrizo	35	30	Sedimento acuoso

### 2.2.1. Medio de propagación.

El medio basal de propagación se preparó con los siguientes compuestos cuantificados en g/L:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.3;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1;  $\text{KCl}$  0.1; Cisteína-HCl 0.5; resazurina 0.001; solución de oligoelementos de Balch 10 mL y NaCl a diferentes concentraciones 1, 15 ó 30 g/L.

Para preparar un litro de medio basal se pesaron todos los compuestos excepto la cisteína-HCl (Carlson *et al.*, 1979) y se disolvieron en un matraz Erlenmeyer que contenía agua destilada c.b.p. 1L. Se ajustó a pH 7.0 con una solución KOH 1 M y se puso una marca de aforo. Se agregó 1/3 más del volumen de agua y se puso a ebullición para eliminar el oxígeno presente. Poco antes de llegar a la marca de aforo se le puso un flujo constante de nitrógeno (Figura 2.2.a) (Ljungdahl y Wiegel, 1986).

Una vez que se llegó al volumen de aforo, se enfrió y se agregó la cisteína-HCl. El medio se repartió con ayuda de un dosificador automático (Wheaton Unispense-II) en botellas serológicas de 60 ó 120 ml sin retirar el flujo de  $\text{N}_2$  e inmediatamente se taparon con septos de hule y se sellaron con arillos de aluminio; a continuación se les

realizó un cambio de atmósferas de N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80:20) durante 1 minuto por cada 20 mL de medio. Posteriormente se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos (Figura 2.2.b).

La solución de oligoelementos de Balch se elaboró disolviendo 1.5 g de ácido nitriloacético en 700 ml de agua destilada; se ajustó el pH a 6.5 con KOH 1M y se adicionaron enseguida los siguientes compuestos: MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 3 g; MnSO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O 0.5 g; NaCl 1 g; FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 0.1 g; CoCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O 0.1 g; CaCl<sub>2</sub> 0.1 g; ZnSO<sub>4</sub> 0.1 g; CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O 0.01 g; AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0.01 g; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.01 g; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O 0.01 g. Se aforó el volumen de agua a 1 litro y se ajustó a pH 7.0 con una solución KOH 1 M. La solución se conservó en un frasco ámbar en refrigeración, hasta su uso.

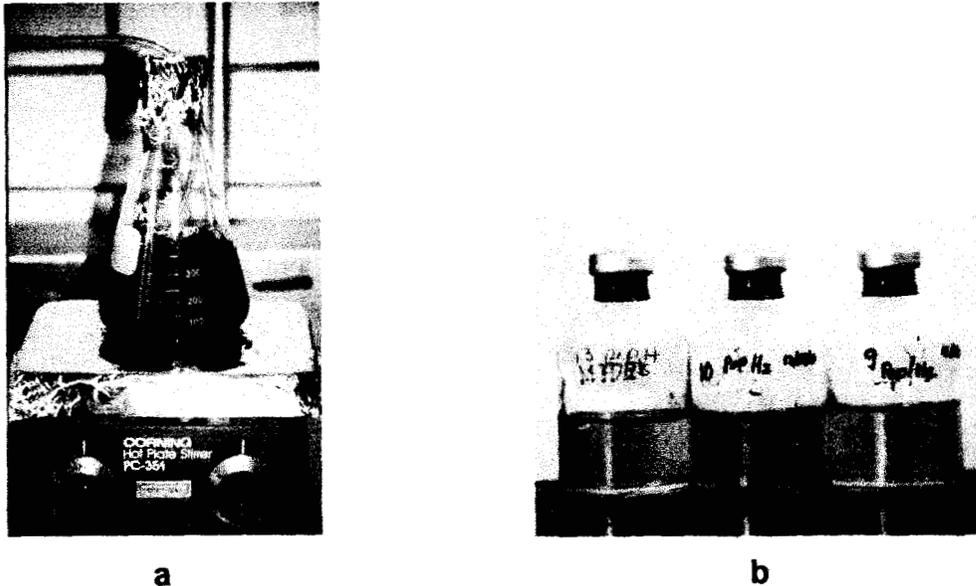


Figura 2.2. Elaboración de medio de cultivo anaerobio, para la propagación de las muestras, a. fase de reducción. b. incubación en botellas serológicas

### 2.2.2. Enriquecimientos del medio

El medio base de propagación se enriqueció variando los substratos y la concentración de los mismos, para detectar procesos de reducción o de dismutación (Bonilla, 1999). Los substratos se prepararon con agua reducida y bajo flujo constante de N<sub>2</sub> a las siguientes concentraciones: NaHCO<sub>3</sub> 10%; Na<sub>2</sub>S•9H<sub>2</sub>O 2%; Na<sub>2</sub>(S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 1M; extracto de levadura 2%; casaminoácidos 2 y 20% y peptona de caseína 2 y 20%, para obtener las concentraciones finales que se muestran en la tabla 2.2; el pH fue ajustado a 7.

Tabla 2.2. Tratamientos a los que fueron sometidas las muestras originales, para detectar reducción o dismutación del tiosulfato de sodio. (Bonilla, 1999). El pH se ajustó a 7.0 con la solución de NaHCO<sub>3</sub> al 10% (p/v).

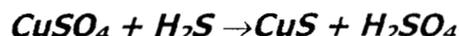
Tratamiento	Na <sub>2</sub> S 9H <sub>2</sub> O 2%	Na <sub>2</sub> (S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Extracto levadura	Casamino ácidos	Peptona de caseína	H <sub>2</sub>	Inóculo
1	0.2g/L	20mM	0.2g/L	0.1 g/L	-	-	10%
2	0.2g/L	20mM	0.2g/L	-	0.1g/L	-	10%
3	0.2g/L	20mM	0.2g/L	5g/L	-	-	10%
4	0.2g/L	20mM	0.2g/L	5g/L	-	2 bar	10%
5	0.2g/L	20mM	0.2g/L	-	5 g/L	2 bar	10%

## 2.3 Selección de muestras

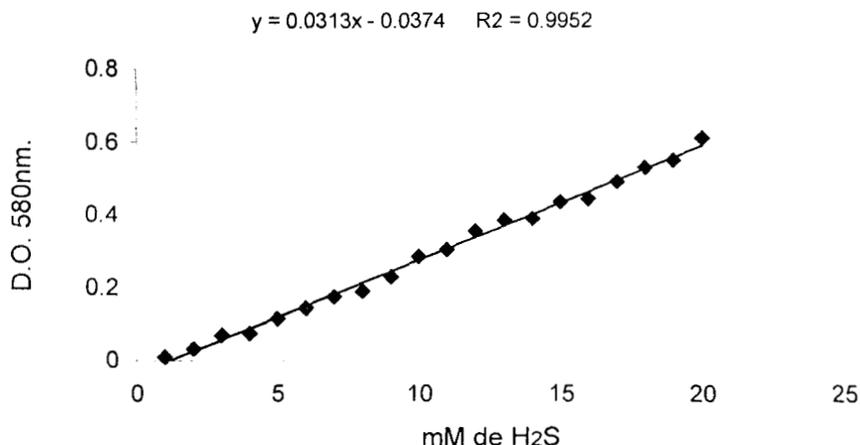
### 2.3.1. Cuantificación de H<sub>2</sub>S disuelto

Cada muestra se trabajó con los 5 tratamientos de la tabla 2.2 para detectar procesos de reducción o dismutación de tiosulfato por la presencia de H<sub>2</sub>S. La presencia de H<sub>2</sub>S se detectó por el método de determinación de sulfuros disueltos y precipitados en cultivos de BRS (Cord-Ruwisch, 1985). Para determinar la precipitación de CuS (según el método), se preparó una solución de CuSO<sub>4</sub> (5 mM) 10 veces concentrada; y una solución de HCl (50 mM) diluidas en agua destilada, las cuales se guardaron en frascos ámbar en refrigeración, hasta su uso.

Para los ensayos se emplearon 4 mL de esta solución con 0.1 ml de cada tubo de la curva estándar. La reacción que se llevó a cabo, es la siguiente:



Para elaborar la curva estándar de H<sub>2</sub>S, entre concentraciones de 1 a 20 mM, se preparó una solución de Na<sub>2</sub>S (50 mM) y una serie de 20 tubos de Hungate que contenían diferentes cantidades de agua reducida. La turbidez provocada por la precipitación del CuS, se midió en un espectrofotómetro a 480 nm. Con estos datos se elaboró la gráfica y se calculó la estimación lineal que se muestran en la figura 2.3.



**Figura 2.3.** Curva de calibración\* para la detección de H<sub>2</sub>S disuelto en solución acuosa según el método de Cord-Ruwisch, 1985. La concentración se determina aplicando la relación:  $x = (\text{Abs.} + .0374) / .0313$ .

**\*Esta curva se ajustó al variar la preparación del Na<sub>2</sub>S y el modelo del espectrofotómetro.**

Las muestras que presentaron una producción elevada de H<sub>2</sub>S, fueron resembradas en una segunda y tercera propagación con el tratamiento respectivo.

## 2.4 Aislamiento

Las muestras que mantuvieron la producción de H<sub>2</sub>S luego de la tercera propagación fueron seleccionadas para continuar con la serie de aislamientos por tubo rodado, que dependiendo de la población bacteriana presente en cada una, fue de 3 a 5 eventos.

### 2.4.1 Método de tubo rodado

#### 2.4.1.1. Bacterias mesofílicas

Para el aislamiento de bacterias mesofílicas se siguió el método de tubo rodado de Hungate (Hungate, 1969) modificado por Ueki (Ueki *et al.*, 1980). El medio de aislamiento fue el mismo que se empleó durante la propagación según el proceso metabólico que se había observado (dismutación o respiración), solo que se le adicionaron 4 g/L de NaHCO<sub>3</sub> y se ajustó a pH 7.0 con HCl 1N.

Una vez preparado el medio, se adicionó una tercera parte del volumen total de agua destilada, y se puso a ebullición con flujo de N<sub>2</sub>. Cuando se alcanzó el volumen inicial (sin dejar enfriar) se adicionó la cisteína-HCl y 18 g/L de agar bacteriológico. Se vertieron 5 mL de medio caliente en tubos de Hungate con flujo constante de N<sub>2</sub> y a cada tubo se le realizó un cambio de atmósferas de N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> por 30 segundos. Posteriormente se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos.

Para iniciar el aislamiento, se fundió el agar de 12 tubos en baño maría, se mantuvieron semi-líquidos en un baño de agua a 48°C y se les agregaron los substratos correspondientes según el proceso metabólico observado para cada una de las muestras.

Se tomó un inóculo de 0.5 mL de la muestra seleccionada y se inyectó al primer tubo el cuál se sacó del baño de agua y se homogeneizó ligeramente para evitar la formación de burbujas. De este primer tubo se tomaron 0.5 mL y se inyectaron al segundo y así sucesivamente hasta completar una serie de 12 diluciones.

Al finalizar la transferencia, el tubo de la última dilución se sacó del baño de agua y se colocó en un motor rotatorio (Bellco Glas), donde se solidificó con ayuda de un trozo de hielo. A continuación se colocó en una gradilla de manera vertical, y se procedió a solidificar el resto. Finalmente los tubos fueron incubados a 35°C hasta la formación de colonias, que dependiendo de la muestra, tardó entre 1 y 4 semanas (figura 2.4.a).

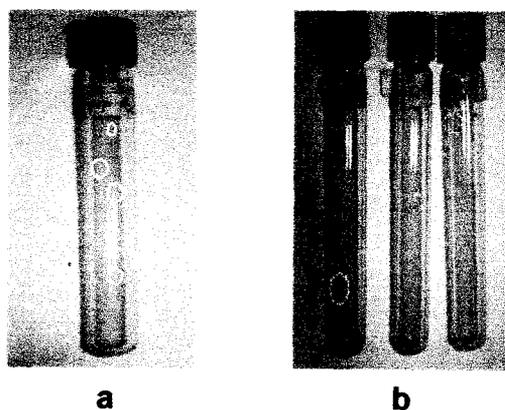
#### 2.4.1.2. Bacterias termofílicas

El aislamiento de bacterias termofílicas se hizo de igual manera que las mesofílicas, usando el método de tubo rodado de Hungate, sólo que en lugar de agar bacteriológico se usó Gelrite o Phytigel, un preparado especial para el aislamiento de termófilos (Kang *et al.*, 1982; Lin *et al.*, 1984).

El medio de cultivo base se preparó con el doble de concentración de sus ingredientes adicionándole además 0.8 g/L de  $MgCl_2$ . Al mismo tiempo, se preparó Gelrite diluída en agua destilada (16 g/L) y se vertió aún caliente en tubos de Hungate. De ambas soluciones se vertieron 2.5 mL en tubos de Hungate por separado pero solo a los tubos con medio líquido se les realizó el cambio de atmósferas con  $N_2-CO_2$  por 30 segundos. Los tubos se esterilizaron por separado a  $121^\circ C$  durante 15 minutos.

Para el aislamiento se fundieron 12 tubos con Gelrite en baño maría y se mantuvieron semi-líquidos en un baño de agua a  $60^\circ C$ . A los tubos con el medio líquido se les agregaron los substratos correspondientes según el proceso metabólico observado para cada muestra y  $NaHCO_3$  necesario para ajustar a pH 7.0. Inmediatamente se hizo la serie de diluciones tomando 0.5 mL de la muestra original como inóculo para el primer tubo de medio líquido; de éste se tomaron 0.5mL y se inyectaron en el siguiente y así sucesivamente. Una vez hecha la serie de diluciones se introdujeron todos los tubos dentro del baño de agua.

Utilizando jeringas purgadas con  $N_2$  se transfirieron los 2.5mL de medio con inóculo en los tubos con Gelrite, para una concentración final 1X. Finalmente se solidificaron con un trozo de hielo y se incubaron a  $60^\circ C$  hasta la formación de colonias, que aconteció alrededor de la sexta semana (figura 2.4.b).

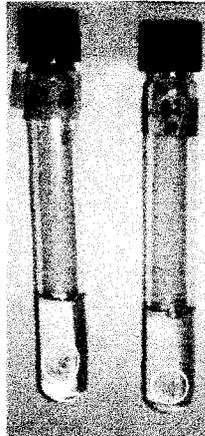


**Figura 2.4.a.** Formación de colonias de bacterias mesofílicas crecidas sobre agar a  $35^\circ C$  luego de 2 semanas de incubación. **b.** Formación de colonias de bacterias termofílicas sobre gelrite a  $60^\circ C$  después de 6 semanas de incubación.

### **2.4.2. Selección de colonias**

Los tubos de mayor dilución ( $10^{-8}$  a  $10^{-12}$ ) fueron escogidos generalmente para transferir las colonias aisladas a medio líquido, e inmediatamente a una nueva serie de tubos con medio sólido. Dado que en este paso no teníamos un parámetro para discernir si se trataba de una BRTS, la selección de las colonias se hizo tomando en cuenta su morfología y grado de aislamiento.

Las colonias seleccionadas se transfirieron a medio líquido con ayuda de una pipeta Pasteur con la punta ligeramente doblada dentro de una cámara anaerobia (Coy). Las cepas aisladas se reinocularon en agar de 2 a 5 veces más hasta observar uniformidad en las colonias. Finalmente se pasaron a una serie de 12 diluciones en medio líquido (figura 2.5).



**Figura 2.5.** Traslado de colonias a medio líquido para confirmar su pureza y posterior propagación a mayor volumen.

### **2.4.3. Evaluación de pureza**

Después de la serie de aislamientos en medio líquido se hicieron observaciones constantes al microscopio para determinar uniformidad en la morfología de las bacterias. Posterior a la apreciación microscópica se hicieron inoculaciones en medio que contenía glucosa 20 mM para descartar crecimiento de bacterias contaminantes. (Bonilla, 1999).

## 2.5. Caracterización fisiológica

### 2.5.1. Tinción de Gram – Microscopía de contraste de fases

Para la tinción de Gram se prepararon las siguientes soluciones de trabajo:

#### 1.-Cristal violeta

Solución A		Solución B	
Cristal violeta	2 g	Oxalato de amonio	0.8 g
Etanol 95%	2 mL	Agua destilada	80 mL

Mezclar las soluciones A y B y almacenar por 24h, filtrar antes de su uso.

#### 2.- Mordente

Yodo	1 g
Ioduro de potasio	2 g,
Agua destilada	300 mL

Mezclar en un mortero el yodo y el ioduro de potasio adicionando lentamente el agua hasta la completa disolución de ambos, almacenar en frasco ámbar.

#### 3.- Solvente de decoloración

Etanol 95% (v/v)

#### 4.- Colorante secundario

Safranina	10 mL (2.5 % (p/V) en etanol 95 %)
Agua destilada	90 mL

Disolver 2.5 g de safranina en etanol al 95 % y aforar a 100 mL, diluir 10 mL de esta mezcla en 90 mL de agua destilada.

Las muestras se fijaron al calor sobre un porta-objetos y se sumergieron en cristal violeta por un minuto. Se lavaron con agua destilada cuidadosamente hasta quitar el exceso de colorante y se les agregó la solución mordente que se dejó actuar por el mismo lapso de tiempo. Se lavaron nuevamente con agua destilada y se les añadió el solvente de decoloración por 30 segundos. Se limpiaron los restos con papel absorbente, se sumergieron 30 segundos más en el colorante secundario y finalmente se lavaron con agua destilada hasta quitar el exceso de colorante (Murray *et al.*, 1994). Las muestras se secaron a temperatura ambiente y fueron observadas en un microscopio óptico de contraste de fases Olympus BH-2 con objetivo de inmersión 100x (figura 2.6).

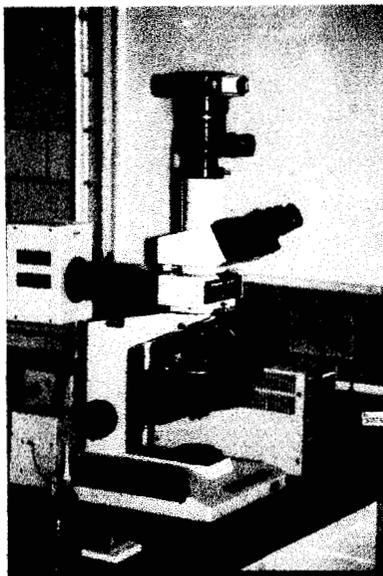


Figura 2.6. Microscopio óptico de contraste de fases Olympus BH-2.

### 2.5.2. *Microscopía electrónica*

La preparación de muestras biológicas para su observación en microscopio electrónico de barrido se llevó a cabo en 5 pasos: 1) Fijación primaria con glutaraldehído 2) Lavado con amortiguador de fosfatos 3) Fijación secundaria con tetraóxido de osmio 4) Deshidratación con alcohol y 5) Desección al punto crítico.

Soluciones de trabajo:

- Glutaraldehído al 2.5 %
- Amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 7.2
- Solución de tetraóxido de osmio al 2%
- Soluciones porcentuales de alcohol etílico 30, 50, 70, 85, 90 y 100%

#### Procedimiento

Las bacterias en fase exponencial de un cultivo puro de 20 mL se colectaron por centrifugación a 14,000g durante 15 minutos. El botón bacteriano se transfirió a un tubo eppendorf y se cubrió con glutaraldehído al 2.5% dejándose en refrigeración a  $-4^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

La muestra se decantó y se lavó de 3 a 5 veces con amortiguador de fosfatos, pero ya sin centrifugar. A partir de este paso y hasta la desecación, se trabajó con guantes de látex y dentro de una campana de extracción.

La muestra libre de amortiguador de fosfatos se cubrió con tetraóxido de osmio al 2% y se selló el tubo dejándose reposar por 2 horas (el tetraóxido de osmio es un metal pesado que facilita el contraste frente al flujo de electrones; fácilmente volatiliza, por lo que siempre debe utilizarse bajo campana de extracción y no tocar la piel).

Se decantó el osmio en un contenedor especial y se procedió a deshidratar la muestra con 2 cambios de 15 minutos cada uno, de los alcoholes al 30, 50 y 70% dejándose reposar toda la noche en esta última dilución. La deshidratación hasta etanol absoluto continuó al siguiente día. La muestra tratada se pasó a una cápsula microporosa y se sumergió en etanol absoluto.

La muestra se desecó al punto crítico con CO<sub>2</sub> líquido. Una vez en forma de polvo, se montó sobre una cinta carbón adherida a un portamuestras. Finalmente, se dio un recubrimiento carbón-oro por 250 segundos (Bozzola y Russell, 1991; Yacamán y Reyes, 1995).

Las muestras se observaron en un microscopio electrónico (JEOL-5900) de bajo vacío en un rango de 10 a 15kV y aumentos de 3 000 a 40,000 X.

### ***2.5.3. Temperatura óptima***

Para determinar la temperatura óptima de crecimiento de las cepas aisladas, se hicieron tres resiembras consecutivas en el mismo medio de propagación, tubo a tubo por triplicado. Se cuantificó el crecimiento de las bacterias aisladas cada 24 horas a 9 temperaturas diferentes (15, 25, 32, 35, 40, 50, 60, 70, y 80°C), en un espectrofotómetro (Spectronic 20) a 580nm. Se elaboró una curva de crecimiento para cada temperatura y se calculó la velocidad de crecimiento específico como se indica en el apartado 2.7 de manejo de datos al final de este capítulo.

### ***2.5.4. Salinidad óptima***

Para determinar la salinidad óptima de crecimiento de las cepas aisladas, se hicieron tres resiembras de las bacterias aisladas tubo a tubo por triplicado a 17 concentraciones diferentes de NaCl (0, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, y 200 g/L). Se utilizó el mismo medio de propagación y cada cepa fue incubada a la temperatura que resultó óptima para su crecimiento.

### 2.5.5. pH óptimo

Para determinar el pH óptimo de crecimiento de cada una de las cepas aisladas, se prepararon dos litros de medio de cultivo anaerobio por cepa, con la concentración de NaCl que resultó óptima para su crecimiento.

El primer litro fue ajustado a pH 2.0 con HCl (1M) y el segundo a pH 7.0 con KOH (1M), se vertieron en tubos de Hungate, se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos y se guardaron por separado.

Después de agregar los substratos requeridos para su crecimiento, una serie de 8 tubos (por cuatriplicado), se ajustó a valores de pH por debajo de 7.0 (4.5, 5.0, 5.2, 5.5, 6.0, 6.5, 6.7, y 6.9) con NaHCO<sub>3</sub> (2%). Otra serie de 8 tubos del segundo medio (también por cuatriplicado) se ajustó a valores de pH por arriba de 6.9 (7.0, 7.3, 7.5, 7.7, 8.0, 8.5, 9.0, 9.2) con NaHCO<sub>3</sub> (10%).

Luego de la inoculación, el cuarto tubo de cada serie se sacrificó y se tomó el pH inicial. Cada cepa se incubó a la temperatura que resultó óptima para su crecimiento. Cuando se concluyó con el experimento, se sacrificaron los tubos para medir el pH final y determinar las variaciones de pH con respecto al pH inicial.

### 2.5.6 Determinación de la enzima catalasa

Para comprobar la ausencia de la enzima catalasa, en un cultivo fresco de 5 ml en crecimiento exponencial, se inyectaron 500µl de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%. Se tomó como control positivo un tubo con 5 mL de la cepa *Pseudomonas aureaginosa* M113.

### 2.5.7. Donadores de electrones – fuentes de carbono

Para determinar las fuentes de carbono idóneas, que las cepas aisladas son capaces de utilizar, se prepararon los substratos que se muestran en la tabla 2.4. Los compuestos solubles en agua destilada se prepararon a una concentración 1M. Algunos fueron esterilizados en autoclave y otros como los azúcares, fueron filtrados. Los compuestos insolubles en agua destilada se pesaron directamente en el tubo previo a la agregación del medio de cultivo. La concentración final para todos los substratos fue de 20 mM, excepto para la peptona, extracto de levadura y casaminoácidos que fue de 2.5 g/L y para los compuestos aromáticos que se manejaron a 0.5 g/L. El medio de cultivo para el caso específico de las cepas MET2 y MET12 fue enriquecido además con 0.1 g/L de extracto de levadura (Hernández-Eugenio *et al.*, 2000; Jeanthon *et al.*, 1995).

Los substratos se probaron cada uno en series de tres tubos, por triplicado. Se cuantificó el crecimiento celular en un espectrofotómetro (Spectronic 20) a 580 nm. Se utilizó un blanco que contenía medio de cultivo para calibrar el aparato, así como un control con medio de cultivo y bacteria sin substrato. Se tomó dicho control de referencia para hacer una segunda y tercera reinoculación tubo a tubo, toda vez que el crecimiento bacteriano alcanzaba la fase estacionaria. Los ensayos en los cuales la bacteria formaba floculos fueron agitados, mientras que aquellos que presentaban precipitación cristalina como el Bifenilo y el DBT, se mantuvieron cuidadosamente en posición vertical, para tomar sólo la lectura del sobrenadante.

**Tabla 2.3** Fuentes de carbono utilizadas como donadores de electrones, para las cepas aisladas.

<b>Alcoholes</b>	<b>Cetonas</b>	<b>Substratos complejos</b>
Etanol	acetona	Casaminoácidos
Fenol		E. de levadura
Glicerol	<b>Compuestos azufrados</b>	Pep.de caseína
Manitol	Dimetil sulfóxido	
Metanol		<b>Sales de ácidos orgánicos</b>
Sorbitol	<b>Azucares</b>	Acetato
	Fructosa	Lactato
<b>Acidos orgánicos</b>	Galactosa	Citrato
Ascórbico	Glucosa	Formiato
Fumárico	Manosa	
Láctico	Ribosa	<b>Acidos grasos volátiles</b>
Málico	Sacarosa	Acético
Pirúvico	D-xilosa	Butírico
	L-xilosa	Fórmico
<b>Compuestos aromáticos</b>		Succínico
Bifenilo		
DBT		
Tolueno		

### 2.5.8. Aceptores de electrones

Se hicieron tres resiembras de las cepas aisladas tubo a tubo por triplicado con 4 diferentes compuestos azufrados como aceptores de electrones: azufre elemental, sulfato de sodio, tiosulfato de sodio y dimetil sulfóxido, todos a una concentración de 20 mM. Todos los aceptores se agregaron de soluciones stock estériles, excepto el azufre elemental, el cual se pesó directamente en el tubo antes de agregar el medio líquido. Se utilizó un tubo con medio como blanco de calibración y otro tubo que contenía a la bacteria sin aceptor de electrones como control negativo. El crecimiento bacteriano se midió en un espectrofotómetro (Spectronic 20) a 580nm, así como la producción de ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) a 480nm, detectado por el método de Cord-Ruwish (Cord-Ruwish, 1985).

## 2.6 Caracterización filogenética

### 2.6.1. Extracción y purificación de DNA total

Se colectaron las bacterias de un cultivo fresco de 100 mL en fase de crecimiento exponencial, por centrifugación a 14,000 g durante 15 minutos. El botón de bacterias se homogeneizó con 1mL de una mezcla de N-lauril-sarcosinato (NLS) al 10%; dodecil sulfato de sodio (SDS) 10% y proteinasa K y se dejó incubando por tres horas a 55°C. La muestra se dividió en 2 viales y se agregaron a cada uno 500 µl de fenol-cloroformo; se agitaron vigorosamente en vórtex y se centrifugaron a 14,000 g durante 10 minutos. Se recuperó la fase acuosa conteniendo el DNA y se agregó un 10 % de acetato de sodio 3 M con respecto al volumen obtenido y el doble de volumen de etanol absoluto. Se refrigeró la muestra a -20°C por una hora, y después se centrifugó a 14,000g durante 10 minutos.

Se decantó el sobrenadante y el DNA se secó en una cámara de vacío (SpeedVAC) a 60°C por 10 minutos. El DNA se resuspendió en 100 µl de amortiguador P1 (Tris-HCl 50 mM; EDTA 10 mM; conteniendo RNasa 100 µg/mL) (GIBCO BRL) y se incubó a 37°C por 30 minutos (Beji *et al.*, 1987). La integridad del DNA, se determinó por corrimiento de 5 µl de la resuspensión en un gel de agarosa al 0.8 % en amortiguador TAE a 100 V durante 15 minutos.

### 2.6.2. Amplificación de la subunidad ribosomal 16S (16S rDNA).

El DNA purificado se usó para amplificar el gene 16S rDNA por PCR. La mezcla de reacción para PCR se preparó con lo siguiente: Amortiguador de PCR 10X (Tris-HCl 100 mM; KCl 500 mM; MgCl<sub>2</sub> 15 mM; Tritón 1 %) 5 µl; MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 10 µl; DNTP's 5 µl de cada uno (dATP, dCTP, dTTP, dGTP); Oligos iniciadores 1 µl de cada uno (≅ 100 pmol); enzima Taq polimerasa 1 µl (equivalente a 0.5 U); DNA del purificado (5 a 10 µl) y agua destilada, para completar un volumen final de 50 µl. El programa con el que se llevó a cabo la amplificación se muestra en la tabla 2.4.

Tabla 2.4 Instrucciones programadas en el termociclador, para la amplificación del gene 16S.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94°C	2 min
2	55	1
3	72	2
4	94	1
5	30 veces al	paso 2
6	55	5
7	72	10
8	4	finalizar

Los oligos iniciadores utilizados, corresponden a las posiciones 8-27 y 1492-1510 del gene 16S de *E.coli*.

Iniciador 5' → 3': 5'<AGAGTTTGATCCTGGCTCAG<3'.

Iniciador 3' → 5': 5'<GGTTACCTTGTTACGACTT<3'. (Haridon *et al.*, 1998).

El producto amplificado se corrió en su totalidad en un gel de agarosa al 0.8% en amortiguador TAE, a 100V por 30 a 40 minutos. Se usó como marcador de peso, DNA del fago  $\lambda$  digerido con la enzima HindIII, que contiene bandas desde 125 pb hasta 23,130 pb. El amplificado se recuperó siguiendo el protocolo "Método rápido de extracción de DNA en gel de agarosa" (GIBCO BRL).

### 2.6.3. Clonación

#### 2.6.3.1. Inserción al plásmido pMOSBlue

Una vez obtenido el amplificado del gene 16S rDNA de 1500 pb aproximadamente, se designó una parte a la secuenciación directa y la otra se introdujo dentro del plásmido pMOSBlue, un plásmido diseñado para clonar productos de PCR que permite seleccionar por color (azul - blanco) las clonas bacterianas transformadas con la construcción. Primeramente el producto se fosforiló a 22°C por 40 minutos en una mezcla pK de reacción conteniendo lo siguiente: Amortiguador pK 10X 1 $\mu$ L; DDT 100 mM 0.5  $\mu$ l; pK enzima 1 $\mu$ l; DNA del amplificado 5  $\mu$ l. La ligación al vector se realizó con 1 $\mu$ l de pMOSBlue y 1 $\mu$ l de DNA T4 ligasa a 16°C por 12 horas.

#### 2.6.3.2. Transformación en células competentes y replicación del plásmido

La construcción se introdujo en bacterias XL1-Blue competentes, preparadas por el método de CaCl<sub>2</sub>. Las bacterias guardadas con glicerol a -80 °C, se sacaron y se descongelaron 10 minutos en hielo. El plásmido añadió y se introdujo en las bacterias a través de un choque térmico a 43°C en un baño de agua por 45 segundos. Se les agregó 1 mL de medio de cultivo LB ( peptona biotriptasa 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g, agua destilada 1000 mL) y se incubaron a 37°C durante 45 minutos.

Las células se centrifugaron a 14000 g durante 1 minuto, se decantó el sobrenadante y se les agregaron 10  $\mu$ l de IPTG (24 mg/mL) y 40  $\mu$ l X-gal (50 mg/mL). Las células transformadas se sembraron en cajas de LB agar conteniendo ampicilina (50mg/mL), y se incubaron a 37°C durante 16 horas. Pasado este tiempo, las colonias que por su color blanco mostraron la presencia del plásmido con inserto, fueron seleccionadas.

Las colonias se picaron y se propagaron por separado en tubos de ensayo con 5 mL de medio LB con antibiótico a 37°C por 24 horas. El tubo que presentó buen crecimiento se resembró en 250 mL de medio LB líquido. Una vez que se observó crecimiento, se procedió a guardar la mitad de éstas en refrigeración a -4°C, y a la otra mitad se le extrajo el plásmido siguiendo el protocolo del Wizard Plus SV – Minipreps.

#### 2.6.3.3. Extracción del plásmido

Se tomaron de 1 a 5 mL de cultivo fresco y se centrifugaron a 1000 g durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y el tubo se volteó con cuidado de no perder el botón, sobre papel secante. Se agregaron 250 µl de solución de resuspensión celular (guanidina-HCl 3 M, tween-20 20 %) y 250 µl de solución de lisis (tris-HCl 50mM, EDTA 50mM, tween-20 0.5%, tritón 100x). Se mezcló suavemente 4 veces por inversión y se incubó de 1 a 5 minutos a 37 °C hasta observar aclaramiento del lisado.

Se agregaron 10 µl de proteasa alcalina, se invirtió 4 veces el tubo y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 350 µl de solución de neutralización (NaCl 750 mM, MOPS 50 mM, isopropanol 15 %) y se invirtió el tubo nuevamente, 4 veces. Se procedió a centrifugar la muestra a 14 000 g durante 10 minutos. Se transfirió el lisado (850µl aprox.) a una columna con resina que une el DNA. Se centrifugó a 14 000 g durante 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 750 µl de solución de lavado (NaCl 1 M, MOPS 50 mM, isopropanol 15 %); se centrifugó nuevamente por 1 minuto y se repitió esta operación con 250 µl de solución de lavado.

La columna se transfirió a un tubo eppendorf nuevo y se eluyó el plásmido adicionando 100 µl de agua libre de endonucleasa y centrifugando nuevamente a la misma velocidad durante 1 minuto.

#### 2.6.4. Secuenciación

La secuencia de los nucleótidos que conforman el gene 16S de cada cepa, fue determinada por el método de terminación de cadenas por dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977) leída en un secuenciador capilar ABI PRISM modelo 310, que contiene implícito en el software el programa META-1, para análisis de datos.

## 2.7. Manejo de datos

Para determinar la velocidad de crecimiento específico de las cepas ante un estímulo dado (temperatura, salinidad, pH), se tomo como base la siguiente relación:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{ec.1}$$

donde **X** es alguna manifestación de la concentración celular (D.O., concentración celular, concentración proteica) y  $\mu$  la velocidad de crecimiento específico. Si la ecuación 1 se integra, se obtiene la fórmula que refleja las actividades de una población microbiana típica de un cultivo cerrado (ecuaciones 2 y 3).

$$\int \frac{dX}{X} = \int \mu dt \quad \text{ec. 2}$$

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t \quad \text{ec. 3}$$

**X<sub>0</sub>** es el número de células a tiempo cero, X es el número de células a tiempo **t**, siendo éste el tiempo transcurrido mientras se mide el crecimiento. Para determinar el óptimo de la condición que se busca, se toman los puntos que abarquen la fase de **crecimiento exponencial** resultantes del proceso anterior, y se encuentra la pendiente. Los valores obtenidos se expresan en términos de velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ), cuyas unidades se refieren a tiempo **h<sup>-1</sup>** (Quintero, 1990). La representación gráfica de la ecuación 3 se muestra en la siguiente figura.

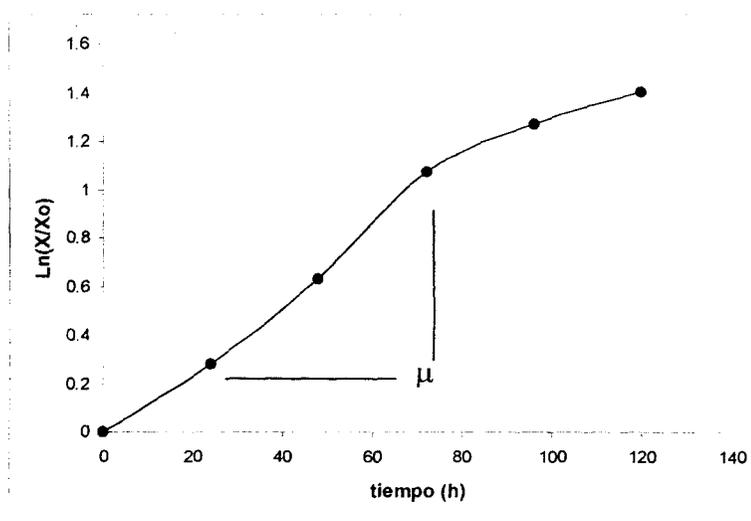


Figura 2.7. Representación gráfica de la velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) dada a partir de la ecuación 3.

## 3.1 Selección de muestras

Se trabajaron 16 muestras de agua de separación, agua de batería y crudo colectadas de pozos petroleros ubicados en el Golfo de México (tabla 2.1). Todas se encontraban en medio basal ajustado a pH 7.0 con 20 mM de tiosulfato de sodio y fueron transferidas para su propagación en medios enriquecidos con 5 variaciones: en el donador de electrones, en el pH y en la fuente de energía (tabla 2.2), con el fin de identificar procesos de dismutación o de reducción del tiosulfato de sodio detectados por la producción de H<sub>2</sub>S.

Seis muestras (2, 3, 4, 5, 7 y 14) fueron descartadas desde el inicio porque en ningún tratamiento presentaron producción del ácido y solo tres de las restantes (muestras 1, 12 y 15), mantuvieron la producción constante de éste hasta la tercera propagación.

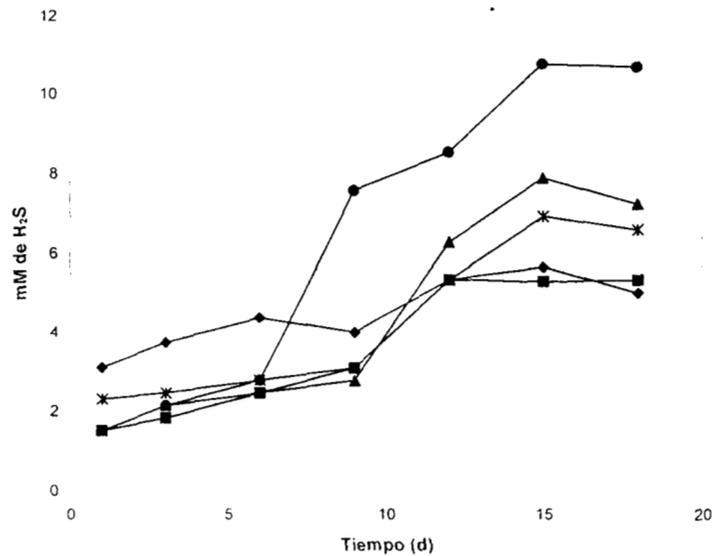
Se hicieron tres resiembras sucesivas en medio basal con el enriquecimiento respectivo, las reinoculaciones se efectuaron toda vez que las concentraciones de H<sub>2</sub>S llegaban a un rango entre 20 y 40 mM. En todas las muestras positivas, el tratamiento con el que se detectó mayor crecimiento y producción de H<sub>2</sub>S fue el implementado con peptona (5 g/L) e H<sub>2</sub> (2 bar) a pH 7.0.

## 3.2. Cepa MET-2

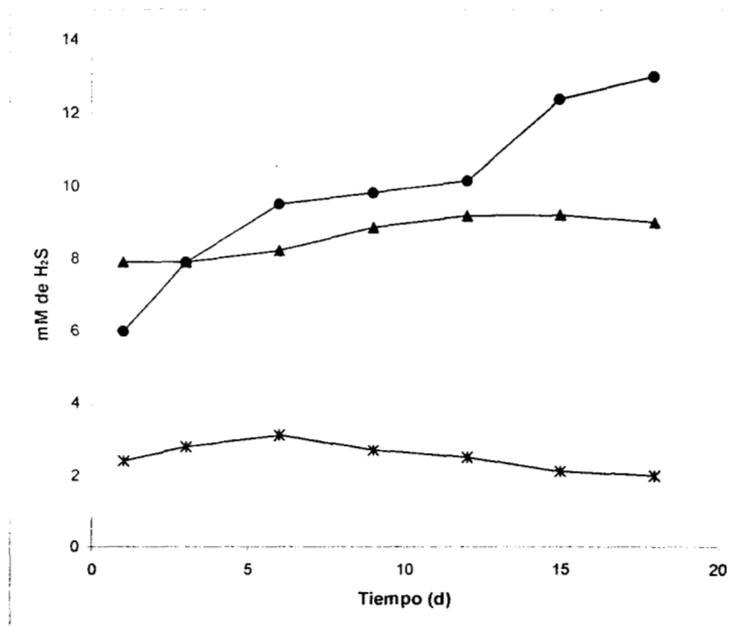
### 3.2.1. Aislamiento

La producción de H<sub>2</sub>S a lo largo de las resiembras de la muestra 1 se puede apreciar en las figuras 3.1 a 3.3, donde se observa que el tratamiento 5 enriquecido con peptona de caseína (5.0g/L) e hidrógeno (2 bar), fue el óptimo para el crecimiento y la reducción del tiosulfato de sodio por los microorganismos de esta muestra.

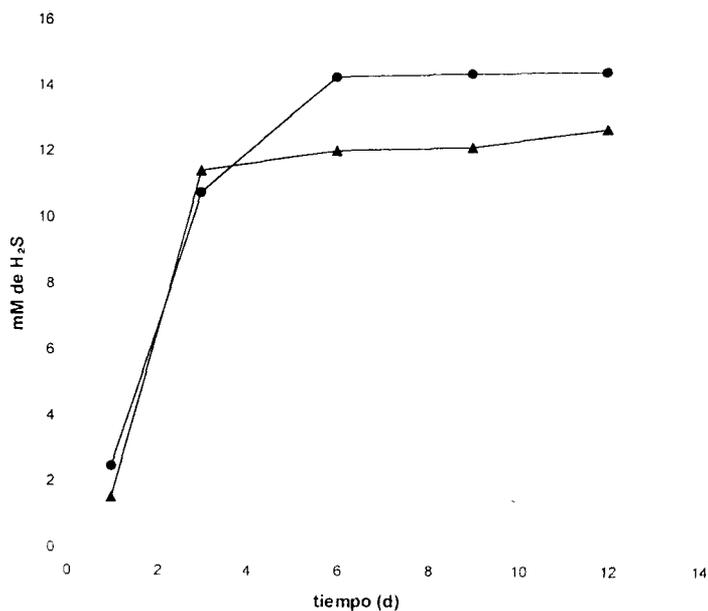
Para el aislamiento de bacterias de la muestra 1 se escogieron 20 colonias de manera aleatoria de los tratamientos que presentaron la mayor producción de H<sub>2</sub>S. Las colonias presentaron diferentes morfologías (tabla 3.1). Los aislamientos crecidos con peptona - hidrógeno, mantuvieron hasta el final la reducción constante del tiosulfato de sodio. Las colonias crecidas con este tratamiento eran de color negro o café, de diámetro variable (1 a 2 mm) y diversidad en la forma, elevación y borde.



**Figura 3.1.** Producción de H<sub>2</sub>S disuelto de la muestra 1, (primera propagación), utilizando 5 tratamientos para identificar procesos de dismutación o de reducción del tiosulfato de sodio. (♦tratamiento 1, con casaminoácidos 0.1g/L); (■ tratamiento 2, con peptona 0.1g/L); (▲ tratamiento 3, con casaminoácidos 5.0g/L); (+ tratamiento 4, con casaminoácidos 5.0g/L e hidrógeno 2 bar); (● tratamiento 5, con peptona 5.0g/L e hidrógeno 2 bar).



**Figura 3.2.** Producción de H<sub>2</sub>S disuelto de la muestra 1, (segunda propagación), utilizando los 3 tratamientos que presentaron mayor producción. (▲ tratamiento 3); (\*) tratamiento 4); (●tratamiento 5).



**Figura 3.3.** Producción de H<sub>2</sub>S disuelto de la muestra 1 (tercera propagación), utilizando los 2 tratamientos que presentaron mayor producción. (▲ tratamiento 3); (● tratamiento 5).

**Tabla 3.1.** Colonias seleccionadas para la serie de aislamientos de la muestra 1. La sobresaliente corresponde a la cepa MET-2.

Colonia	Tratamiento	Dilución	Forma	Elevación	Borde	Diámetro	Color
1	Casamino	10 <sup>-7</sup>	Rizoide	Convexa	Filamentoso	2.0 mm	Café
2	Casamino	10 <sup>-7</sup>	Fusiforme	Plana	Entero	5.0	Beige
3	Pept-H <sub>2</sub>	10 <sup>-10</sup>	Circular	Convexa	"	1.5	Negra
4	Casam-H <sub>2</sub>	10 <sup>-7</sup>	"	Umbonada	"	1.5	Café
5	Pept-H <sub>2</sub>	10 <sup>-11</sup>	"	Convexa	"	1.0	Negra
6	Pept-H <sub>2</sub>	10 <sup>-9</sup>	"	"	"	1.0	Negra
7	Casamino	10 <sup>-8</sup>	"	Plana	"	1.0	Negra
8	Casamino	10 <sup>-8</sup>	Amiboide	Elevada	Amiboide	3	Ocre
9	Casamino	10 <sup>-6</sup>	"	"	"	1.0	Negra
10	Casam-H <sub>2</sub>	10 <sup>-5</sup>	Fusiforme	Plana	Entero	1.0	Café
11	Casam-H <sub>2</sub>	10 <sup>-5</sup>	Amiboide	Elevada	Ondulado	2.0	Verduzca
12	Casam-H <sub>2</sub>	10 <sup>-4</sup>	Circ-amiboide	"	"	1.5	Negra
13	Pept-H <sub>2</sub>	10 <sup>-5</sup>	Fusiforme	Plana	Entero	1.0	Café
14	Casamino	10 <sup>-9</sup>	"	"	"	1.0	Negra
15	Casam-H <sub>2</sub>	10 <sup>-8</sup>	Circ-irregular	"	Ondulado	1.0	Negra
16	Casam-H <sub>2</sub>	10 <sup>-6</sup>	Circular	"	Entero	1.0	Café
17	Pept-H <sub>2</sub>	10 <sup>-12</sup>	"	Convexa	"	2.0	Negra
18	Pept-H <sub>2</sub>	10 <sup>-7</sup>	"	Plana	"	1.0	Negra-tras
19	Pept-H <sub>2</sub>	10 <sup>-8</sup>	Fusiforme	"	"	1.0	Café
20	Pept-H <sub>2</sub>	10 <sup>-6</sup>	Circular	Elevada	"	2.5	Negra

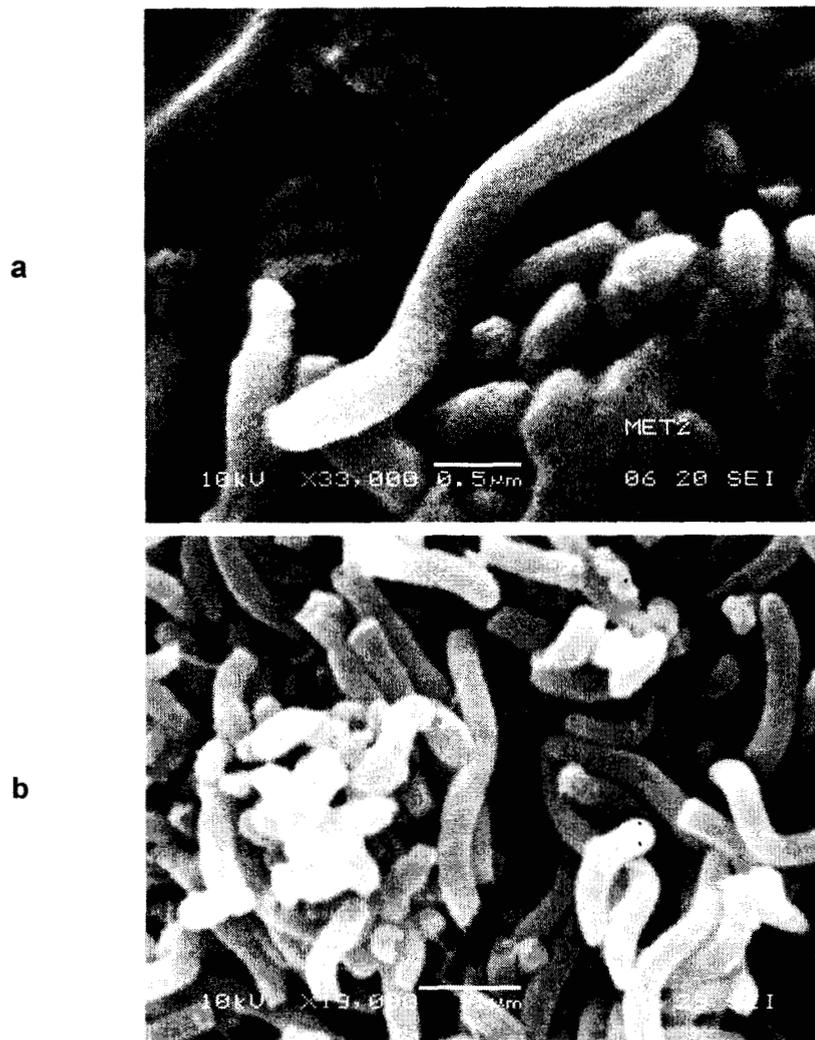
### 3.2.2. Caracterización fisiológica

#### 3.2.2.1. Tinción de Gram

De la muestra 1, procedente del pozo SAM-III, se aisló una bacteria que en cultivo fresco dio (+) a la tinción de Gram. Son vibrios uniflagelados que se presentan solos, miden aproximadamente  $3.0\mu\text{m}$  de largo por  $0.5\mu\text{m}$  de ancho. Forman colonias sobre agar de forma circular, elevadas, con borde entero, de 2.5 mm de diámetro y de color negro.

#### 3.2.2.2. Microscopía electrónica

La cepa MET-2 se trabajó para su observación al microscopio electrónico a partir de un cultivo fresco en fase exponencial. La figura 3.4 **a**, muestra el acercamiento de un vibrio individual visto a 33000x. En **b**. se aprecian los vibrios entrelazados y algunos de los flagelos que les confieren motilidad vistos a 19000.



**Figura 3.4.** Microscopía electrónica de la cepa MET-2 a 33,000 y 19,000x (respectivamente), y 10 kv. En **a** se puede apreciar la forma de una bacteria individual y en **b** algunas bacterias que muestran el flagelo que les confiere la motilidad.

### 3.2.2.3. Temperatura óptima

La cepa MET-2 se sometió a 7 temperaturas diferentes: 15, 25, 32, 35, 40, 50 y 60°C. A partir de la absorbancia promedio de los triplicados de cada temperatura, se construyó la gráfica de la figura 3.5. La velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) se calculó como se detalla en el apartado 2.7 para deducir la temperatura óptima a la cual crece esta cepa. Los resultados finales se graficaron en la figura 3.6.

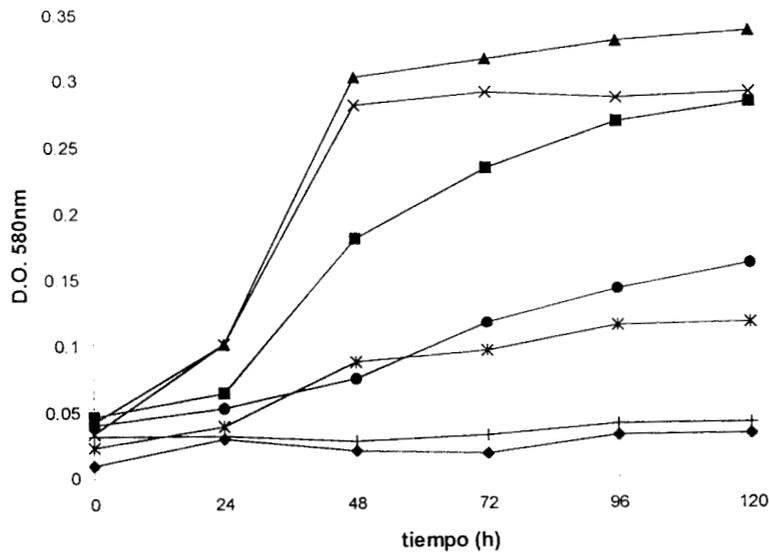


Figura 3.5. Gráfica que muestra el crecimiento de la cepa MET-2 sometida a diferentes temperaturas. (◆ 15°C); (■ 25°C); (▲ 32°C); (x 35°C); (\* 40°C); (● 50°C); (l 60°C).

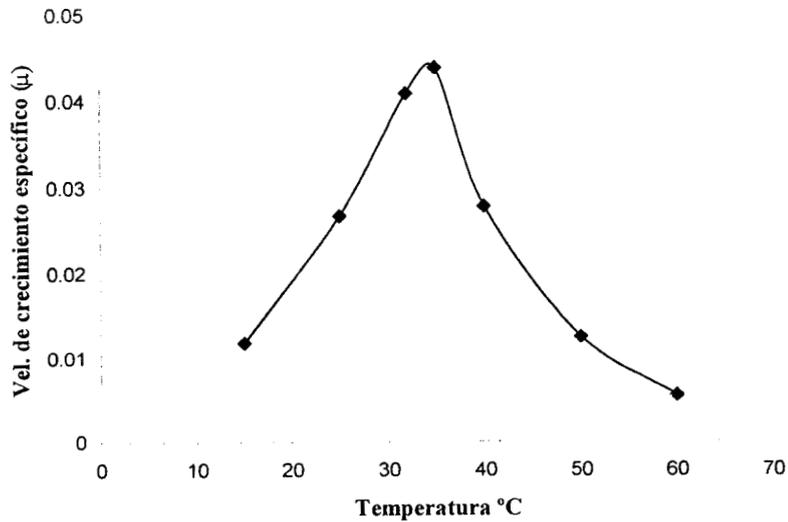


Figura 3.6. Gráfica donde se aprecia la relación de temperaturas con respecto a la velocidad de crecimiento específico ( $\mu - h^{-1}$ ) de la cepa MET-2. La temperatura óptima de crecimiento para esta cepa fue de 35°C.

### 3.2.2.4. Salinidad óptima

La cepa MET-2 se probó con 11 concentraciones diferentes de NaCl: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 y 200 g/L, a la temperatura que resultó óptima para su crecimiento (35°C). A partir de la absorbancia promedio de los triplicados se construyó la gráfica de la figura 3.7. La velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) se calculó para obtener la concentración de NaCl óptima a la cual crece esta cepa (figura 3.8).

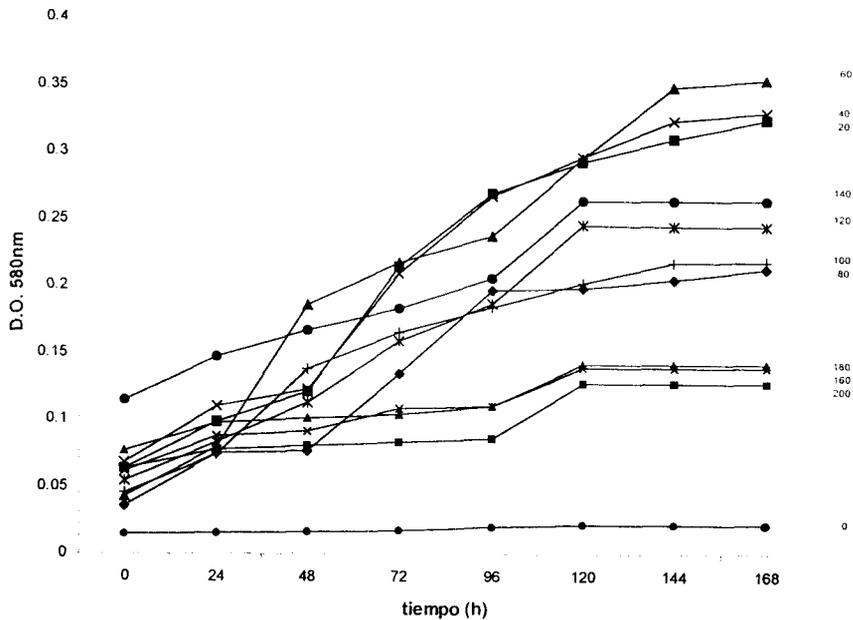


Figura 3.7. Gráfica que muestra el crecimiento de la cepa MET-2 a diferentes concentraciones de NaCl (g/L).

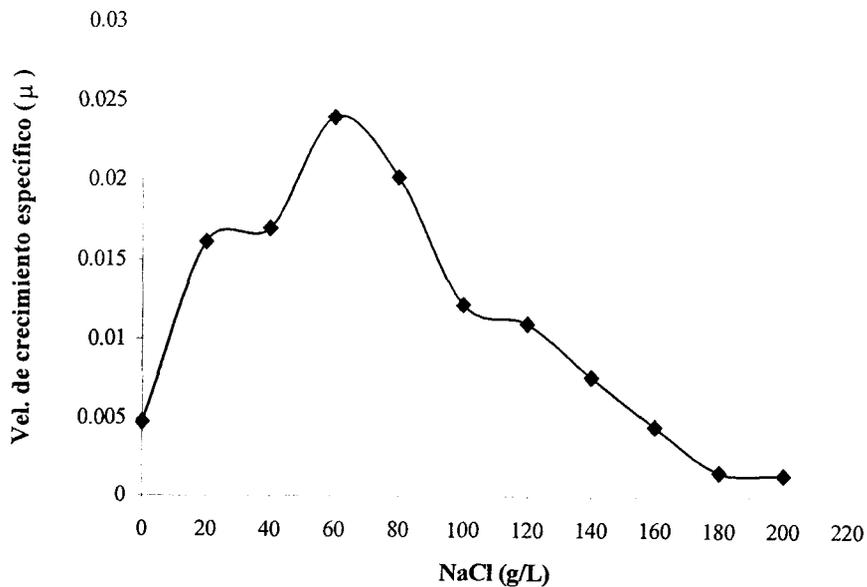


Figura 3.8. Gráfica donde se aprecia la relación de concentración de NaCl, con respecto a la velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) unidades  $h^{-1}$ . La concentración óptima de crecimiento fue de 60g/L de NaCl.

### 3.2.2.5. pH óptimo

La cepa MET-2 cultivada a 35°C y 60g/l de NaCl, se sometió a 7 valores de pH: 4.95, 5.2, 6.7, 7.0, 7.5, 8.0, 9.2. A partir de la absorbancia promedio de los triplicados se construyó la gráfica de la figura 3.9. La velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) se calculó para obtener el pH óptimo de crecimiento de esta cepa (figura 3.10).

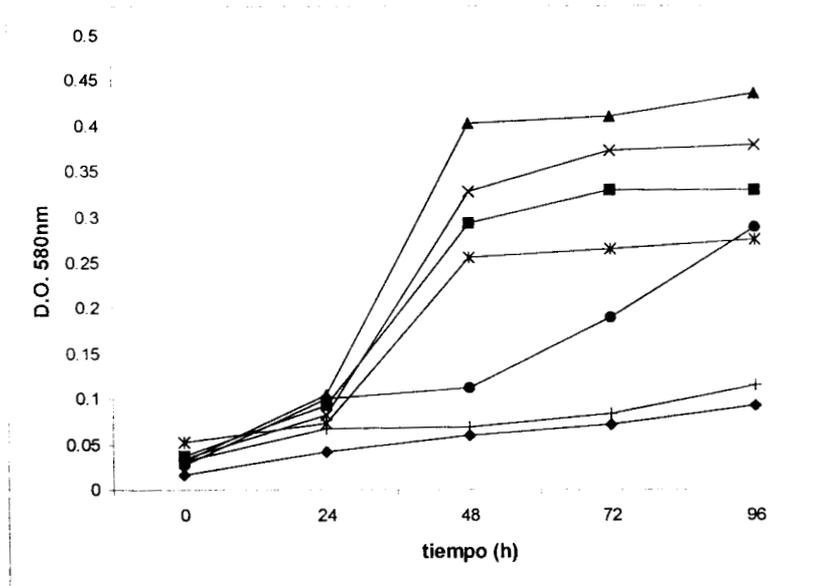


Figura 3.9. Gráfica que muestra el crecimiento de la cepa MET-2 a diferentes valores de pH. (+ 4.95); (• 5.2); (x 6.7); (▲ 7.0); (■ 7.5); (\*) 8.0); (◆ 9.2).

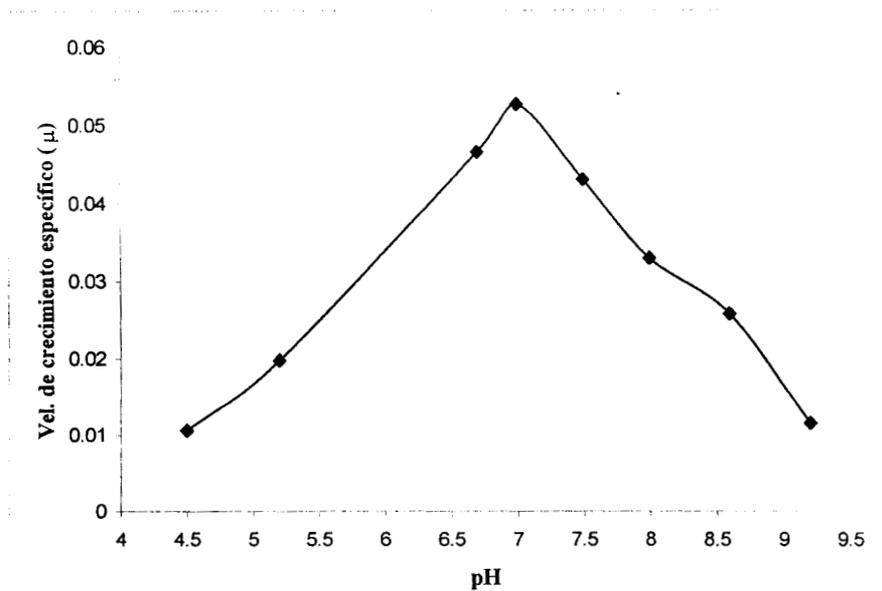


Figura 3.10. Gráfica donde se aprecia la relación de pH, con respecto a la velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) unidades  $h^{-1}$ . El pH óptimo de crecimiento de esta cepa fue de 7.0.

### 3.2.2.6. Determinación de la enzima catalasa

El ensayo para la determinación de la presencia de la enzima catalasa se realizó como se describe en el apartado 2.56. La cepa MET-2 presentó un resultado negativo a la presencia de tal enzima.

### 3.2.2.7. Donadores de electrones

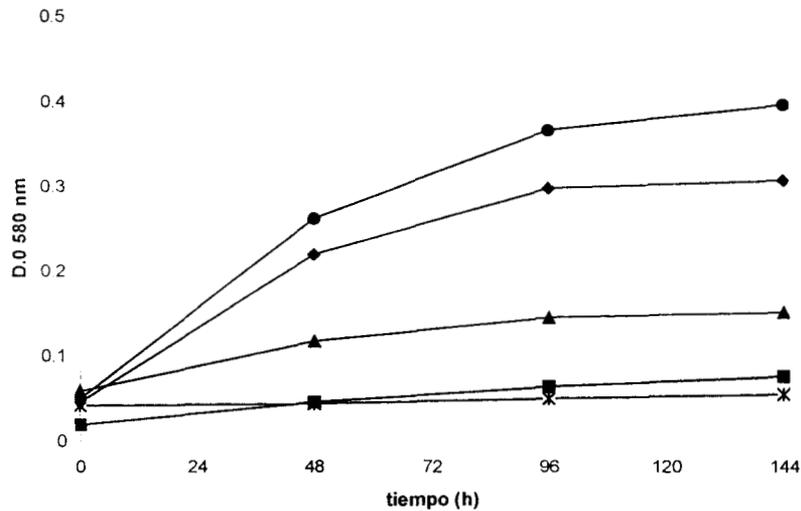
La tabla 3.2 muestra el crecimiento máximo de la cepa MET-2 registrado a diferentes tiempos, con diferentes donadores de electrones como fuentes de carbono. Los ensayos se hicieron por triplicado por lo que se muestra la desviación estándar de la media de tales lecturas.

Tabla 3.2. Muestra el crecimiento de la cepa MET-2 con diferentes sustratos como fuentes de carbono. Los valores marcados con \* presentan turbidez por la naturaleza del sustrato, mas no por crecimiento de la bacteria.

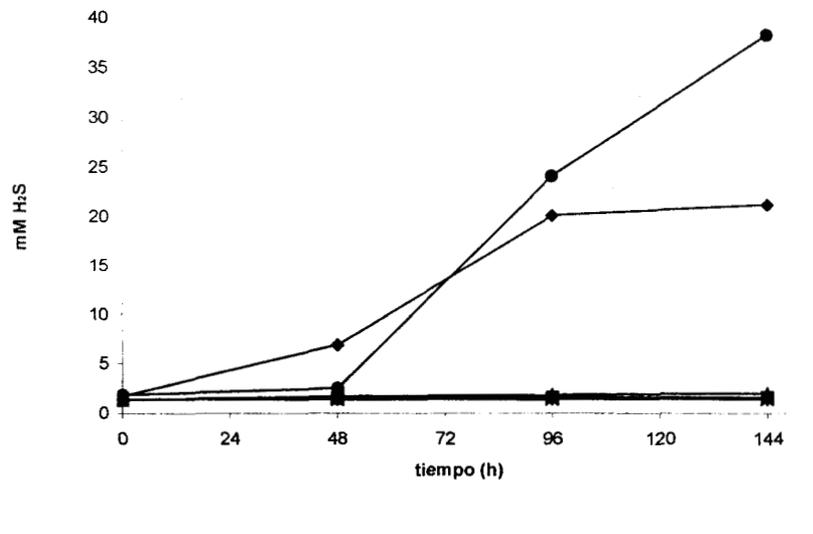
Sustrato	tiempo (d)	Abs.max. 580nm	Desv.est	H <sub>2</sub> S	Sustrato	tiempo (d)	Abs.max. 580nm	Desv.est	H <sub>2</sub> S
Control	3	0.109	0.028	+	<b>AMINOACIDOS</b>				
<b>ALCOHOLES</b>					Casamino	3	<b>0.512</b>	0.011	+
Etanol	4	<b>0.147</b>	0.067	+					
Fenol	7	0.079	0.013	-	Extracto.lev	3	<b>0.365</b>	0.007	+
Glicerol	4	<b>0.213</b>	0.009	+					
Manitol	7	<b>0.212</b>	0.001	+	<b>AZUCARES</b>				
Metanol	7	<b>0.198</b>	0.002	+	Fructosa	6	<b>0.259</b>	0.033	+
Sorbitol	6	<b>0.262</b>	0.002	+	Galactosa	4	<b>0.201</b>	0.018	+
					Glucosa	6	<b>0.225</b>	0.014	+
<b>ACIDOS ORGANICOS</b>					Manosa	4	<b>0.171</b>	0.024	+
Ascórbico	7	<b>0.232</b>	0.002	+	Ribosa	6	<b>0.219</b>	0.025	+
Fumarico	4	<b>0.301</b>	0.017	+	Sacarosa	7	<b>0.227</b>	0.002	+
Láctico	6	<b>0.438</b>	0.033	+	Xilosa	4	<b>0.207</b>	0.004	+
Malico	6	<b>0.292</b>	0.001	+					
Piruvico	4	<b>0.465</b>	0.016	+	<b>CETONAS</b>				
					Acetona	6	<b>0.133</b>	0.023	+
<b>AROMATICOS</b>									
Bifenilo	6	0.116*	0.012	+	<b>PROTEINAS</b>				
DBT	3	0.139*	0.011	+	Peptona	6	<b>0.441</b>	0.001	+
Tolueno	4	<b>0.214</b>	0.009	+					
					<b>SALES DE ACIDOS ORGANICOS</b>				
<b>ACIDOS GRASOS VOLATILES</b>					Acetato	3	<b>0.384</b>	0.016	+
Acético	7	<b>0.2445</b>	0.014	+	Lactato	3	<b>0.749</b>	0.024	+
Butírico	7	<b>0.245</b>	0.012	+	Citrato	7	<b>0.195</b>	0.007	+
Formico	4	<b>0.213</b>	0.008	+	Formiato	4	<b>0.217</b>	0.007	+
Succinico	6	<b>0.246</b>	0.004	+					
<b>COMPUESTOS AZUFRADOS</b>									
DMSO	7	<b>0.21</b>	0.02	+					

### 3.2.2.8. Aceptores de electrones

En la figura 3.11 se muestra el crecimiento de la cepa MET-2 sobre medio basal enriquecido con peptona de caseína (5g/L), hidrógeno (2 bar) y 4 diferentes aceptores de electrones: azufre elemental, dimetil sulfóxido, sulfato de sodio y tiosulfato de sodio. En la figura 3.12 se muestra la producción de H<sub>2</sub>S cuantificado cada tercer día sobre el mismo experimento donde se observa que esta cepa reduce de manera completa el sulfato y el tiosulfato de sodio.



**Figura 3.11.** Gráfica que muestra el crecimiento de la cepa MET- 2 con 4 diferentes aceptores de electrones. (+ control sin aceptor de electrones); (■ azufre); (▲dimetil sulfóxido); (◆ sulfato); (● tiosulfato).

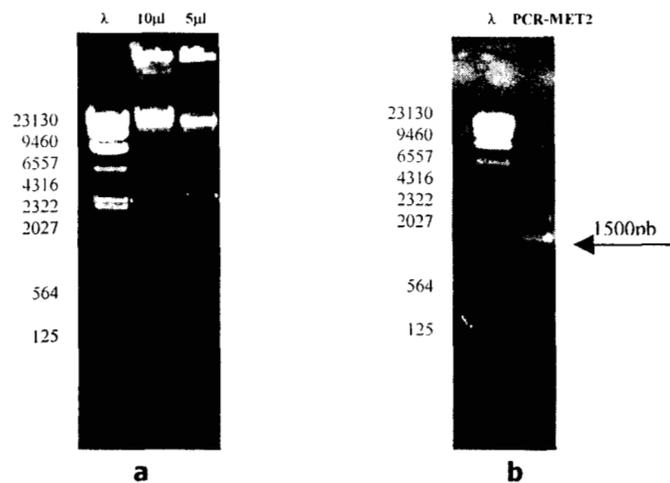


**Figura 3.12.** Gráfica que ilustra la producción de H<sub>2</sub>S de la cepa MET-2 en presencia de cuatro diferentes aceptores de electrones y peptona de caseína como donador. (\* control sin aceptor de electrones); (■ azufre); (▲dimetil sulfóxido); (◆ sulfato); (● tiosulfato).

### 3.2.3. Caracterización filogenética

#### 3.2.3.1. Extracción - purificación y amplificación de DNA total

La extracción de DNA total se llevó a cabo como se describe en el apartado 2.61. La figura 3.13.a muestra el corrimiento de 10 y 5  $\mu$ l respectivamente de DNA extraído de la cepa MET-2, donde se puede apreciar que debido al tratamiento de extracción no existe presencia de RNA ni de DNA fragmentado. La amplificación se llevó a cabo como se describió en el apartado 2.62. La figura 3.13.b muestra el corrimiento de 5  $\mu$ l del producto de la amplificación del gene 16S rDNA, donde se puede apreciar una banda de aproximadamente 1500 pb.



**Figura 3.13 a.** Corrimiento en un gel de agarosa 0.8% en TAE de DNA total extraído de la cepa MET-2 (10 y 5  $\mu$ l respectivamente) donde se aprecian las dos bandas superiores de DNA. **b.** Corrimiento de 5  $\mu$ l del amplificado de la cepa MET-2 sobre un gel de agarosa al 0.8% en TAE.

#### 3.2.3.2. Secuencia del 16S rDNA

La secuenciación del producto de PCR del gene 16S rDNA se llevó a cabo como se describió en el apartado 2.64. Las figuras 3.14.a y 3.14.b muestran las secuencias parciales de ambos extremos leídas con los iniciadores descritos en el apartado 2.62. Para el "Forward" el iniciador 5'  $\rightarrow$  3' y para el "Reverse" el iniciador 3'  $\rightarrow$  5'. Las secuencias parciales se introdujeron al GeneBank y el programa resolvió que la cepa con la que muestra un 94% de identidad es *Desulfovibrio gracilis* (U53464.1). La tabla 3.3 muestra la comparación entre la secuencia parciales de la cepa MET-2 y aquellas con las que arrojó mayor similitud: *Desulfovibrio longus* (X63623.1); *Bacterial sp 2BP48* (AF121888.1); *Bacterial sp* (X95230); *Desulfovibrio sp BG50* (U85475); *Desulfovibrio sp* (U53463); *Desulfovibrio sp* (U33316); *Desulfovibrio sp* (L42995) y *Desulfovibrio halophilus* (U48243).



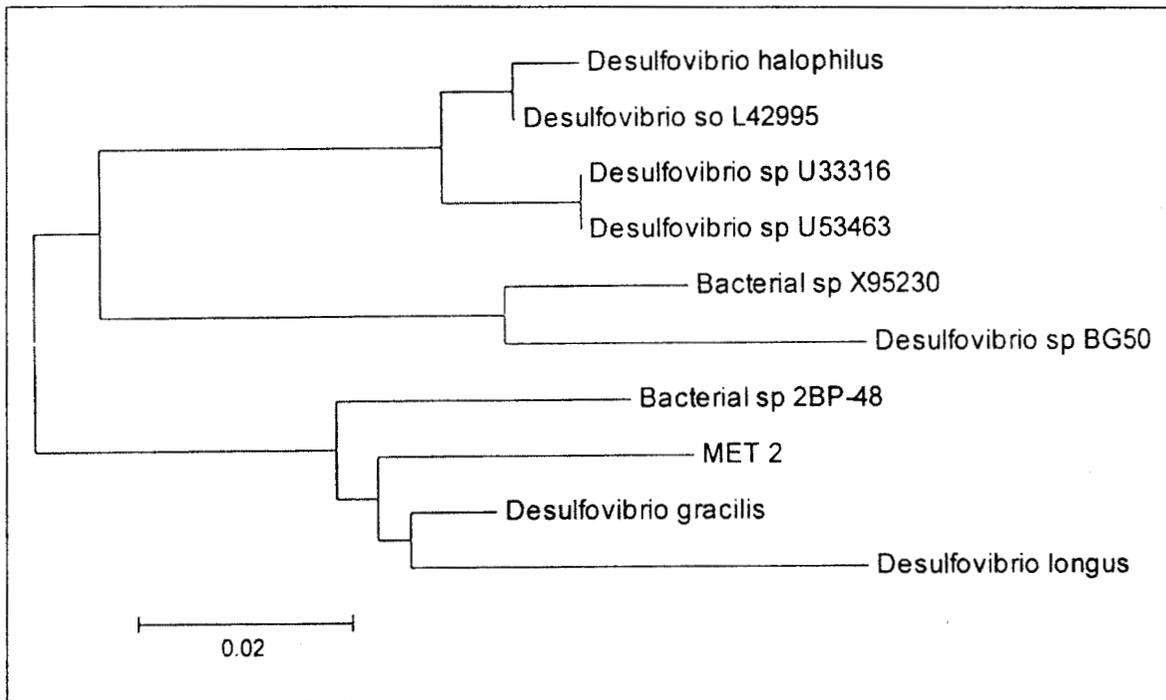
**Tabla 3.3.** Comparación de las secuencias parciales del gene 16S rDNA entre la cepa MET-2 y aquellas con las que presentó mayor similitud según el GeneBank.  
 A - adenina; C - citocina; G - guanina; T - timina; N - base no determinada.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
MET_002	-----TGANGAAGCTNCGGGCG-----TGCTTACACATGCAAGNCGAGCAGAAA--GGTCTCTTCGGGGCCCTGAGTAGAGCGGCGCACGGGGTGA											
D. graci	-----CACATGCAAGTCGAGCGAGAAA--GGATCCTTCGGGATCTGAGTAGAGCGGCGCACGGGGTGA											
D. longu	TTCCCTGAGGGTTGATCCTGGC-----TCAGGTTGAACCGCTAGCGGGC-----CGCTTAACCCATGCAAGTCNAACGAGAAA--GGTCTCTTCGGGACCTGAGTAGAGCGGCGCACGGGGTGA											
D. halop	-----GAGTTTGATCCTGGC-----TCAGATTGAACCGCTGGCGGGC-----TGCTTAAACACATGCAAGTCGTCGAGAAA--GTCTCCTTCGGGAGATGAGTAGAGCGGCGCACGGGGTGA											
D. L4299	-----ATCCTGGC-----TCAGANNGAACCGCTGGCGGGC-----TGCTTAAACACATGCAAGTCGTCGAGAAA--GTCTCCTTCGGGAGATGAGTAGAGCGGCGCACGGGGTGA											
D. U3331	-----ANAGTTTGATCCTGGC-----TCAGATTGAANGCTGGCGGGC-----TGCTTAAACACATGCAAGTCGTCGAGAAA--GTCTCCTTCGGGAGATGAGTAGAGCGGCGCACGGGGTGA											
D. U5346	-----ATTTGAACGCTGGCGGGC-----TGCTTAAACACATGCAAGTCGTCGAGAAA--GTCTCCTTCGGGAGATGAGTAGAGCGGCGCACGGGGTGA											
B. sp. X9	-----TCAGATTGAACGCTGGCGGGC-----TGCTTAAACACATGCAAGTCGAGCGAGAAA--GTCTCCTTCGGGAGATGAGTAGAGCGGCGCACGGGGTGA											
Ds. BG50	-----AGNTTTGGATCCTGGC-----TCAGATTGAANGAATTGGGGGGGGGATAACAAATGCAAGTCGAGGGCTAAAAGGGTCTTCGGGGCCTGATTAGAGCGGCGCACGGGGTGA											
B. 2BP48	-----AGAGTTTGGATCCTGGC-----TCAGATTGAANGAATTGGGGGGGGGATAACAAATGCAAGTCGAGGGCTAAAAGGGTCTTCGGGGCCTGATTAGAGCGGCGCACGGGGTGA											
MET_002	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
D. graci	GTAAACGGGTAGGTGATCTACCCCTTTGGATCGGGAT--AACAGTTGGAACCGGCTGCTAATACCGGATGTCTCCATATTTAGCTTTATGGGGAAAGGTGGCCCTGCATGCAAGCTACCA											
D. longu	GTAAACGGGTAGGTGATCTACCCCTTTGGATCGGGAT--AACAGTTGGAACCGGCTGCTAATACCGGATACCTCATATTTAGCTTTATGGGGAAAGGTGGCCCTGCATGCAAGCTACCA											
D. halop	GTAAACGGGTAGGTGATCTACCCCTTTGGATCGGGAT--AACAGTTGGAACCGGCTGCTAATACCGGATACCTCATATTTAGCTTTATGGGGAAAGGTGGCCCTGCATGCAAGCTACCA											
D. L4299	GTAAACGGGTAGGTGATCTACCCCTTTGGATCGGGAT--AACAGTTGGAACCGGCTGCTAATACCGGATACCTCATATTTAGCTTTATGGGGAAAGGTGGCCCTGCATGCAAGCTACCA											
D. U3331	GTAAACGGGTAGGTGATCTACCCCTTTGGATCGGGAT--AACAGTTGGAACCGGCTGCTAATACCGGATACCTCATATTTAGCTTTATGGGGAAAGGTGGCCCTGCATGCAAGCTACCA											
D. U5346	GTAAACGGGTAGGTGATCTACCCCTTTGGATCGGGAT--AACAGTTGGAACCGGCTGCTAATACCGGATACCTCATATTTAGCTTTATGGGGAAAGGTGGCCCTGCATGCAAGCTACCA											
B. sp. X9	GTAAACGGGTAGGTGATCTACCCCTTTGGATCGGGAT--AACAGTTGGAACCGGCTGCTAATACCGGATACCTCATATTTAGCTTTATGGGGAAAGGTGGCCCTGCATGCAAGCTACCA											
Ds. BG50	GTAAACGGGTAGGTGATCTACCCCTTTGGATCGGGAT--AACAGTTGGAACCGGCTGCTAATACCGGATACCTCATATTTAGCTTTATGGGGAAAGGTGGCCCTGCATGCAAGCTACCA											
B. 2BP48	GTAAACGGGTAGGTGATCTACCCCTTTGGATCGGGAT--AACAGTTGGAACCGGCTGCTAATACCGGATACCTCATATTTAGCTTTATGGGGAAAGGTGGCCCTGCATGCAAGCTACCA											
MET_002	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
D. graci	CCAAATGATGAACCTGCGTCTCATTAGCTTCTGTTGGTGAATGGCCCTACCAAGCGGACGATGACTACTTTGGTCTGAGAGGATGATCAGACACACTGGGACTGGAAACACACGGCCCCAG											
D. longu	CCAAAGG--ATGAACCTGCGTCTCATTAGCTTGT--TGTTGGGGTAAATGGCCCTACCAAGCGGACGATGATAGCT--GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGGAAACACACGGCCCCAG											
D. halop	CCTAAGG--ATGAACCTGCGTCTCATTAGCTTGT--TGTTGGGGTAAATGGCCCTACCAAGCGGACGATGATAGCT--GATCTGGGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGGAAACACACGGCCCCAG											
D. L4299	CTGTCCG--ATGGGCCCGGCTCATTAGCTTGT--TGTTGGGGTAAATGGCCCTACCAAGCGGACGATGATAGCT--GGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGGAAACACACGGCCCCAG											
D. U3331	CTGTCCG--ATGGGCCCGGCTCATTAGCTTGT--TGTTGGGGTAAATGGCCCTACCAAGCGGACGATGATAGCT--GGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGGAAACACACGGCCCCAG											
D. U5346	CTGTCCG--ATGGGCCCGGCTCATTAGCTTGT--TGTTGGGGTAAATGGCCCTACCAAGCGGACGATGATAGCT--GGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGGAAACACACGGCCCCAG											
B. sp. X9	CTTTTGG--ATGAGTCCGCGTCTCATTAGCTTGT--TGTTGGGGTAAATGGCCCTACCAAGCGGACGATGATAGCT--GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGGAAACACACGGCCCCAG											
Ds. BG50	CTTTTGG--ATGAGTCCGCGTCTCATTAGCTTGT--TGTTGGGGTAAATGGCCCTACCAAGCGGACGATGATAGCT--GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGGAAACACACGGCCCCAG											
B. 2BP48	CCTTGGG--ATGAACCTGCGTCTCATTAGCTTGT--TGTTGGGGTAAATGGCCCTACCAAGCGGACGATGATAGCT--GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGGAAACACACGGCCCCAG											



### 3.2.3.3. Arbol filogenético

El árbol filogenético de la cepa MET-2 se construyó con las secuencias de microorganismos pertenecientes al género *Desulfovibrio* y las bacterias descritas en el apartado anterior, con las que arrojó mayor similitud (figura 3.15).



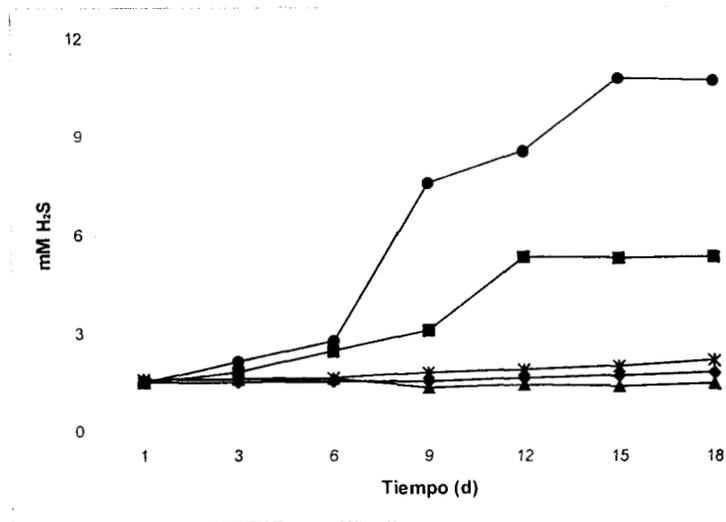
**Figura 3.15.** Árbol filogenético construido a partir de las secuencias parciales de la cepa MET-2 y los principales géneros con los que presenta similitud.

### 3.3. Cepa MET-12

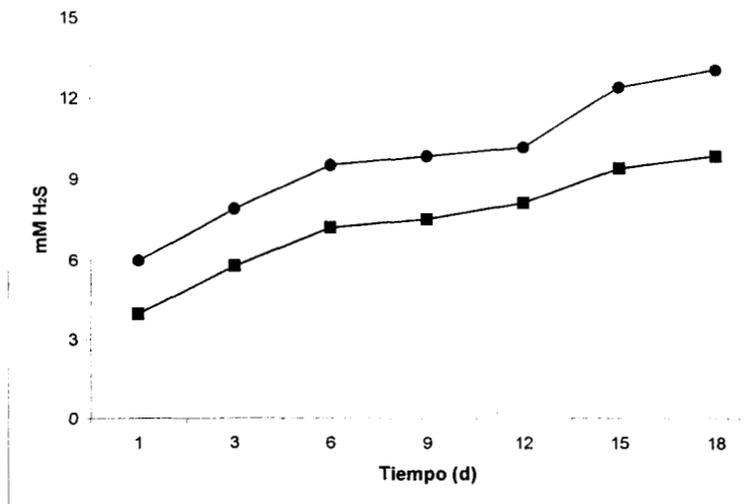
#### 3.3.1. Aislamiento

En las figuras 3.16 a 3.18 se puede apreciar la producción de  $H_2S$  a lo largo de las resiembras de la muestra 12, donde se observa que el tratamiento 5 enriquecido con peptona de caseína (5 g/L) e hidrógeno (2 bar) fue el óptimo para el crecimiento y reducción del tiosulfato de sodio por los microorganismos presentes en este pozo.

Para el aislamiento de las bacterias de la muestra 12 se escogieron 5 colonias de manera aleatoria de los tratamientos que presentaron mayor producción de  $H_2S$ . Las diferentes colonias aisladas se describen en la tabla 3.4.



**Figura 3.16.** Producción de  $H_2S$  disuelto de la muestra 12 (primera propagación), utilizando 5 tratamientos para identificar procesos de dismutación o de reducción del tiosulfato de sodio. (◆tratamiento 1, con casaminoácidos 0.1g/L); (■ tratamiento 2, con peptona 0.1g/L); (▲ tratamiento 3, con casaminoácidos 5.0g/L); (+ tratamiento 4, con casaminoácidos 5.0g/L e hidrógeno 2 bar); (● tratamiento 5, con peptona 5.0g/L e hidrógeno 2 bar).



**Figura 3.17.** Producción de  $H_2S$  disuelto de la muestra 12 (segunda propagación) utilizando los tratamientos que presentaron mayor producción del ácido: (■ tratamiento 2), (● tratamiento 5).

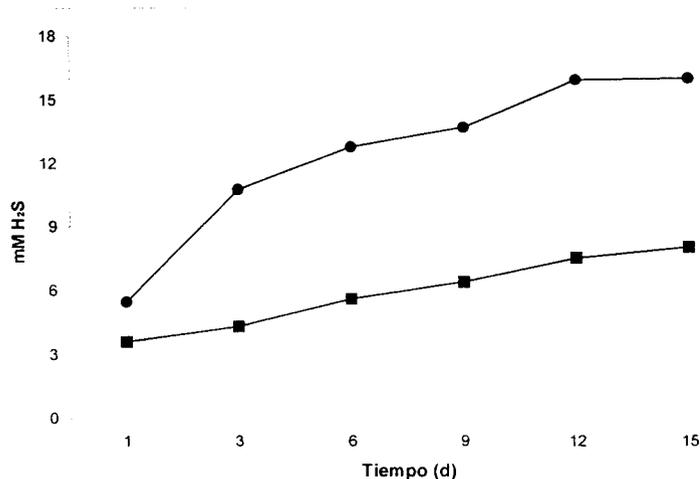


Figura 3.18. Producción de H<sub>2</sub>S disuelto de la muestra 12 (tercera propagación), utilizando los dos tratamientos que presentaron mayor producción del ácido: (■ tratamiento 2), (● tratamiento 5).

Tabla 3.4. Colonias seleccionadas para la serie de aislamientos de la muestra 12 (fila sombreada).

Colonia	Tratamiento	Dilución	Forma	Elevación	Borde	Diámetro	Color
1	Pept-H <sub>2</sub>	10 <sup>-8</sup>	Circular	Convexa	Entero	2.0 mm	Blanco
2	Pept-H <sub>2</sub>	10 <sup>-9</sup>	Circular	Convexa	Entero	2.5	Beige
3	Pept-H <sub>2</sub>	10 <sup>-12</sup>	Rizoide	Convexa	Filamentoso	1.5	Transparente
4	Pept-H <sub>2</sub>	10 <sup>-11</sup>	Amiboide	Convexa	Amiboide	2.0	Blanco
5	Pept-H <sub>2</sub>	10 <sup>-8</sup>	Circular	Convexa	Entero	2.5	Transparente

### 3.3.2. Caracterización fisiológica

#### 3.3.2.1 Tinción de Gram

De la muestra 12 procedente del pozo 21-D, se aisló una cepa que en cultivo fresco dio (-) a la tinción de Gram. Son bacilos largos con una envoltura de exopolímeros ("toga") de tamaño variable (3 a 10 μm de largo por 0.5 a 1.0 μm de ancho), que presentan motilidad y formación de colonias de hasta 2.5 mm de diámetro, circulares, convexas y de color transparente. La figura 3.19 muestra la morfología de la cepa MET-12.



Figura 3.19. Morfología de la cepa MET-12, vista en microscopio de contraste de fases con objetivo 100x. La barra mide 2.5 μm aproximadamente. La delgada capa que dividen la unión de bacilos reciben el nombre de "toga".

### 3.3.2.2. Temperatura óptima

La cepa MET-12, se sometió a 9 temperaturas diferentes: 15, 25, 32, 35, 40, 50, 60, 70 y 80°C. A partir de la absorbancia promedio de los triplicados de cada temperatura, se construyó la gráfica de la figura 3.20. La velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) se calculó como se detalló en el apartado 2.7 para deducir la temperatura óptima a la cual crece esta cepa (figura 3.21).

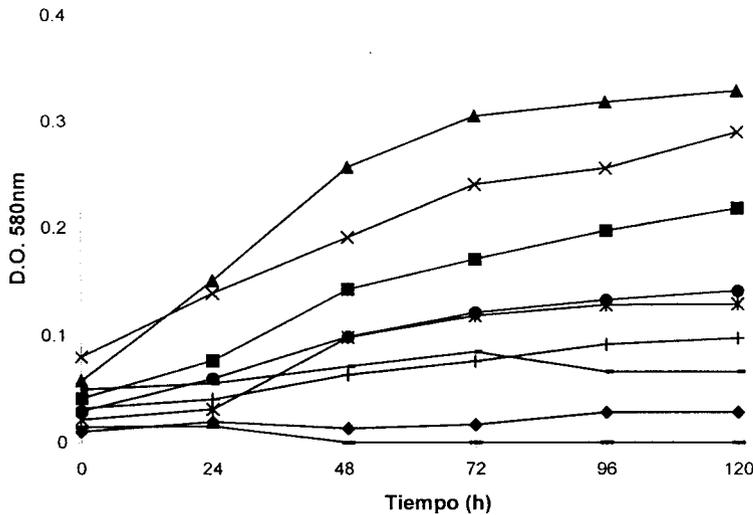


Figura 3.20. Gráfica que muestra el crecimiento de la cepa MET-12 sometida a diferentes temperaturas de incubación. (— 15°C); (| 25°C); (\* 32°C); (• 35°C); (■ 40°C); (x 50°C); (▲ 60 °C); (- 70°C); (♦ 80°C).

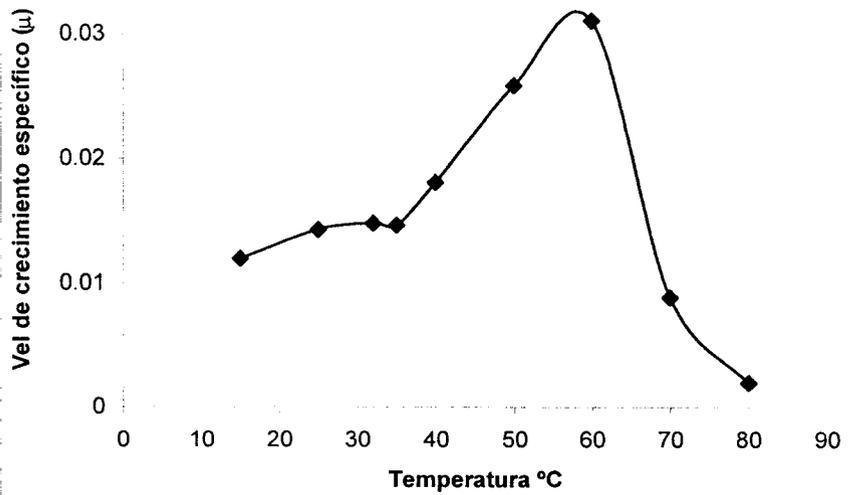


Figura 3.21. Gráfica donde se aprecia la relación de temperaturas con respecto a la velocidad de crecimiento específico de la cepa MET-12. La temperatura óptima de crecimiento para esta cepa fue de 60°C.

### 3.3.2.3. Salinidad

La cepa MET-12, se probó a 60°C con 12 concentraciones diferentes de NaCl: 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 g/L, para detectar su óptimo crecimiento en condiciones de halofilia. A partir de la absorbancia promedio de los triplicados se construyó la gráfica de la figura 3.22. La velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) se calculó para obtener la concentración de NaCl óptima a la cuál crece esta cepa (figura 3.23).

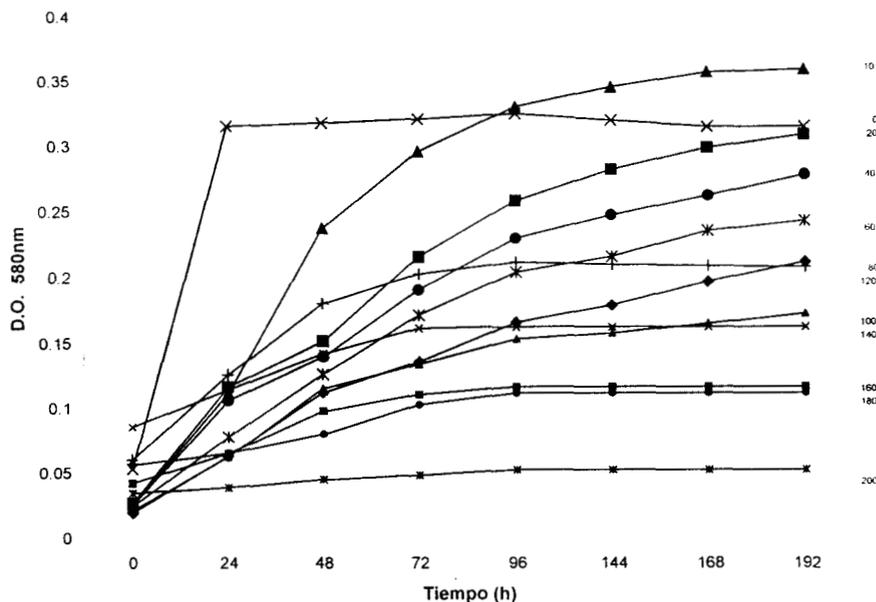
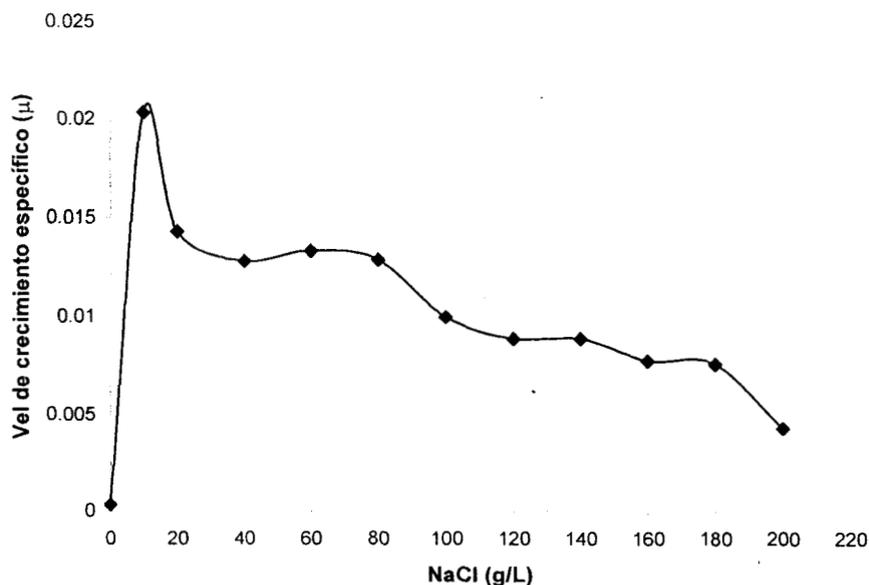


Figura 3.22. Gráfica que muestra el crecimiento de la cepa MET-12 a diferentes concentraciones de NaCl.



225711

Figura 3.23. Gráfica donde se aprecia la relación de concentración de NaCl, con respecto a la velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ). La concentración óptima de crecimiento fue de 10 g/L de NaCl.

### 3.3.2.4. pH óptimo

La cepa MET-12 cultivada a 60°C y 10g/L de NaCl se sometió a 8 diferentes valores de pH: 4.5, 5.0, 6.0, 6.7, 7.15, 7.3, 8.2, 9.1. A partir de la absorbancia promedio de los triplicados se construyó la gráfica de la figura 3.24. La velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) se calculó para obtener el pH óptimo de crecimiento de esta cepa, el cuál se ilustra en la gráfica de la figura 3.25.

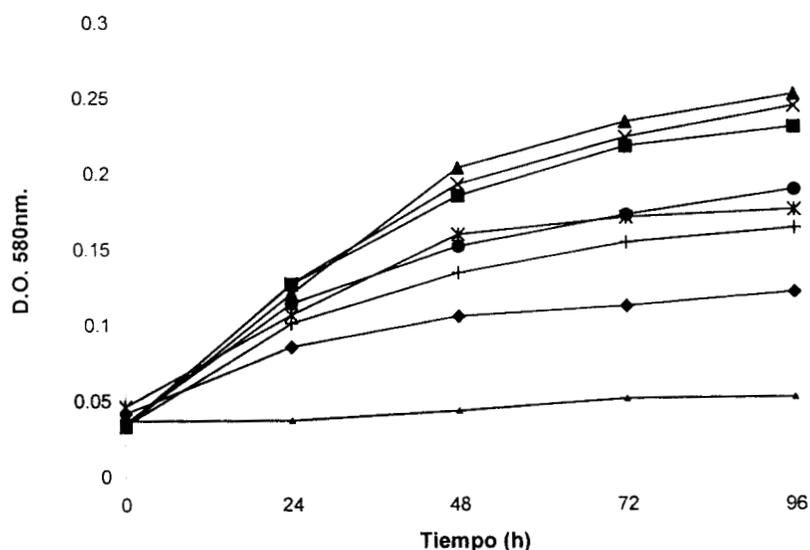


Figura 3.24. Gráfica que muestra el crecimiento de la cepa MET-12 a diferentes valores de pH. ( $\blacktriangle$  4.5); ( $\blacklozenge$  5.0); ( $\ast$  6.0); ( $\blacktriangle$  6.7); ( $\times$  7.15); ( $\blacksquare$  7.3); ( $\bullet$  8.2); ( $\mid$  9.1).

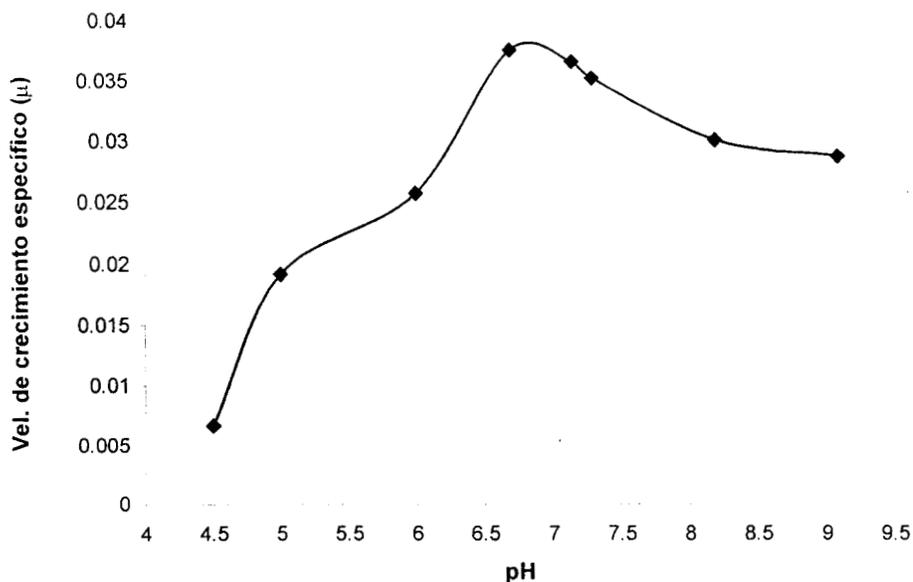


Figura 3.25. Gráfica donde se aprecia la relación entre los diferentes valores de pH con respecto a la velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) de la cepa MET-12. El pH óptimo de crecimiento para esta cepa fue de 6.7.

### 3.3.2.5. Determinación de la enzima catalasa

La cepa MET-12 presentó un resultado negativo a la presencia de la enzima catalasa.

### 3.3.2.6. Donadores de electrones – fuentes de carbono

La tabla 3.5 muestra el crecimiento de la cepa MET-12 registrado a diferentes tiempos con diferentes donadores de electrones como fuentes de carbono. Los ensayos se hicieron por triplicado por lo que se muestra la desviación estándar de la media de las lecturas.

**Tabla 3.5.** Muestra el crecimiento de la cepa MET-12 con diferentes sustratos como fuentes de carbono. Los valores marcados con \* presentan turbidez por la naturaleza del sustrato, mas no por crecimiento de la bacteria.

Sustrato	tiempo (d)	Abs.max. 580nm	Desv.est	H <sub>2</sub> S	Sustrato	tiempo (d)	Abs.max. 580nm	Desv.est	H <sub>2</sub> S
Control	6	0.051	0.009	-	<b>AMINOACIDOS</b>				
<b>ALCOHOLES</b>					Casamino	4	0.041	0.004	-
Etanol	4	0.062	0.008	(+)					
Fenol	2	0.03	0.009	-	Extracto.lev	3	<b>0.286</b>	0.002	+
Glicerol	4	0.077	0.019	(+)					
Manitol	4	0.026	0.006	-	<b>AZUCARES</b>				
Metanol	7	0.072	0.033	(+)	Fructosa	5	<b>0.217</b>	0.002	(+)
Sorbitol	4	0.067	0.011	(+)	Galactosa	5	<b>0.171</b>	0.022	-
					Glucosa	4	<b>0.151</b>	0.055	-
<b>ACIDOS ORGANICOS</b>					Manosa	3	<b>0.196</b>	0.016	(+)
Ascórbico	3	0.033	0.004	-	Ribosa	3	<b>0.173</b>	0.022	(+)
Cítrico	3	0.02	0.0007	-	Sacarosa	7	<b>0.265</b>	0.053	(+)
Fumarico	3	0.038	0.008	-	Xilosa	4	<b>0.058</b>	0.01	(+)
Láctico	3	0.029	0.022	-					
Malico	3	0.032	0.011	-	<b>CETONAS</b>				
Piruvico	6	0.043	0.003	-	Acetona	2	0.024	0.005	-
					<b>PROTEINAS</b>				
<b>AROMATICOS</b>					Peptona	3	<b>0.242</b>	<b>0.013</b>	+
Bifenilo	2	0.064*	0.001	-					
DBT	2	0.034*	0.018	-	<b>COMPUESTOS AZUFRADOS</b>				
Tolueno	3	0.035	0.011	-	DMSO	4	<b>0.184</b>	<b>0.051</b>	(+)
<b>ACIDOS GRASOS VOLATILES</b>					<b>SALES DE ACIDOS ORGANICOS</b>				
Acético	2	0.05	0.012	-	Acetato	4	<b>0.093</b>	0.0005	(+)
Butírico	3	0.046	0.016	-	Lactato	3	<b>0.088</b>	0.007	(+)
Formico	3	0.027	0.022	-	Formiato	2	0.059	0.015	-
Succinico	7	0.05	0.015	-					
<b>(+)produjo menos de 5mM de H<sub>2</sub>S</b>									

### 3.3.2.7. Aceptores de electrones

En la figura 3.26 se muestra el crecimiento de la cepa MET-12 sobre medio basal enriquecido con peptona (5g/L), hidrógeno (2bar) y los 4 diferentes aceptores de electrones: azufre elemental, dimetil sulfóxido, sulfato de sodio y tiosulfato de sodio. En la figura 3.27 se muestra la producción de  $H_2S$ , cuantificado cada tercer día sobre el mismo experimento.

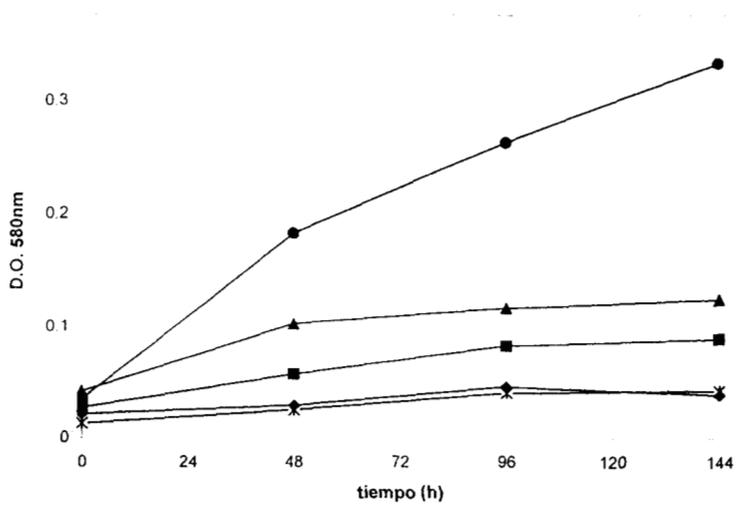


Figura 3.26. Gráfica que muestra el crecimiento de la cepa MET-12 con 4 diferentes aceptores de electrones, durante seis días. (\* control sin aceptor de electrones); (■ azufre); (▲ dimetil sulfóxido); (◆ sulfato); (● tiosulfato).

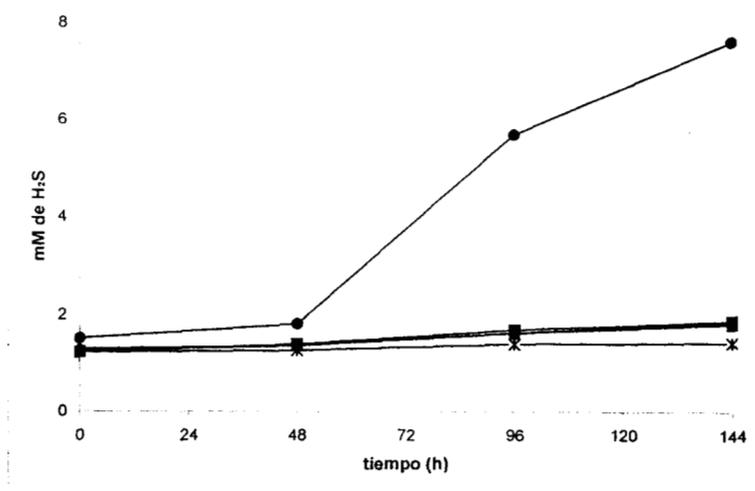


Figura 3.27. Gráfica que muestra la producción de  $H_2S$  de la cepa MET-12 en presencia de cuatro diferentes aceptores de electrones y peptona de caseína como donador. (\* control sin aceptor de electrones); (■ azufre); (▲ dimetil sulfóxido); (◆ sulfato); (● tiosulfato).

### 3.3.3. Caracterización filogenética

#### 3.3.3.1. Extracción purificación y amplificación de DNA total

La figura 3.28.a muestra el corrimiento de 10 y 5µl de DNA total de la cepa MET-12. La figura 3.28.b muestra el corrimiento de 10 y 5µl del producto de PCR donde se pueden apreciar 2 bandas intermedias de entre 1500 y 1600 pb.

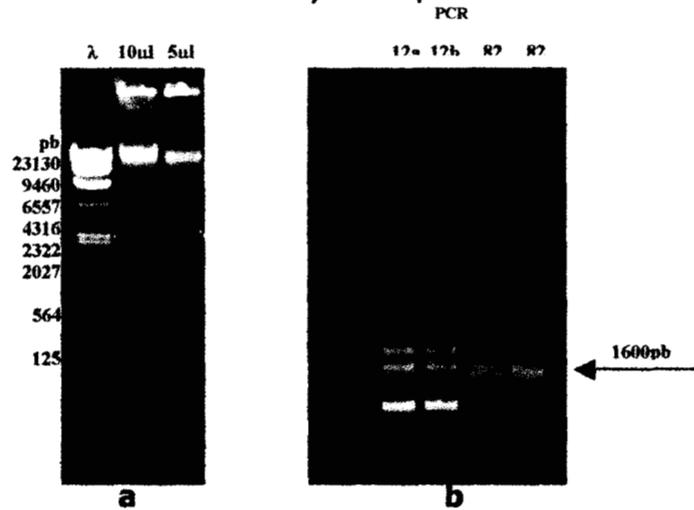


Figura 3.28 a. Corrimiento en un gel de agarosa 0.8% en TAE, de DNA total extraído de la cepa MET-12. b. Corrimiento del amplificado de la cepa MET-12 sobre un gel de agarosa al 0.8% en TAE.

#### 3.3.3.2. Secuencia del 16S rDNA

La secuenciación del producto de PCR del gene 16S rDNA se muestra en la figura 3.29. La secuencia parcial a partir del "Forward" (iniciador 5' → 3'), se introdujo al GeneBank y se obtuvo que la cepa MET-12 presenta un alto porcentaje de identidad con miembros de la familia *Termitogaceae*. En la tabla 3.6 se muestra la comparación entre la secuencia parcial de la cepa MET-12 y aquellas con las que presentó mayor similitud como son *Petrogona mobilis* (Y15479.1); *P. miotherma* (L10657); *Geotoga petrea* (L10658); *G. subterránea* (L10659); *Fervidobacterium islandicum* (M59176); *F. nodosum* (M59177); *Termitoga marítima* (M21774); *T. subterránea*(U22664); y *Thermosiphon africanus* (M24022).

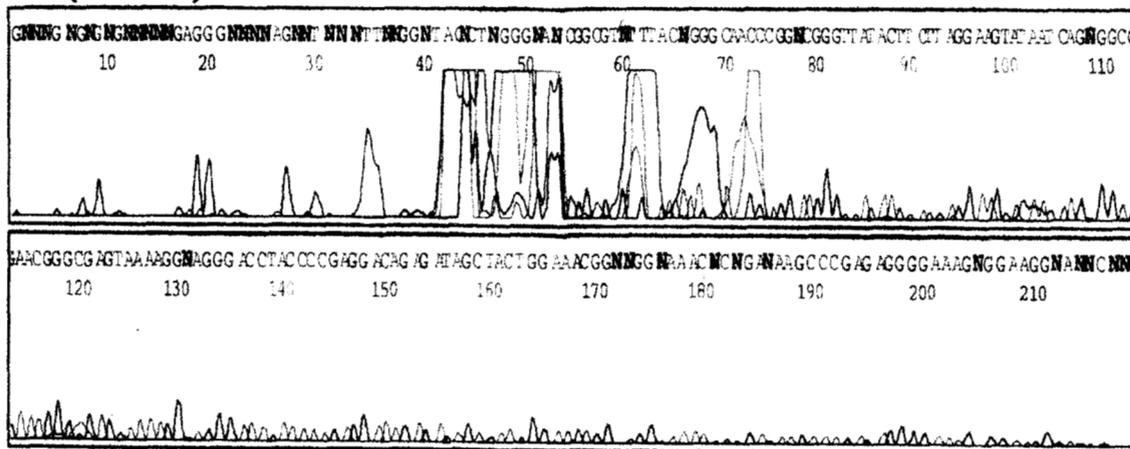


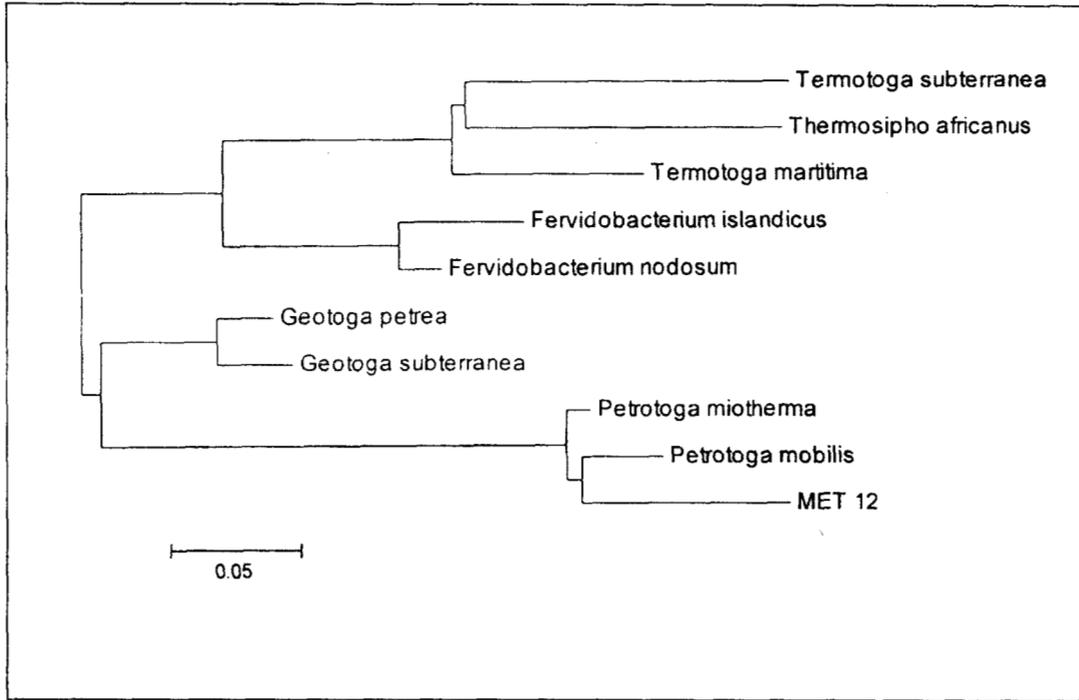
Figura 3.29. Secuenciación del producto de PCR del gene 16S rDNA de la cepa MET-12, donde se aprecia el "Forward" de 200pb aproximadamente. El color de cada pico es específico de un nucleótido: A - adenina; C - citocina; G - guanina; T - timina; N - base no determinada.

**Tabla 3.6.** Comparación de las secuencias parciales del gene 16S rDNA entre la cepa MET-12 y aquellas con las que presentó mayor similitud. A - adenina, C - citocina, G - guanina, I - timina; N - base no determinada.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MET_12										
P.mioth	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P.mobil	NNNAGATN	AGGTTTNA	TCCINGCT	CAGGTA	AAACGCT	NGGCGCT	GCTG	CGGCTG	CGGT	ACACGGG
T.subte	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T.mari	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T.afric	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
F.islan	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
F.nodos	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G.petre	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G.subte	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MET_12										
P.mioth	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P.mobil	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T.subte	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T.mari	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T.afric	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
F.islan	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
F.nodos	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G.petre	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G.subte	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MET_12										
P.mioth	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P.mobil	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T.subte	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T.mari	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T.afric	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
F.islan	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
F.nodos	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G.petre	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G.subte	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

### 3.3.3.2 Árbol filogenético

El árbol filogenético de la cepa MET-12 se construyó a partir de la secuencia parcial obtenida comparada con las mismas regiones de cepas pertenecientes a la familia *Thermotogaceae*, géneros *Thermotoga*, *Geotoga*, *Fervidobacterium* y *Petrotoga*, con las que arrojó similitudes (figura 3.30).

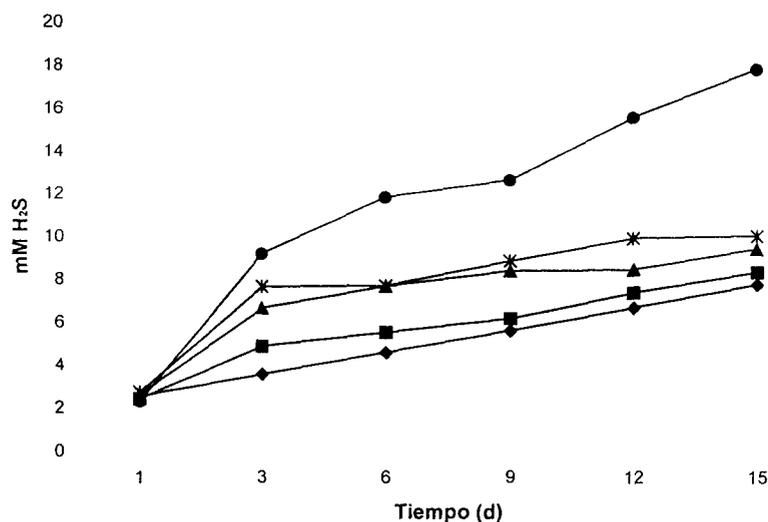


**Figura 3.30.** Árbol filogenético construido a partir de la secuencia parcial del gene 16S rDNA de la cepa MET-12 y las principales especies con las que presenta similitudes.

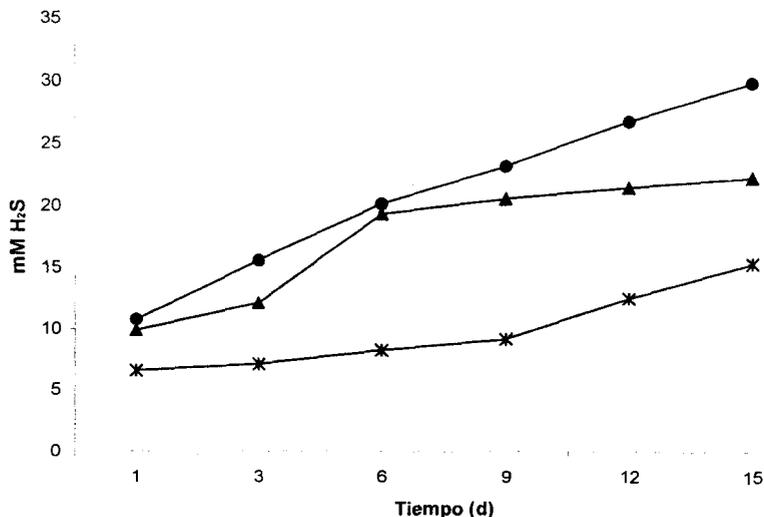
### 3.4 Cepa MET-82

#### 3.4.1 Aislamiento

La producción de  $H_2S$  a lo largo de las resiembras de la muestra 15 se aprecia en las figuras 3.31 a 3.33, donde se observa que el tratamiento en el que presentó producción constante de dicho ácido, fue el implementado con peptona de caseína e hidrógeno. Para el aislamiento de bacterias de esta muestra se tomaron 32 colonias de manera aleatoria, de los tratamientos que presentaron mayor producción de  $H_2S$ , cuya morfología se describe en la tabla 3.7.



**Figura 3.31.** Producción de  $H_2S$  disuelto de la muestra 15 (primera propagación), utilizando 5 tratamientos para identificar procesos de dismutación o de reducción del tiosulfato de sodio. (♦tratamiento 1, con casaminoácidos 0.1g/L); (■ tratamiento 2, con peptona 0.1g/L); (▲ tratamiento 3, con casaminoácidos 5.0g/L); (· tratamiento 4, con casaminoácidos 5.0g/L e hidrógeno 2 bar); (● tratamiento 5, con peptona 5.0g/L e hidrógeno 2 bar).



**Figura 3.32.** Producción de  $H_2S$  disuelto de la muestra 15 (segunda propagación), utilizando los 3 tratamientos que presentaron mayor producción. (▲ tratamiento 3); (\*) tratamiento 4); (● tratamiento 5).

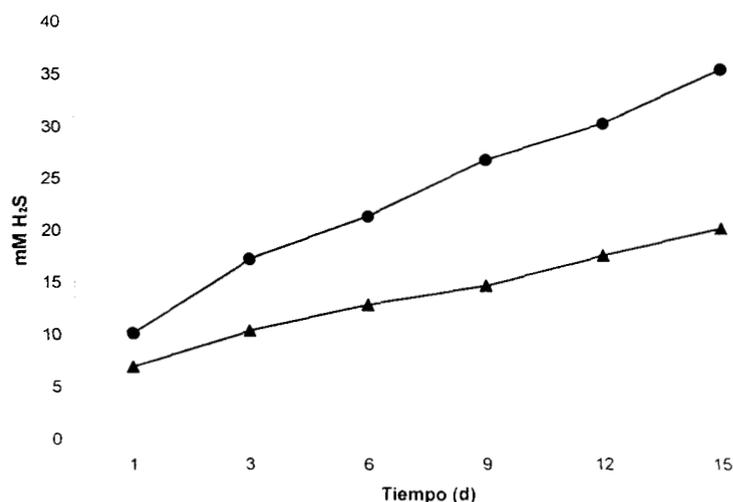


Figura 3.33. Producción de H<sub>2</sub>S disuelto de la muestra 15 (tercera propagación), utilizando los 2 tratamientos con los que presentó mayor producción. (▲ tratamiento 3); (● tratamiento 5).

Tabla 3.7. Colonias seleccionadas para la serie de aislamientos de la muestra 15. Las sobresalientes corresponden a la cepa MET-82.

Colonia	Tratamiento	Dilución	Forma	Elevación	Borde	Diámetro	Color
1	Pept-H <sub>2</sub>	10 <sup>-8</sup>	Amiboide	Convexa	Amiboide	1.5 mm	Negra
2	"	10 <sup>-8</sup>	Circular	Plana	Entero	1.5	Café
3	"	10 <sup>-9</sup>	"	Convexa	"	0.5	Negra
4	"	10 <sup>-6</sup>	"	Elevada	"	1.5	Café
5	"	10 <sup>-7</sup>	"	Convexa	"	1.0	Negra
6	"	10 <sup>-8</sup>	"	"	"	0.5	"
7	Casamino	10 <sup>-9</sup>	"	Plana	"	1.0	"
8	"	10 <sup>-11</sup>	"	Elevada	"	1.5	"
9	"	10 <sup>-10</sup>	"	"	"	0.5	"
10	Pept-H <sub>2</sub>	10 <sup>-11</sup>	Amiboide	Plana	Amiboide	1.0	Café
11	"	10 <sup>-10</sup>	Circular	Elevada	"	1.5	Negra
12	"	10 <sup>-7</sup>	"	"	"	0.5	"
13	Casamino	10 <sup>-7</sup>	Rizoide	Convexa	Filamentoso	2.0	Café
14	"	10 <sup>-11</sup>	Fusiforme	Plana	Entero	2.0	Beige
15	"	10 <sup>-10</sup>	Circular	Convexa	"	1.5	Negra
16	"	10 <sup>-11</sup>	"	Umbonada	"	1.5	Café
17	Pept-H <sub>2</sub>	10 <sup>-11</sup>	"	Convexa	"	1.0	Negra
18	"	10 <sup>-11</sup>	"	"	"	1.0	"
19	"	10 <sup>-8</sup>	"	Plana	"	1.0	"
20	"	10 <sup>-8</sup>	Amiboide	Elevada	Amiboide	2.0	Ocre
21	"	10 <sup>-8</sup>	"	"	"	1.0	Negra
22	"	10 <sup>-5</sup>	Fusiforme	Plana	Entero	1.0	Café
23	"	10 <sup>-5</sup>	Amiboide	Elevada	Ondulado	2.0	Verduzca
24	"	10 <sup>-7</sup>	Circ-amiboide	"	"	1.5	Negra
25	"	10 <sup>-7</sup>	Fusiforme	Plana	Entero	1.0	Café
26	Casamino	10 <sup>-11</sup>	"	"	"	1.0	Negra
27	"	10 <sup>-8</sup>	Circ-irregular	"	Ondulado	1.0	"
28	"	10 <sup>-8</sup>	Circular	"	Entero	1.0	Café
29	"	10 <sup>-12</sup>	"	Convexa	"	2.0	"
30	Pept-H <sub>2</sub>	10 <sup>-11</sup>	"	Plana	"	0.5	transparente
31	"	10 <sup>-8</sup>	Fusiforme	"	"	1.0	Café
32	"	10 <sup>-8</sup>	Circular	Elevada	"	2.5	Negra

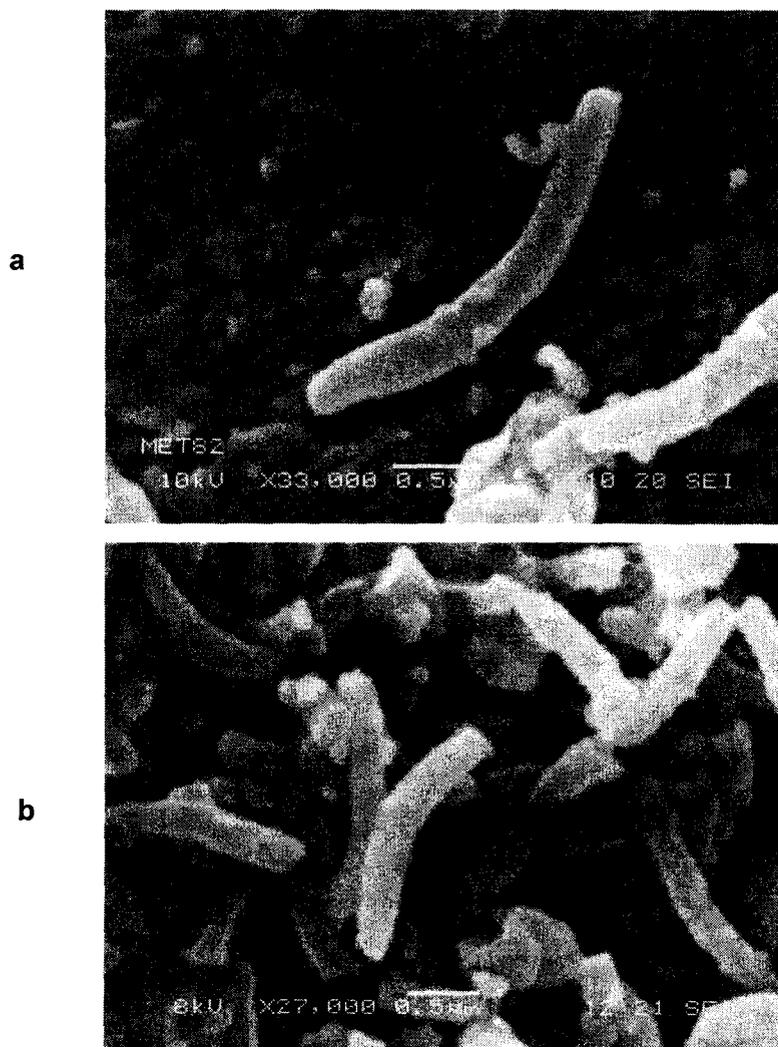
### 3.4.2. Caracterización fisiológica

#### 3.4.2.1. Tinción de Gram

De la muestra 15 procedente del agua de batería del pozo SAM-III se aisló una bacteria Gram (+). Son vibrios que se presentan solos o en pares, miden aproximadamente  $3.0\mu\text{m}$  de largo por  $0.5\mu\text{m}$  de ancho y en cultivos viejos se unen en cadenas y forman flóculos que se adhieren al fondo del recipiente. Forman colonias sobre agar de forma circular, elevación convexa, con borde entero, de 0.5 mm de diámetro y de color negro.

#### 3.4.2.2. Microscopía electrónica

La cepa MET-82 se trabajó para su observación al microscopio electrónico a partir de un cultivo en fase exponencial. En la figura 3.34a, se muestra el acercamiento de un vibrio individual visto a 33000 aumentos cuya morfología se ha descrito para miembros del género *Desulfovibrio*. En b, se aprecian algunas bacterias entrelazadas a 27000 aumentos.



**Figura 3.34.** Microscopía electrónica de la cepa MET-82 . a. 33,000 aumentos, se puede apreciar la forma vibroide. b. 27,000 aumentos, se puede observar una cadena de vibrios unidos por la parte terminal.

### 3.4.2.3. Temperatura óptima

La cepa MET-82 se incubó a 7 temperaturas diferentes: 15, 25, 32, 35, 40, 50 y 60°C. A partir de la absorbancia promedio de los triplicados de cada temperatura, se construyó la gráfica de la figura 3.35. La velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) se calculó como se detalla en el apartado 2.7 para deducir la temperatura óptima de crecimiento de esta cepa, los cuales se grafican en la figura 3.36.

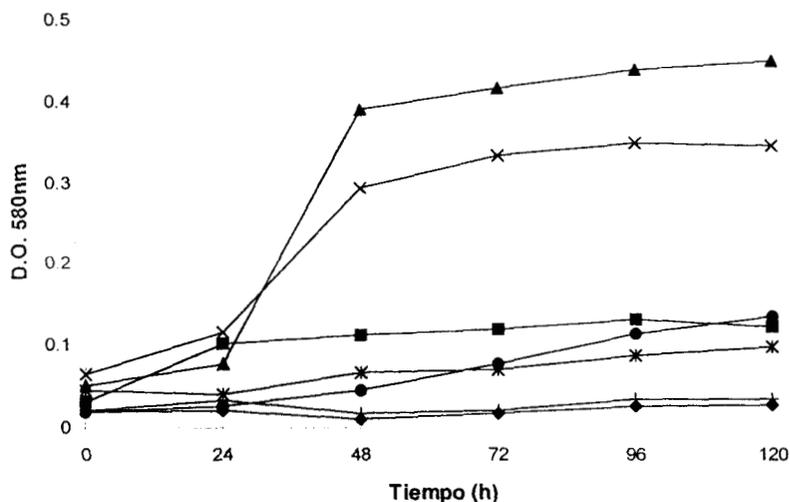


Figura 3.35. Gráfica que muestra el crecimiento de la cepa MET-82 sometida a diferentes temperaturas. (| 15°C); (● 25°C); (▲ 32°C); (x 35°C); (◆ 40°C); (■ 50°C); (\*60°C).

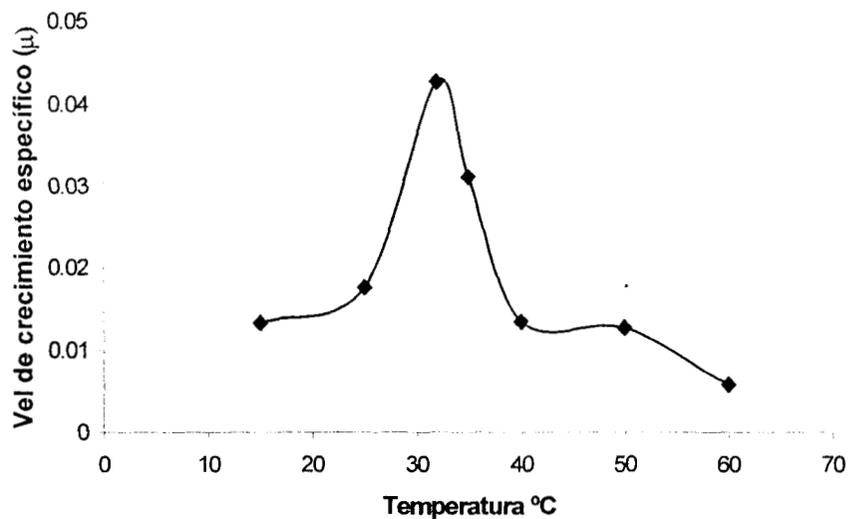


Figura 3.36. Gráfica donde se aprecia la relación de temperaturas con respecto a la velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) de la cepa MET-82. La temperatura óptima de crecimiento fue de 32°C.

### 3.4.2.4. Salinidad óptima

La cepa MET-82 se probó con 15 concentraciones diferentes de NaCl: 0, 1, 10, 20, 40, 50, 60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200 g/L, a la temperatura que resultó óptima para su crecimiento (32°C). A partir de la absorbancia promedio de los triplicados se construyó la gráfica de la figura 3.37. La velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) se calculó para obtener la concentración de NaCl óptima a la cual crece esta cepa (figura 3.38).

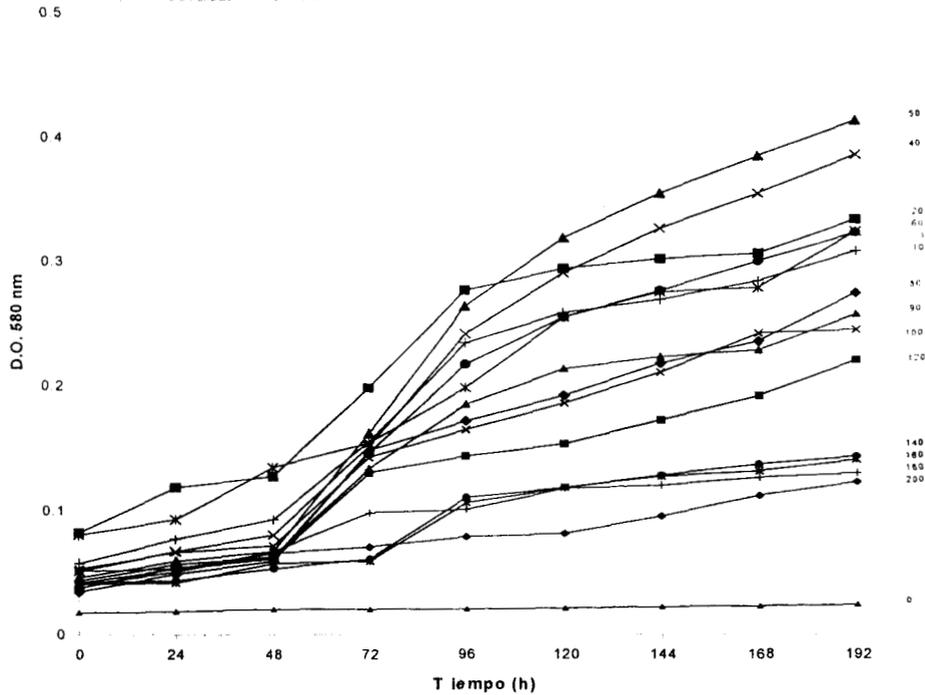


Figura 3.37. Gráfica que muestra el crecimiento de la cepa MET-82 a diferentes concentraciones de NaCl (g/L).

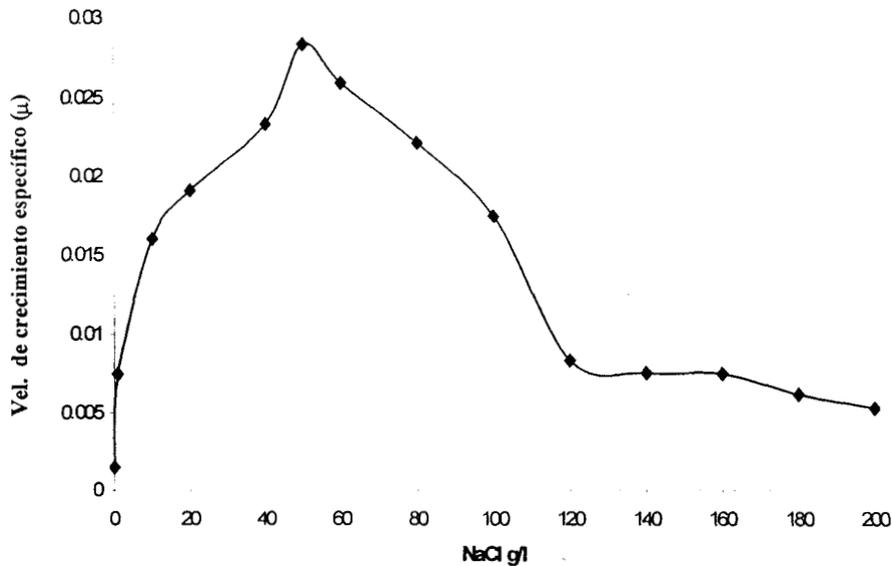


Figura 3.38. Gráfica donde se aprecia la relación de concentración de NaCl, con respecto a la velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) para la cepa MET-82. La concentración a la que crece de manera óptima fue de 50g/L.

### 3.4.2.5. pH óptimo

La cepa MET-82 se creció a 32°C y 50g/L de NaCl a diferentes valores de pH: 5.5, 6.0, 6.6, 7.07, 7.3, 7.96, 8.14 y 8.32. A partir de la absorbancia promedio de los triplicados se construyó la gráfica 3.39. La velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) se calculó para obtener el pH óptimo de crecimiento de esta cepa (figura 3.40).

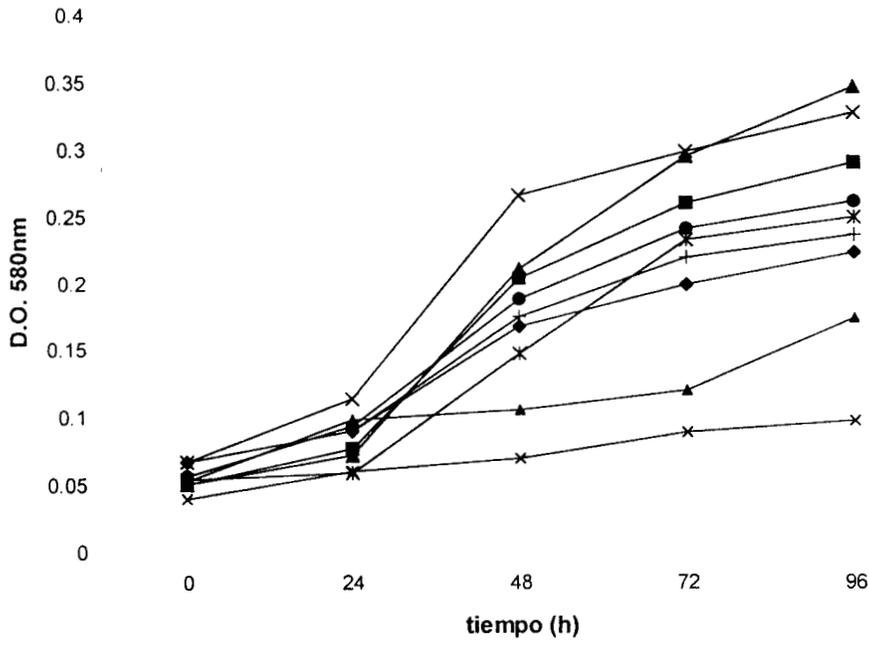


Figura 3.39. Gráfica que muestra el crecimiento de la cepa MET-82 a diferentes valores de pH. (x 5.5); (▲ 6.0); (◆ 6.6); (\*) 7.07; (▲ 7.3); (■ 7.65); (x 7.96); (● 8.14); (l 8.32).

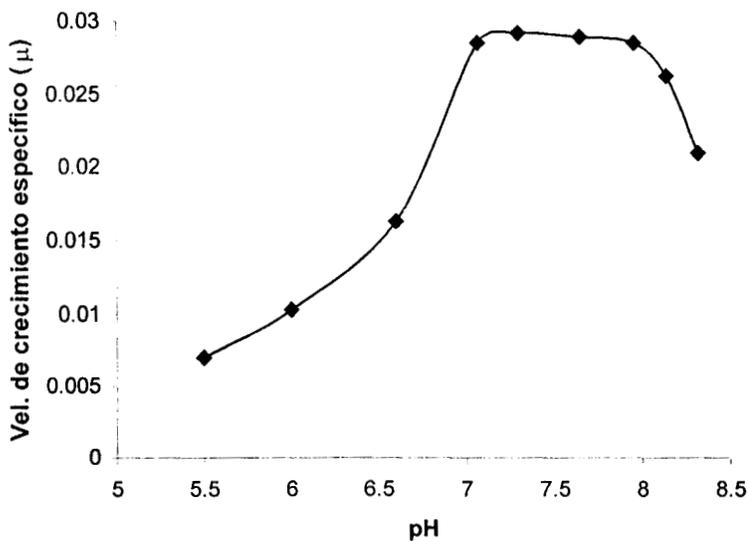


Figura 3.40. Gráfica donde se aprecia la relación de pH con respecto a la velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ). La cepa MET-82 creció bien en un rango de pH de 7.07 a 7.96.

### 3.4.2.6. Determinación de la enzima catalasa

La cepa MET-82 presentó un resultado negativo a la presencia de la enzima catalasa.

### 3.4.2.7. Donadores de electrones - fuentes de carbono

Las tablas 3.8 y 3.9 muestran el crecimiento de la cepa MET-82 registrado a diferentes tiempos con diferentes fuentes de carbono como donadores de electrones y sulfato o tiosulfato de sodio como aceptores. El medio de cultivo con sulfato de sodio se implementó con 0.2 g/L de extracto de levadura.

Tabla 3.8. Crecimiento de la cepa MET-82 con diferentes sustratos como fuente de carbono y sulfato de sodio.

Sustrato	tiempo(d)	Abs.max.		Sustrato	tiempo(d)	Abs.max.
Control	10	0.1		Control	10	0.05
<b>ALCOHOLES</b>				H <sub>2</sub> - CO <sub>2</sub>	10	.023
Manitol	10	0.29		Acetato - H <sub>2</sub>	10	.085
<b>AZUCARES</b>				<b>ALCOHOLES</b>		
Fructosa	10	0.14		Etanol	10	<b>1.2</b>
Galactosa	10	0.12		<b>ACIDOS ORGANICOS</b>		
Glucosa	10	0.16		Fumarico	10	<b>1.56</b>
Manosa	10	0.21		Láctico	10	0.8
Sacarosa	10	0.19		Malico	10	<b>1.2</b>
Xilosa	10	0.22		Piruvico	10	0.22
<b>SALES DE ACIDOS ORGANICOS</b>				<b>ACIDOS GRASOS VOLATILES</b>		
Lactato	10	<b>0.32</b>		Formico	10	0.21
Acetato	10	0.04		Succinico	10	<b>0.33</b>

Tabla 3.9. Crecimiento de la cepa MET-82 con diferentes sustratos como fuente de carbono y tiosulfato de sodio.

Sustrato	tiempo(d)	Abs.max.	H <sub>2</sub> S	<b>ACIDOS GRASOS VOLATILES</b>			
Control	7	0.06	-	Acético	7	0.16	+
<b>ALCOHOLES</b>				Butírico	7	<b>0.21</b>	+
Etanol	7	<b>0.23</b>	+	Formico	7	0.12	+
Fenol	7	0	-	Succinico	7	<b>0.24</b>	+
Glicerol	7	<b>0.26</b>	+	<b>AMINOACIDOS</b>			
<b>ACIDOS ORGANICOS</b>				Casamino	7	<b>0.31</b>	+
Fumarico	7	<b>0.41</b>	+				
Láctico	7	<b>0.38</b>	+	Extracto.lev	7	<b>0.42</b>	+
Piruvico	7	<b>0.28</b>	+				
<b>AZUCARES</b>				<b>PROTEINAS</b>			
Glucosa	7	<b>0.26</b>		Peptona	7	0.15	+
<b>CETONAS</b>							
Acetona	7	0	-				

### 3.4.2.8 Aceptores de electrones

En la figura 3.41 se muestra el crecimiento de la cepa MET-82 sobre medio basal enriquecido con peptona (5g/L) e hidrógeno (2bar); y los 4 diferentes aceptores de electrones: azufre elemental, dimetil sulfóxido, sulfato de sodio y tiosulfato de sodio. En la figura 3.42 se muestra la producción de H<sub>2</sub>S cuantificado cada tercer día sobre el mismo experimento.

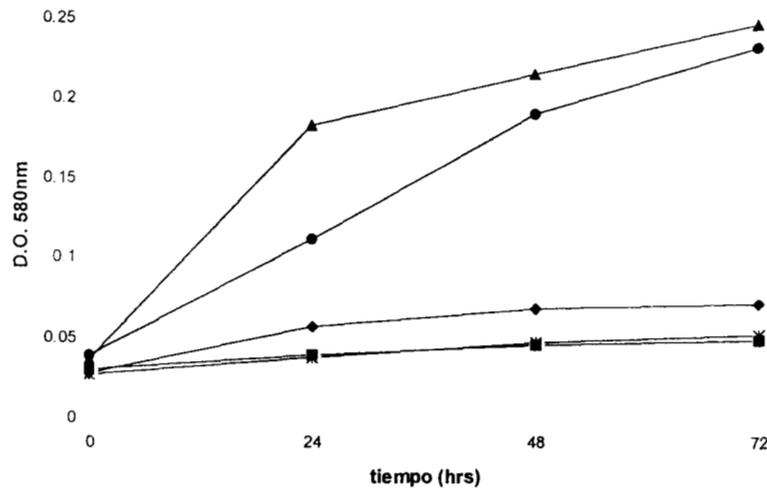


Figura 3.41. Gráfica que muestra el crecimiento de la cepa MET-82 con 4 diferentes aceptores de electrones, durante 6 días. (● control sin aceptor de electrones); (■ azufre); (▲ dimetil sulfóxido); (◆ sulfato); (● tiosulfato).

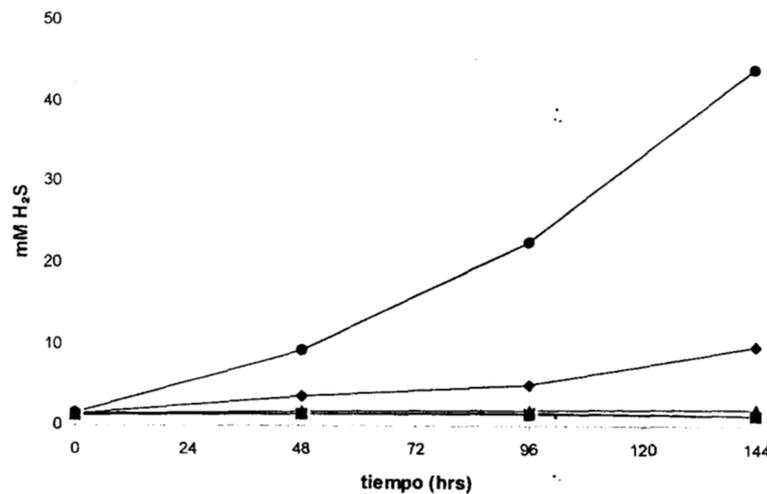
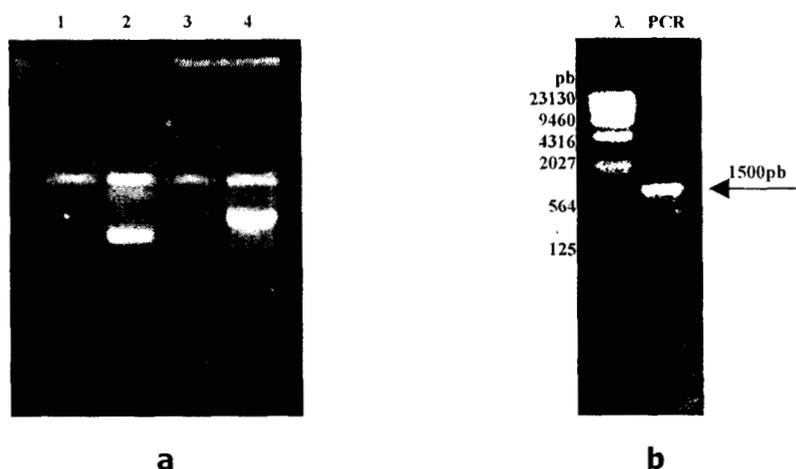


Figura 3.42. Gráfica que ilustra la producción de H<sub>2</sub>S por la cepa MET-82 en presencia de 4 diferentes aceptores de electrones y peptona de caseína como donador. (\* control sin aceptor de electrones); (■ azufre); (▲ dimetil sulfóxido); (◆ sulfato); (● tiosulfato).

### 3.4.3. Caracterización filogenética

#### 3.4.3.1. Extracción - purificación y amplificación de DNA total

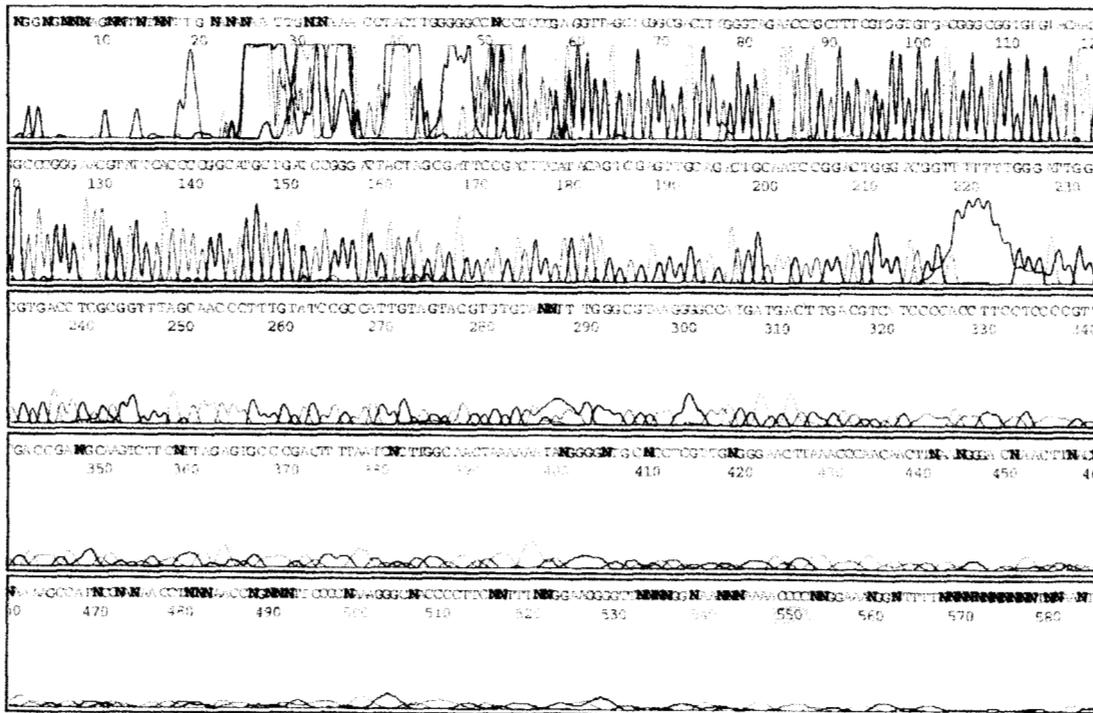
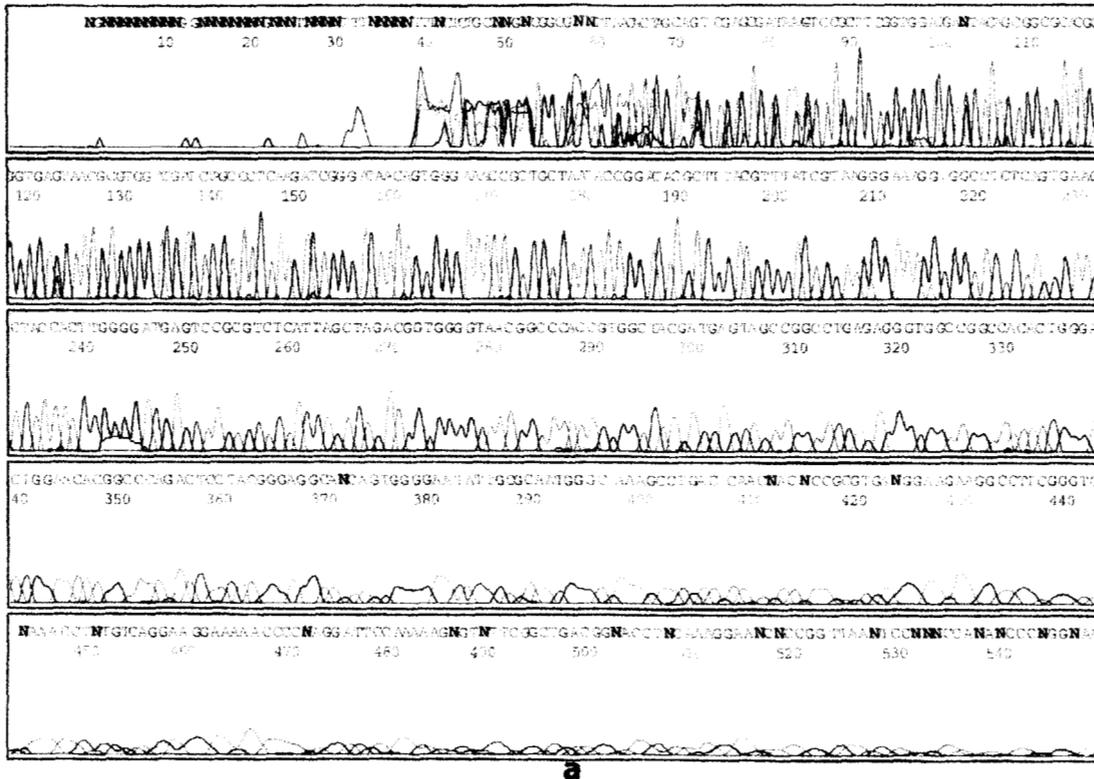
La extracción de DNA total se llevó a cabo como se describe en el apartado 2.61. La figura 3.43.a muestra el corrimiento de DNA extraído de bacterias de la cepa MET-82. La amplificación se llevó a cabo como se describió en el apartado 2.62. La figura 3.43.b muestra el corrimiento de 10 $\mu$ l del producto de la amplificación del gene16S rDNA, donde se aprecia una banda de aproximadamente 1500 pb.



**Figura 3.43.** a. Corrimiento en un gel de agarosa 0.8% en TAE, de DNA total extraído de la cepa MET-82 (carriles 1 y 3). b. Corrimiento de 5 $\mu$ l del producto de PCR de la cepa MET-82 sobre un gel de agarosa al 0.8% en TAE.

#### 3.4.3.2. Secuencia del 16S rDNA

La secuenciación del producto de PCR del gene 16S rDNA se llevó a cabo como se describió en el apartado 2.64. Las figuras 3.44.a y 3.44.b muestran las secuencias parciales de ambos extremos leídas con los iniciadores descritos en el apartado 2.62. Las secuencias parciales se introdujeron al GeneBank y el programa resolvió que la cepa MET-82 muestra un 92% de identidad con *Desulfovibrio gabonensis* (U31080.1). La tabla 3.10 muestra la comparación entre las secuencias parciales de la cepa MET-82 y aquellas cepas con las que mostró mayor identidad como: *Desulfovibrio africanus* (X99236.1); *D. halophilus* (X99237.1); *D. gracilis* (U53464.1); *D.sp* (L42995); *D. caledonensis* (U53465.1); *D. zosteriae* (Y18049.1); *D. inopinatus* (AF177276.1); *D. bastinii* (U53462.1); y *Desulfomicrobium sp* (AF132873).



**Figura 3.44. a** Secuenciación del producto de PCR del gene 16S rDNA de la cepa MET-82. **a.** "Forward" (360 pb aproximadamente). **b.** "Reverse" (300 pb aproximadamente). Cada pico es específico de un nucleótido: A - adenina; C - citocina; G - guanina; T - timina; N - base no determinada.

**Tabla 3. 10. Comparación de las secuencias parciales del gene 16S rDNA de la cepa MET-82 y aquellas con las que presentó mayor similitud.**  
A - adenina, C - citocina, G - guanina, T - timina, N - base no determinada.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
MET_82	-----TTTNC	TC	GC	NN	CG	CG	NN	TT	NA	CA	CT	AG
D.gabo	-----CACAT	GC	CA	AA	AG	TC	CG	TC	CG	TC	CG	TC
D.baot	-----CACAT	GC	CA	AA	AG	TC	CG	TC	CG	TC	CG	TC
D.zost	-----ATTGA	AC	GC	TC	GT	GC	GC	TC	GC	GC	TC	GC
D.cale	-----CACAT	GC	CA	AA	AG	TC	CG	TC	CG	TC	CG	TC
DspL42	-----TGA	AC	GC	TC	GT	GC	GC	TC	GC	GC	TC	GC
D.halo	-----TGC	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG
D.grac	-----TGA	AC	GC	TC	GT	GC	GC	TC	GC	GC	TC	GC
D.afri	-----TTGA	AC	GC	TC	GT	GC	GC	TC	GC	GC	TC	GC
D.inop	-----AATGA	AC	GC	TC	GT	GC	GC	TC	GC	GC	TC	GC
Dsmicr	-----AATGA	AC	GC	TC	GT	GC	GC	TC	GC	GC	TC	GC
MET_82	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
D.gabo	CAAGAT	CGGG	ATAAC	AGTGG	GAAC	CGCT	TAAT	ACCG	GATAC	CGCT	TTAC	GTAA
D.baot	GAAGAT	CGGG	ATAAC	AGTGG	GAAC	CGCT	TAAT	ACCG	GATAC	CGCT	TTAC	GTAA
D.zost	GAAGAT	CGGG	ATAAC	AGTGG	GAAC	CGCT	TAAT	ACCG	GATAC	CGCT	TTAC	GTAA
D.cale	GAAGAT	CGGG	ATAAC	AGTGG	GAAC	CGCT	TAAT	ACCG	GATAC	CGCT	TTAC	GTAA
DspL42	ACAGAT	CGGG	ATAAC	AGTGG	GAAC	CGCT	TAAT	ACCG	GATAC	CGCT	TTAC	GTAA
D.halo	ACAGAT	CGGG	ATAAC	AGTGG	GAAC	CGCT	TAAT	ACCG	GATAC	CGCT	TTAC	GTAA
D.grac	TTGGAT	CGGG	ATAAC	AGTGG	GAAC	CGCT	TAAT	ACCG	GATAC	CGCT	TTAC	GTAA
D.afri	ACAGAT	CGGG	ATAAC	AGTGG	GAAC	CGCT	TAAT	ACCG	GATAC	CGCT	TTAC	GTAA
D.inop	GAAGAT	CGGG	ATAAC	AGTGG	GAAC	CGCT	TAAT	ACCG	GATAC	CGCT	TTAC	GTAA
Dsmicr	TTGGAT	CGGG	ATAAC	AGTGG	GAAC	CGCT	TAAT	ACCG	GATAC	CGCT	TTAC	GTAA
MET_82	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
D.gabo	TAGCTA	GACGG	TGGG	TAA	CGG	CC	AC	CG	TAC	GAT	GAT	GAT
D.baot	TAGCTT	GTTGG	TAA	CGG	CC	AC	CG	TAC	GAT	GAT	GAT	GAT
D.zost	TAGCTT	GTTGG	TAA	CGG	CC	AC	CG	TAC	GAT	GAT	GAT	GAT
D.cale	TAGCTT	GTTGG	TAA	CGG	CC	AC	CG	TAC	GAT	GAT	GAT	GAT
DspL42	TAGCTT	GTTGG	TAA	CGG	CC	AC	CG	TAC	GAT	GAT	GAT	GAT
D.halo	TAGCTT	GTTGG	TAA	CGG	CC	AC	CG	TAC	GAT	GAT	GAT	GAT
D.grac	TAGCTT	GTTGG	TAA	CGG	CC	AC	CG	TAC	GAT	GAT	GAT	GAT
D.afri	TAGCTT	GTTGG	TAA	CGG	CC	AC	CG	TAC	GAT	GAT	GAT	GAT
D.inop	TAGCTT	GTTGG	TAA	CGG	CC	AC	CG	TAC	GAT	GAT	GAT	GAT
Dsmicr	TAGCTT	GTTGG	TAA	CGG	CC	AC	CG	TAC	GAT	GAT	GAT	GAT



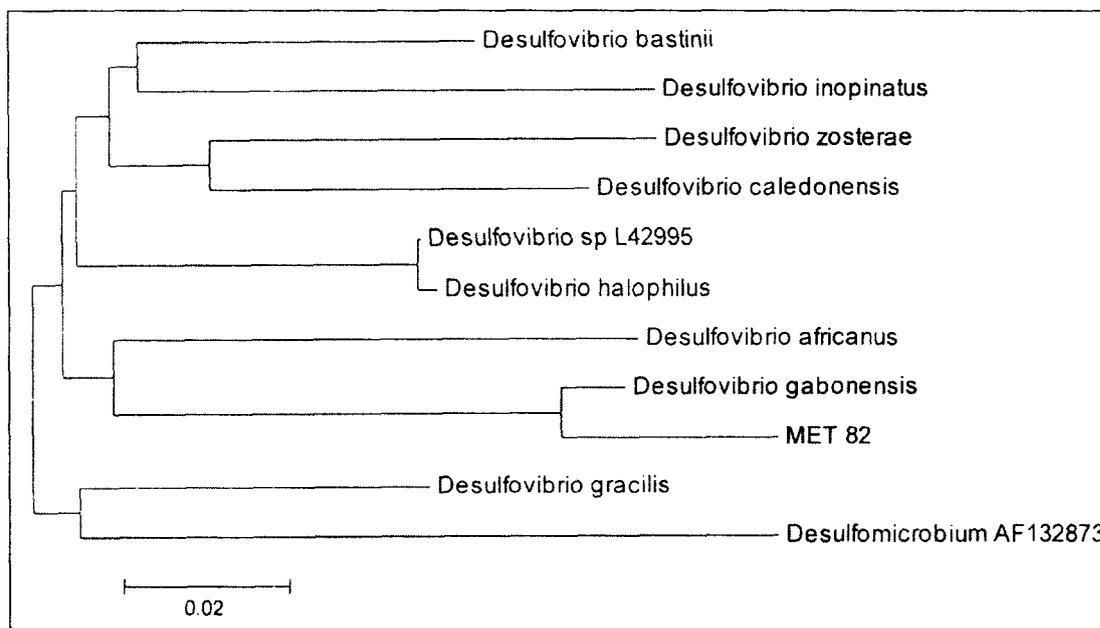
MET\_82 1210 | 1220 | 1230 | 1240 | 1250 | 1260 | 1270 | 1280 | 1290 | 1300 | 1310 | 1320 |  
 D.gabo |  
 D.bast |  
 D.zost |  
 D.cale |  
 Dspl42 |  
 D.grac |  
 D.afri |  
 D.inop |  
 Dsmicr |

MET\_82 1330 | 1340 | 1350 | 1360 | 1370 | 1380 | 1390 | 1400 | 1410 | 1420 | 1430 | 1440 |  
 D.gabo |  
 D.bast |  
 D.zost |  
 D.cale |  
 Dspl42 |  
 D.halo |  
 D.grac |  
 D.afri |  
 D.inop |  
 Dsmicr |

MET\_82 1450 | 1460 | 1470 | 1480 | 1490 | 1500 | 1510 | 1520 | 1530 |  
 D.gabo |  
 D.bast |  
 D.zost |  
 D.cale |  
 Dspl42 |  
 D.halo |  
 D.grac |  
 D.afri |  
 D.inop |  
 Dsmicr |

### 3.4.3.3. Árbol filogenético

El árbol filogenético de la cepa MET-82 (figura 3.45) se construyó con las secuencias de microorganismos pertenecientes al género *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium*, con los que mostró mayor porcentaje de identidad.



**Figura 3.45.** Árbol filogenético construido a partir de las secuencias de la cepa MET-82 y los principales géneros con los que presentó un porcentaje alto de identidad.

## Discusión y conclusiones

---

En el presente trabajo se logró el aislamiento, identificación y caracterización parcial de tres cepas de bacterias reductoras de tiosulfato, procedentes de dos pozos petroleros situados en el Golfo de México. Del pozo SAM-III se aislaron dos cepas de bacterias mesofílicas que se nombraron MET-2 y MET-82, la primera de éstas procedente de agua de sedimentación y la segunda procedente de agua de batería del mismo pozo. Del pozo 21-D se aisló una bacteria termofílica que se nombró como MET-12.

En las figuras 3.1 a 3.3 de la fase de aislamiento, se puede apreciar que los microorganismos anaerobios presentes en el pozo **SAM-III**, llevaron a cabo una ruta metabólica que involucró la reducción constante del tiosulfato de sodio en presencia de peptona de caseína e hidrógeno como fuente de energía. En la fase de aislamiento en tubo rodado, se desarrollaron una gama de morfologías coloniales de forma, elevación y borde variados, de 1 a 3 mm de diámetro y colores desde el beige hasta el negro, los cuales se describieron en la tabla 3.1.

La cepa **MET-2** aislada de este pozo, correspondió a vibrios Gram (+), uniflagelados, de 3.0  $\mu\text{m}$  de largo por 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho, que en cultivos frescos se observan individuales, pero en cultivos viejos forman flóculos que se adhieren al fondo del frasco que los contiene; lo que sugiere que esta cepa podría ser precursora de la formación de biopelículas, definidas como "la población de bacterias unidas en una matriz, que se encuentran adheridas entre sí y ancladas a una superficie". La unión de bacterias en biopelículas les confiere ventajas sobre las bacterias de vida libre como son: intercambio de nutrientes, metabolitos, material genético y protección de agentes antimicrobianos, ya que se sabe que las biopelículas son al menos 500 veces más resistentes a bactericidas que las bacterias de vida libre. (Lappin-Scott *et al.*, 1992; Walch, 1992; Costerton *et al.*, 1995).

La cepa MET-2 crece bien en un intervalo de 32 a 35 °C (figura 3.6), con un óptimo a 35°C y en un intervalo de 20 a 80 g/L de NaCl, con crecimiento óptimo a 60 g/L (figura 3.8). A concentraciones más elevadas su morfología vista al microscopio óptico comienza a sufrir deformaciones. El pH óptimo de crecimiento es de 7.0, aunque puede crecer en un intervalo de 6.7 a 7.5 (figura 3.10). No se detectó actividad de enzima catalasa. Crece con varios compuestos como donadores de electrones y tiosulfato de sodio como aceptor. Entre los donadores tenemos: alcoholes (etanol\*, glicerol, manitol, metanol\*, sorbitol); ácidos orgánicos (ascórbico, fumárico, láctico, málico y pirúvico); compuestos aromáticos (tolueno); ácidos grasos volátiles (acético, butírico, fórmico y succínico); compuestos azufrados (dimetil sulfóxido); azúcares (fructosa, galactosa,

glucosa, manosa\*, ribosa, sacarosa, y xilosa); sales de ácidos orgánicos (acetato, lactato, citrato\* y formiato), extracto de levadura, casaminoácidos, peptona de caseína y acetona\*. Con los compuestos marcados (\*), la cepa crece ligeramente por arriba del control (tabla 3.2). El lactato resultó ser la fuente de carbono óptima para su crecimiento en presencia de tiosulfato, la máxima producción celular se observó a los tres días de incubación. Con acetato mostró crecimiento por arriba del control, seguramente por la presencia del extracto de levadura implementado en el medio (0.1g/L).

Algunas de las rutas de degradación que lleva a cabo de estos compuestos, son similares a aquellas del modelo que Gibson (1990) planteó para las principales rutas metabólicas de las bacterias reductoras de sulfato (figura 4.1).

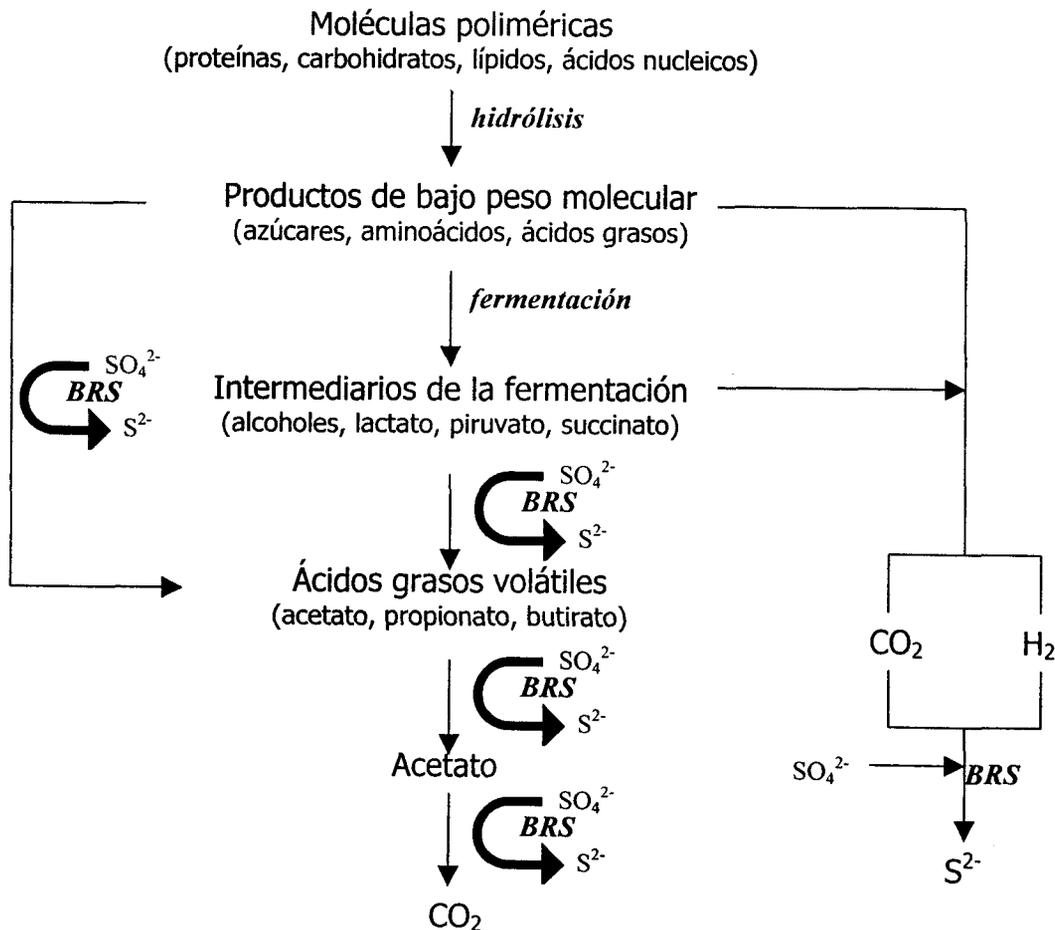


Figura 4.1. Rutas de la degradación anaerobia de materia orgánica, mostrando las interacciones potenciales de bacterias reductoras de sulfato BRS (Gibson, 1990).

En conjunto, los resultados sugieren que esta cepa pertenece al grupo de las BRS, ya que en las pruebas con diferentes aceptores de electrones lleva a cabo la reducción del sulfato así como del tiosulfato de sodio (figura 3.12).

Por otra parte, la secuencia parcial del gene 16S rDNA arrojó un 94% de identidad con la especie *Desulfovibrio gracilis* (U53464.1) cuya secuencia fue depositada en el GeneBank por Tardy-Jacquenod en 1996 y de la cual sin embargo no se ha publicado un artículo.

Efectivamente, la cepa Met-2 comparte varias características con diferentes especies del género *Desulfovibrio*, como son: su morfología, el uso de lactato como mejor donador de electrones, el requerimiento de NaCl para su óptimo crecimiento, el uso de sulfato o tiosulfato de sodio como aceptores de electrones, y que crece de manera óptima sobre lactato y tiosulfato de sodio (Gibson, 1990; Hernández-Eugenio *et al.*, 2000; Widdel y Pfening, 1984).

Se puede concluir que la cepa MET-2 pertenece al género *Desulfovibrio* y se ubica dentro del grupo de BRS mesofílicas, halotolerantes, que crecen de manera óptima con tiosulfato de sodio como aceptor de electrones, llevando a cabo la siguiente reacción:  $4\text{H}_2\text{O} + \text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow 2\text{HS}^- + 3\text{H}_2\text{O}$ . El sulfuro producido, podría ser tomado como precursor de aminoácidos como la cisteína o la metionina (Hao *et al.*, 1996).

La caracterización filogenética parcial, sugiere que MET-2 podría ser una especie no reportada, perteneciente al género *Desulfovibrio*. Sin embargo, sólo la totalidad de la secuencia del gene 16S así como la determinación de su contenido de G+C% e hibridación directa DNA-DNA con *D.gracilis* podría definirlo.

**225711**

Los microorganismos termófilos presentes en el pozo **21-D**, crecieron preferentemente en los tratamientos con peptona de caseína a lo largo de las tres resiembras (figuras 3.16 a 3.18). La máxima producción de H<sub>2</sub>S se observó con 5 g/L de peptona y 2 bar de hidrógeno; de este tratamiento se aislaron colonias de escasa variedad, diferentes en forma, tamaño y color (tabla 3.4).

La cepa **MET-12** aislada de este pozo, son bacilos largos Gram(-), con envoltura de exopolímeros "toga" que llegan a medir de 3 a 10 μm de largo por 0.5 a 1 μm de ancho y presentan gran motilidad. En cultivos frescos se aprecian de morfología similar a la especie *Thermotoga subterranea* (Jeanthon *et al.*, 1995), mientras que en cultivos viejos forma vainas con número variable de células (figura 3.19), así como cuerpos esféricos. Esta cepa crece bien en un intervalo de temperaturas de 50 a 60°C siendo esta última la óptima para su crecimiento (figura 3.21); así mismo, presenta un óptimo crecimiento con 10 g/L de NaCl en el medio de cultivo, pero es capaz de tolerar hasta 80 g/L (figura 3.23). El pH óptimo de crecimiento es de 6.7, aunque puede crecer en un intervalo de 6.7 a 7.3 (figura 3.25). No se detectó actividad de catalasa.

Crece con un número limitado de compuestos orgánicos como donadores de electrones y tiosulfato de sodio como aceptor. Al igual que otras especies de la familia *Thermotogaceae*, requirió 0.1 g/L de extracto de levadura adicional en el medio de cultivo para poder metabolizarlos (Jeanthon, 1995; Lien *et al.*, 1998b). Entre los donadores tenemos: extracto de levadura, peptona de caseína, azúcares (fructosa, galactosa, glucosa, manosa, ribosa, sacarosa, y xilosa), compuestos azufrados (dimetil sulfóxido) y creció ligeramente con sales de ácidos orgánicos (acetato, lactato). El máximo crecimiento se observó con peptona de caseína y extracto de levadura a los tres días de inoculación (tabla 3.5). Mostró crecimiento óptimo con tiosulfato de sodio en los experimentos con diferentes aceptores de electrones, reduciéndolo lentamente en presencia de peptona de caseína; mientras que los demás compuestos azufrados no fueron utilizados (figura 3.27). La reducción del tiosulfato promovió la división celular (figura 3.26) al igual que las cepas pertenecientes a la familia *Thermotogaceae* (Ravot *et al.*, 1995; Ravot *et al.*, 1996; Lien *et al.*, 1998b).

Los resultados bioquímicos mostraron concordancia con la secuencia parcial del 16S, que mostró un alto porcentaje de identidad con ambas especies del género *Petrotoga*; *P. miotherma* (L10657.1) y *P. mobilis* (DSM 10674). Las principales características de estas dos cepas se enumeran en la tabla 4.1 y son comparadas con las de la cepa MET-12.

Tabla 4.1. Comparación de las principales características de las especies *P. mobilis*, *P. miotherma* (Lien *et al.*, 1998b) y la cepa MET-12.

Características	<i>Petrotoga mobilis</i>	<i>Petrotoga miotherma</i>	MET-12
Forma celular	Bacilo con toga	Bacilo con toga	Bacilo con toga
Tamaño (µm)			
Ancho	0.5 - 1.5	0.6	0.5 - 1
Longitud	1 - 50	2 - 7.5	3 - 10
Células por vaina	1 - 24	1- 5	1-5
Motilidad y flagelos	Motil - subpolar	No motil	Motil - ?
Cuerpos esféricos	-	+	+
Temperatura optima	58 - 60°C	55°C	60°C
NaCl óptimo (g/l)	30 - 40	20	10
pH óptimo	6.5 - 7	ND	6.7 - 7.3
Requiere vitaminas	+	ND	ND
Extracto de levadura	+	+	+
Reduce S <sup>0</sup> →H <sub>2</sub> S	+	+	-
Substratos usados			
Xilano	+	-	ND
Celulosa	-	-	-
Ribosa	+	ND	+
Sacarosa	+	+	+
Glucosa	+	+	+
Fructosa	+	+	+
Galactosa	+	+	+
Maltosa	+	+	ND
Xilosa	+	+	+
Manosa	ND	ND	+

La cepa MET-12 comparte con *Petrotoga mobilis* características como: aproximación en el tamaño, motilidad, temperatura óptima y degradación en común de compuestos utilizados como donadores de electrones (extracto de levadura, ribosa, sacarosa, glucosa, fructosa, galactosa y xilosa). Con *Petrotoga miotherma*, comparte características como la formación de cuerpos esféricos y crecimiento en una serie de compuestos como donadores de electrones; pero a diferencia de ambas cepas, la MET-12 no fue capaz de reducir azufre elemental a H<sub>2</sub>S.

Si bien, la caracterización filogenética parcial sugiere que se trata de una nueva especie perteneciente al género *Petrotoga*, se requiere la secuencia completa del gene 16S rDNA para descartar que se trate de una subespecie de cualquiera de las dos (*P. miotherma* o *P. mobilis*); de otra forma, se tendrá que recurrir a estudios de hibridación de DNA, para descartar esta opción.

Los microorganismos dominantes en el agua de batería del pozo **SAM-III**, crecieron preferentemente con los tratamientos que tenían mayor cantidad de casaminoácidos y peptona de caseína (figuras 3.31 a 3.33). De esta muestra se aisló la cepa **MET-82**, que son vibrios Gram (+) de hasta 3  $\mu\text{m}$  de largo que se presentan solos o en pares formando cadenas (figuras 3.34.a y b) y flóculos en cultivos viejos. Esta cepa crece de manera óptima a 32°C y en un intervalo de 10 a 100 g/L de NaCl, con una concentración óptima de 50 g/L (figura 3.38). El pH óptimo de crecimiento abarcó un intervalo de 7.07 a 7.96 (figura 3.40). No se detectó actividad de catalasa. Crece sobre varios compuestos orgánicos que utiliza como donadores de electrones y sulfato o tiosulfato de sodio como aceptores.

En presencia de tiosulfato, crece con alcoholes (etanol y glicerol); ácidos orgánicos (fumárico, láctico y pirúvico); ácidos grasos volátiles (acético, butírico, fórmico y succínico); azúcares (glucosa) y compuestos complejos (casaminoácidos, peptona de caseína y extracto de levadura). En presencia de sulfato crece con: lactato, piruvato, malato, fumarato, succinato, formiato y etanol. Con acetato- $\text{H}_2$  y con  $\text{H}_2\text{-CO}_2$ , creció ligeramente sobre el control (tabla 3.8). Las rutas de degradación que sigue esta cepa son similares a las descritas para las BRS en la figura 4.1, sólo que esta cepa no lleva a cabo la degradación completa de acetato hasta  $\text{CO}_2$ .

En los experimentos con diferentes aceptores de electrones, presentó mayor crecimiento con dimetil sulfóxido y tiosulfato de sodio en presencia de peptona de caseína como donador de electrones (figura 3.41). En la cuantificación de  $\text{H}_2\text{S}$  del mismo experimento, se detectó que el tiosulfato fue reducido en su totalidad, el sulfato se redujo escasamente, mientras que el dimetil sulfóxido no fue empleado como aceptor de electrones, a pesar de que el crecimiento de la cepa resultó óptimo con este compuesto (figura 3.42).

La secuencia parcial del gene 16S rDNA mostró que existen un 92% de identidad con la especie *Desulfovibrio gabonensis* (U31080.1) reportada por Tardy-Jaquenod *et al.*, (1996), aislada de agua de producción de un pozo petrolero en Africa. La tabla 4.2 muestra las similitudes fisiológicas entre ambas cepas.

Tabla 4.2. Comparación de las principales características de la especie *Desulfovibrio gabonensis* con la cepa MET-2

<b>Característica</b>	<b><i>Desulfovibrio gabonensis</i></b>	<b>MET-82</b>
Tamaño celular ( $\mu\text{m}$ )	0.4 ancho por 2-4 largo	0.5 ancho por 3 largo
Intervalo de salinidad (%)	1 - 17	1 - 10
Optimo de salinidad (%)	5 - 6	5
Intervalo de temperatura	15 - 40	-
Temperatura óptima $^{\circ}\text{C}$	30	32
Intervalo de pH	6.4 - 8.2	7.07 - 7.96
Optimo pH	6.9 - 7.3	7.3 - 7.65
Donadores de electrones usados con sulfato		
H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	-	-
H <sub>2</sub> + acetato	+	+
Lactato	+	+
Piruvato	+	+
Malato	+	+
Fumarato	+	+
Succinato	+	+
Acetato	-	-
Etanol	+	+
Lactato + tiosulfato	+	+
Peptona	ND	+
Extracto de levadura	ND	+

Si bien las características fisiológicas de la cepa MET-82 son muy similares a las de *Desulfovibrio gabonensis*, la diferencia en el número de bases de la secuencia parcial del gene 16S, sugiere que podría tratarse de una nueva especie. La secuenciación total así como pruebas fisiológicas subsecuentes descartarán de manera definitiva, que se trate de la misma o de una subespecie de ésta.

En la tabla 4.3 se muestran las principales características fisiológicas de las cepas aisladas en el presente trabajo. Se hace evidente, que se trata de especies diferentes por su forma, tamaño, fuentes de carbono utilizadas como sustratos, temperaturas óptimas de crecimiento así como concentraciones de NaCl y pH.

Tabla 4.3. Principales características fisiológicas determinadas en las cepas aisladas en el presente trabajo.

<b>Característica</b>	<b>MET-2</b>	<b>MET-12</b>	<b>MET-82</b>
Pozo de origen	SAM-III	21-D	SAM-III
Consistencia de la muestra	acuosa	acuosa	acuosa
Forma	vibrios	bacilos con 'toga'	vibrios
Ancho ( $\mu\text{m}$ )	0.5	0.5 a 1	0.5
Longitud ( $\mu\text{m}$ )	3.0	3 a 10	3.0
Motilidad	+	+	+
Células por vaina	-	1 a 5	-
Cuerpos esféricos	-	+	-
Intervalo de temperatura $^{\circ}\text{C}$	32 a 35	50 a 60	-
Temperatura óptima $^{\circ}\text{C}$	35	60	32
Intervalo de salinidad (%)	2 a 8	1 a 8	1 a 10
Salinidad óptima (%)	6	10	5
Intervalo de pH	6.7 a 7.5	6.7 a 7.3	7.07 a 7.96
pH óptimo	7.0	6.7	7.3 a 7.65
Reduce $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$	+	+	+
Reduce $\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$	+	-	+
Reduce $\text{S}^{\circ} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$	-	-	-
Actividad catalasa	-	-	-
<b>Substratos usados con tiosulfato de sodio</b>			
peptona de caseína	+	+	+
extracto de levadura	+	+	+
casaminoácidos	+	-	+
Fructosa	+	+	ND
Galactosa	+	+	ND
Glucosa	+	+	+
Manosa	+	+	ND
Ribosa	+	+	ND
Sacarosa	+	+	ND
Xilosa	+	+	ND
Etanol	+	-	+
Glicerol	+	-	+
Manitol	+	-	ND
Metanol	+	-	ND
Sorbitol	+	-	ND
Tolueno	+	-	ND
Acetato	+	+	ND
Citrato	+	-	ND
Formiato	+	-	ND
Lactato	+	+	+
Acetona	+	-	-
Dimetil sulfóxido	+	+	+
Ac. acético	+	-	+
Ac. butírico	+	-	+
Ac. fórmico	+	-	+
Ac. succínico	+	-	+
Identidad con otra especie	<i>D. gracilis</i>	<i>P. miotherma</i>	<i>D. gabonensis</i>

A lo largo del territorio nacional la paraestatal PEMEX mantiene en operación un sistema de alrededor de 56 mil kilómetros de ductos, de los cuales un 41% deben ser reemplazados por problemas de corrosión. Los fluidos que son transportados contienen importantes cantidades de H<sub>2</sub>S. La corrosión asociada a la presencia de este compuesto es considerada como un grave problema causante de diversas fallas y accidentes.

Actualmente, en el Instituto Mexicano del Petróleo, se llevan a cabo estudios multidisciplinarios enfocados a la búsqueda de soluciones ante este grave problema. Los estudios se basan en la instalación de estaciones de campo donde se llevan a cabo análisis de la diversidad microbiológica mediante técnicas de ingeniería genética, caracterización metalúrgica, electroquímica de procesos, elaboración de sustancias inhibidoras, biocidas y elementos tóxicos para los microorganismos.

En el presente trabajo se realizó el proceso convencional para el aislamiento e identificación de tres cepas presentes en pozos petroleros del Golfo de México, con problemas de corrosión; cuya peculiaridad es la producción de H<sub>2</sub>S que llevan a cabo mediante un metabolismo desasimilatorio.

Si bien el aislamiento y purificación son procesos tediosos que hay que realizar pacientemente, existen actualmente diversos métodos para hacer el trabajo más práctico. Si se quieren identificar géneros específicos, se puede recurrir a técnicas de biología o de clonación molecular como las descritas en: (Godon *et al.*, 1997; Orphan *et al.*, 2000); por otro lado, si se busca el aislamiento de ciertos grupos de microorganismos para encontrar nuevas especies en muestras con un gran número de bacterias, se puede recurrir a las técnicas inmunológicas o magnéticas como las descritas en: (Beeder *et al.*, 1995), con el fin de optimizar el trabajo e identificar géneros específicos de manera rápida y precisa, pudiendo predecir su participación en un fenómeno observado.

## Referencias

---

<sup>1</sup> <http://www.ecopetrol.com.co/prin/petroleo/origenes/htm>

<sup>2</sup> <http://www.imp.mx>

Atlas R. (1992). "Petroleum Microbiology". En: Encyclopedia of Microbiology. Joshua Lederberg (ed). Academic Press Inc. Vol. 3. Pp. 363-369.

Balch W.E, Fox G.E, Magrum L.J, Woese C.R y Wolfe R.S. (1979). "Methanogens: reevaluation of a unique biological group". **Microbiol Rev.** 43:260-296.

Barton L.L. (1992). "Sulfur Metabolism". En: Encyclopedia of Microbiology. Joshua Lederberg (ed). Academic Press Inc. Vol. 4. Pp. 135-149.

Beeder J, Torsvik T, y Lien T. (1995). *Thermodesulfohabdus norvegicus* gen. nov., sp., nov., a novel thermophilic sulfate-reducing bacterium from oil field water. **Arch Microbiol.** 164:331-336.

Beji A, Izard D, Gavini F, Leclerc H, Leseine-Delstanche M, y Krembel J. (1987). A rapid chemical procedure for isolation and purification of chromosomal DNA from Gram-Negative bacilli. **Analytical Biochemistry.** 162:18-23.

Bonilla M. (1999). Aislamiento y caracterización de bacterias que utilizan tiosulfato. **Tesis de Maestría de la Universidad Autónoma Metropolitana.** México, D.F. pp. 72.

Bozzola J.J. y Russell L.D. (1991). Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists. Jones and Bartlett Publishers. Boston. USA. pp 40-61.

Carlson J.G, Grandberg P.D, Nubig G.K. y Eglund M.B.K. (1979). Bactericidal effect of cysteine exposed to atmospheric oxygen. **Appl Environm Microbiol.** 37:383-390.

Cayol J.L, Ollivier B, Patel B.K.C. Ravot G, Magot M, Ageron E, Grimont P.A.D, y García J.L. (1995). Description of *Thermoanaerobacter brockii* subsp. Lactiethylicus subsp. Nov., Isolated from a Deep Subsurface French Oil Well, a Proposal to reclassify *Thermoanaerobacter finni* as *Thermoanaerobacter brockii* subsp. Finni comb. Nov., and Emended Description of *Thermoanaerobacter brockii*. **Int J Syst Bacteriol.** 45, 783-789

Cord-Ruwisch R. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. **J Microbiol Met.** 4:33-36.

Corpet F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research.** 16:10881-10890.

Costerton J.W, Lewandowski Z, Cadwell D.E, Korber D.R. y Lappin-Scott H.M. (1995). Microbial Biofilms. **Annu Rev Microbiol.** 49: 711-745.

Cypionka H. (2000). Oxygen Respiration by Desulfovibrio Species. **Annu Rev Microbiol.** 54:827-848.

Chen J, Banks D, Jarret RL, Chang J, Smith BJ. (2000). Use of 16SrDNA sequences as signature characters to identify *Xylella fastidiosa*. **Curr Microbiol.** 40:29-33.

Dannenberg S, Kroder M, Dilling W, y Cypionka H. (1992). Oxidation of H<sub>2</sub>, organic compounds and inorganic sulfur compounds coupled to reduction of O<sub>2</sub> or nitrate by sulfate-reducing bacteria. **Arch. Microbiol.** 158:93-99.

Dick W. (1992). "Sulfur Cycle". En: Encyclopedia of Microbiology. Joshua Lederberg (ed). Academic Press Inc. Vol. 4. Pp.125-133.

Fardeau M.L, Cayol J.L, Magot M, y Ollivier B. (1993). H<sub>2</sub> oxidation in the presence of thiosulfate by a *Thermoanaerobacter* strain isolated from an oil-producing well. **FEMS Microbiol. Lett.** 113:327-332.

Fardeau M.L, Cayol J.L, Magot M, y Ollivier B. (1994). Hydrogen oxidation abilities in the presence of thiosulfate as electron acceptor within the genus *Thermoanaerobacter*. **Curr Microbiol.** 29:269-272.

Fardeau M.L, Ollivier B, Patel B.K.C, Dwived D, Ravot M, y García J.L. (1995). Isolation and characterization of a thermophilic sulfato-reducing bacterium *Desulfotomaculum thermosapovorans* sp., nov., **Int J Syst Bacteriol.** 45(2):218-221.

Fardeau M.L, Patel B.K.C, Magot M, y Ollivier B. (1997a). Utilization of Serine, Leucine, Isoleucine, and Valine by *Thermoanaerobacter brockii* in the presence of thiosulfate or *Methanobacterium* sp. as electron acceptors. **Anaerobe.** 3, 405-410.

Fardeau M.L, Ollivier B, Patel B.K.C, Magot M, Thomas P, Rimbault A, Rocchiccioli F, y García J.L. (1997b). *Thermotoga hypogea* sp. nov., a Xylanolytic, Thermophilic Bacterium from an Oil-Producing Well. **Int J Syst Bacteriol.** 47:1013-1019.

Faudon C, Fardeau M.L, Heim J, Patel B.K.C, Magot M, y Ollivier B. (1995). Peptide and amino acid oxidation in the presence of thiosulfate by members of the genus *Thermoanaerobacter*. **Current Microbiology.** 31:152-157.

Gibson G.R. (1990). Physiology and ecology of the Sulphate-Reducing Bacteria. **Journal of Applied Bacteriology.** 69:769-797.

Godon J, Zumstein E, Dabert P, Frédérick Habuzi, y René Molea. (1997). Microbial 16s rDNA diversity in an Anaerobic digester. **Wat Sci Tech.** 36(6-7):49-55.

Hao O.J, Chen J.M, Huang L, and Buglass R.L. (1996). Sulfate-Reducing Bacteria. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**. 26:155-187.

Haridon S.L, Cilia V, Messner P, Raguénès G, Gambacorta A, Sleytr U.B, Prieur D, y Jeanhon C. (1998). "*Desulfobacterium thermolithotrophum* gen. nov., sp. nov., a novel autotrophic, sulfur-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent". **Int J Syst Bacteriol**. 48: 701-711.

Hernández-Eugenio G, Fardeau M.L, Patel B.K.C, Macarie H, García J.L, y Ollivier B. (2000). *Desulfovibrio mexicanus* sp., nov, a sulfate-reducing bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating cheese wastewaters. **Anaerobe** 6:305-312.

Huber R, Woese C.R, Langworthy T.A, Kristjansson J.K. y Stetter K.O.(1990). *Fervidobacterium islandicum* sp., nov., a new extremely thermophilic eubacterium belonging to the "*Thermotogales*". **Archives of Microbiology**. 154:105-111.

Hungate R.E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. En: Methods in Microbiology. Vol. 3B. Norris J.R. and Ribbons D.W. (eds). Academic Press Inc. New York. pp. 117-132.

Jannasch H.W, Huber R, Belkin S, y Stetter K.O. (1988). *Thermotoga neapolitana* sp., nov., of the extremely thermophilic eubacterial genus *Thermotoga*. **Arch Microbiol**. 150:103-104.

Jeanthon C., Reysenbach AL, L'Haridon S, Gambacorta A, Pace NR, y Glenat. (1995). *Thermotoga subterranea* sp. Nov a new thermophilic bacterium isolated from a continental oil reservoir. **Arch Microbiol**.164:91-97.

Jørgensen B. (1990). A thiosulfate shunt in the sulphur cycle of marine sediments. **Science**, 249:152-154.

Jørgensen B, y Bak B. (1991). "Pathways and microbiology of thiosulfate transformations and sulfate reduction in a marine sediment (Kattegat, Denmark). **Appl Environ Microbiol**. 57(3):847-856.

Kang K.S, Veeder G.T, Mirrasoul P.J, Kaneko T, y Cotrell I.W. (1982) Agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties. **Appl Environm Microbiol**. 43:1086-1091.

Lappin-Scott H.M, Costerton J.W, y Marie T.J. (1992). "Biofilms and Biofiling". En: Encyclopedia of Microbiology. Joshua Lederberg (ed). Academic Press .Inc. Vol. 1.pp.277-283.

Leu J.Y, Mc.Govern-Traa C.P, Porter A, Harris W, y Hamilton A. (1998). Identification and Phylogenetic Analysis of Thermophilic Sulfate-Reducing Bacteria in Oil Field Samples by 16s rDNA Gene Cloning and Sequencing. **Anaerobe**. 4:165-174.

Lewin B. GENES V. (1994). Oxford University Press. pp. 1272.

Lien T, Beeder J. (1997). *Desulfobacter vibrioformis* sp., nov., a sulfate reducer from a water-oil separation system. **Int J Syst Bacteriol**. 47(4):1124-1128.

Lien T, Madsen M, Steen IH, y Gjerdevik K. (1998a). *Desulfobulbus rhabdoformis* sp., nov., a sulfate-reducer from a water-oil separation system. **Int J Syst Bacteriol**. 48, 469-474.

Lien T, Madsen M, Rainey F.A., y Birkeland N.K. (1998b). *Petrotoga mobilis* sp. nov., from a North Sea oil-production well. **Int J Syst Bacteriol**. 48(3): 1007-1013.

Lin C.C., y Casida L.E. (1984). Gelrite as a gelling agent in media for the growth of thermophilic microorganisms. **Appl Environ Microbiol**. 47:427-429.

Ljungdahl, L.G. y Wiegel J. (1986). Working with anaerobic Bacteria. En: Manual of Industrial Microbiology and biotechnology. Editors: Arnold L. Demain and Nadine A. Solomov. American Society for microbiology. USA. 84-96

Madigan M.T, Martinko J.M, y Parker J. (1998). Brock. Biología de los microorganismos. 8ª ed. Prentice Hall. España. 986 pp.

Magot M, Ravot G, Campaignolle X, Ollivier B, Patel B.K.C, Fardeau M.L, Thomas P, Crolet J.L, y García J.L. (1997a). *Dethiosulfovibrio peptidovorans* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, slightly halophilic, thiosulfate-reducing bacterium from corroding offshore oil wells. **Int J Syst Bacteriol**. 47: 818-824.

Magot M, Fardeau M.L, Arnauld O, Lanan C, Ollivier B, Thomas P, y Patel B.K.C. (1997b). *Spirochaeta smaragdinae* sp. nov., a new mesophilic, strictly anaerobic spirochete from an oil field. **FEMS Microbiology Letters** 155: 185-191.

Maka A, y Cork D.J. (1992). "Sulfur Microorganisms in the Fossil Fuel Industry". En: Encyclopedia of Microbiology. Joshua Lederberg (ed). Academic Press Inc. Vol. 4.pp. 151-155.

Murray R.G.E, Wood W.A, y Krieg N.R. (1994). "Coloration GRAM". En: Methods for general and molecular bacteriology. pp. 78.

Noll K. (1992). "Archaeobacteria (Archaea)". En: Encyclopedia of Microbiology. Joshua Lederberg (ed). Academic Press Inc. Vol. 1.pp.149-160.

Ollivier B, Caumette P, García JL, y Mah RA. (1994). Anaerobic Bacteria from hipersaline environments. **Microbiological Reviews**, 27-38.

Orphan V.J, Taylor L.T, Hafenbradl D, y Delong E.F. (2000). Culture-Dependent and Culture-Independent Characterization of Microbial Assemblages Associated with High-Temperature Petroleum Reservoirs. **Appl Environ Microbiol.** 66:700-711.

Oude Elferink SJ, Maas RN, Harmsen HJ, y Stams AJ. (1995). *Desulfoharbdus amnigenus* gen., nov., sp., nov., a sulfate reducer isolated from anaerobic granular sludge. **Arch Microbiol.** 164(2):119-124.

Patel B.K.C, Morgan H.W, y Daniel R.M. (1985). *Fervidobacterium nodosum* gen., nov. And spec. Nov., a new chemoorganotrophic caldoactive, anaerobic bacterium. **Arch Microbiol.** 141:63-69.

Qatibi Al, Bennisse R, Jana M, y García JL. (1998). Anaerobic degradation of glycerol by *Desulfovibrio fructosovorans* and *D.carbinolicus* and evidence for glycerol-dependent utilization of 1,2-propanediol. **Curr Microbiol.** 36. 283-290.

Quintero R. (1990). Ingeniería Bioquímica. Primera edición, segunda reimpresión. Editorial Alhambra Mexicana, S.A. de C.V. pp 27-37.

Raskin L, Zheng D, Griffin M.E. Stroot P.G. y Misra P. (1995). Characterization of Microbial Communities in Anaerobic bioreactors using molecular probes. **Antonie van Leeuwenhock.** 68:297-308.

Ravot G, Ollivier B, Magot M, Patel B.K.C, Crolet J.L, Fardeau M.L, y García J.L. (1995). Thiosulfate reduction, an important physiological feature shared by members of the order *Thermotogales*. **Appl Environ Microbiol.** 61(5): 2053-2055.

Ravot G, Ollivier B, Fardeau M.L, Magot M, y García J.L. (1996). La Réduction du Thiosulfate par les bactéries anaérobies Thermophiles et Hypertermophiles. En: Memorias del Coloquio: Microbiologie Industrielle et environnement. Narbonne 18-19 avril.

Sanger R, Nicklen S, y Coulson A.R. (1997). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci.** USA 74:5463 - 5483.

Tardy-Jacquenod C, Magot M, Laigret F, Kaghad M, Patel BKC, Guezennec J, Matheron R, y Caumette P. (1996). *Desulfovibrio gabonensis* sp., nov., a New moderately halophilic sulfate-reducing bacterium isolated from an oil pipeline. **Int J System Bacteriol.** 46:710-715.

Tardy-Jacquenod C, Magot M, Patel BKC, Matheron R, y Caumette P. (1998). *Desulfotomaculum halophilum* sp., nov., a halophilic sulfate-reducing bacterium isolated from oil production facilities. **Int J System Bacteriol.** 48. 333-338.

Taylor B.F. (1992). "Marine Habitats Bacteria". En: Encyclopedia of Microbiology. Joshua Lederberg (ed). Academic Press Inc. Vol. 3.pp. 29-43.

Ueki A, Minato H, Azuma R, y Suto T. (1980). Enumeration and Isolation of anaerobic bacteria in sewage digester fluids: enumeration of sulfate-reducers by the anaerobic roll tube method. **J Gen Appl Microbiol**, 26, 25-35.

Walch M. (1992). "Corrosion Microbial". En: Encyclopedia of Microbiology. Joshua Lederberg (ed). Academic Press Inc. Vol. 1.pp.585-591.

Widdel F, y Pfenning N. (1984). Dissimilatory Sulfate or Sulfur – reducing Bacteria en: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins. 663-679.

Wiegel J, y Ljungdahl L.G. (1981). *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen. nov., spec. nov., a new extreme Thermophilic, Anaerobic Bacterium. **Arch Microbiol**. 128: 343-348.

Wolfe R. (1999). "Anaerobic Life – a Centennial View". **Journal of Bacteriology**. 181:3317-3320.

Yacamán J.M, y Reyes J. Microscopía electrónica. Una visión del microcosmos. 1995. Fondo de Cultura Económica. México. 140pp.

Zamos B.L, Nielsen H.K, y Starnes R.L. (1991). Thermostable enzymes for industrial applications. **J Ind Microbiol**. 8: 71-82

Zeikus J.G, Hegge P.W, y Anderson M.A. (1979). *Thermoanaerobium brockii* gen. nov., a new chemoorganotrophic, caldoactive, anaerobic bacterium. **Arch Microbiol**. 122:41-48.

*El jurado designado por la*  
*División de Ciencias Biológicas y de la Salud*  
*Universidad Autónoma Metropolitana*  
*aprobó la presente TESIS el día 26 de julio del 2001.*

---

*Dra. Florina Ramírez Rives*

---

*Dr. Pedro Ostoa Salama*

---

*Dr. Didier Alazard*

---

*Dr. Oscar Monroy Hermosillo*

---

*Dr. Julio César Carrero Sánchez*

*México, D. F. a 26 de julio del 2001.*

---