

66  
2ej



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

## "FISIOLOGIA, BIOQUIMICA Y ECOLOGIA DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS"

**TRABAJO ESCRITO**  
VIA CURSOS DE EDUCACION CONTINUA  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
**P R E S E N T A :**  
**BLANCA ESTHELA RODRIGUEZ GOMEZ**



MEXICO, D. F.



275140

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA.

1999

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

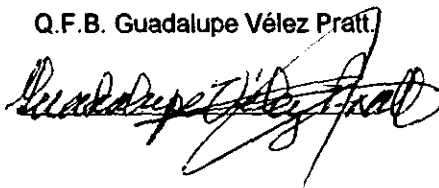
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente:	Q.F.B.	Guadalupe Vélez Pratt
Vocal:	Q.	Lilia Vierna García
Secretario:	Q.F.B.	Beatriz Luna Millán
1er Suplente:	M.en C.	Guadalupe Tsuzuki Reyes
2do Suplente	Dr.	Jorge Manuel Romero Jarero

Sitio donde se desarrolló el tema: Bibliotecas del Campus Cd. Universitaria, del IMP y otras.

Asesor del tema: Q.F.B. Guadalupe Vélez Pratt



Sustentante: Blanca Esthela Rodríguez Gómez.



# CONTENIDO

	Pág.
Introducción.	1
Capítulo I Generalidades.	3
Características de las bacterias reductoras de sulfato.	4
Características del género <i>Desulfovibrio</i> .	4
Características del género <i>Desulfotomaculum</i> .	5
Capítulo II Fisiología y bioquímica de las bacterias sulfato reductoras, (BSR)	9
Utilización de diversas fuentes de carbono por las BSR.	9
Mecanismos de regulación del funcionamiento del consorcio.	11
Energética	12
Descripción del modelo de la ruta del hidrógeno en el crecimiento de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> .	14
Bases bioquímicas de la ruta del hidrógeno	15
Características más importantes del modelo de Widdel y Hansen.	16
Comparación entre la reducción asimilatoria y la desasimilatoria del sulfato	21
Remoción de metales por BSR.	25
Capítulo III Aislamiento y cultivo de las bacterias sulfato reductoras.	27
Medios de cultivo específicos para BSR.	27
Resultados de crecimiento con sustratos específicos para BSR.	34
Otros medios de cultivo	34
Análisis por seguimiento de huella radioactiva en la reducción del sulfato.	35
Determinación colorimétrica de H <sub>2</sub> S	37
Medición química de sulfato	37
Mediciones de BSR en el medio ambiente a través del uso de fluorescencia.	37

Capítulo IV Ecología.	38
Adherencia e incrustación	38
Formas de adherencia bacteriana.	39
Biocorrosión.	41
Técnica para medir el porcentaje de la corrosión.	42
Papel de las BSR en los procesos de corrosión	43
Control microbiológico de la producción de H <sub>2</sub> S por BSR.	45
Métodos de identificación de BSR para problemas de incrustación, taponamiento y formación de biofilm.	46
Técnicas utilizadas en perforaciones petroleras con problemas de formación del biofilm y biocorrosión.	46
Análisis cuantitativos y cualitativos	48
Conclusiones.	49
Bibliografía	51

## ABREVIATURAS

ADP	Adenosin difosfato
AMP	Adenosin monofosfato
APS	Adenosin fosfosulfato
ATP	Adenosin trifosfato
BSR	Bacterias sulfato reductoras
CoA	Coenzima A
CTAB	Bromuro de celil- trimetilamonio
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
Eh	Potencial redox
FUM	Fumarato
ISOCIT	Isocitrato
LDH	Deshidrogenasa láctica
MAL	Malato
mdd	Miligramos por decímetro cuadrado por año
MIC	Influencia de corrosión microbiológica
mpy	Milímetros de penetración por año
OA	Oxalacetato
OG	Cetoglutarato
PAPS	Fosfoadenosínfosfosulfato
Pi	Fosfato inorgánico
PPi	Pirofosfato inorgánico

**Dedico este trabajo: A mi esposo, hijas, padres, hermanos, Elia, sobrinos, y amigos, en especial a: J. Luis Moreno y Margarita Amador. Gracias por su infinita paciencia, su buen humor y apoyo, durante el proceso de realización, de mi carrera.**

**Dedico este trabajo: Con infinito agradecimiento por su apoyo.  
A la Maestra Q.F.B. Guadalupe Vélez Pratt.**

**Deseo hacer un reconocimiento especial a una exitosa pareja, que con su apoyo y confianza en mí coadyuvaron a la culminación de mi licenciatura.**

**Gracias tío Angel y Neri**

## Introducción

Las actividades bioquímicas con las que diferentes organismos contribuyen al reciclaje de la materia en la biosfera son muy diversas.

Los microorganismos, entre ellos, las bacterias desarrollan actividades bioquímicas sorprendentes, tanto por su variedad como por el tipo de reacciones que se efectúan en la biosfera; de hecho, en los ciclos de la materia la parte más importante, en el reciclaje de la materia, cuali- y en ocasiones cuantitativamente, las tienen a su cargo los microorganismos.

Los diversos grupos bacterianos dan cuenta de la formación de una variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos que enriquecen los diferentes hábitats en el medio ambiente. Así, por mencionar algunas de las transformaciones microbianas de la materia se puede considerar las siguientes: la producción de  $\text{CO}_2$  es el resultado de la respiración, proceso al cual contribuyen los microorganismos; en cambio, la formación biológica del metano es, por el contrario, exclusiva de las arqueas metanogénicas. Muchos organismos pueden utilizar los nitratos, ya sea para asimilar el nitrógeno reduciéndolo o para desasimilarlo, obteniendo energía; pero sólo un pequeño grupo de bacterias puede fijar el nitrógeno para asimilarlo.

Casi todas las bacterias y cianobacterias, así como un grupo de bacterias quimiolitótrofas pueden oxidar los sulfuros, pero solo unos cuantos géneros reducen los sulfatos produciendo sulfuros. En fin, las diversas formas orgánicas e inorgánicas de los elementos que se encuentran en el medio y que se representan en los ciclos biogeoquímicos esquemáticamente, son producto, en gran parte, de la intervención de las bacterias para beneficio de ellas mismas y de otros organismos, a través del reciclaje de la materia. La investigación de la fisiología microbiana es muy importante para entender su efecto en el medio, favorecer las condiciones en que se lleven al cabo los procesos y con ello evitar en éste, la pérdida de sus características naturales.

Sin embargo, algunas actividades dentro de esta red de transformaciones ambientales, pueden constituir un factor de daño aunque no precisamente al ambiente, sino a ciertas instalaciones industriales

Dichas actividades se refieren al metabolismo de las bacterias sulfato reductoras, las cuales, reducen desasimilatoriamente el sulfato y otros compuestos oxidados de azufre en el medio, produciendo ácido sulfhídrico. De manera natural, lo anterior no constituye un problema, pues aunque se trata de un producto tóxico, puede ser nuevamente transformado por otros microorganismos a una forma no tóxica.



Sin embargo, en ciertas instalaciones como las variadas de la industria petrolera, la formación de sulfuros es un factor importante en la corrosión de ductos, tanques y tuberías, causando un daño que se traduce en múltiples pérdidas no solamente económicas. Aunque la industria petrolera no es la única que enfrenta tal riesgo, ciertamente es la más importante, por su alcance e importancia económica.

Las bacterias sulfato reductoras son particularmente activas en ecosistemas en los cuales la concentración de sulfatos es alta, la concentración de oxígeno es mínima o nula y es en estos ecosistemas terrestres y acuáticos, donde se produce la corrosión.

El objetivo de este trabajo, dada la importancia ecológica de las bacterias sulfato reductoras, ya que nos interesa conocer mejor a este grupo de bacterias y darlo a conocer a través de este breve trabajo. Es hacer una revisión de los aspectos fisiológicos, bioquímicos y ecológicos de estas bacterias y de las técnicas de cultivo adecuadas para ellas.

# Capítulo I

## Generalidades.

Las bacterias sulfato reductoras (BSR) son un grupo de microorganismos gram-negativos, que reducen el sulfato. Aunque algunas especies reducen también, el nitrato a amonio pero esto es poco común. Estas bacterias oxidan compuestos orgánicos simples como: acetato, formiato, piruvato, lactato, colina, etanol, propanol, alcoholes primarios y monóxido de carbono. En algunas especies de BSR el metabolismo es también fermentativo. Dan lugar a compuestos que constituyen sistemas amortiguadores como  $-SH/H_2S$  y  $-HCO_3^-/CO_2$ , los cuales protegen a las células de valores de pH extremos, mediante la conservación de energía, aunque tradicionalmente para las BSR se han empleado para su crecimiento, los medios que contienen lactato y en menor grado, piruvato o malato como donador de electrones.

Su crecimiento se lleva a cabo en condiciones estrictamente anaerobias, en un medio alcalino y con requerimientos de NaCl de 20 %. También requieren hierro como micronutrientes que es utilizado en el medio y sirve como indicador de la formación de ácido sulfhídrico debido al precipitado de color negro del sulfuro de hierro, sin embargo, la cisteína inhibe el precipitado de color negro del sulfuro de hierro debido a la formación del ácido sulfhídrico.

El pH óptimo de crecimiento es de 7.2 a 7.8, pero se pueden encontrar a un pH de 6.5 a 8.5 y la temperatura óptima es de 20 a 40 °C aunque algunas son consideradas como termófilas. (1, 2)

Una clasificación general de las BSR, con base en la fuente de carbono que utilizan se presenta a continuación. En la Tabla I.

Entre los géneros más importantes están: **Desulfovibrio**, **Desulfotomaculum**, **Desulfomonas**, **Desulfobacter**, **Desulfobulbus**, **Desulfosarcina** y **Desulfococcus**.

De los anteriores géneros, los más importantes que están involucrados en la corrosión del metal y por lo tanto las más dañinas para la industria petrolera, son las siguientes:

**Tabla I Características de las bacterias reductoras de sulfato y sulfuro<sup>(9)</sup>**

Grupo I Reductoras de sulfato: No oxidan el acetato.			
Género	DNA (mol % GC)	Género	DNA (mol % GC)
<i>Desulfovibrio</i>	46 - 61	<i>Desulfomicrobium</i>	52 - 57
<i>Desulfobotulus</i>	53	<i>Desulfotomaculum</i>	37 - 46
<i>Desulfomonile</i>	49	<i>Desulfobacula</i>	42
<i>Archaeoglobus</i>	41 - 46	<i>Desulfobulbus</i>	59 - 60
<i>Thermodesulfobacterium</i>	34		
Grupo II Reductoras de sulfato: Que oxidan el acetato			
Género	DNA (mol % GC)	Género	DNA (mol % GC)
<i>Desulfobacter</i>	45 - 46	<i>Desulfobacterium</i>	41 - 59
<i>Desulfococcus</i>	57	<i>Desulfonema</i>	35- 42
<i>Desulfosarcina</i>	51	<i>Desulfoarculus</i>	66
<i>Desulfacinum</i>	64	<i>Desulforhabdus</i>	52
<i>Thermodesulforhabdus</i>	51		
Otras reductoras de sulfato (desasimilación)			
<i>Desulfuromonas</i>	50 - 63	<i>Desulfurella</i>	31
<i>Campylobacter</i>	40 - 42		
Arqueas hipertermofílicas			

Con el fin de dar a conocer dos de los géneros más abundantes y que tienen gran importancia en los fenómenos de biocorrosión, se incluyen en las Tablas II y III que describen las características de las especies más representativas de estos dos géneros.<sup>(9)</sup>

### Género *Desulfovibrio*

Los miembros del género *Desulfovibrio* no forman esporas, tienen forma de varillas curvas, miden 0.5 - 1.0 x 1.0 - 5.0 micras, se presentan como cadenas y tienen apariencia de espiral, son gram-negativas, son móviles por medio de un flagelo polar, y fluorescen por medio de luz UV a 365 nm en medio alcalino en el cual se observa una fluorescencia roja.

Se han descrito cinco especies reconocidas: *D. desulfuricans*, *D. vulgaris*, *D. salexigens*, *D. africanus* y *D. gigas*, con flagelación típica. Para su crecimiento, como fuente de carbono están incluidos el piruvato y la colina, son resistentes a la clorhexidina y su requerimiento de NaCl es del 20%.

**Desulfovibrio** obtiene su energía por desasimilación o respiración en el proceso de la reducción del sulfato, es decir, el sulfato actúa como aceptor final de electrones en el proceso de respiración, produciendo H<sub>2</sub>S. (1, 2, 18)

**Tabla II Características del género Desulfovibrio.** (1, 2, 19)

características / especies	<i>desulfuricans</i>	<i>vulgaris</i>	<i>salexigens</i>	<i>africanus</i>	<i>gigas</i>
forma	vibrio	vibrio	vibrio grueso	sigmoide	espiral
flagelación	polar (1)	polar (1)	polar (1)	polar lofótrico	lofótrico
esporas	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo-
Tipo de citocromo	C <sub>3</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> , b	C <sub>3</sub>
desulfovirdina	positivo	negativo	positivo	positivo	positivo
% de G-C	55.3 +- 1	61.2 +-1	46.1+-1	61.2 +-1	60.2
crecimiento con 20 % de NaCl	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
resistencia a la Clorhexidina mg / l	10 - 25	2.5	1000	2.5	2.5
hábitat	suelo, agua, lodo	suelo, agua, lodo	agua de mar, lodo	agua salada	estuarios, lodo
tamaño en micras	0.5-1 x 3.5	0.5-1 x 3.5	0.5 x 3.5	0.5 x 5-10	1.2 - 1 x 5-10

### Género Desulfotomaculum

Los miembros del género **Desulfotomaculum** (antes incluido en el género **Clostridium**)<sup>(18)</sup> son móviles, tienen forma de varillas y también son gram-negativas; producen esporas, son anaerobios estrictos pero no fluorescen por medio de luz UV en medio alcalino.

Los flagelos en este género son peritricos, en contraste con la flagelación polar de **Desulfovibrio**. Son clasificados en el orden **Eubacteriales** con tres especies: **D. nigrificans**, **D. orientis** y **D. ruminis**, estos organismos se asocian, igual que el género **Desulfovibrio**, con el metabolismo del azufre, dañando al metal de tuberías y produciendo microincrustaciones.

Su respiración es igual a la del género **Desulfovibrio**, así como su medio de cultivo<sup>(1,2,18)</sup>

**Tabla III Características del género *Desulfotomaculum*.**(1, 2, 19)

características / especies	<i>nigrificans</i>	<i>orientis</i>	<i>ruminis</i>
forma	varilla	varilla curva	varilla
flagelación	peritrico	peritrico	peritrico
esporas	negativo	positivo	positivo
tipo. de citocromo	b	b	b
desulfovinidina	negativo	negativo	negativo
% de G-C	44.7	41.7	45.6
crecimiento con 20 % de NaCl	negativo	negativo	negativo
resistencia. a la Clorohexidina mg/l	0.25	0.25	1
hábitat	suelo, residuos de comida	suelo	rúmen de animales
tamaño en micras	0.3 - 0.5 x 3 - 6	1.5 x 5	0.5 x 3 - 6

El potencial redox de las BSR (Eh) se encuentra en la región de -100 mV, así un agente reductor como el ascorbato, tioglicolato, ditionato o sulfuro de sodio, al ser añadidos al medio de cultivo excluyen al oxígeno y mantienen las condiciones bajas de (Eh) hasta un valor suficiente que permita el crecimiento de las BSR, (ver Tabla IV).

En las siguientes Tablas se dan los valores E° de algunos pares redox importantes en la bioquímica microbiana.

**Tabla IV Potencial de par redox de las BSR**

PAR REDOX	Eo (V)
2 H <sup>+</sup> / H <sub>2</sub>	-0.41
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> /HS <sup>-</sup> + HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-0.40
Ferredoxina ox /red	-0.39
NAD <sup>+</sup> / NADH	-0.32
Citocromo c <sub>3</sub> ox/red	-0.29
CO <sub>2</sub> / acetato	-0.29
S <sup>0</sup> / HS <sup>-</sup>	-0.27
CO <sub>2</sub> / CH <sub>4</sub>	-0.24
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> / HS <sup>-</sup>	-0.22
piruvato / lactato	-0.19
HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / HS <sup>-</sup>	-0.11
Fumarato/succinato	+0.033
Citocromo b ox/red	+0.035
Ubiquinona ox/red	+0.115
Citocromo c <sub>1</sub> ox /red	+0.23
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> / NO	+0.36
Citocromo a <sub>3</sub> ox/red	+0.385
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+0.43
Fe <sup>3+</sup> / Fe <sup>2+</sup>	+0.77
O <sub>2</sub> / H <sub>2</sub> O	+0.82
N <sub>2</sub> O / N <sub>2</sub>	+1.36

**Tabla V Potenciales E'o de algunos grupos bacterianos.**

<b>E'o (V)</b>	<b>REACCIÓN</b>	<b>EJEMPLOS</b>
-0.29	$\text{CO}_2 \longrightarrow \text{CH}_3\text{-COO}$	Bacterias homoacetogénicas, anaerobias obligadas
-0.27	$\text{S}^\circ \longrightarrow \text{HS}^-$	Bacterias aerobias facultativas o anaerobias obligadas.
-0.24	$\text{CO}_2 \longrightarrow \text{CH}_4$	Arqueas metanogénicas, anaerobias obligadas.
-0.22	$\text{SO}_4^{2-} \longrightarrow \text{HS}^-$	<b>Bacterias reductoras de sulfato, anaerobias obligadas.</b>
+0.033	Fumarato $\longrightarrow$ Succinato	Bacterias aerobias facultativas.
+0.43	$\text{NO}_3^- \longrightarrow \text{NO}_2^-, \text{N}_2\text{O}, \text{N}_2$	Bacterias desnitrificantes, aerobias facultativas.
+0.77	$\text{Fe}^{3+} \longrightarrow \text{Fe}^{2+}$	Bacterias aerobias facultativas o anaerobias obligadas.
+0.82	$\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$	Bacterias aerobias obligadas, o aerobias facultativas.

En esta Tabla se muestra la posición intermedia del proceso característico de las BSR en comparación con otros procesos fisiológicos microbianos.

## Capítulo II

### Fisiología y Bioquímica de las bacterias sulfato reductoras

Aunque las BSR son organismos anaerobios estrictos, y a pesar del efecto inhibitorio del oxígeno, estas bacterias son, en ocasiones, activas en sedimentos acuáticos aerobios ya que pueden prosperar en nichos anaeróbicos existentes en estos sedimentos. La formación y existencia de estos micronichos puede explicarse porque los procesos respiratorios de la microflora consumen la totalidad del oxígeno disponible, y porque el ácido sulfhídrico producido por las BSR, que es un agente reductor, reacciona con el oxígeno a temperatura ambiente.

De esta manera, una vez establecidas las colonias de BSR, pueden protegerse del oxígeno por sí mismas; no obstante, en un ambiente homogéneo aireado, las BSR se tornan inactivas; aunque pueden sobrevivir en aguas que contengan 5 mg/l de oxígeno disuelto por muchas horas y aún días, aunque no pueden multiplicarse. Cuando encuentran nuevamente condiciones anaerobias, estas bacterias recuperan su actividad.<sup>(18)</sup>

Las bacterias sulfato reductoras son gram-negativas, (fijan el colorante de safranina) por lo que constituye una prueba útil que forma parte de un cuadro general de las pruebas de identificación para estos microorganismos.<sup>(5, 20)</sup>

Las BSR prefieren los valores de pH cercanos a la neutralidad y en ambientes con pH fuera de estos valores, buscan ocupar micronichos en los cuales las condiciones se acerquen a la neutralidad.<sup>(18)</sup>

La fisiología de las BSR no puede entenderse si no es en relación con otras bacterias las cuales están estrechamente asociada, por lo que aquí se presentan sus actividades fisiológicas en un contexto ecológico.<sup>(9)</sup>

#### Utilización de diversas fuentes de carbono por las BSR.

Los sustratos carbonados que pueden ser utilizadas como fuente de carbono y electrones por las diversas especies de BSR son variadas. La utilización de lactato y piruvato es prácticamente universal por todos los miembros de este grupo de bacterias y muchos miembros del grupo I (ver Tabla I), utilizan malato, formato, ciertos alcoholes primarios como metanol, etanol, propanol y butanol. También algunas especies del género *Desulfotomaculum* utilizan glucosa, aunque esto es más bien raro entre las BSR.<sup>(9)</sup>



Las BSR del grupo I oxidan su fuente de carbono hasta el nivel de acetato, que excretan como producto final. En cambio las BSR del grupo II pueden oxidar ácidos grasos, lactato, succinato y aún benzoato hasta  $\text{CO}_2$ . Los géneros **Desulfosarcina**, **Desulfonema**, **Desulfococcus**, **Desulfobacterium**, **Desulfotomaculum** y algunas especies de **Desulfovibrio** pueden crecer quimiolitotróficamente con  $\text{H}_2$  como donador de electrones y  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono. Sin embargo, la mayoría de las BSR son quimioorganotrofas y utilizan diversos donadores de electrones. (ver Tabla VI).<sup>(9)</sup>

**Tabla VI Compuestos del azufre y donadores de electrones para la reducción del sulfato.** <sup>(9)</sup>

Compuestos	Estados de oxidación
<b>Estados de oxidación de los compuestos del azufre más importantes</b>	
Orgánico S (R - SH)	-2
Sulfuro ( $\text{H}_2\text{S}$ )	-2
Azufre elemental ( $\text{S}^0$ )	0
Tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ )	+2 (promedio para S)
Tetrionato ( $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ )	+2.5 (promedio para S)
Dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ )	+4
Sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ )	+4
Trióxido de azufre ( $\text{SO}_3$ )	+6
Sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ )	+6
<b>Algunos donadores de electrones usados para la reducción del sulfato</b>	
$\text{H}_2$	Acetato
Lactato	Propionato
Piruvato	Butirato
Etanol y otros alcoholes	Acidos grasos de cadenas largas
Fumarato	Benzoato
Malato	Indol
Colina	Hexadecano

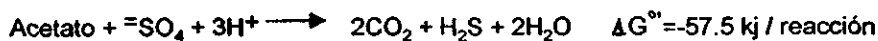
Las BSR crecen sintróficamente en asociación unas con otras que, aunque poseen fisiología y metabolismo diferente, interactúan para un mismo fin que es el equilibrio natural del ecosistema. Estos consorcios están formados por diversos grupos tróficos, (acetogénicos y metanogénicos además de las BSR) las cuales llevan a cabo diferentes funciones para catabolizar los sustratos orgánicos.<sup>(18)</sup>

Las bacterias acetogénicas son productoras de hidrógeno, al catabolizar ácidos orgánicos, este hidrógeno es aprovechado, para la reducción del sulfato.<sup>(9)</sup>

El hidrógeno es esencial en la interacción de las bacterias del consorcio ya que lo involucran en un proceso llamado "transferencia de hidrógeno interespecies"; por ejemplo, las acetogénicas tienen un papel importante en este proceso debido a que funcionan como productoras cuando fermentan compuestos orgánicos, y como consumidoras cuando crecen autotróficamente.

De esta manera, el producto de las acetogénicas es utilizado por las bacterias hidrogenotróficas las sulfato reductoras y las arqueas metanogénicas.

Las BSR que utilizan acetato lo oxidan completamente hasta CO<sub>2</sub> y el sulfato es reducido a sulfuro según la siguiente ecuación.



Sin embargo, la oxidación del acetato no se lleva a cabo a través del ciclo del citrato como en la mayoría de los organismos quimioorganotrofos; en el caso de las BSR, el acetato se oxida por una serie de reacciones que constituyen un ciclo del citrato modificado que tiene semejanzas con el ciclo del glioxilato utilizado por otras bacterias para la oxidación del acetato.

Esta vía metabólica que se ha estudiado en **Desulfobacter**, presenta, además de la mayoría de las enzimas del ciclo del citrato, una enzima que activa el acetato por tioesterificación con la coenzima A proveniente de succinil CoA, formando acetil CoA; Esta última entra al ciclo del citrato para llevar a cabo las reacciones normales de este ciclo y oxidar el acetato hasta CO<sub>2</sub>.

#### Mecanismos de regulación del funcionamiento del consorcio.

Los principales mecanismos son:

- 1- Concentración de sulfato en los sedimentos.
- 2- Inhibición de la metanogénesis por el aumento de la concentración de sulfuro.
- 3- Aporte de materia orgánica al sedimento.

1. Concentración del sulfato.- En el caso de los lagos que sufren cambios estacionales en la distribución de sus aguas, el sulfato que se encuentra es variable; en tanto que en los lagos estratificados se favorece la deposición del sulfato y por lo tanto el establecimiento de zonas anóxicas.

En el proceso de selección natural los microorganismos sobrevivientes son aquellos que desarrollaron la capacidad degradadora y por lo tanto en cualquier interacción con fines de biorremediación se deben utilizar de preferencia los microorganismos autóctonos. Por ejemplo; en derrames de hidrocarburos es muy difícil la adaptación de microorganismos exógenos a un nuevo hábitat.<sup>(9)</sup>

2. Inhibición de la metanogénesis.- La generación de metano y la reducción del sulfato son procesos metabólicos alternos al término. Por lo tanto, el metabolismo de ambas es complementario. El metano sólo es producido en ausencia de sulfato disuelto, dicho gas es consumido por las BSR; principalmente por *Desulfovibrio*.

Las BSR Tipo I liberan acetato como producto final del metabolismo para obtener energía y las bacterias metanogénicas utilizan el acetato como sustrato produciendo metano y  $\text{CO}_2$ .

Se ha visto que la interacción ecológica entre las bacterias sulfato reductoras y las metanogénicas en relación con la concentración del  $\text{SO}_4^{=}$  es más compleja, porque hay una serie de factores que están involucrados como mecanismos de control de la producción y consumo de metano.<sup>(9)</sup>

3. Aporte de materia orgánica.- Las bacterias sulfato reductoras pueden competir por el hidrógeno cuando el sulfato y el hidrógeno son abundantes y los sustratos orgánicos limitados.

En ausencia de sulfato las bacterias respiradoras de sulfato generan hidrógeno a partir de la oxidación de la materia orgánica.

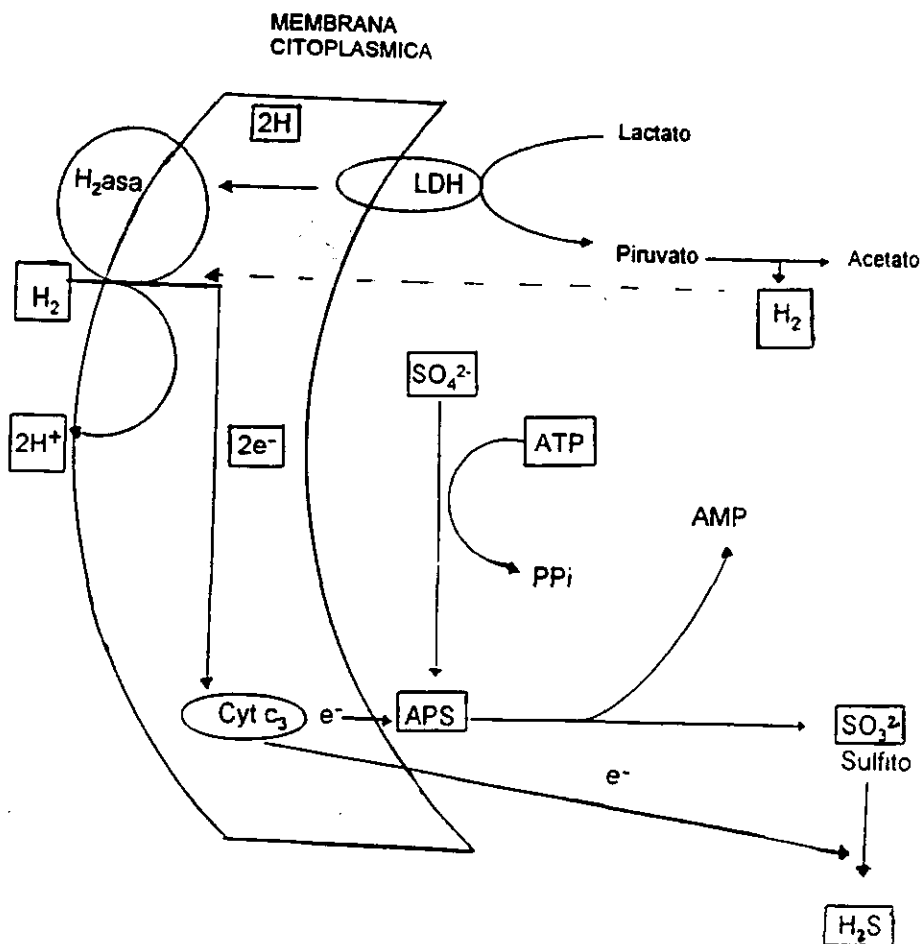
#### Energética.<sup>(9)</sup>

El proceso de transporte de electrones de las BSR está basado en un sistema de citocromo en el cual los electrones que provienen del sustrato reducido se transfieren al sulfato del adenosín fosfosulfato APS y al sulfito. El citocromo  $c_3$  de las BSR no se encuentra en otros organismos que utilizan otros aceptores de electrones. En adición al citocromo de las BSR, la cadena de transporte de electrones también incluye ferredoxina y flavodoxina.

Las BSR del Tipo II (especies que pueden degradar acetato y otros ácidos grasos), también contienen un citocromo b, mismos que probablemente esté involucrado en el transporte de electrones; el citocromo tipo b está ausente en las BSR Tipo I, que no degradan ácidos grasos. El sistema de transporte de electrones de las BSR se muestra en la Figura 1.

EXTERIOR

INTERIOR



**Figura 1** Transporte de electrones y generación de un protón producido por las BSR. Una adición externa de hidrógeno es producido por el metabolismo fermentativo anaerobio, también es originado por el catabolismo de los compuestos orgánicos, como lactato y piruvato. APS: Adenosin fosfosulfato; LDH: Deshidrogenasa lactica.<sup>(9)</sup>

El género *Desulfovibrio* ha sido utilizado como modelo para el estudio del metabolismo central del  $H_2$ .

Siendo el hidrógeno un elemento importante en la reducción del sulfato, se han hecho numerosas investigaciones con el fin de dilucidar los mecanismos por los cuales las células bacterianas transportan el hidrógeno para formar el  $H_2S$  que resulta como producto final. Se ha propuesto un modelo que se describe a continuación, para explicar la evolución del  $H_2$  en las células de las BSR.

#### **Descripción del modelo de la ruta del hidrógeno en el crecimiento de *Desulfovibrio vulgaris*.**

Widdel y Hansen,<sup>(22)</sup> proponen un modelo de la ruta del hidrógeno, que se refiere a la evolución del hidrógeno a través de la membrana de la célula; este modelo asume la existencia de dos mecanismos simultáneos de transporte de electrones. (ver figura 2).

El primer mecanismo es semejante al modelo del ciclo del  $H_2$ ,<sup>(23)</sup> en lo que respecta a la evolución y consumo de  $H_2$ .

En el segundo mecanismo, los electrones son transportados directamente de un donador a un aceptor con la participación del hidrógeno.

En condiciones controladas, los autores<sup>(22)</sup> combinaron cinética y termodinámicamente el experimento del crecimiento de *Desulfovibrio vulgaris*, en lactato en presencia o ausencia del sulfato. Se estima que un resultado del 48% de electrones transportados de lactato a sulfato implicaba la producción de hidrógeno e indicaban que el ciclo del hidrógeno es fundamental en el proceso de *Desulfovibrio vulgaris*.

Zinder, en 1993,<sup>(26)</sup> demostró que la conversión anaeróbica de compuestos orgánicos complejos tiene un papel muy importante en la regulación del hidrógeno; el  $H_2$  consumido es esencial para mantener concentraciones bajas de él, mismas que son necesarias para la transformación completa de material orgánico a metano y dióxido de carbono, suponiendo un consorcio microbiano.

La estimulación de los organismos productores de hidrógeno es termodinámicamente factible porque el hidrógeno es consumido inmediatamente e indican que las concentraciones altas de  $H_2$  inhiben el crecimiento de organismos sintróficos resultando la incompleta degradación de materia orgánica y la acumulación de ácidos orgánicos, y que la estabilidad de una comunidad microbiológica anaeróbica depende de los balances coexistentes de los productores de hidrógeno y de los consumidores del mismo.

Las BSR pueden usar el hidrógeno como un donador de electrones, sin embargo, las hidrogenasas catalizan la reducción de los protones moleculares reversiblemente. <sup>(12)</sup>

El hidrógeno juega un papel central muy importante en la actividad metabólica de muchas especies de **Desulfovibrio**. Se conocen al menos tres mecanismos en los que así sucede y son los siguientes:<sup>(12)</sup>

1°-El H<sub>2</sub> puede servir como un donador externo de electrones, cuando la fuente de hidrógeno es la adecuada y el aceptor de electrones se encuentra presente.

2°-El H<sub>2</sub> actúa como un donador de electrones siendo transportado entre especies durante el crecimiento sintrófico por un consumidor de hidrógeno, tal como los metanogénicos.

3°-El H<sub>2</sub> es simultáneamente producido y consumido por muchas especies de **Desulfovibrio**, durante la degradación de compuestos orgánicos, en presencia de sulfato.

Muchas especies de **Desulfovibrio** tienen la habilidad de funcionar de las dos maneras, como productores de hidrógeno y como consumidores, o en combinación, dependiendo del medio ambiente que se encuentren.

En medios anaeróbicos, sin la presencia de sulfato, las especies de **Desulfovibrio**, pueden actuar como productores de hidrógeno usando productos de fermentación semejantes al lactato y etanol como sustitutos energéticos.

**Desulfovibrio** puede tener la habilidad de intercambiar rápidamente su metabolismo en respuesta a los cambios del medio ambiente; por lo tanto se dice que las BSR son dominantes en medios donde el sulfato es escaso.

Raskin, en 1996<sup>(24)</sup>, demostró en el laboratorio con reactores de cama de biofilm que la mayor parte de BSR sobreviven en ausencia de sulfato, por otra parte, la persistencia de las BSR en ausencia de sulfato implica una alternativa en la desasimilación metabólica de la reducción del sulfato a un metabolismo que tiene H<sub>2</sub> centrales; éste modelo experimental nos dice que en los intercambios rápidos del metabolismo de **D. vulgaris** de las comunidades microbiológicas, los mecanismos de cinética y termodinámica son suficientes para la evolución del hidrógeno.<sup>(12)</sup>

#### **Bases bioquímicas de la ruta del hidrógeno.**

El papel del H<sub>2</sub> durante la degradación del lactato por algunos miembros del género **Desulfovibrio** en presencia de sulfato ha sido debatido desde 1981.

Odem y Peck,<sup>(23)</sup> proponen el modelo cíclico del  $H_2$ , en el cual el hidrógeno es requerido durante el transporte de electrones de un donador orgánico al aceptor,

así, el  $H_2$  es simultáneamente producido y consumido observándose una rápida acumulación de  $H_2$ . Posteriormente se vio que el  $H_2$  no es un intermediario obligatorio, sino que es producido sólo como un mecanismo de control redox y que el transporte de electrones se hace directamente a través de la membrana.

Estos experimentos han recibido mucho apoyo y actualmente se examinan las consecuencias de tener dos diferentes mecanismos de transporte en función simultáneamente. La existencia de un doble mecanismo de transporte puede explicar la capacidad de muchas especies de *Desulfovibrio* de adaptarse rápidamente a una gran variedad de condiciones ambientales.<sup>(12)</sup>

#### **Características más importantes del modelo de Widdel y Hansen, 1991.<sup>(22)</sup>**

El modelo implica la oxidación incompleta de lactato a acetato, que tiene lugar en el citoplasma. En la oxidación de dos moléculas de lactato, se forman dos moléculas de acetato, con 8 protones y 8 electrones, en adición, a los resultados de ésta transformación, se genera ATP por fosforilación a nivel del sustrato. (ver figura 4)

Los electrones generados durante la oxidación del lactato siguen dos rutas diferentes: la primera ruta sigue el paso 1 y 2, (ver Fig. 2).

La oxidación del hidrógeno en el periplasma y el subsecuente transporte de electrones son realizados en la célula por el paso 2 contribuyendo a la formación del protón necesario para la generación de ATP, es decir, utilizado en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa.

El segundo electrón transportado por el mecanismo del paso 3 no requiere de hidrógeno como intermediario.

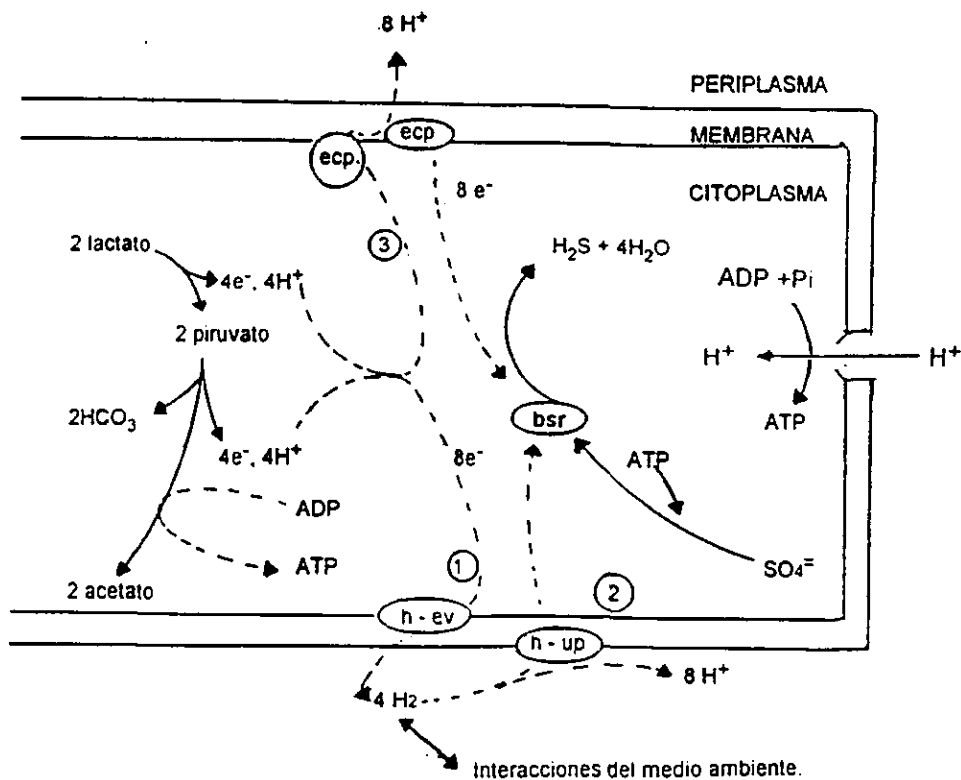
Se supone que la conservación de energía ocurre por la traslocación del protón durante el transporte de electrones.

El modelo asume la presencia de dos actividades separadas la del hidrógeno activo y su evolución respectivamente. Esta suposición es consecuencia de la identificación de los 3 tipos diferentes de hidrogenasas en la especie de *Desulfovibrio vulgaris* y de su diferente actividad catalítica.

La reducción del sulfato a ácido sulfhídrico ocurre en el citoplasma e implica el consumo de un ATP.

La producción de formiato a partir de  $H_2 + CO_2$ , es una posible reacción de la especie *Desulfovibrio* por la actividad de la formiato deshidrogenasa.

En la fig. 2 se presentan las bases bioquímicas del modelo de Widdel y Hansen<sup>(22)</sup> que es, de acuerdo con la actual comprensión de su bioquímica, el mecanismo de transporte de protones de *Desulfovibrio vulgaris*.<sup>(12)</sup>



- h - ev = hidrogenasa de evolución
- h - up = hidrogenasa de utilización
- bsr = bisulfito reductasa
- ecp = proteína transportadora de electrones.

**Figura 2** Modelo de Widdel y Hansen<sup>(22)</sup> propuesto para la actividad catabólica de *Desulfovibrio vulgaris*.



Los caminos o pasos presentados en el modelo de la Fig. 2 explican la versatilidad de muchas especies de *Desulfovibrio* al adaptarse rápidamente a los cambios de medio ambiente.

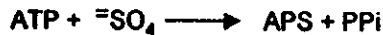
El modelo que propone se realizó utilizando 3 diferentes medios.

1°- Cuando el medio contiene lactato + sulfato, por los tres caminos se obtiene actividad simultánea de las deshidrogenasas.

2°- En ausencia de lactato u otros sustratos orgánicos, muchas especies de *Desulfovibrio* pueden usar el  $H_2$  sólo como donador de electrones en el paso 2.

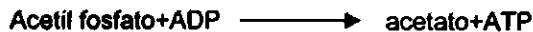
3°- En ausencia del aceptor de electrones sólo es posible la primera reacción del paso 1.

Las estrategias bioenergéticas de los dos principales géneros de bacterias sulfato reductoras, *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum* son fundamentalmente diferentes. En el caso de *Desulfovibrio*, el pirofosfato (PPi), producido durante la formación del adenilil sulfato (APS), a partir del sulfato y ATP, se hidroliza a ortofosfato (Pi), por una pirofosfatasa inorgánica:



Mediante este proceso, la energía química del pirofosfato no se conserva, de modo que para obtener un rendimiento neto de ATP durante el crecimiento con lactato y sulfato, *Desulfovibrio* debe llevar a cabo la fosforilación acoplada a la transferencia de electrones, es decir, utilizando el gradiente de protones que se forma en el exterior de la célula.

En contraste, *Desulfotomaculum* conserva la energía de enlace del pirofosfato producida por la ATP-sulfurilasa, por medio de la enzima acetato: PPI transferasa y la subsecuente formación de ATP por la acetato cinasa:



Estas reacciones permiten a *Desulfotomaculum* utilizar el PPI como fuente de energía, cuando crece con lactato y sulfato. La conversión de APS (adenosil fosfosulfato), a sulfito por medio de la APS reductasa requiere la adición de dos electrones.



La posterior reducción del sulfito a sulfuro, requiere la acción de la sulfito reductasa, tritionato reductasa, y tiosulfato reductasa para reciclar al sulfito.

Por lo tanto, el metabolismo de *Desulfovibrio*, bajo una atmósfera de hidrógeno, combina la fosforilación y el transporte de electrones por medio del citocromo  $c_3$ .

Ya que la energía requerida para activar el acetato y el rendimiento en ATP a través de este ciclo del citrato modificado son prácticamente iguales, *Desulfobacter* ha resuelto este problema utilizando una enzima capaz de acoplar la síntesis de ATP con una fosforilación a nivel de sustrato a partir de acetil-CoA (vía acetil-P), durante la formación del citrato (ver Fig. 3) La formación de ATP adicional en esta forma, permite el crecimiento de *Desulfobacter*.

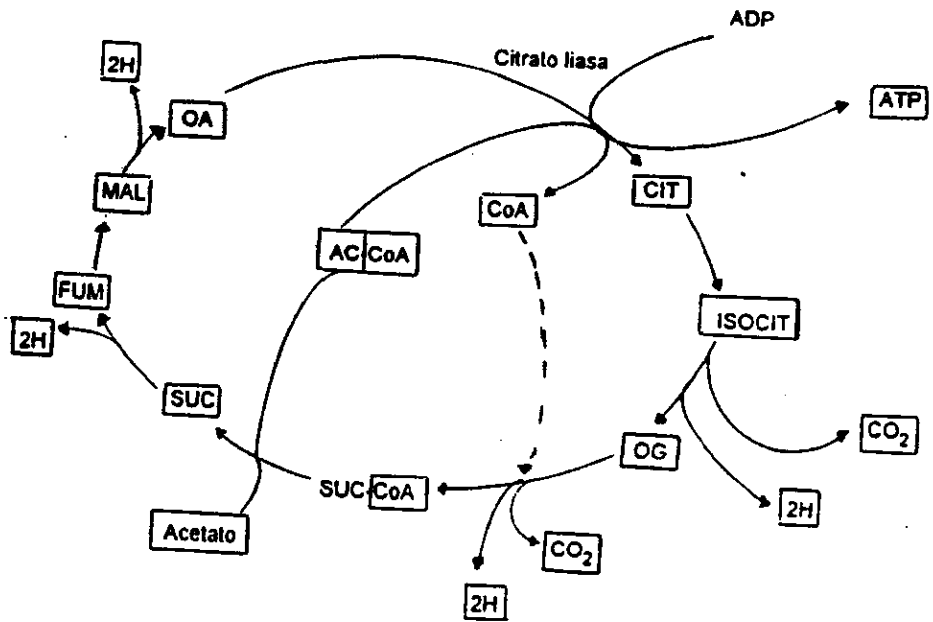
Los otros géneros de BSR del grupo II que utilizan el acetato como fuente de carbono no lo hacen por el sistema del ciclo del citrato modificado sino por medio de una vía llamada vía de la acetil-CoA, originalmente encontrada en bacterias homoacetogénicas en la que se produce el acetato a partir de  $\text{CO}_2$ . Este sistema lo utilizan las BSR, aparentemente por reacciones a la inversa del ciclo de la acetil-CoA, para oxidar el acetato.

Sin embargo, los sulfuros ( $\text{=S}$ ) y sulfitos ( $\text{=SO}_3^-$ ), no se producen solamente por la reducción del sulfato mediada por APS, sino también a través de una variedad de otros compuestos azufrados tales como el tritionato, tiosulfato y bisulfito. El sulfito puede ser producido por la reducción del tiosulfato por una dismutación. Una tiosulfato reductasa en unión con el citocromo  $c_3$ , reduce el tiosulfato a sulfito el cual a su vez, es también reducido a  $\text{H}_2\text{S}$  o puede ser reciclado a tiosulfato por vía de una enzima estrechamente asociada con la enzima que cataliza la reducción del bisulfito para transformarlo en tritionato.

La enzima bisulfito reductasa es en realidad una desulfoviridina cuyo único producto de la reducción del bisulfito es el tritionato.

Por lo tanto, es posible que sean utilizados en el medio ambiente varios compuestos inorgánicos azufrados para producir sulfito y de éste, el sulfuro tóxico y corrosivo.

El hidrógeno puede ser reemplazado por numerosos compuestos orgánicos, siempre y cuando el sulfato este presente en el medio. Esto significa que las BSR pueden utilizar los productos de otras fermentaciones como el lactato, malato o piruvato, como donadores de electrones e hidrógeno. Cada uno de estos compuestos orgánicos, se oxida hasta acetato y  $\text{CO}_2$ , y el poder reductor generado en esta oxidación, es utilizado para la reducción del sulfato a sulfito.



**Figura 3** Mecanismos en la oxidación del acetato a  $\text{CO}_2$ , de las BSR que utilizan el citrato, para la oxidación del acetato. La coenzima A se recicla en esta serie de reacciones por interacción de la succinil-CoA y acetato; notese el uso de citrato liasa para formar citrato. OA, Oxalacetato; MAL, malato; FUM, fumarato; SUC, succinato; SUC-CoA, succinil -coenzima A; OG,  $\alpha$ -cetoglutarato; ISOCIT, isocitrato; CIT, citrato; AC-CoA, acetil-coenzima A.

En el caso del lactato como donador de hidrógeno, el paso más importante de su oxidación es la utilización del piruvato (ver Fig. 4). El piruvato se descarboxila como se indica en el esquema y forma acetil fosfato y  $\text{CO}_2$ , liberando hidrógeno. La anterior es una reacción que se encuentra también en muchas otras bacterias cuyo metabolismo es fermentativo. Esta reacción es catalizada por la ferredoxina oxidoreductasa. Otra enzima, la acetato cinasa finalmente produce acetato y una mol de ATP, por fosforilación a nivel de sustrato, del ADP.

Los hidrógenos liberados durante los dos primeros pasos de la ruta, son utilizados para la reducción del sulfato. El balance de ATP es muy similar al de la reducción del sulfato utilizando directamente hidrógeno como donador de electrones.

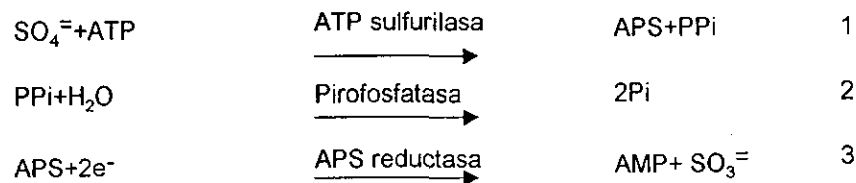
#### Comparación entre la reducción asimilatoria y la desasimilatoria del sulfato.

La mayoría de las bacterias y muchos otros microorganismos son capaces de reducir el sulfato con fines biosintéticos, es decir, de reducirlos en forma asimilatoria, al contrario de las BSR. En todos estos microorganismos se encuentra el sistema enzimático de la ATP sulfurilasa -descrito más arriba-, y que cataliza la activación del sulfato uniéndolo al ATP dando lugar al APS.

Sin embargo, para la reducción asimilatoria del sulfato es necesario fosforilar la porción adenilato del APS esterificando un nuevo fosfato con el -OH del carbono 2' de la ribosa (ver la Fig. 4), lo que da lugar al PAPS, fosfoadenosínfosfosulfato y sólo en ésta forma los microorganismos pueden reducir el sulfato a sulfito y posteriormente a ion  $\text{HS}^-$  para asimilarlo sintetizando los aminoácidos azufrados.<sup>(9)</sup>

El acetato formado a partir de lactato o piruvato es utilizado con fines asimilatorios, es decir, para el crecimiento del microorganismo; las células utilizan acetato en un 70% para su anabolismo y el 30% restante, proviene del  $\text{CO}_2$ .

#### En resumen, las principales reacciones de la reducción del sulfato son:



1-El sulfato es activado por el ATP y forma el nucleótido de adenosín-5'- fosfosulfato (APS, ver Fig. 5 y 6), la enzima que activa la reacción es ATP sulfurilasa.

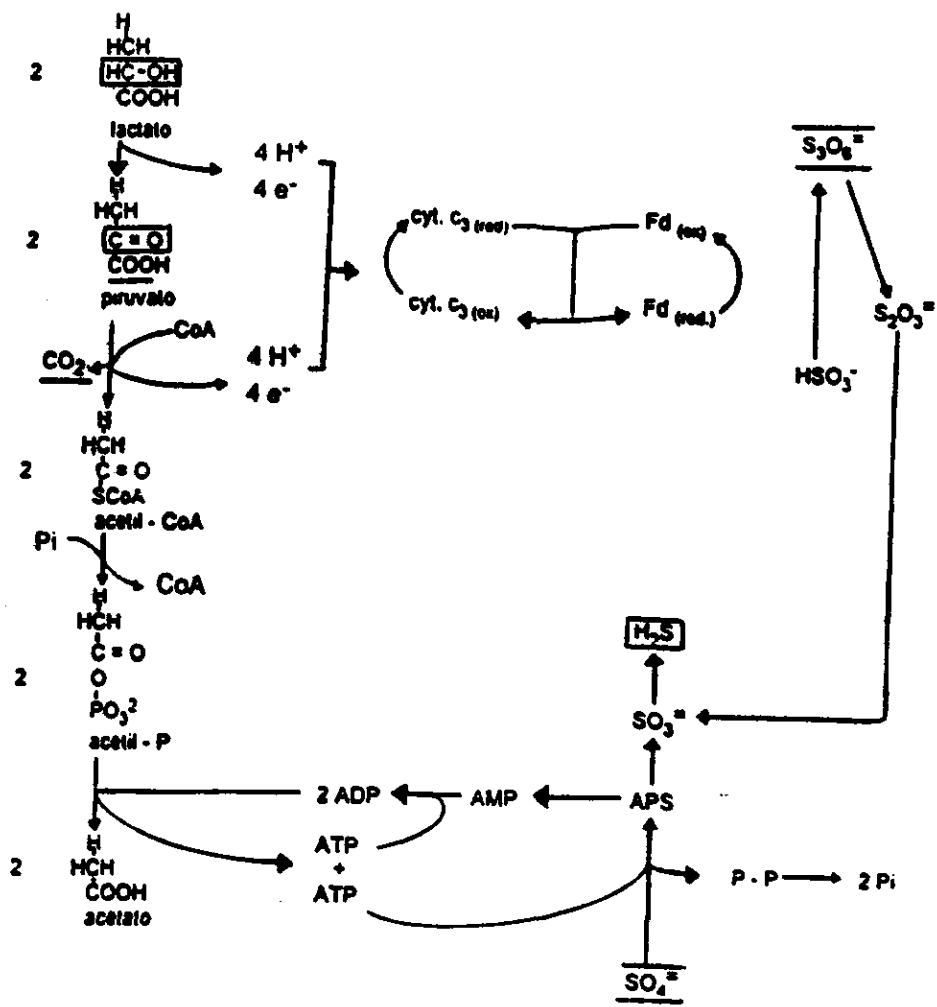
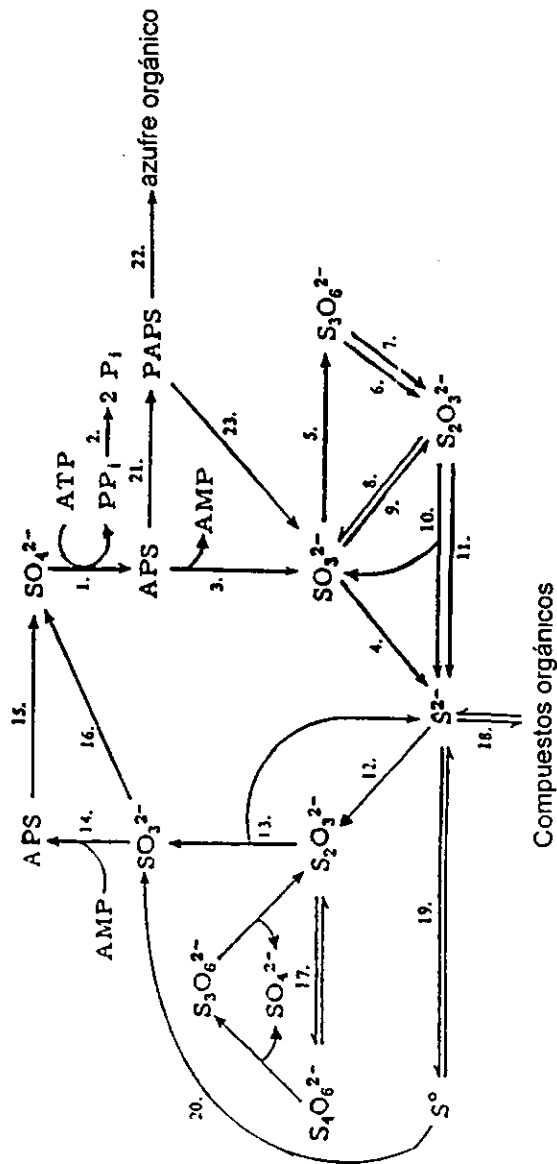


Figura 4 Reducción de sulfato con lactato como donador de hidrógeno. Las reacciones están explicadas en el texto



**Figura 5** Ciclo del azufre en la naturaleza. Las reacciones de la 1 a 11 son usadas para la desasimilación de las bacterias sulfato reductoras, (p.ej. *Desulfovibrio*). Las enzimas utilizadas son las siguientes:

1. sulfato adenililtransferasa; 2. pirofosfatasa inorgánica; 3. pirofosfatasa inorgánica; 4. sulfato reductasa; 5. bisulfito reductasa (desulfoviridina); 6. enzima formadora de tiosulfato; 7. tetrionato reductasa; 8. tiosulfato sulfotransferasa; 9. sistema formador de tiosulfato; 10. tiosulfato reductasa y la 11: sistema de reducción de tiosulfato.  
 Las reacciones 12-17, 19 y 20 son utilizadas para las bacterias oxidantes de sulfuro, (p.ej. *Thiobacillus*). Las enzimas utilizadas son: 12: sulfuro oxidasa; 13: tiosulfato reductasa; 14: adenilil sulfato reductasa; 15: adenililsulfatasa; 16: sulfito oxidasa; 17: tetralionasa. La reacción 18 la realizan la mayoría de los microorganismos. La enzima es: cistationina sintetasa; 19: sulfuro oxidasa; 20: sulfuro dioxigenasa. Las reacciones 21-23 son utilizadas para la asimilación reductora de sulfato. Las enzimas son: 21: adenililsulfato quinasa; 22: aril sulfotransferasa y la 23 PAPS reductasa.

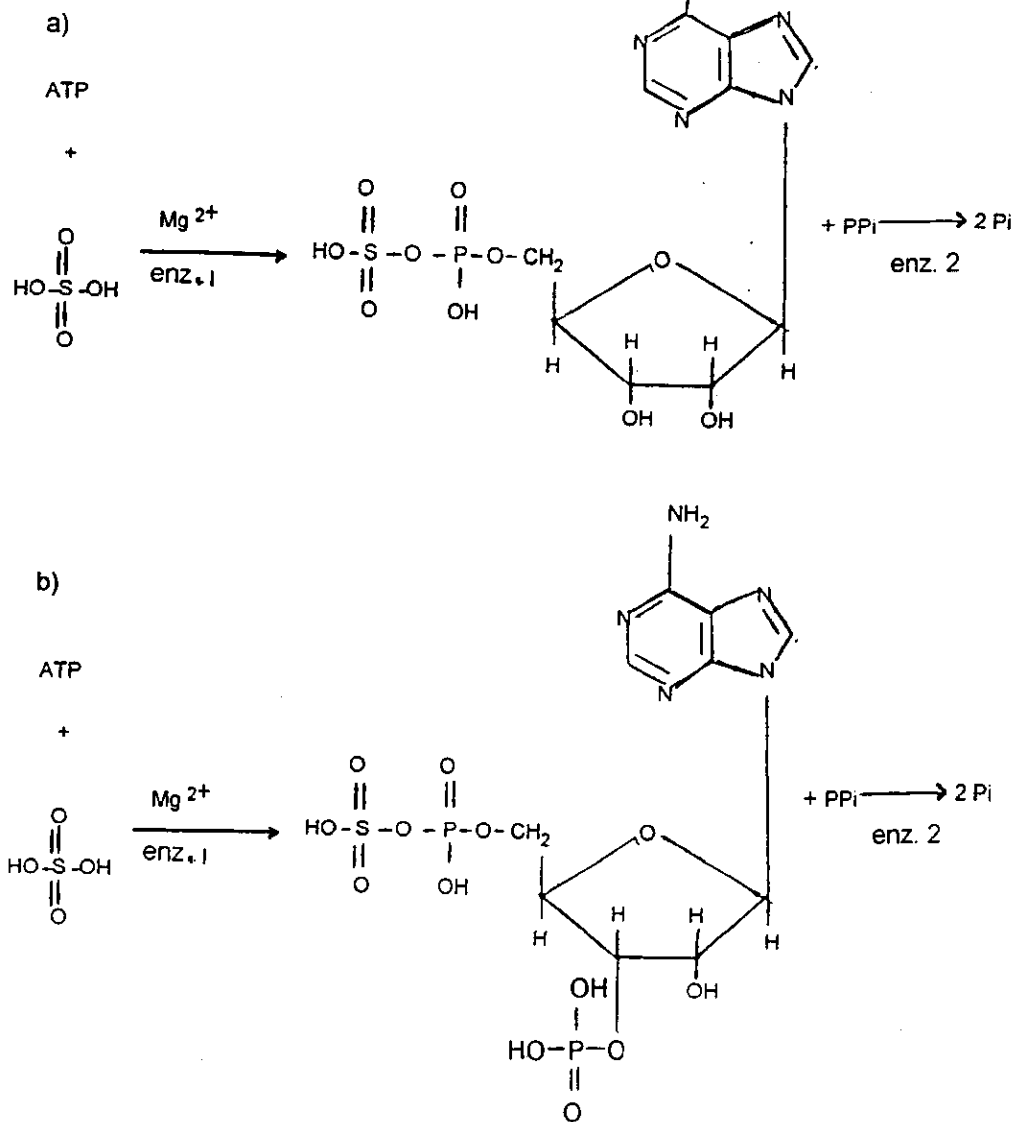


Figura 6 a) Adenosin 5' fosfosulfato; b) Fosfoadenosin 5' fosfosulfato.

2-El pirofosfato (PPi) es hidrolizado a ortofosfato por la pirofosfatasa.

3-El APS es entonces reducido por la APS-reductasa con los electrones del hidrógeno, (vía hidrogenasa), hidrolizando el enlace P-S con una adenosín monofosfatasa; y el azufre queda oxidado como sulfito. En la formación del sulfito ( $\text{SO}_3^-$ ), participa un citocromo  $c_3$  de muy alto potencial redox (- 250 mV). (18, 20)

Además de utilizar el sulfato como aceptor de electrones, muchas BSR pueden crecer utilizando nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), como aceptor de electrones o bien, pueden utilizar ciertos compuestos orgánicos para obtener energía por fermentación si no está presente el sulfato ni otros aceptores de electrones alternos.

Algunas BSR como *Desulfovibrio* y *Desulfobacter* pueden fijar el  $\text{N}_2$ .

#### **Remoción de metales por BSR.**

Las BSR pueden reducir también una serie de elementos metálicos por lo que se ha utilizado esta capacidad bioquímica para remover metales de efluentes industriales.

Esta propiedad está siendo utilizada para realizar la reducción de los metales por células inmovilizadas, en un proceso biotecnológico.

Las células microbianas pueden inmovilizarse con objeto de realizar las reacciones de reducción y aplicarlas a la biorremediación por ejemplo en un reactor biológico de columna, como en el caso del experimento, que a continuación se describe para remover el uranio y el molibdeno, en un proceso continuo por medio de reducciones enzimáticas. Llevado a nivel de laboratorio, donde se demuestra la reducción desasimilatoria de las BSR células de *D. desulfuricans*, inmovilizadas en gel de poliacrilamida, se montaron en los reactores de columna, con agua para cada uno de los metales uranio y molibdeno, conteniendo donadores de electrones como lactato y formiato.

La concentración inicial del molibdeno es de 10 mg/l y del uranio es de 5 mg/l la permanencia del material en la columna es de 24 a 36 horas. Encontrándose que en la columna de molibdeno con lactato o con formiato, como donadores de electrones alcanzan una eficiencia de remoción del metal del 99 %, donde el molibdeno que era soluble (Mo-VI) pasa de un compuesto reducido a un compuesto insoluble (Mo-IV). De igual manera sucede con el uranio, este alcanza una eficiencia de remoción del metal del 98 %, que pasa de un compuesto soluble (U-VI) a un compuesto insoluble (U-IV) esto se lleva a cabo en la fase de reducción enzimática.

Los resultados indican que la reducción enzimática del molibdeno y del uranio es realizada por las células inmovilizadas de *D. desulfuricans*. Y se pueden utilizar, como un método viable para remover molibdeno y uranio de agua contaminada, en reactores de flujo continuo.<sup>(14)</sup>



En investigaciones recientes<sup>(14)</sup> se ha demostrado que *D. desulfuricans*, reduce y precipita al uranio, cromo, molibdeno y selenio por medio de reducciones enzimáticas.

La precipitación del metal por la reducción desasimilatoria, se utiliza como un posible método para remover los contaminantes del agua en un reactor biológico.

## Capítulo III

### Aislamiento y cultivo de las BSR.

Los requerimientos nutricionales de las BSR pueden ser simples o complejos; sin embargo, debido a que las BSR dependen de otras bacterias para obtener nutrimentos esenciales como el  $H_2$  en su hábitat, los medios de aislamiento; incluyen un amplio rango de nutrimentos para aumentar las probabilidades de que puedan crecer en ellos. La mayoría de las BSR, requieren de factores de crecimiento adicionales como trazas de metales, cloruro de sodio, cloruro de magnesio, aminoácidos, vitaminas, extracto de levadura y agentes reductores. Por lo tanto para su aislamiento y cultivo de mantenimiento, se prefieren los medios complejos, esto facilita la detección de contaminantes.

Para el aislamiento de cepas de BSR encontradas en la naturaleza es mejor agregar nutrimentos extraídos del hábitat del inóculo.

Con objeto de crecer y reproducirse las BSR, deben tomar del medio de cultivo todas las sustancias que requieran, porque las utilizan para la síntesis de sus materiales celulares y también para la generación de energía.

Los procedimientos para la preparación de los medios de cultivo de las BSR, y los cultivos de transferencia, se hacen bajo una atmósfera libre de oxígeno, para esto se utiliza nitrógeno, hidrógeno, dióxido de carbono o mezclas de ellos.

Es muy importante controlar el pH de los medios de aislamiento y cultivo de las BSR, ya que la mayoría crecen a un pH cercano a la neutralidad, entre 6.5 a 8.5, pero su pH óptimo es de 7.2 a 7.8.

El rango de temperatura óptimo de crecimiento de las BSR, es de 20°C a 40 °C, siendo por esto mesófilos, aunque algunos son consideradas como termófilos.<sup>(2, 5)</sup>

#### Medios de cultivo específicos para BSR

Los medios de cultivo siguientes, denominados A, B y C, son específicos para las BSR.<sup>(2)</sup>

Para el medio de cultivo A.- Se usan frascos de vidrio con tapón de goma (viales), los cuales se llenan completamente y se les extrae el aire asépticamente; se esterilizan a 121° C por 15 min, después de la esterilización se guardan en un lugar fresco, para utilizarlos cuando se requieran.

El medio de cultivo B. - Es usado cuando se requieran lotes grandes, se preparan de 10 a 20 litros por lote, no contiene agentes reductores; se esteriliza a 121°C por 60 min. Se almacena en un lugar fresco y con una atmósfera anaerobia lograda con una mezcla de gases (80% N<sub>2</sub> / 20% CO<sub>2</sub>), (Ver en el Protocolo 1, la descripción y enumeración de los métodos usados en el medio de cultivo C Posgate.), que son específicos para los géneros, **Desulfovibrio** y **Desulfotomaculum**, por la presencia del tioglicolato no puede crecer otro tipo de BSR. Se prefiere el medio de cultivo de Pfening.<sup>(25)</sup>

En el medio de crecimiento C. - Se utiliza el "método de dilución" (ver Fig. 7), para los géneros **Desulfovibrio** y **Desulfotomaculum**. Los componentes de los medios de cultivo A, B y C. se encuentran en la Tabla VII.

Desde el punto de vista fisiológico, son más apropiadas las soluciones isotónicas y además de que contienen iones.

Solución de Ringer - Locke. Composición salina isotónica: NaCl 0.9 %; CaCl<sub>2</sub> 0.024 %; KCl 0.042 %; NaHCO<sub>3</sub>; 0.10 - 0.03 %; Glucosa 0.10 - 0.2 %.

Protocolo 1. Para cuenta viable de BSR, mesófilos. Método de dilución. <sup>(2)</sup>

\*Se utiliza un medio de resistencia de una solución anaeróbica de Ringer (después de preparada la solución se le pasa una corriente de gas anaeróbico de 80% de N<sub>2</sub> y 20% de CO<sub>2</sub>).

\*Bromuro de cetil-trimetilamonio, (CTAB) como surfactante.

\*Medio de enumeración (Posgate, medio C, con agar purificado 15 g/l).

\*Parafina de cera estéril, (a una pastilla de cera fundida a 60°C, añadir tres partes de parafina líquida).

\*Frascos con tapón de rosca.

\*Pipetas Pasteur estériles.

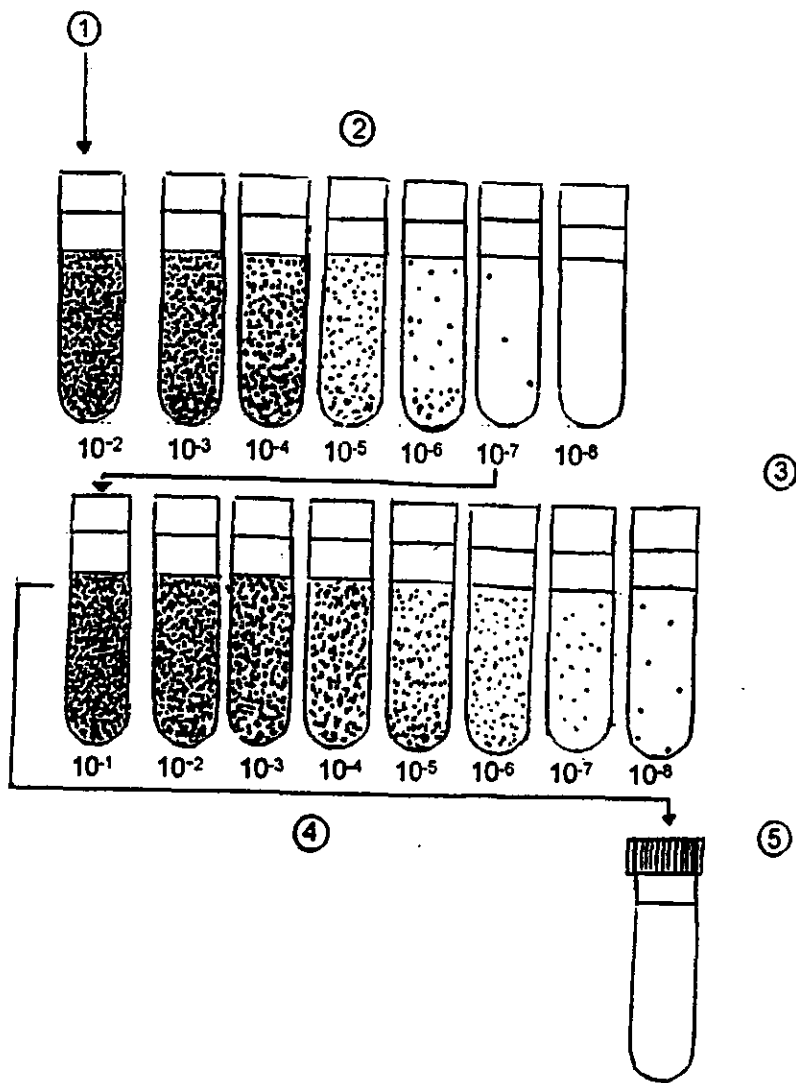
\*Baño de agua a 40 °C.

\*Baño de agua a 4 °C.

\*Tubos de vidrio de (15 cm por 1 cm), con tapón de goma, y una rejilla o gradilla.

#### Procedimiento.

- 1- Si el inóculo es sólido o semisólido, obtenido del suelo, de heces o del sedimento, se prepara por duplicado 10 tubos para dilución de la muestra. En una solución anaeróbica de Ringer, se añade 0.01 mg/l de surfactante CTAB, y se agita suavemente por 15 minutos, este paso no es necesario para muestras líquidas, cultivos puros o de agua.
- 2- Se hace una serie de 10 tubos para dilución, conteniendo c/u 9 ml de medio de crecimiento estéril fundido a 40 °C.
- 3- Una vez inoculado el tubo se invierte, se enfría rápidamente y se transfiere 1 ml al siguiente tubo.



**Figura 7** Procedimiento por el método de dilución; (1) La dilución inicial de la muestra sólida, se prepara en un medio anaeróbico de una solución de Ringer. (2) La dilución en el agar se mantiene a una temperatura de 40°C, los tubos son cubiertos con un baño de agua fría, y se incuban a la temperatura deseada. (3) Después del crecimiento de las BSR, se renueva una sola colonia, usando una pipeta Pasteur estéril, y se resuspende en 1 ml de solución anaeróbica de Ringer, la dilución se agita y se incuban. (4) Confirmación del cultivo puro. (5) La colonia pura es transferida a un medio líquido adecuado para la cepa de BSR a estudiar.<sup>(2)</sup>

- 4- Inmediatamente después, el tubo se inocula, se sella herméticamente, y se vierte sobre la superficie del medio una capa de 2 cm de parafina, con el fin de evitar el acceso de aire en la columna del agar y se cierra con el tapón de goma.
- 5- Se incuba a una temperatura de 28 a 37 °C, por 2 semanas, dependiendo de la temperatura óptima de la bacteria.
- 6- Después de 24 horas de incubación se extrae todo el aire que se formó en el tubo.
- 7- Terminado el tiempo de incubación de las 2 semanas, se cuentan las colonias negras en la dilución apropiada y se calcula su población, con el cuenta-colonias y anotar la dilución correspondiente.
- 8- Para el aislamiento de cultivo puro de BSR, se corta el tubo con una lima y se remueve el agar se separa una colonia con la pipeta Pasteur estéril, se resuspende en 1 ml de solución anaeróbica de Ringer, y se agita para ser transferida.
- 9- Si microscópicamente es homogéneo, se transfiere la colonia a un nuevo medio de cultivo líquido y se controla que sea puro. (Ver Protocolo 2).
- 10- Se mantiene el cultivo puro contenido en el medio de cultivo líquido, si hay crecimiento rápido de BSR en los cultivos líquidos después de 4 a 6 días de incubación, se almacena a 5 °C, y dependiendo de la cepa, se transfiere a un nuevo medio de cultivo por 2 a 3 meses, después de éste tiempo se hace una resiembra para mantenerlas vivas.<sup>(2)</sup>

#### Protocolo 2 Valoración de cultivo puro <sup>(2)</sup>

- \*Placas con agar nutritivo conteniendo glucosa y peptona.
- \*Agar de peptona -glucosa +0.05% (w/v), sulfato de amonio ferroso (pH 7.0 a 7.6).
- \*Tubos de ensayo con tapón de goma de (15 por 1 cm).
- \*Pipetas Pasteur estéril.
- \*Baño de agua a 40 °C.
- \*Baño de agua a 4 °C.

#### Prueba de contaminación aeróbica.

- 1-Placas con agar nutritivo.
- 2-Incubar a 30°C.
- 3-No debe haber crecimiento.

#### Prueba cualitativa para contaminación anaeróbica.

- 1- Asépticamente, distribuir 5 ml. de agar estéril de peptona y glucosa, conteniendo sulfato de amonio ferroso dentro de cada uno de los tubos.
- 2- Se enfría a 40 °C.
- 3- Se hace una serie de diluciones, con la pipeta Pasteur del cultivo de prueba.
- 4- Se pone en baño de agua fría, e incubar a 30°C.
- 5- La observación de colonias negras, después de 4 días, indica la presencia de BSR.

## Procedimiento del protocolo 2.

El examen microscópico proporciona información sobre la forma, tamaño y movilidad de la célula. La formación de esporas en el género *Desulfotomaculum*, se distingue fácilmente de otras BSR. No nos indica si es una o más especies de BSR.

Los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*, Se distinguen fácilmente por su membrana lipídica específica, por lo tanto pueden ser marcados por inmunofluorescencia. En la observación, las BSR fluorescen con un color rojo ladrillo bajo la luz de UV a 365 nm. Esta prueba es útil para diferenciar entre los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*, donde el género *Desulfovibrio*, fue positivo y el género *Desulfotomaculum*, negativo.

El género *Desulfovibrio* se valora rápidamente por la prueba de desulfoviridina, el procedimiento implica hacer una centrifugación con más o menos 15 ml. de un cultivo de BSR y resuspendiendo, en un volumen mínimo de medio restante, una porción de la suspensión se observa al microscopio, con una gota de NaOH 2M.<sup>(2)</sup>

Los medios de cultivo que se recomiendan en Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology.<sup>(1)</sup> Son prácticamente iguales a las anteriores. Y no se señalan como exclusivas para *Desulfovibrio*.

Y se indica el siguiente procedimiento;

Generalmente se utiliza para el aislamiento de las especies del género *Desulfovibrio*.

Se prepara una solución de reserva del medio A, con salinidad apropiada, 25 ml de agar al 1 %, ascorbato de sodio 0.01 % y tioglicolato de sodio al 0.01 %. Se esteriliza a 121°C durante 5 min, el medio no debe ser almacenado después de su esterilización, el pH debe ser de 7.5 y se distribuye 4 ml del medio de cultivo en cada tubo de 10 por 150 mm, y se mantiene una temperatura de 40°C. Con una pipeta Pasteur estéril, se inocula de 1 a 6 tubos esterilizados, se cierra y se debe evitar que se moje, se incuba a 30 °C después de 4 a 5 días se observa que en el 4° y 5° tubo, hay crecimiento positivo de colonias negras de BSR, se rompe el tubo, y se toman de 2 a 3 colonias con la pipeta Pasteur estéril, se resuspende en unas gotas de solución salina, y se observa la suspensión celular en el microscopio, si la suspensión es aparentemente pura, se incuba una parte de la suspensión en el medio líquido A y se añade un agente reductor que es de Na<sub>2</sub>S.

Se usa la suspensión sobrante para repetir la prueba con una pipeta Pasteur estéril, la cual se utiliza para comprobar si son cepas puras.

Nota: el tioglicolato se esteriliza por filtración.

El medio A, se debe hacer de rutina, para mantener los cultivos puros. En el medio B, por ser fisiológicamente estable, se investiga la población por medio de su metabolismo. El medio C, se utiliza para mantener el crecimiento de algunas especies de poblaciones libres de sulfuro, así como para diagnosticar la población en los pozos petroleros.<sup>(1)</sup>

**Tabla VII Componentes de los Medios de crecimiento, enriquecimiento, enumeración y aislamiento de las BSR.<sup>(2)</sup>**

**Medio Postgate<sup>(2)</sup>**

Reactivos g / l.	A	B	C
$KH_2PO_4$	0.5	0.5	0.5
$CaSO_4$	1.0		
$Na_2SO_4$		4.5	1
$NH_4Cl$	1.0	1.0	1.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.0	0.06	2.0
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$		0.06	1.0
Lactato de sodio	3.5	6.0	3.5
Citrato trisodico		0.3	
Extracto de levadura	1.0	1.0	1.0
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	0.004	0.5
Ascorbato	0.1		0.1
Tioglicolato	0.1		0.1
Agar purificado			15.0
Agua de la llave	1000 ml		1000 ml
Agua destilada		1000 ml	
pH	7.0 a 7.5	7.5	7.6
Notas	contiene precipitado	medio limpio	
Uso	enriquecimiento y crecimiento de cultivos puros	lote de cultivo de mayor capacidad	enumeración

**Tabla VIII Medio de cultivo para las especies del género *Desulfovibrio*.<sup>(1)</sup>**

Reactivos g / l.	A	B	C
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.5	0.5	0.5
$\text{NH}_4\text{CL}$	1.0	1.0	1.0
$\text{CaSO}_4$	1.0		
$\text{Na}_2\text{SO}_4$		4.5	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.0	2.0	
Lactato de sodio	3.5	3.5	
Piruvato de sodio			3.5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0.06	0.1
$\text{MgCl}_2$			1.6
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	0.004	0.004
Extracto de levadura	1.0	1.0	1.0
Citrato de sodio		0.3	
Agua destilada	1000	1000	1000



**Tabla IX Resultado de crecimiento con sustratos específicos para BSR, de los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*.**

**Género *Desulfovibrio*.**

especies		<i>desulfuricans</i>	<i>vulgaris</i>	<i>salexigens</i>	<i>africanus</i>	<i>gigas</i>
*medio de crecimiento		A, B, C	A, B, C	A, B, C	A, B, C	A, B, C
piruvato sin sulfato	sin	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
colina sulfato	sin	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
malato sulfato	y	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
acetato sulfato	y	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo

**Género *Desulfotomaculum*.**

especies		<i>nigrificans</i>	<i>orientis</i>	<i>ruminis</i>
*medio de crecimiento		A, B, C	A, B, C	A, B, C
piruvato sin sulfato		negativo	negativo	positivo
acetato y sulfato		negativo	negativo	negativo
formiato y sulfato		negativo	negativo	

**Otros medios de cultivo**

**Medio de crecimiento para BSR marinas.**

El medio de crecimiento de las cepas marinas, de los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*, tienen requerimientos variados porque son bacterias anaerobias estrictas, y utilizan 20 g/l de NaCl y 3 g/l de MgCl<sub>2</sub> que son añadidos alternando agua de mar y de la llave. Cuando el medio es ácido el pH se ajusta con una solución de NaOH 2 M esterilizado.

El pH óptimo es de 7.2 a 7.8 y la temperatura óptima de incubación es de 20 a 40 °C. Para muchas especies, el hierro es incluido en los medios, que lo utilizan como nutriente y al mismo tiempo como indicador en la formación de H<sub>2</sub>S, observándose un precipitado de color negro que es formado por los iones ferrosos, así como un olor penetrante a huevo podrido.

Estos microorganismos utilizan los sustratos (acetato, formiato, piruvato, lactato, colina, etanol, propanol, alcoholes primarios y monóxido de carbono) como nutrientes para la síntesis de su material celular.

Así como el sulfato es un aceptor terminal de electrones, de esta misma manera lo son el tiosulfato, sulfito, tetrationato y el azufre elemental.<sup>(1, 2)</sup>

#### Medio de crecimiento para otras BSR.

Se utiliza el medio de Pfennig.<sup>(25)</sup> El cual es más complejo en su preparación y requiere más tiempo de incubación, dependiendo del donador de electrones usado, así como la cepa de BSR a estudiar.

#### Enumeración de BSR.

Se realiza por diferentes métodos, con estricta anaerobiosis para la población viable de BSR, ya sea de cultivos puros o mezclas de cultivos.

Por cuenta en placas, número más probable en tubos, (se hacen diluciones y se incuba).<sup>(2)</sup>

#### Identificación de BSR.

Cada uno de los siguientes métodos pueden aplicarse para el estudio de cultivos puros o para ecosistemas individuales.

Los cultivos puros de BSR, inicialmente son evaluados por análisis microscópico, aunado a la determinación cualitativa de la producción de sulfuro (formación de un precipitado negro), ya que el medio contiene sulfato así como iones ferrosos. El método de placas es en un medio anaeróbico, y se usa para determinar la ausencia de contaminantes.<sup>(2)</sup>

#### Análisis por seguimiento de huella radioactiva en la reducción del sulfato.<sup>(2)</sup>

La técnica para el seguimiento radioactivo, se utiliza para determinar la estructura de una molécula o parte de ellas, por medio de isótopos radioactivos, en este caso el isótopo usado del azufre es; (<sup>35</sup>S).

En un análisis por seguimiento de huella radioactiva en la reducción del sulfato, se lleva a cabo con una solución de <sup>35</sup>S - SO<sub>4</sub><sup>=</sup>, en la muestra, se incuba a temperatura ambiente, la muestra fluye a través de un aparato de destilación de sulfuro radioactivo, (ver Fig. 8). En el cual se encuentran dos trampas, la primera contiene acetato de zinc que forma un precipitado de sulfuro de zinc y la segunda esta constituido por cloruro de cadmio que se utiliza para determinar el sulfuro en la muestra que quedó atrapada en él. <sup>35</sup>S, la muestra cambia de incolora a color amarillo.

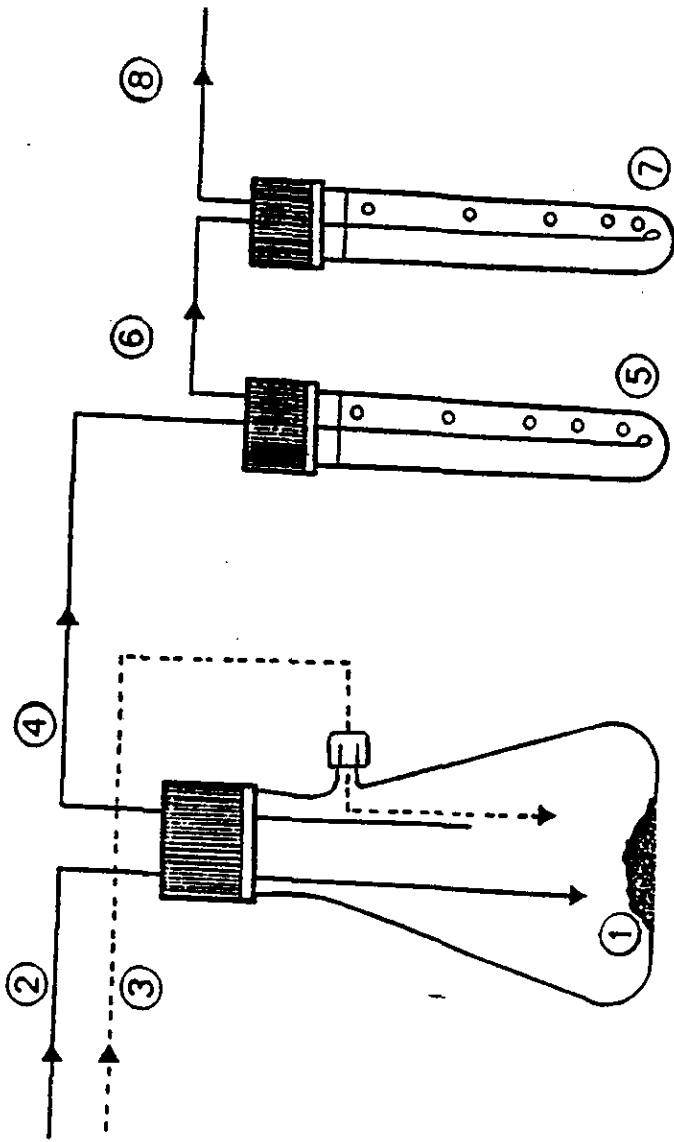


Figura 8 Aparato de destilación de sulfuro (1) muestra con agitación y calor; (2) entrada del gas oxígeno y nitrógeno; (3) adición de agua deoxigenada y HCL deoxigenado; (4) transferencia de ácido sulfhídrico volátil; (5) trampa de acetato de zinc; (6) salida del gas; (7) trampa de cloruro de cadmio detector de sulfuro; (8) salida de gas.

La porción del material radioactivo es convertida a  $^{35}\text{S} - \text{S}^=$  el cual se utiliza para determinar el % de la reducción del sulfato.

La determinación del porcentaje en la reducción del sulfato se hace por medio de la siguiente ecuación:

$$\% = \frac{[\text{SO}_4^=] \times ^{35}\text{S} - \text{S}^= \times 1.06}{^{35}\text{S} - \text{SO}_4^= \times t \times d} \quad \text{n mol de SO}_4^= \text{ reducido / ml. de muestra / día}$$

$[\text{SO}_4^=]$ : Concentración inicial de sulfato.

$^{35}\text{S} - \text{S}^=$ : Diferencia que da la cantidad del sulfuro radioactivo atrapado.

1.06: factor de radioactividad entre  $^{32}\text{S}$  y  $^{35}\text{S}$ , y la radioactividad del sulfato  $^{35}\text{S} - \text{SO}_4^=$

t: tiempo de incubación en días.

d: factor de dilución en 1 ml de muestra.

#### Determinación colorimétrica de $\text{H}_2\text{S}$ .

El método para medir el  $\text{H}_2\text{S}$ , se basa en la desasimilación metabólica y la reducción del sulfato e implica el uso de electrodos selectivos de sulfuro, técnicas de cromatografía de gases y de técnicas espectrofotométricas.<sup>(2)</sup>

#### Medición química de sulfato.

La desaparición del sulfato en el material biológico ocasionado por el paso del tiempo, puede usarse como un índice de la actividad de las BSR. La medición del sulfato se realiza con agua de mar y el sedimento, por formación de un precipitado de sulfato de bario. Si el pH de la solución se encuentra bajo, se trata con una solución de EDTA, se filtra y se disuelve el exceso de EDTA con una solución de  $\text{MgCl}_2$ .<sup>(2)</sup>

#### Mediciones de BSR en el medio ambiente a través del uso de fluorescencia

Se analizan muestras de diferentes ambientes por medio de una enzima específica constitutiva, que transforma el sulfato a ácido sulfhídrico.

Esta enzima importante es la sulfito reductasa. El cofactor de esta enzima, absorbe la luz a 605 nm.

Es crítico el detectar en los campos petroleros, que la enzima sulfito reductasa se encuentra bajo varias condiciones ambientales. La sulfito reductasa es una enzima constitutiva producida por las BSR con un crecimiento normal. La densidad bacteriana y las mezclas de cultivos bacterianos en las películas que se forman (biofilm) se pueden medir fácilmente por medio de fluorescencia.<sup>(16)</sup>

## Capítulo IV

### Ecología.

Según se señaló en el capítulo anterior, las BSR se encuentran en ambientes anaerobios, en el suelo, el agua y sedimentos, así como en sistemas de depuración de efluentes, en un consorcio con otras bacterias.

Entre estas bacterias se presenta una relación de sinergismo en la cual, unas bacterias aportan el  $H_2$  requerido por las BSR para la reducción del sulfato; a su vez, las bacterias sulfato reductoras pueden presentar una competencia por el  $H_2$  con otras bacterias o arqueas para la metanogénesis.

Sin embargo estas no son las únicas interacciones de las BSR en el medio, además de las ya señaladas, existen otras posibilidades de relación en las que las BSR pueden verse inhibidas, como se verá más adelante.

Ya que de la actividad de las BSR en el medio depende un efecto deletéreo en ciertos ambientes, es decir, su participación en fenómenos de biocorrosión y sus consecuencias, en esta parte trataremos en particular la intervención de las bacterias sulfato reductoras en la biocorrosión.

Las BSR juegan un papel importante en las reacciones de mineralización en los ciclos del nitrógeno, carbono y azufre; este último es el más importante ya que la producción de ácido sulfhídrico facilita el crecimiento de un consorcio de microorganismos (**acetogénicos, bacterias tiosulfato reductoras, metanogénicos, otras arqueas**), logrando en ocasiones una mineralización total de la materia orgánica y/o una eficiente depuración de aguas residuales.

#### **Adherencia e incrustación**

Un aspecto muy importante de estas bacterias es la formación de microincrustaciones en superficies metálicas provocando con ello la corrosión que daña los sistemas de distribución por ejemplo: de hidrocarburos en la industria petrolera.

La corrosión ocasiona problemas operacionales que afectan la continuidad del servicio e incrementan el costo de mantenimiento y rehabilitación de pozos, bombas, tuberías, y plataformas, así como del carbón, aceite y gas en la industria petrolera.<sup>(1, 2, 5)</sup>

Los microorganismos y especialmente las bacterias tienen la propiedad de adherirse a las superficies del material que los rodea. Lo anterior es debido al tamaño pequeño de ellas, aunados a fuerzas de tensión superficial, además depende de una serie específica de eventos que se basan en las características del sustrato que se coloniza; es por ello que a las BSR se les facilita formar incrustaciones en superficies metálicas causando cambios o alteraciones en el metal.<sup>(4)</sup>

#### **Formas de adherencia bacteriana.**

Las formas de adherencia bacteriana pueden ser:

- \*Adherencia temporal (bacterias deslizantes).
- \*Adherencia específica irreversible (unión a superficies específicas).
- \*Adherencia no específica irreversible (cualquier superficie).

El mecanismo molecular sugiere la presencia de factores de adhesión celular que se expresan en la superficie de la célula y promueven la interacción entre ésta y el sustrato formando una estructura denominada biopelícula o biofilm, la cual constituye una verdadera película que cubre la superficie del material sobre el que se adhieren las células y le confiere estabilidad al sistema impidiendo la difusión de partículas.

La adhesión está determinada por las interacciones entre los receptores de las adhesinas (proteínas específicas), la biosíntesis de carbohidratos, la secreción de exopolisacáridos que se utilizan para promover la agresión célula-célula y el secuestro de nutrientes. La carga común de grupo repele uno a otro en la interacción célula-sustrato debido a las repulsiones tipo Van der Waals; sin embargo a una distancia de 2 a 3 nm se da la atracción, en el que las interacciones hidrofóbicas superan a las fuerzas electrostáticas y tanto las adhesinas como el sustrato interactúan provocando que las adhesinas formen fuertes enlaces con los residuos glicoprotéicos de la superficie o de receptores celulares.<sup>(4)</sup>

La colonización microbiana en el biofilm depende de las características de las bacterias, así como de la interfase del fluido y del sustrato. Las superficies que presentan sitios de enlace, son favorables energéticamente para interactuar con las células, moléculas o elementos favoreciendo el medio ambiente la colonización microbiana, así como la temperatura, pH, salinidad y nutrientes.<sup>(4)</sup>

El biofilm está constituido por una estructura dentro de la cual las células se dispersan y la mayoría del carbono orgánico es retenido como sustancia orgánica polimérica extracelular actuando como revestimiento semipermeable y además funciona como reserva potencial de nutrientes para las bacterias que lo habitan.

Dentro del biofilm existe una constante competencia entre el consorcio de microorganismos que lo componen.

En un biofilm joven se encuentran de 25 a 30 cepas bacterianas diferentes reduciéndose a 5 o menos cepas en la etapa de maduración, éste proceso de maduración lleva también a una estratificación del biofilm, cuyas capas interiores revisten condiciones anaeróbicas, en el caso de las BSR estas capas entran en contacto con la superficie inerte generando procesos de corrosión por la formación de sulfuro de hidrógeno y/o ácidos orgánicos.

Por lo tanto, la compleja relación simbiótica entre las numerosas especies bacterianas existente es de gran utilidad para el proceso anaeróbico en el tratamiento de agua así como para la biorremediación de suelos y acuíferos.<sup>(9)</sup>

Recientemente se ha publicado,<sup>(10)</sup> que en nuestro país se utilizarán las BSR en digestores de las aguas residuales de una empacadora de alimentos del mar y de una industria textil en la cual se lleva a cabo actualmente la biodegradación de colorantes con magníficos resultados.

Ecológicamente, los microorganismos en el ambiente acuático así como el terrestre tienden a adquirir un mayor grado de estabilidad mediante una condición de equilibrio dinámico, el cual está condicionado al sistema biológico, que tiene la capacidad de recirculación óptima de materiales, con una mínima pérdida de energía, lo cual se ve afectada por el tiempo y factores fisicoquímicos; sin embargo, si se autorregula, puede alcanzar en un corto periodo una condición óptima de equilibrio. Pero cuando hay una modificación en los factores fisicoquímicos y biológicos, se desencadena una serie de reacciones, rompiéndose así la capacidad de autorregulación, provocando la eliminación, transformación o desintegración del equilibrio del sistema ecológico.

Cuando el medio terrestre o acuático se contamina por ejemplo, con hidrocarburos, la concentración del contaminante está en función del tiempo en que se permita su acumulación y su tratamiento restaurador.<sup>(5, 9)</sup>

Las reacciones bioquímicas que se desencadenan durante la degradación de la materia orgánica incluyen tanto procesos aerobios como anaerobios, ya que en ambos sucederá una serie de transformaciones capaces de descomponer la materia orgánica en diferentes grados; por ejemplo, en ambientes acuáticos y terrestres tiene lugar una autodepuración constituida por los procesos de digestión, asimilación y metabolismo del compuesto orgánico promovidos por los microorganismos, es decir por medio de la actividad microbiana se transforman en compuestos diferentes, pudiendo algunos ser completamente degradados, de forma tal que se cumple con la *primera ley de la termodinámica*, también cuando la transformación llega hasta la generación de bióxido de carbono y metano se habla de una completa mineralización

Se reitera que en el caso de la industria petrolera, la actividad bacteriana ocasiona numerosos problemas en acueductos y tanques, además de taponamientos, corrosión, tuberculización en cañerías y tanques e incrementos de sulfuros debido a la actividad de las BSR, por mencionar sólo algunos de los problemas más comunes;

asimismo, en plantas de gas, refinerías y petroquímicas, la actividad bacteriana puede causar pérdida en la transferencia de calor, por afectar a los intercambiadores de calor y los condensadores.

En estudios recientes<sup>(13)</sup> se detectó que en el fondo de los tanques cargueros se encontraba una excesiva corrosión por picadura en un tanque nuevo de sólo dos años y sé diagnóstico como "influencia de corrosión microbiológica," (MIC).

La concentración de BSR fue muy alta, de 100,000 a 10,000,000 de células / ml, en el sedimento del tanque, se realizaron pruebas en el laboratorio, usando biocidas específicos para un consorcio microbiológico aislado del fondo del tanque carguero. Los resultados no fueron buenos, entonces procedieron a cambiar el casco del tanque poniéndole, doble casco, encontrándose nuevamente picadura mayor de 2 mm / año.

La excesiva corrosión presentada en instalaciones de la industria del petróleo es del orden de 4 a 5 veces mayor por año, causada por las BSR que por el consorcio de microorganismos que tienen efecto corrosivo en el metal. Estas bacterias contaminan el petróleo crudo, así como el agua de inyección, pozos, tanques y tuberías.

En los sitios donde ocurren derrames de hidrocarburos que no son atendidos inmediatamente, la flora microbiana presente en el suelo o en acuíferos, se somete a un proceso de selección natural, en él, los microorganismos sobrevivientes son aquellos que desarrollaron la capacidad degradadora, por lo que es mejor utilizar la flora autóctona del sitio, en lugar de agregar microorganismos exógenos para tratar los derrames, por que es muy difícil la adaptación de microorganismos a un nuevo hábitat.<sup>(5, 9)</sup>

### **Biocorrosión.**

La corrosión se define como "el ataque destructivo de un metal por reacciones químicas o electroquímicas con su ambiente." <sup>(11, 18)</sup>

La biocorrosión o (corrosión microbiológica) es el ataque destructivo de un metal por medio de microorganismos.

En la biocorrosión los procesos que la originan son de naturaleza electroquímica, pero se ven favorecidos por la actividad de los microorganismos, la biocorrosión puede hacerse en presencia de oxígeno (aerobia) o en ausencia de él (anaerobia), como resultado de la actividad de las BSR.

La corrosión microbiológica es reconocida como una de las principales causas de corrosión en los metales y el acero, originada por las BSR.<sup>(11, 17, 18)</sup>

En la industria petrolera, como se ha mencionado con anterioridad, la actividad bacteriana ocasiona numerosos problemas e incrementa los costos de mantenimiento y rehabilitación de su infraestructura en contacto con esta problemática. <sup>(11, 18)</sup>



La corrosión del sustrato (metal, acero, etc.) involucra un agotamiento gradual del material, como el agrietamiento debido a la oclusión, por las células microbianas, de la corriente eléctrica que se genera por contacto entre metales o en los electrolitos de una solución fisiológica así como las fuerzas de rozamientos y fricción, en acción concertada con las enzimas degradadoras del metal. (11, 18)

El deterioro resultante de la actividad biológica y la producción del biofilm conducen a la formación de microincrustaciones en la superficie metálica, que se asocia con la corrosión.

#### Técnica para medir el porcentaje de la corrosión (18)

En esta técnica es de suma importancia el peso, la superficie, y el tiempo de exposición en la muestra a estudiar, haciendo las mediciones antes y después de la prueba.

$$\% \text{ de corrosión (mpy)} = \frac{534 W (\text{mg})}{D (\text{gm} / \text{cm}^3) A (\text{pulg.}^2) \times t (\text{horas})}$$

534 = Constante

W = Pérdida de peso

D = Densidad de la muestra

A = Area de la muestra

t = Tiempo de exposición

mpy = mm. de penetración por año, se convierte a (mg por dm<sup>2</sup> por día), por lo tanto  
mpy = mdd x 1.44 / D. de hierro

La densidad del hierro es de = 7.87; mdd x (0.183) = mpy.

Se estima que las BSR son responsables de más del 77% de la corrosión microbiológica y tomando en cuenta su metabolismo anaerobio estricto así como su hábitat y forma de vida, se da por hecho que en las BSR se encuentran las proteínas de pared celular específicas para adherirse, que interactúan de manera tal, que se induce el fenómeno de corrosión sobre las superficies metálicas.

En la biocorrosión también se encuentra un consorcio de microorganismos formado por:

Bacterias acetogénicas; **Thiobacillus ferrooxidans**; bacterias tiosulfato reductoras; bacterias metanogénicas y otras arqueas.

## Papel de las BSR en los procesos de corrosión

Existen 5 hipótesis,<sup>(11, 18)</sup> para explicar el papel de las BSR en los procesos de biocorrosión:

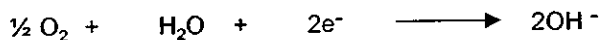
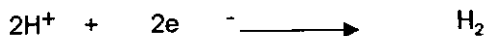
- \*- La despolarización bacteriana del cátodo.
- \*- La corrosión por iones de sulfuro.
- \*- La corrosión galvánica debido a la formación de un biofilm de sulfuro de hierro.
- \*- La producción de fósforo corrosivo y volátil.
- \*- La formación de azufre elemental.<sup>(18)</sup>

### Teoría de la Despolarización catódica.<sup>(11, 18)</sup>

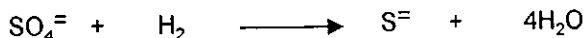
La teoría de la despolarización catódica de Von Wolzogen Kuhr y Vander Vlugt<sup>(18)</sup> está basada en la actividad metabólica de las BSR. Los microorganismos pueden promover la corrosión por la acción de agentes oxidantes, por lo tanto los productos metabólicos o provenientes de la actividad con el metal, dan como resultado el proceso de oxidación, los electrones, son removidos del hierro y éste queda en solución.



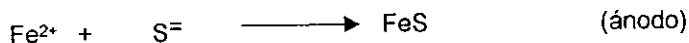
El crecimiento de la biomasa microbiana contribuye a iniciar el proceso de corrosión. La corrosión anaerobia, postula que las BSR activan y utilizan el  $H_2$  (removiendo electrones), y acelerando la reacción.



La remoción del hidrógeno molecular es polarizada por la hidrogenasa bacteriana con la transformación del sulfato a sulfuro.



Y la formación de los productos de corrosión.



### Reacción global.



### Corrosión por iones de sulfuro.

La corrosión del metal por iones de sulfuro es debido a la adición de iones ferrosos, resultando una producción de sulfuro de hierro. Esto se lleva a cabo en la corrosión anaeróbica relacionada con la concentración en el medio de iones ferrosos; si la concentración de hierro es grande, la corrosión del metal es grande, por ejemplo: es de  $(1250 \text{ mg/dm}^2 \times \text{día})$ , estos resultados se obtuvieron en condiciones anaeróbicas en un filtro con un cultivo marino de *Desulfovibrio*, en donde los iones de sulfuro son removidos por la acción de iones ferrosos, resultando en la formación del sulfuro de hierro.<sup>(11, 18)</sup>

### Corrosión galvánica debido a la formación del biofilm de sulfuro de hierro.<sup>(11, 18)</sup>

En una celda galvánica, la corrosión se presenta cuando dos metales diferentes están en contacto o conectados por medio de un conductor eléctrico, los que son expuestos a una solución conductora, y con un medio de cultivo apropiado, para el crecimiento de las BSR.

En este caso, el sulfuro de hierro que se forma como una película sobre la superficie del metal, es producido por la actividad metabólica de las BSR, el sulfuro de hierro en los cultivos procede a solubilizar al hierro y por lo tanto aumenta la corrosión, la primera película formada sobre el metal es el compuesto llamado mackinawite ( $\text{FeS}_{1-x}$ ).

Durante la corrosión microbiológica, se forma un mineral tetragonal de sulfuro de hierro Mackinawite ( $\text{FeS}_{1-x}$ ), generalmente es el principal producto que causa la corrosión del metal propiciado por las BSR. Es inestable arriba de  $150^\circ\text{C}$ , este mineral es formado durante el proceso de corrosión con la consecuente producción de ácido sulfhídrico. Este mineral no se encuentra normalmente en la biosfera.<sup>(17)</sup>

### Producción de fósforo corrosivo y volátil.

En una investigación reciente,<sup>(11)</sup> se demostró que la corrosión que se observa de color negro, es producida por el hierro amorfo, e indica que los agentes corrosivos fueron ocasionados por la producción de fósforo volátil, aunados a la actividad metabólica de las BSR, así como por la formación del sulfuro de hidrógeno.<sup>(11, 18)</sup>

### Formación de azufre elemental.

Químicamente, el azufre se produce en el suelo, pozos petroleros, así como también es formado por el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{H}_2\text{S}$  en el agua desmineralizada, en condiciones aeróbicas o anaeróbicas; en éste caso, se debe a la actividad metabólica de las BSR, la producción del sulfuro de hidrógeno, que se oxida biológicamente formando el azufre elemental.<sup>(11, 18)</sup>

### Control microbiológico de la producción de H<sub>2</sub>S por BSR.

Los productos de reducción del sulfato (H<sub>2</sub>S, HS<sup>-</sup> y S<sup>=</sup>) frecuentemente contaminan el petróleo, y la fuente de estos sulfuros es generalmente, debida al metabolismo de las BSR.

La toxicidad y las propiedades corrosivas del sulfuro son responsables de numerosos problemas en la industria petrolera, como ya se ha mencionado anteriormente; por ejemplo: en la recuperación secundaria de petróleo, el agua es tratada con biocidas como el glutaraldehído, para controlar el crecimiento de las BSR en depósitos, pozos y tuberías.

Dado que las BSR son anaerobios estrictos, la aireación en el torrente de la columna se utiliza para inhibir la producción de H<sub>2</sub>S; sin embargo estas medidas son de efectividad limitada, porque las BSR se encuentran adheridas en la superficie con otras bacterias, aglomeradas en un gel de polisacáridos mediante el cual, las BSR se encuentran protegidas del medio ambiente. Ya que ni los biocidas ni el oxígeno logran penetrar al gel y es difícil que se inhiban las bacterias.

La producción de H<sub>2</sub>S no se puede prevenir; pero la acidez del agua puede ser tratada por métodos fisicoquímicos. Por ejemplo; la producción bioquímica de H<sub>2</sub>S por las BSR está sujeta al control biológico, en este caso, **Tiobacillus denitrificans**, que es un autótrofo anaerobio facultativo, se utiliza para reducir la concentración de los compuestos de sulfuro.

El control microbiológico, arriba mencionado quita el H<sub>2</sub>S del medio ambiente utilizando un cultivo de una cepa silvestre de **Tiobacillus denitrificans**.

La especie de **denitrificans** oxida estequiométricamente el H<sub>2</sub>S producido por las BSR, hasta sulfato, por lo tanto baja la concentración y previene la formación de H<sub>2</sub>S.<sup>(15)</sup>

Principales métodos para la prevención de la corrosión. Se ha recurrido a la protección catódica, el uso de biocidas e inhibidores, así como la aplicación de cubiertas protectoras. Esta última es una película formada por un material que se aplica como pintura, generalmente metálica, constituida por fosfatos o cromatos.

La protección catódica no es muy eficiente para evitar la influencia de las BSR, porque utiliza un potencial de corrosión de -300 a -700 mV, y al estudiar la eficiencia de la protección catódica contra el crecimiento de las BSR se observa que el potencial requerido para inhibirlas es de -880 mV, además la aplicación de este voltaje produce H<sub>2</sub>, que promueve el crecimiento de las BSR.<sup>(11, 18)</sup>

## **Métodos de identificación de BSR para problemas de incrustación, taponamiento y formación de biofilm.**

Las causas biológicas o no biológicas que originan los procesos de incrustación, formación del biofilm y finalmente corrosión, no se distinguen fácilmente, ya que en la mayoría de los casos existe una interacción entre los diversos factores que se deben considerar solo para determinar la influencia del factor biológico.

Una de estas técnicas consiste en utilizar anticuerpos específicos que actúan con una enzima constitutiva de las BSR (la adenosín-5'-fosfosulfato reductasa) que si está presente en la muestra provoca desarrollo de color en la solución, proporciona la cantidad de BSR presentes.<sup>(8)</sup>

Para las bacterias relacionadas con la precipitación de hierro, existen diversos medios de enriquecimiento y técnicas para la observación directa de estas bacterias en muestras de agua. Un método accesible y de fácil ejecución, para obtener muestras de bacterias adheridas a superficies, es el método del portaobjetos sumergido el cual consiste en colocar varios portaobjetos sumergidos dentro del pozo y dejarlos por un tiempo considerable. El autor<sup>(8)</sup> encuentra que con 7 días de exposición se puede colectar un buen material, transcurrido el tiempo de exposición; el portaobjetos se retira, se seca y se fija a la flama se tiñe con cristal violeta al 0.1%; y en el examen microscópico se buscan bacterias filamentosas.

Otro método simple de realizar es una variante de la prueba de estabilidad relativa que se utiliza para estudios de contaminación orgánica, en aguas superficiales.

Se agrega colorante azul de metileno a un matraz que contiene la muestra de agua; los microorganismos presentes en la muestra agotan el oxígeno disponible debido a su metabolismo respiratorio. Las deshidrogenasas liberan hidrógeno, y son fijadas por el colorante reduciéndolo a su forma incolora; el tiempo transcurrido para que el colorante se decolore está relacionado con la concentración del material orgánico presente.<sup>(8)</sup>

### **Técnicas utilizadas en perforaciones petroleras con problemas de biocontaminación (formación del biofilm) y biocorrosión.**

Las siguientes etapas: deben realizarse cuidadosamente.

\*Obtención de la muestra en forma adecuada.

\*Conservación de la muestra desde el momento de su obtención hasta su procesamiento.

\*Utilización de recipientes y materiales adecuados, medios de cultivo apropiados y exámenes microscópicos para identificación específica.

La calidad de los medios de cultivo es determinante. En el manejo de los microorganismos ya sea por sus características de aislamiento, identificación o de conservación.

Es importante considerar que la toma de la muestra ocupa un lugar primordial, ya que una muestra mal tomada llevará a falsos resultados.

Para el estudio bacteriológico se deben de considerar de antemano todos y cada uno de los elementos necesarios conforme el tipo de muestra que se vaya a analizar y considerar si las muestras serán analizadas "in situ" o se colectarán y se enviarán a un laboratorio para ser analizadas.

#### Muestras de agua bombeada.

Cuando la muestra es analizada "in situ" es necesario que se recolecte en un frasco de vidrio transparente (vidrio borosilicatado preferentemente) de boca ancha y estéril de 200 a 250 ml de capacidad.

El frasco se destapa evitando tocar con las manos la tapa y la boca del frasco y se llena a 2/3 partes de su volumen total. Se tapa, los análisis se deben practicar no más de 2 horas después de obtenida la muestra. Si fuera necesario procesarlas dentro de las 24 horas, las muestras se deberán colocar en un contenedor y refrigerarlas, manteniendo la temperatura de 4°C aproximadamente, evitando pérdidas o derrames en su traslado.

#### Muestras de incrustaciones o tubérculos

Las muestras deberán ser retiradas o extraídas de las tuberías o bombas; para desprenderlas de la superficie, se utiliza una pequeña espátula que deberá flamearse con alcohol evitando tocar con los dedos el material recogido.

Si la muestra no se analiza "in situ" se recolectará en un frasco de vidrio estéril con una humedad relativa elevada, una vez recibida la muestra en el laboratorio, se toma una porción de 10g y se coloca en un mortero estéril, se homogeniza agregando agua destilada estéril para lograr una suspensión, se inocula una alícuota de la muestra en dos diferentes medios de cultivo, (de los medios descritos) y otra alícuota se prepara para la observación microscópica.

Cuando la muestra se analiza "in situ" es posible reducir los resultados falsos negativos sobre todo en el caso de las BSR, ya que por su anaerobiosis estricta son las más afectadas por la oxigenación de la muestra.

Los grupos bacterianos que suelen estudiarse en las muestras arriba descritas desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo son los siguientes:

- \*Bacterias aerobias totales (BAT).
- \*Bacterias precipitantes, no oxidantes del hierro (BPNM).
- \*Bacterias sulfato reductoras (BSR).
- \*Bacterias precipitantes y oxidantes del hierro (BPOM).

### **Análisis cuantitativos.**

Se usa la técnica de "dilución por extinción", la cual consiste en inocular una serie de frascos, con tapón de rosca cada uno de 9 ml con medio de cultivo cuya composición esté de acuerdo al grupo bacteriano que se requiera cuantificar.

#### **Procedimiento.**

Se obtiene 1 ml de la muestra usando una jeringa desechable, de 1 ó 2 ml de capacidad y se inocula el primer frasco; sin retirar la aguja se agita, se invierte y se retira 1 ml que se inocula en el segundo frasco y se procede igual que con el anterior. Con una nueva jeringa, se retira 1 ml del frasco número 2 previamente agitado y se inocula el frasco número 3 y así sucesivamente, utilizando una nueva jeringa para cada frasco.

La manifestación de crecimiento bacteriano es la turbidez del medio de cultivo que se compara con un frasco testigo que no se ha inoculado. Ya que se inocularon los frascos se rotulan, se incuban a 35°C durante 5 días efectuando lecturas diarias para observar aquellos que manifiesten desarrollo positivo. Los resultados se expresan como bacterias / ml.

### **Análisis cualitativos.**

En este caso se utilizan frascos con tapón de rosca de 20 - 25 ml de capacidad que contengan 10 ml del medio de cultivo apropiado.

Se extrae una muestra de agua con jeringa desechable estéril de 10 ml de capacidad, se eliminan las burbujas de aire que pudieran quedar y se inoculan los frascos empleando en este caso la misma jeringa.<sup>(6)</sup>

## Conclusiones.

- Las bacterias sulfato reductoras son anaerobias estrictas que reducen el sulfato y se encuentran en suelo, agua y lodo.
- De los siete géneros reportados de BSR solo dos son las que se encuentran frecuentemente: **Desulfovibrio** y **Desulfotomaculum**.
- De los dos géneros arriba mencionados el **Desulfovibrio** es el más abundante.
- Las BSR son difíciles de cultivar, así como el mantenerlas viables, porque sus requerimientos nutricionales dependen de otras bacterias el  $H_2$  es esencial en su hábitat.
- Las bacterias sulfato reductoras, juegan un papel importante en las reacciones de mineralización en los ciclos del nitrógeno, carbono, fósforo y azufre. Este último es el más importante ya que la producción de ácido sulfhídrico facilita el crecimiento de un consorcio de microorganismos.
- El significado ecológico de la interacción metabólica de las bacterias sulfato reductoras se debe a que existen asociaciones mutualistas y antagónicas, entre estas y otras bacterias del consorcio.
- Varias especies de **Desulfovibrio**, han mostrado la capacidad de ser tanto productoras como consumidoras de  $H_2$ . El hidrógeno es producido solo como un mecanismo de control redox.
- La existencia de un doble mecanismo de transporte según Widdel y Hansen, puede explicar la capacidad de muchas especies de **Desulfovibrio**, para adaptarse rápidamente a variaciones de las condiciones ambientales.
- Las BSR en especial el género **Desulfovibrio**, son responsables de la corrosión en instalaciones industriales, por la formación de microincrustaciones en superficies metálicas.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



- La importancia económica de la biocorrosión en la industria petrolera es primordial porque los índices de corrosión del metal y el acero en condiciones anaeróbicas en presencia de BSR son extremadamente altas por lo tanto se concluye que es un problema potencial que se debe atacar de inmediato.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology. Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria 1984, Vol. 1 pp. 663-679 Williams & Wilkins, Baltimore / London.
- 2 Levett, P. N. Ed Anaerobic microbiology a practical approach, 1991, pp. 201-222 D. Rickwood & B. D. Hames., Oxford, New York.
- 3 Lutterbach, I. J, 1994 Biofilm formation in water cooling systems, Vol. 12: pp. 391 - 394 J Microbiol & Biotechnology.
- 4 Itzhak, M. L., 1993, Bacterial adhesion to cell and tissues, ed. Champman & Hall, USA.
- 5 Stanier, R.Y., E.A. Adelberg, J.L. Ingraham. Microbiología 1986 ed. REPLA, S.A. México D.F.
- 6 National Association of Corrosion Engineers, Publication TPC 3, 1976 The role of bacteria in the corrosion of oilfield equipment, 1st ed., Houston, Tx: NACE,
- 7 Watkins, B. 1994 Microbiologically influenced corrosion handbook, Industrial Press, USA.
- 8 Pope, D. H. T.P. Zintel, 1989, Methods for investigating underdeposit microbiologically influenced corrosion. Houston, Tx. NACE.
- 9 Madigan, M. T., Martinko J. M., y Parker J. Brock Biology of Microorganisms. 8 th Ed. 1997 Prentice Hall NJ.
- 10 Kuppusamy, I. R. Briones. Degradación de colorantes por bacterias sulfato reductoras. Coordinación de Bioprocesos Ambientales del Inst. de Ingeniería (II) de la UNAM. Gaceta UNAM. Febrero1999.

- 11 Warren, P. I., F. Maryland, Microbial corrosion of metals. 1987 Advances in Applied Microbiology, Vol. 32, pp. 1-31, Academic Press London.
- 12 Noguera, D.R., G.A. Brusseau, B. E. Rittmann, D. A. Stahl. 1998 A unified model describing the role of hydrogen in the growth of *Desulfovibrio vulgaris* under different environmental conditions, John Wiley & Sons. Illinois.
- 13 Huang, R.T. B. L. McFarland, R. Z. Hodgman. 1997 Microbial influenced corrosion in cargo oil tanks of crude oil tankers, Corrosion 97 Paper num. 535 by International Houston Tx. NACE.
- 14 Mark, D.T., B. Larry L, T. Bruce M. 1998 Removal of U and Mo from water by immobilized *Desulfovibrio desulfuricans* in column reactors, John Wiley & Sons, Inc. New Mexico.
- 15 Montgomery, A.D., M. J. McInerney, K. L. Sublette. Microbial control of the production of hydrogen sulfide by sulfate-reducing bacteria, Biotechnology and Bioengineering, Vol 35, pp, 533-539, 1990.
- 16 Barton, L. L., C. M. Carpenter. Measurement of sulfate-reducing bacteria in the environment through the use of fluorescence, Department of Biology, The University of New Mexico.
- 17 McNeil, M. B., B.J. Little. 1989, Technical Note: Mackinawite formation during microbial corrosion. National Association of Corrosion Engineers Vol. 46 No 7
- 18 Warren, P. Iverson, 1974 Microbial corrosion of iron metabolism. A Comprehensive Treatise, Academic press, London and New York.
- 19 LeGall, J., Postgate J.R. The physiology of sulphate-reducing bacteria Advances in Microbial Physiology, Vol 10, pp.82-125, 1973.
- 20 Salle, A.J., Fundamental principles of bacteriology, 1974 ed. McGraw-Hill, Publishing Company. New York.

- 21 Rehm, H.J. & G. Reed, eds. 1981, Biotechnology. A Comprehensive Treatise. Vol. 1 Microbial Fundamentals, Verlag Chemie, Basilea.
- 22 Widde F., T.A Hansen. En: Noguera, D.R, G.A. Brusseau, B. E. Rittmann. D. A. Stahl. 1998 A unified model describing the role of hydrogen in the growth of *Desulfovibrio vulgaris* under different environmental conditions, John Wiley & Sons. Illinois.
- 23 Odem, J. M., Peck. H. D. En Noguera, D.R, G.A. Brusseau, B. E. Rittmann. D. A. Stahl. 1998 A unified model describing the role of hydrogen in the growth of *Desulfovibrio vulgaris* under different environmental conditions, John Wiley & Sons. Illinois.
- 24 Raskin, L., En Noguera, D.R, G.A. Brusseau, B. E. Rittmann. D. A. Stahl. 1998 A unified model describing the role of hydrogen in the growth of *Desulfovibrio vulgaris* under different environmental conditions, John Wiley & Sons. Illinois.
- 25 Pfenning, N. 1984. En Levett P. N. ed Anaerobic microbiology a practical approach, 1991, pp. 201-222 D. Rickwood & B. D. Hames., Oxford, New York.
- 26 Zinder, M. En Noguera, D.R, G.A. Brusseau, B. E. Rittmann. D. A. Stahl. 1998 A unified model describing the role of hydrogen in the growth of *Desulfovibrio vulgaris* under different environmental conditions, John Wiley & Sons. Illinois.