



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN DE ALGUNOS MICROORGANISMOS SULFATO-
REDUCTORES (MSR) EN UN REACTOR ANAEROBIO DE LECHO DE
Lodos DE FLUJO ASCENDENTE (RALLFA) ALIMENTADO CON AGUA
DE FLOTACIÓN DE UNA MINA COOPERANTE**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA

EDGAR FELIPE BAUTISTA OLIVERA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

VOCAL: M. en C. Rolando Salvador García Gómez

SECRETARIO: Q.F.B. Juan Manuel Díaz Álvarez

1ER. SUPLENTE: Dr. José Agustín García Reynoso

2DO SUPLENTE: Dra. Marisela Bernal González

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorios 301, 302 y 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental. Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, ya que fue la parte experimental de lo propuesto de manera teórica en su investigación bibliográfica por el ahora I.Q. Donovan Enrique Álvarez Márquez.

ASESOR DEL TEMA:

Dr.-Ing. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. en Ing. Marisela Bernal González

SUSTENTANTE

Edgar Felipe Bautista Olivera

DECLARATORIA

“Declaro conocer el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, plasmado en la Legislación Universitaria. Con base en las definiciones de integridad y honestidad ahí especificadas, aseguro mediante mi firma al calce que el presente trabajo es original y enteramente de mi autoría. Todas las citas de, o con referencia a, las obras de otros autores(as) aparecen debida y adecuadamente señaladas, así como acreditadas mediante recursos editoriales convencionales”.

Sustentante
Edgar Felipe Bautista Olivera

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM: Los reactivos, consumibles y materiales empleados en esta investigación fueron adquiridos con el apoyo financiero parcial del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) “Desarrollo de un modelo cinético diferencial para un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA) utilizado para el tratamiento de un efluente proveniente del proceso unitario de flotación” Clave 1N110022. Al Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME) “Innovación en docencia para la asignatura de estancia académica de Ingeniería Química ante la problemática del COVID-19: Creación de ejemplos para solucionar problemas reales mediante el empleo de paquetes de cómputo” Clave PE-101822

También, se agradece al Programa de Apoyo a la investigación y el Posgrado, PAIP, de la Facultad de Química de la UNAM, el apoyo parcial a través de la asesora del tema de tesis (Clave 50009067)

Se da un especial reconocimiento al Centro de Informática dependiente de la Secretaría de Planeación e Informática de la Facultad de Química de la UNAM y especialmente a los Ingenieros Edgar López y Cedric Reyes Cadena por su valioso apoyo para instalar los paquetes de cómputo empleados

Se agradece al Dr. Rafael Iván Puente Lee, por la observación de las muestras mediante microscopía electrónica de barrido. A la M. en C. Karina Jiménez Durán por la observación también de las muestras mediante microscopio confocal, ambos de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria, Edificio H Mario Molina de la Facultad de Química de la UNAM

Se agradece a la M. en C. María Berenit Mendoza Garfias por el servicio de secado a punto crítico, del Laboratorio de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad 1 del Instituto de Biología de la UNAM

Se agradece a la Jefa del Laboratorio de Producción de Medios de Cultivo de la Facultad de Química de la UNAM Ana Lilia Cruces Martínez por el préstamo de reactivos

Finalmente, se agradece al personal de la mina cooperante por el aprovisionamiento de agua de su operación unitaria de flotación, desde la recolección en sus instalaciones hasta el envío a los laboratorios de la UNAM, así como por las visitas técnicas a sus instalaciones

Al Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación” diseñado por la Facultad de Química de la UNAM ya que gracias a su apoyo pude terminar satisfactoriamente este proyecto de investigación

RECONOCIMIENTOS

A la Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa por la orientación y ayuda recibida para el desarrollo de esta tesis

A la Dra. Marisela Bernal González por la asesoría técnica brindada a lo largo del proyecto, por estar siempre al pendiente, por su paciencia y atención

A los honorables miembros del jurado, M. en C. Rolando Salvador García Gómez, QFB Juan Manuel Díaz Álvarez y Dr. José Agustín García Reynoso, quienes enriquecieron con sus comentarios este documento de investigación

Un agradecimiento especial al Sr. Benjamín Ramírez Castillo de los Laboratorios 301, 302 y 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental (LIQAYQA) por el préstamo de material y por siempre mostrar buena disposición para su entrega y ayuda en el manejo de material de laboratorio. Al Sr. Deyby por realizar sus labores con gran entusiasmo, lo que nos contagia, para trabajar también con entusiasmo en nuestras tareas académicas

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
JURADO	II
DECLARATORIA	III
RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES	IV
RECONOCIMIENTOS	VI
GLOSARIO	XVIII
RESUMEN	1
CAPÍTULO I. PROBLEMÁTICA	2
1.1. Introducción	2
1.2. Hipótesis	4
1.3. Justificación	4
1.4. Objetivos	5
1.4.1. Objetivo general	5
1.4.2. Objetivos particulares	5
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	7
2.1. El uso de agua en México	7
2.1.1. Industria minera: El consumo de agua	9
2.1.2. Proceso de extracción de minerales tales como Pb, Zn, Cu y Fe	11
2.2. Principio del sistema de tratamiento biológico anaerobio utilizado para el tratamiento de agua	13
2.2.1. El reactor del lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA) / <i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB, por sus siglas en inglés) reactor</i>	16
2.2.2. Bio-reactores de lecho fijo de flujo descendente / <i>Down-flow structured bed bioreactors (DFSBR)</i>	17
2.2.3. Reactor de biopelícula de flujo ascendente sulfurogénico de	18

	Pág.
	baja temperatura / <i>Sulfidogenic up-flow biofilm reactor at low temperatura</i>
2.2.4.	Reactor de lecho fluidificado de flujo ascendente y flujo descendente / <i>Upflow and Downflow Fluidized Bed Reactor (UFBR, DFBR)</i> 18
2.2.5.	Reactor de tanque agitado 19
2.2.6.	Reactor de lecho empacado anaerobio con flujo ascendente / <i>Upflow anaerobic packed bed reactor (UAPB)</i> 20
2.2.7.	Biorreactor anaerobio de lecho fluidificado / <i>Anaerobic Fluidized Bed Bioreactor (AFBB)</i> 20
2.2.8.	Reactor secuencial anaerobio discontinuo / <i>Anaerobic Sequential Batch Reactor (ASBR)</i> 21
2.2.9.	Reactor de biopelícula anaerobia de secuenciación discontinua / <i>Anaerobic sequencing batch biofilm reactor (ASBBR)</i> 22
2.3.	Principales especies de microorganismos sulfato-reductores (MSR) responsables de lograr la precipitación de metales en un sistema anaerobio 23
2.3.1.	Mecanismos de precipitación de los metales disueltos como sulfuros metálicos en el agua proveniente de la operación unitaria de flotación usando los metales de interés de la mina cooperante en un sistema anaerobio mediante MSR 24
2.4.	Metodologías utilizadas para la identificación de los MSR en un sistema anaerobio 27
2.4.1.	Métodos fenotípicos 27
2.4.2.	Medios de cultivo 28
2.4.3	Métodos de contabilización 28
2.4.3.1.	Número más probable 28
2.4.3.2.	Recuento directo en placa 29
2.4.4.	Microscopía 29
2.4.4.1.	Microscopio óptico de campo claro 29

	Pág.
2.4.4.2.	Microscopía electrónica de barrido 29
2.4.4.3.	Microscopía confocal 30
2.4.5.	Métodos genotípicos 30
2.4.6.	Métodos basados en proteómica 31
2.4.7.	Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz (<i>MALDI</i> en inglés) 32
2.4.7.1.	Espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (<i>MALDI-TOF</i> en inglés) 33
CAPÍTULO III.	METODOLOGÍA 34
3.1.	Agua de estudio procedente de una mina cooperante 34
3.2.	Reactor tipo RALLFA 35
3.3.	Experimentación 36
3.4.	Medios de cultivo 37
3.4.1	Medio de cultivo general 37
3.4.2.	Medio de cultivo específico para la actividad sulfato-reductora 39
3.4.3.	Medios de cultivo selectivos para cada una de las bacterias seleccionadas en esta investigación (Atlas, 2010; DSMZ, 2022) 39
3.4.3.1.	Medio 63: <i>Desulfovibrio</i> (Postgate) 39
3.4.3.2.	Medio 63a: <i>Desulfotomaculum</i> 41
3.4.3.3.	Medio 194: <i>Desulfobulbus sp.</i> (Freshwater) 42
3.4.3.4.	Medio 195: <i>Desulfobacter</i> 42
3.4.3.5.	Medio 383: <i>Desulfobacterium</i> 42
3.4.3.6.	Medio 2059: <i>Desulfococcus multivorans</i> 42
3.5.	Preparación de muestras para observar al microscopio 43
3.5.1.	Microscopio electrónico de barrido (MEB) (Toscano-Pérez 2012; Vergara-Salgado 2010) 43
3.5.2.	Microscopio confocal (Toscano-Pérez 2012; Vergara-Salgado 2010) 43
3.5.3.	Microscopio óptico de campo claro (Rodríguez-Mejía, 2012) 44

	Pág.
3.6.	Diseño experimental 45
3.6.1.	Ensayo 1: Selección de la dilución de trabajo 45
3.6.2.	Ensayo 2: Aislamiento e identificación de las características de proliferación (crecimiento) para las bacterias sulfato-reductoras 46
3.6.3.	Ensayo 3: Cuantificación de las MSR por medio del método del NMP 47
3.6.4.	Ensayo 4: Aislamiento e identificación de las bacterias sulfato-reductoras: <i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfotomaculum</i> , <i>Desulfobulbus</i> , <i>Desulfobacter</i> , <i>Desulfobacterium</i> y <i>Desulfococcus</i> 47
3.6.4.1.	Preparación del inóculo para el sembrado en caja Petri 48
3.6.4.2.	Método de cuantificación: Recuento directo en placa 48
3.6.4.3.	Cinética de crecimiento exponencial para el medio de cultivo selectivo 49
CAPÍTULO IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN 51
4.1.	Ensayo 1: Medio de cultivo general, selección de la dilución correcta 51
4.2.	Ensayo 2: Medio de cultivo específico para la actividad sulfato-reductora 52
4.3.	Ensayo 3: Cuantificación de los MSR por el método del NMP 54
4.4.	Ensayo 4: Identificación de bacterias sulfato-reductoras a través de medios de cultivo selectivos 57
4.4.1.	Recuento directo en placa para el medio de cultivo selectivo 57
4.4.1.1.	Medio 63: <i>Desulfovibrio</i> 61
4.4.1.2.	Medio 63a: <i>Desulfotomaculum</i> 62
4.4.1.3.	Medio 194: <i>Desulfobulbus sp</i> 63
4.4.1.4.	Medio 195: <i>Desulfobacter</i> 63
4.4.1.5.	Medio 383: <i>Desulfobacterium</i> 64
4.4.1.6.	Medio 2059: <i>Desulfococcus multivorans</i> 65
4.4.2.	Cinética de crecimiento exponencial para el medio de cultivo 66

ANEXO III.	Disposición controlada de los residuos producidos durante la investigación	Pág. 104
------------	--	-------------

BIBLIOGRAFÍA		107
---------------------	--	-----

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 2.1.	Descargas de aguas residuales no municipales en 2018 (Datos CONAGUA, 2019)	8
Tabla 2.2.	Top 10 de empresa mineras con mayor consumo de agua en 2016 (Llano, 2016)	11
Tabla 2.3.	Top 10 de estados con mayor consumo de agua en la industria minera en 2016 (Llano, 2016)	11
Tabla 2.4.	Sistema de tratamiento biológico anaerobio utilizado para el tratamiento de agua	13
Tabla 2.5.	Principales especies de microorganismos sulfato-reductores (MSR), responsables de la precipitación de metales como el Pb, Zn, Cu y Fe	26
Tabla 3.1.	Datos de caracterización del agua proveniente de la operación unitaria de flotación (Rojas-Torreblanca, 2023)	34
Tabla 3.2.	Composición de las soluciones individuales del medio de cultivo general (Vergara-Salgado, 2010)	38
Tabla 3.3.	Composición del medio de cultivo general (Vergara-Salgado, 2010)	38
Tabla 3.4.	Composición del medio de cultivo específico (Vergara-Salgado, 2010)	39
Tabla 3.5.	Medios de cultivo selectivo para los géneros <i>Desulfobulbus</i> , <i>Desulfobacter</i> , <i>Desulfobacterium</i> y <i>Desulfococcus</i> (Atlas, 2010; DSMZ, 2022)	40
Tabla 3.6.	Medios de cultivo selectivo para los géneros <i>Desulfovibrio</i> ,	40

	Pág.
	<i>Desulfotomaculum</i> (Atlas, 2010; DSMZ, 2022)
Tabla 3.7.	Composición de las soluciones complementarias del medio de cultivo selectivo (Atlas, 2010; DSMZ, 2022) 41
Tabla 3.8.	Condiciones de experimentación del segundo ensayo 46
Tabla 3.9.	Condiciones de experimentación del tercer ensayo 47
Tabla 3.10.	Condiciones experimentales del cuarto ensayo 48
Tabla 4.1.	Número más probable: Resultados de los tubos positivos y negativos 55
Tabla 4.2.	Estimación de la concentración de MSR presentes en el lodo 56
Tabla 4.3.	Datos de cinética de crecimiento exponencial para las diferentes bacterias 66
Tabla 4.4.	Comparación bibliográfica de los BSR identificados 67
Tabla 4.5.	Observaciones en los distintos tipos de microscopio para la bacteria: <i>Desulfovibrio</i> 69
Tabla 4.6.	Observaciones en los distintos tipos de microscopio para la bacteria: <i>Desulfotomaculum</i> 70
Tabla 4.7.	Observaciones en los distintos tipos de microscopio para la bacteria: <i>Desulfobulbus sp</i> 72
Tabla 4.8.	Observaciones en los distintos tipos de microscopio para la bacteria: <i>Desulfobacter</i> 73
Tabla 4.9.	Observaciones en los distintos tipos de microscopio para la bacteria: <i>Desulfobacterium</i> 74
Tabla 4.10.	Observaciones en los distintos tipos de microscopio para la bacteria: <i>Desulfococcus multivorans</i> 75
Tabla AI.1.	Tabla AI.1. Valores de NMP por cada 100 mL de muestra y 95 % de límite de confianza (para diversas combinaciones de resultados positivos cuando se utilizan tres alícuotas de muestra de 10 mL, tres de 1 mL y tres de 0.1 mL) (DOF, 2015) 81
Tabla AII.1.	Medio de cultivo general: Observación con tinción de Gram (incubación por 5 días) 86

	Pág.	
Tabla AII.2.	Características del medio de cultivo específico para microorganismos sulfato-reductores. (Incubación 30 días)	88
Tabla AII.3.	Seguimiento de la experimentación del número más probable. (Incubación por 30 días)	92
Tabla AII.4.	Tubos positivos y negativos para la técnica del número más probable	96
Tabla AII.5.	Recuento directo en placa para el Medio 63a: <i>Desulfotomaculum</i> por 27 días	98
Tabla AII.6.	Recuento directo en placa para el Medio 195: <i>Desulfobacter</i> por 28 días	99
Tabla AII.7.	Recuento directo en placa para el Medio 383: <i>Desulfobacterium</i> por 27 días	100
Tabla AII.8.	Recuento directo en placa para el Medio 2059: <i>Desulfococcus multivorans</i> por 27 días	101
Tabla AII.9.	Recuento directo en placa para el Medio 63: <i>Desulfovibrio (Postgate)</i> por 27 días	102
Tabla AII.10.	Recuento directo en placa para el Medio 194: <i>Desulfobulbus sp.</i> por 27 días	103

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.	
Figura 2.1.	Distribución anual de agua concesionada para uso consuntivo en el año 2018 (Datos tomados de CONAGUA, 2019)	7
Figura 2.2.	Distribución de volúmenes concesionados para usos agrupados consuntivos en 2018 (Datos tomados de CONAGUA, 2019)	8
Figura 2.3.	Concesiones de agua para la industria minera en 2016 (Llano, 2016)	10
Figura 2.4.	Diagrama Eh-pH del sistema Cu-H ₂ O (Adroer et al., 2020)	25
Figura 2.5.	Diagrama Eh vs. pH del sistema Pb-H ₂ O (Ortiz-Reyes, 2020)	25

	Pág.
Figura 2.6. Diagrama Eh vs. pH del sistema Zn-H ₂ O (Molina-Aguirre y Sandoval-Pauker, 2016)	25
Figura 2.7. Diagrama Eh vs. pH del sistema Fe-H ₂ O (Adroer et al., 2020)	25
Figura 3.1. Reactor tipo RALLFA (Poblete-Mier, 2015)	35
Figura 3.2. Inoculación del RALLFA (Poblete-Mier, 2015)	35
Figura 3.3. RALLFA con enchaquetado de fibra de vidrio y recubierto con aluminio	35
Figura 3.4. Diagrama experimental	36
Figura 3.5. Cámara de atmósfera controlada	37
Figura 4.1. Tubos de cultivo	51
Figura 4.2. Dilución 10 ⁻¹	51
Figura 4.3. Dilución 10 ⁻²	51
Figura 4.4. Dilución 10 ⁻³	51
Figura 4.5. Tubos con medio de cultivo específico en el día 30	53
Figura 4.6. Microorganismos observados en el medio de cultivo específico con el objetivo de 40x en el día 30	54
Figura 4.7. Microorganismos observados en el medio de cultivo específico con el objetivo de 100x en el día 30	54
Figura 4.8. Tubos con reacción negativa y positiva	55
Figura 4.9. Tubos de cultivo con medio específico: Respuesta positiva para la prueba de NMP	56
Figura 4.10. Seguimiento del desarrollo de (A) <i>Desulfovibrio</i> (B) <i>Desulfotomaculum</i> (C) <i>Desulfobulbus sp</i> (D) <i>Desulfobacter</i> (E) <i>Desulfobacterium</i> (F) <i>Desulfococcus</i> durante 27 días	58
Figura 4.11. Caja Petri del medio 63: <i>Desulfovibrio</i>	62
Figura 4.12. <i>Desulfovibrio</i> Colonia superficial	62
Figura 4.13. <i>Desulfovibrio</i> Colonia suspendida	62
Figura 4.14. Caja Petri del medio 63a: <i>Desulfotomaculum</i>	62
Figura 4.15. <i>Desulfotomaculum</i> Colonia A	62
Figura 4.16. <i>Desulfotomaculum</i> Colonia B	62

	Pág.
Figura 4.17. Caja Petri del medio 194: <i>Desulfobulbus sp</i>	63
Figura 4.18. <i>Desulfobulbus sp</i> Colonia A	63
Figura 4.19. <i>Desulfobulbus sp</i> Colonia B	63
Figura 4.20. Caja Petri del medio 195: <i>Desulfobacter</i>	64
Figura 4.21. <i>Desulfobacter</i> Colonia A	64
Figura 4.22. <i>Desulfobacter</i> Colonia B	64
Figura 4.23. Caja Petri del medio 383: <i>Desulfobacterium</i>	65
Figura 4.24. <i>Desulfobacterium</i> Colonia A	65
Figura 4.25. <i>Desulfobacterium</i> Colonia B	65
Figura 4.26. Caja Petri del medio 2059: <i>Desulfococcus multivorans</i>	65
Figura 4.27. <i>Desulfococcus multivorans</i> Colonia suspendida	65
Figura AIII.1. Generación de residuos en cada etapa del experimento	105

ÍNDICE DE ECUACIONES

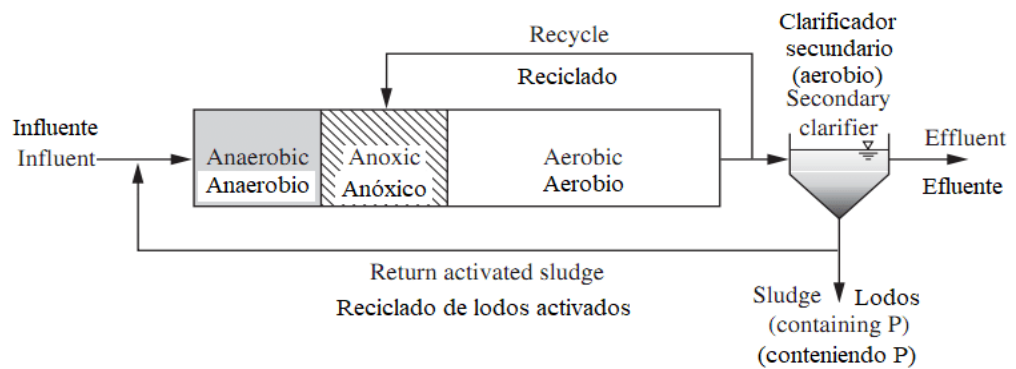
Ecuación 3.1.	49
Ecuación 4.1.	56
Ecuación AI.1.	83
Ecuación AI.2.	84
Ecuación AI.3.	84
Ecuación AI.4.	84

GLOSARIO

Término	Significado
<i>Ad hoc</i>	Locución latina "para esto"
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AF	Agua proveniente de la operación unitaria de flotación
<i>AFBB</i>	<i>Anaerobic fluidized bed biorreactor</i>
AGV	Ácidos grasos volátiles o de cadena corta (ácido acético, por ejemplo)
AlK(SO ₄) ₂	Sulfato de aluminio y potasio
Anaerobio <i>versus</i> anóxico	<p>Comentario de la asesora: Hossein Barzinmehr, de la Sharif University of Technology señaló el 21 de mayo de 2021 lo siguiente (https://www.researchgate.net/post/What_is_the_difference_between_anaerobic_and_anoxic_conditions):</p> <p><i>It depends on the field you work in! In microbiology: Anoxic is used to describe environments without molecular oxygen. Anaerobic refers to microorganisms which are able to live without molecular oxygen. The metabolism they use is also called anaerobic So anoxic refers to environments and anaerobic refers to microorganisms and processes (Brock Biology of Microorganisms) / ¡Depende del campo de trabajo! En microbiología: Anóxico se usa para describir un ambiente sin oxígeno molecular. Anaerobio se refiere a los microorganismos que pueden vivir sin oxígeno molecular. Al metabolismo que ellos usan se le llama anaerobio. Por tanto, anóxico se refiere al entorno o ambiente y anaerobio se refiere a los microorganismos y sus procesos metabólicos (Brock Biology of Microorganisms)</i></p> <p><i>However, in wastewater treatment field, they can be used in different ways: When we environmental engineers say anoxic decomposition, we are referring a condition in which microorganisms use nitrate as the terminal electron acceptor in the absence of O₂. Oxidation by this route is called anoxic denitrification. In wastewater industry, a reactor that works in this way is called an anoxic reactor. An anoxic reactor is a reactor without aeration but it receives recycle flow (enriched with nitrate) from an aerated tank. (Look at</i></p>

Término	Significado
---------	-------------

the picture below please) / Sin embargo, en el campo del tratamiento de agua residual se pueden usar de diferentes maneras: Cuando los ingenieros ambientales dicen descomposición anóxica se refieren a una condición en la que los microorganismos usan nitrato como aceptador final de electrones en ausencia de O₂. La oxidación por esta ruta (metabólica) se llama desnitrificación anóxica. En el tratamiento de aguas residuales, un reactor que trabaja de esta forma se llama reactor anóxico. Un reactor anóxico es un reactor sin aeración pero que recibe una corriente de reflujo (enriquecida con nitratos) de un tanque aerado (ver la figura abajo)



Nota: Imagen tomada de Hossein Barzinmehr (Sharif University of Technology)

Anaerobic decomposition is achieved when molecular oxygen and nitrate aren't present and microorganisms use sulfate and other compounds as final electron acceptors. A reactor in which there is no molecular oxygen and nitrate is called an anaerobic reactor. Anaerobic reactors receive raw wastewater (Water and Wastewater Engineering, Davis, Chapter 22) (Biological Wastewater Treatment 3rd, Grady, Chapter 14) / Una descomposición anaerobia se alcanza cuando el oxígeno molecular y los nitratos no están presentes y los microorganismos usan sulfatos u otros compuestos como aceptores finales de electrones. Un reactor en el que no hay oxígeno molecular y nitratos se llama reactor anaerobio. Los reactores anaerobios reciben aguas residuales "crudas" (sin tratamiento) (Water and Wastewater Engineering, Davis, Chapter 22) (Biological Wastewater Treatment 3rd, Grady, Chapter 14)

Anóxico En tratamiento de aguas residuales: En ausencia de oxígeno molecular y mediante nitratos como aceptores de electrones

ARNr Ácido ribonucleico ribosomal

Término	Significado
<i>ASBBR</i>	<i>Anaerobic sequencing batch biofilm reactor</i>
<i>ASBR</i>	<i>Anaerobic sequential batch reactor</i>
BSR	Bacterias sulfato reductoras
°C	Grados Celsius
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio dihidratado
CaCO ₃	Carbonato de calcio
Cd	Cadmio
cm ²	Centímetros cuadrados
CO ₂	Dióxido de carbono
CoCl ₂	Cloruro de cobalto
CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado
CONAGUA	Comisión Nacional del Agua
CoSO ₄	Sulfato de cobalto (II)
COT	Carbono orgánico total
Cu	Cobre
CuCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de cobre (II) dihidratado
CuFeS ₂	Sulfuro de hierro (II) y cobre (II) (Calcopirita)
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre (II) pentahidratado
d	Día
DAM	Drenaje ácido de mina
DAR	Drenaje ácido de roca
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DBO ₅	Demanda bioquímica de oxígeno consumo durante 5 días
<i>DFBR</i>	<i>Downflow fluidized bed reactor</i>
<i>DFSBR</i>	<i>Down-flow structured bed bioreactors</i>
Digerir	Del latín <i>digerere</i> 'distribuir, repartir'. Conjugación como <i>sentir</i> . 1. Verbo transitivo. Convertir en el aparato digestivo los alimentos en sustancias asimilables por el organismo. ... 4. Química. Degradar materia orgánica mediante calor, reactivos químicos o microorganismos (https://dle.rae.es/digerir?m=form)
Digestión	Proceso en ausencia de oxígeno que descompone materia orgánica, especialmente en el aparato digestivo de mamíferos. Por extensión, en los albores de la química a los procesos en ausencia de oxígeno se les

Término	Significado
	denominó digestiones. Desafortunadamente, por ignorancia, se le agrega el adjetivo anaerobio que es totalmente innecesario ya que la digestión es inherentemente anaerobia. Hay algunos colegas, especialmente con poca formación química, que se atreven a usar los términos digestión aerobia por degradación aerobia. Del latín <i>digestio</i> , <i>-ōnis</i> . 1. femenina. Acción y efecto de digerir (https://dle.rae.es/digesti%C3%B3n?m=form)
DQO	Demanda química de oxígeno
ESI	<i>Electro-Spray ionization</i>
F	Valor de tablas NMP/mL (DOF, 2015), que se obtiene de la combinación de tubos positivos y negativos. Dado el caso en el que más de una dilución muestra 3 tubos positivos y la última da menos de 3, se elige esta última y las dos diluciones anteriores más bajas
FBR	<i>Fluidized Bed Reactor</i>
Fe	Hierro
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄).6	Sulfato de hierro (II) y amonio hexahidratado
H ₂ O	
Fe ²⁺	Ion ferroso
FeCl ₂ .4H ₂ O	Cloruro de hierro (II) tetrahidratado
FeS ₂	Sulfuro ferroso (Pirita)
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de hierro (II) heptahidratado
Fig.	Abreviatura de la palabra figura
Fluidificar	Hacer fluido algo (https://dle.rae.es/fluidificar?m=form)
Fluidizar	La palabra fluidizar no está en el Diccionario (https://dle.rae.es/fluidizar?m=form)
g	Gramos
Gram	Método de caracterización de bacterias que utiliza colorantes como cristal violeta y safranina para teñir las bacterias de morado (Gram positivas) o color rosa (Gram negativas) desarrollado por Hans Christian Joachim Gram, bacteriólogo danés, de amplio uso en microbiología que ayuda a clasificar bacterias y a hacerlas más visibles en el microscopio
h	Hora
H ₂	Hidrógeno
H ₂ O	Agua

Término	Significado
H ₂ S	Ácido sulfhídrico/Sulfuro de hidrógeno
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
HCl	Ácido clorhídrico
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
hm ³	Hectómetro cúbico
HS ⁻	Bisulfuro
HSR9732	Cepa de <i>Desulfovibrio halophilus sp</i>
<i>Inc.</i>	<i>Incorporated</i>
<i>JCW</i>	<i>jarosite-contaminated wáter</i>
K ₂ HPO ₄	Difosfato de potasio
KCl	Cloruro de potasio
kg	Kilogramo
kg/cm ²	Unidades de la presión del equipo (autoclave) empleado para la esterilización de los medios de cultivo y otros materiales (1 kg/cm ² es equivalente a 98066.5 Pa)
KH ₂ PO ₄	Monofosfato de potasio
L	Litro
m ³	Metro cúbico
<i>MALDI</i>	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
<i>MALDI-TOF</i>	<i>MALDI-Time-Of-Flight</i>
MEB	Microscopio electrónico de barrido
mg	Miligramos
MgCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de magnesio dihidratado
MgCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de magnesio hexahidratado
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mmol	Milimol
MnCl ₂ .4H ₂ O	Cloruro de manganeso tetrahidratado
MnSO ₄ .2H ₂ O	Sulfato de manganeso dihidratado
MSR	Microorganismos sulfato-reductores
N ₂	Nitrógeno molecular

Término	Significado
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio dihidratado
Na ₂ S.9H ₂ O	Sulfuro de sodio nonahidratado
Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O	Selenito de sodio pentahidratado
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O	Tungstato de sodio dihidratado
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amonio
Ni	Níquel
NiCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de níquel hexahidratado
NMP	Número Más Probable
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pb	Plomo
PbS	Sulfuro de plomo (Galena)
<i>PCR-RFLP</i>	<i>Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
pH	Potencial de hidrógeno
Pleoformismo, pleofórmica	En microbiología, el pleomorfismo es la capacidad de algunos microorganismos para alterar su morfología, funciones biológicas o modos reproductivos en respuesta a las condiciones ambientales. Se ha observado pleomorfismo en algunos miembros de la familia Deinococcaceae (Wikipedia , 2023)
<i>psi</i>	<i>Pounds per square inch</i>
Postgate C	Medio de cultivo específico para bacterias sulfato-reductoras
R.P.M., rpm	Revoluciones por minuto
RALLFA	Reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente
Refractar	Verbo transitivo. Física: Hacer que cambie de dirección un rayo de luz u otra radiación electromagnética al pasar oblicuamente de un medio a otro de diferente velocidad de propagación. Usar también como prnl. La forma «prnl.» es la abreviatura de «pronominal». Indica que el verbo se usa como pronominal, esto es, «escucharse»

Término	Significado
Refractariedad	La palabra refractariedad no está en el Diccionario (https://dle.rae.es/refractariedad?m=form) pero aparece en el título de una publicación en una revista peruana
Refractario	Refractario, ria. Del latín <i>refractarius</i> 'obstinado, pertinaz'. 1. adjetivo. Dicho de una persona: Que rehúsa cumplir una promesa u obligación. 2. adjetivo. Opuesto, rebelde a aceptar una idea, opinión o costumbre. 3. adjetivo. Dicho de un material: Que resiste la acción del fuego sin alterarse
REPDA	Siglas usadas en México para “Registro público de derechos de agua”
s	Segundos
S.A. de C.V.	Sociedad Anónima de Capital Variable (México)
S.A.B. de C.V.	Sociedad Anónima Bursátil de Capital Variable (México)
S ⁰	Azufre elemental
S ²⁻	Sulfuros
SEM	<i>Scannig Electron Microscopy</i>
SO ₄ ²⁻	Sulfatos
<i>Sputtering</i>	La depositación por bombardeo iónico en fase gaseosa (<i>sputtering</i>) es un método estándar para la preparación de muestras no conductoras antes de su observación en un microscopio electrónico de barrido
SSF	Sólidos suspendidos fijos
ST	Sólidos totales
SVT	Sólidos volátiles totales
ton	Toneladas
UAPB	<i>Upflow anaerobic packed bed reactor</i>
UASB	<i>Upflow anaerobic sludge blanket reactor</i>
UFBR	<i>Upflow fluidized bed reactor</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
Uso consuntivo	Volumen de agua de una calidad determinada que se consume al llevar a cabo una actividad específica, el cual se determina como la diferencia del volumen de una calidad determinada que se extrae, menos el volumen de una calidad también determinada que se descarga, y que se señalan en el título respectivo (Ley de Aguas Nacionales, México)
V	Volumen mayor de muestra

Término	Significado
Xantatos	Son las sales y ésteres del ácido xántico, se pueden producir a partir del disulfuro de carbono, usándose como agentes de flotación en el procesamiento de minerales
<i>XRF</i>	<i>X-Ray fluorescence</i>
Zn	Zinc
ZnCl ₂	Cloruro de zinc
ZnS	Sulfuro de zinc (esfalerita)
ZnSO ₄	Sulfato de zinc
5S ARNr	Gen que codifica el ácido ribonucleico ribosomal 5S
16S ARNr	Gen que codifica el ácido ribonucleico ribosomal 16S
23S ARNr	Gen que codifica el ácido ribonucleico ribosomal 23S

SÍMBOLOS

Término	Significado
°	Grados
%	Porcentaje
+	Más/Positivo
-	Menos/Negativo
±	Más / Menos
=	Igual

Notas:

Esta tesis usa el punto decimal de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana correspondiente (DOF, 2009). Las unidades % y °C van junto al valor numérico. Las abreviaturas derivadas de las locuciones latinas *et cetera* y *et altere*, etc. y et al. van sin cursivas por su uso frecuente. Cualquier otra sigla o palabra en idioma diferente al español se pone en cursivas.

RESUMEN

En esta investigación se utilizó un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente, RALLFA, que tiene en su biomasa microorganismos sulfato-reductores, MSR, para la conversión de sulfatos (SO_4^{2-}) en sulfuros en agua de la operación unitaria de flotación de una mina cooperante. En ese efluente acuoso también vienen disueltos con bajas concentraciones plomo (Pb), zinc (Zn), cobre (Cu) y hierro (Fe), los cuales se transforman en sulfuros metálicos provocando su precipitación ($\text{S}^{2-} + \text{M}^{2+} = \text{MS}\downarrow$). El objetivo de la investigación fue la identificación de algunos géneros de MSR presentes en la biomasa, a través de su aislamiento en medios de cultivo selectivo y su posterior observación mediante un microscopio óptico de campo claro, confocal y electrónico de barrido (MEB). Los resultados permitieron identificar 6 géneros de MSR, *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium* y *Desulfococcus*, responsables de la disminución de SO_4^{2-} mediante su conversión a sulfuros que, a su vez precipitaron los iones metálicos en el interior del sistema.

Palabras clave: Microorganismos sulfato-reductores; géneros; biomasa

ABSTRACT

*In this research, an upflow anaerobic sludge blanket reactor, UASB type, which has sulfate-reducing microorganisms, SRM, in its biomass, was used for the conversion of sulfates (SO_4^{2-}) into sulfides in water from the unit flotation operation of a cooperating mine. Lead (Pb), zinc (Zn), copper (Cu), and iron (Fe) are also dissolved in this aqueous effluent with low concentrations, which are transformed into metal sulfides causing their precipitation ($\text{S}^{2-} + \text{M}^{2+} = \text{MS}\downarrow$). The objective of the research was the identification of some SRM genera present in the biomass, through their isolation in selective culture media and their subsequent observation using a bright field, confocal, and scanning electron microscope (SEM). The results allowed the identification of 6 genera of MSR, *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, and *Desulfococcus*, responsible for the reduction of SO_4^{2-} to sulfide that in turn precipitated metal ions inside the system.*

Keywords: Sulfate-reducing microorganisms; genera; biomass

CAPÍTULO I. PROBLEMÁTICA

1.1. Introducción

El tratamiento del agua es un componente esencial para el desarrollo sostenible. El aumento de la población y la rápida industrialización han contribuido al deterioro de los recursos hídricos. En particular, los efluentes antropogénicos de las industrias química, farmacéutica, petrolera y otras han provocado una grave degradación ecológica (Jain et al., 2021). Muchos de estos contaminantes perjudiciales son altamente tóxicos incluso en concentraciones bajas, actúan como carcinógenos e infligen efectos graves y duraderos en la salud humana. Esta investigación subraya las posibles aplicaciones de diferentes tratamientos biológicos anaerobios mediante microorganismos sulfato-reductores, de un efluente proveniente de la operación unitaria de flotación de una mina cooperante. Además de investigar los principales métodos analíticos para la identificación de los microorganismos sulfato-reductores (MSR) en el sistema de tratamiento. Con base en las palabras clave de la literatura publicada en los últimos diez años, la investigación proporcionará una comprensión profunda de las interacciones de los MSR con los efluentes ricos en sulfatos. Las concentraciones más altas de sulfato presentes en las aguas residuales se encuentran en los efluentes de las refinerías de la industria de petróleo, en donde el ácido sulfúrico se usa para recuperar ácidos grasos volátiles (AGV) de agua de proceso muy alcalina. Estas "aguas ácidas" contienen hasta 50 g L^{-1} de sulfatos y materia orgánica insuficiente para lograr una reducción completa del sulfato (Tong et al., 2013; Verla et al., 2014). Por otro lado, otra de las industrias con efluentes ricos en sulfatos es la que procesa mariscos, habiendo dos categorías de aguas residuales: Aguas residuales de alta salinidad, que se producen cuando el agua de mar se usa como agua de proceso y/o cuando se abren los mariscos, liberando el agua salina atrapada y aguas residuales de baja salinidad, obtenidas cuando son frescas. Las aguas residuales que se originan en el procesamiento de mejillones, atún y pulpo contienen entre 2.1 a $2.7 \text{ g SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$ y de 12.4 a $16.9 \text{ g DQO L}^{-1}$, mientras que las aguas residuales de producción de harina de

pescado contienen una concentración más baja de sulfatos ($0.6 \text{ g SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$), pero concentraciones más altas de DQO (55.4 g L^{-1}) (Ido y Kaneta, 2020). Otras actividades industriales incluyen la conversión de pieles crudas en cuero que comprende el precurtido, el curtido (usando cromo o tanino vegetal) y los pasos de acabado. Las aguas residuales de la curtiduría tienen un pH de 8.6 y contienen $4.8 \text{ a } 8.0 \text{ g DQO L}^{-1}$, $150 \text{ a } 300 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$ y $1.2 \text{ a } 2.0 \text{ g SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$ (Shin et al., 1997). Los efluentes de invernadero generalmente tienen un pH de 11.2 a 12.5 y contienen $2.8 \text{ a } 4.5 \text{ g DBO L}^{-1}$ y de $0.5 \text{ a } 1.5 \text{ g S}^{2-} \text{ L}^{-1}$ (Pichtel y Bradway, 2008). Los efluentes de fotoprocesamiento son una mezcla concentrada con una carga orgánica de $67.8 \text{ g DQO L}^{-1}$ que contiene tiosulfato (45.5 g L^{-1}), $8.0 \text{ SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$ y sulfito (3.5 g L^{-1}) (Dutta et al., 2010). El efluente generado en la industria minera es el drenaje ácido de minas (DAM) o el drenaje ácido de rocas (DAR) y los sulfatos son uno de los principales contribuyentes de estas corrientes. Los drenajes ácidos de mina (DAM) se producen por la oxidación de sulfuros metálicos. Los sulfuros producen sulfatos y eventualmente acidifican el medio convirtiéndolo en ácido sulfúrico. A medida que el DAM contamina las fuentes de agua, aguas abajo, el límite establecido de sulfatos para el consumo humano se ve comprometido (Backer, 2000). La Organización Mundial de la Salud (OMS) hace hincapié en una concentración de sulfato de 250 mg L^{-1} en el agua para consumo humano (Balintova et al., 2015; US EPA, 2017). La eliminación no regulada de dicho drenaje puede provocar un aumento de la salinidad y un aumento en su acidez (valores del pH muy bajos), lo que puede ser perjudicial para la utilidad del agua corriente abajo. La corrosión, la descamación y las implicaciones para la salud son resultados definitivos del DAM. Por tanto, se encuentran disponibles numerosos enfoques para tratar dichas corrientes. El método específico seleccionado depende del nivel de remoción esperado, las legislaciones ambientales, los recursos disponibles, el espacio requerido, la economía y el volumen del agua contaminada (Fernando et al., 2018). Los métodos de remediación que se encuentran actualmente en práctica son los métodos convencionales incluyen cal, caliza y humedales, los desarrollos recientes incluyen filtración, electrocoagulación, adsorción, intercambio iónico y precipitación de los efluentes (Bologo et al., 2010; Iakovleva et al., 2015). También se puede aplicar un tratamiento biológico del agua, como es el objetivo de esta investigación, mediante un

reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA), que utiliza microorganismos para llevar a cabo la transformación de los componentes solubles a insolubles. Esto se logra aprovechando la capacidad de esos microorganismos de asimilar la materia orgánica y los nutrientes disueltos en fase acuosa (carbono, nitrógeno y fósforo) para su propio desarrollo (Salgado-Bernal et al., 2012), empleando como aceptores de electrones a los sulfatos que, al transformarse en sulfuros, logran precipitar a los cationes presentes como sulfuros metálicos.

1.2. Hipótesis

En esta primera etapa, una información general sobre la composición de la comunidad microbiana como es la identificación de las principales especies de microorganismos sulfato-reductores encargados de convertir los sulfatos en sulfuros, precipitando a estas sales como sulfuros metálicos proporcionará una mejor información para lograr una adaptación y estabilización más rápida del sistema, así como información crucial para el desarrollo y la optimización de los sistemas de tratamiento anaerobio.

1.3. Justificación

La caracterización de la estructura de la comunidad microbiana y la comprensión de su comportamiento es esencial para mejorar el rendimiento de los procesos anaerobios. Sin embargo, la diversidad de microorganismos involucrados y sus respuestas a los cambios en las prácticas de manejo y las condiciones ambientales se pasan por alto debido a la compleja ecología microbiana. En este sentido, el uso de técnicas avanzadas de biología molecular es de importancia para comprender y aclarar las reacciones que tienen lugar en los sistemas anaerobios (Lin et al., 2012; Ventorino et al., 2018). Por tanto, la identificación de microorganismos consiste en determinar cuáles son los grupos taxonómicos que están presentes en un sistema mediante pruebas preseleccionadas y apropiadas para el problema que se está estudiando (Sandle, 2016). La identificación efectiva de los microorganismos presentes en los sistemas requiere de métodos reconocidos para determinar las características fenotípicas y

genotípicas de un grupo taxonómico determinado. El análisis de los datos obtenidos con tales métodos también puede ayudar a identificar organismos estrechamente relacionados (a nivel de especie o incluso subespecie) (Bernatchez et al., 2018). Dentro de tales comunidades, muchas funciones se llevan a cabo mediante esfuerzos cooperativos. Por esta complejidad entre la gran variedad de MSR y su respuesta variable a cambios en el pH, temperatura, conductividad eléctrica, materia orgánica presentes en el interior de un RALLFA, se plantea la identificación de MSR más estudiados y abundantes en este tipo de sistemas anaerobios (Álvarez-Márquez, 2022).

A continuación, se presentan los objetivos de esta investigación experimental.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Determinar algunas de las especies de microorganismos sulfato-reductores (MSR) presentes en un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA) a escala de laboratorio dosificado con un efluente ácido con bajas concentraciones de Pb, Zn, Cu y Fe provenientes de la operación unitaria de flotación de una mina cooperante para disminuir el tiempo de arranque y estabilización del reactor anaerobio.

1.4.2. Objetivos particulares

- ❖ Revisar en la literatura cuáles son las principales especies de microorganismos sulfato-reductores (MSR), responsables de la precipitación de metales como el Pb, Zn, Cu y Fe en un sistema anaerobio
- ❖ Evaluar cuáles son las metodologías utilizadas para la identificación de los MSR en un sistema anaerobio logrando la mayor precipitación de metales como el Pb, el Zn y el Cu y del Fe que acompaña a los tres primeros

- ❖ Preparar los medios de cultivo general, específico y selectivo para el desarrollo de los microorganismos sulfato-reductores que se encuentran en el reactor tipo RALLFA
- ❖ Determinar el tipo de microorganismos sulfato-reductores, mediante la técnica de tinción de Gram
- ❖ Aislar algunos microorganismos sulfato-reductores que se encuentran en el reactor tipo RALLFA a 28-30°C
- ❖ Observar los microorganismos sulfato-reductores que se aislaron con microscopio electrónico de barrido y microscopio confocal
- ❖ Identificar taxonómicamente los microorganismos sulfato-reductores hasta llegar a género o especie que se encuentran en el reactor tipo RALLFA.

A continuación, en el siguiente capítulo se presenta el marco teórico de esta investigación experimental.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. El uso de agua en México

México emplea el agua a su disposición de diversas formas en todas las actividades humanas, ya sea para subsistir o producir e intercambiar bienes y servicios. En el Registro Público de Derechos de Agua (REPDA) se registran los volúmenes concesionados o asignados a los usuarios de aguas nacionales (CONAGUA, 2019). En el informe de estadísticas del agua en México del 2019, se tenían concesionados 88,840 hm³ de agua para uso consuntivo. En la Figura 2.1 se muestra su distribución anual, donde se resalta el uso industrial ya que solamente representa el 3.03% comparado con el uso agrícola de más de 60%.

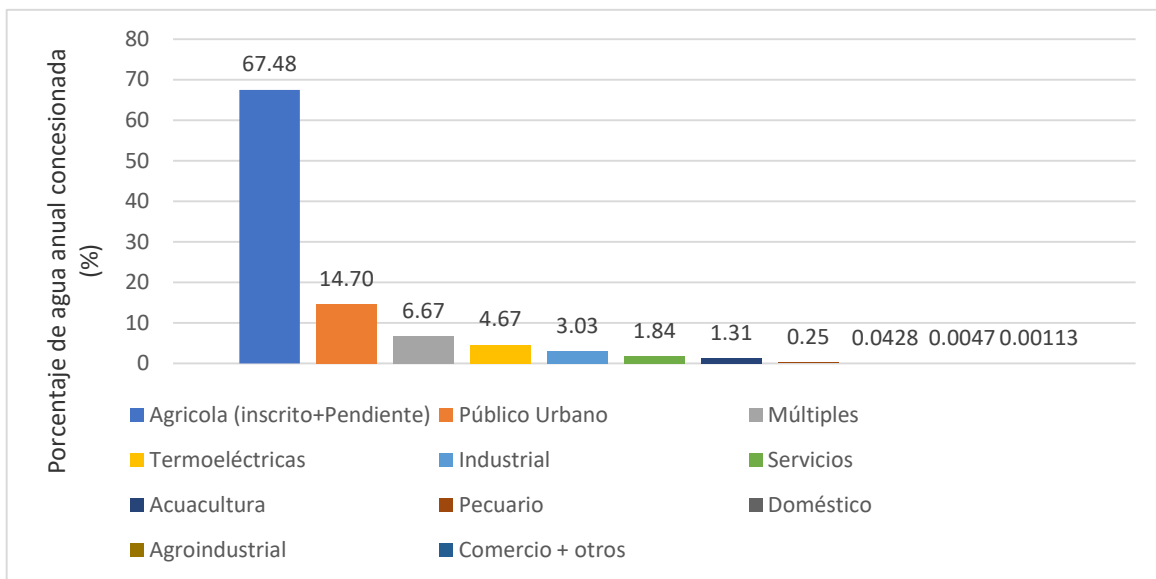


Figura 2.1. Distribución anual de agua concesionada para uso consuntivo en el año 2018 (Datos tomados de CONAGUA, 2019)

Por otro lado, la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA, 2019) establece otra clasificación usando el término usos agrupados (Figura 2.2). Dentro del uso agrupado industria autoabastecida, es decir la industria que toma el agua que requiere directamente de los ríos, arroyos, lagos o acuíferos del país, se encuentra el sector de

la minería y aunque solamente representa el 4.88% del uso consuntivo total, del año 2008 al 2017 se incrementó un 23.5% el volumen para este uso (CONAGUA, 2018).

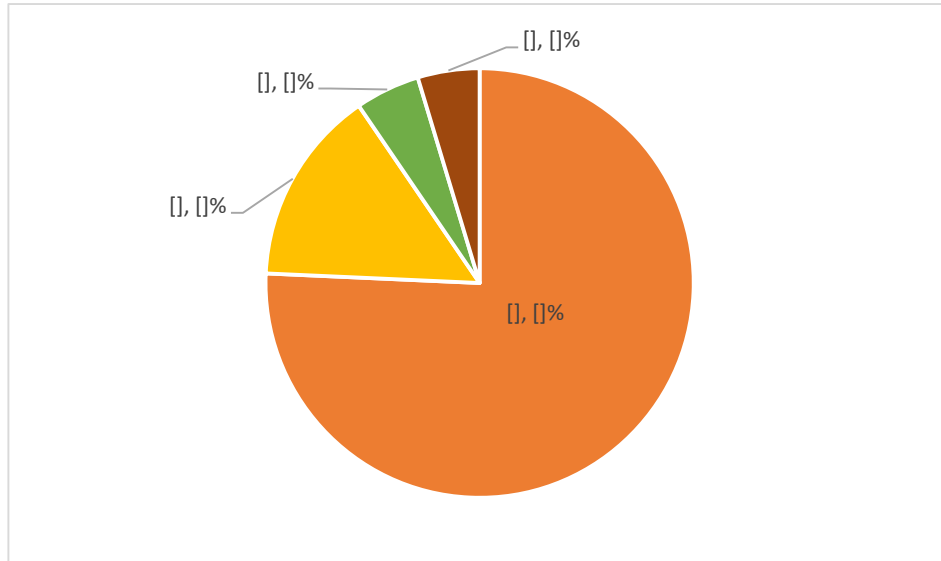


Figura 2.2. Distribución de volúmenes concesionados para usos agrupados consuntivos en 2018

Sin embargo, el agua residual generada por el uso de la industria autoabastecida entre otros (no municipales) se descargan directamente a los cuerpos de agua nacionales sin ser colectadas por sistemas de alcantarillado, de las cuales en el año 2018 solamente se trataron el 40.09%. En la Tabla 2.1 se observa la cantidad de agua que no es tratada, generando un problema de contaminación ambiental (CONAGUA, 2019).

Tabla 2.1. Descargas de aguas residuales no municipales en 2018 (Datos tomados de CONAGUA, 2019)

Descargas	Volumen
Aguas residuales no municipales	6.86 miles de hm ³ /año (217.4 m ³ /s)
Se tratan	2.75 miles de hm ³ /año (87.1 m ³ /s)
Carga contaminante	
Se generan	10.29 millones de ton de DBO ₅ al año
Se remueven en los sistemas de tratamiento	1.85 millones de ton de DBO ₅ al año

2.1.1. Industria minera: El consumo de agua

La minería es una industria que tiene una estrecha relación con el agua y que puede considerarse además de importante, muy diversa, dado que se desarrolla en varios contextos territoriales, sociales e hidrológicos (Younger et al., 2002). En México se encuentran predominantemente en la zona noroeste del país, donde de manera natural escasea el agua. De esta manera se ejemplifica que el clima y la hidrología local establecen los requisitos necesarios de infraestructura para la operación de una mina y tienen una gran influencia en la naturaleza de los riesgos hídricos que enfrentan las compañías mineras y las comunidades que conviven en ese territorio (Pedrozo-Acuña, 2022).

Su consumo de agua está directamente relacionado con la cantidad efectiva de mineral que es aprovechado de un cierto volumen removido del suelo en la mina: A menor grado de mena, mayor consumo de agua por parte de la industria y presas de jales más grandes para almacenar los residuos de la industria (Prior et al., 2012). Esto provoca la contaminación de los cuerpos de agua por la descarga de aguas residuales sin tratamiento convirtiendo a la industria minera en una de las más intensivas en el consumo de agua y afectando tanto la disponibilidad como la calidad de esta.

Younger et al. (2002) mencionan que los impactos de la minería en el medio acuático surgen de cinco fases distintas del ciclo de vida de la minería:

- a) El proceso minero propiamente dicho
- b) Las operaciones de tratamiento del mineral
- c) El desagüe que se lleva a cabo para hacer posible la explotación minera
- d) La filtración de lixiviados contaminados de las pilas de roca estéril y las presas de estériles
- e) Inundación de las explotaciones una vez finalizada la extracción
- f) Vertido de aguas no tratadas una vez finalizada la inundación.

Un estudio realizado por Llano en 2016 encontró 417 empresas mineras dentro del REPDA, los cuales se clasificaron en 230 grupos empresariales mineros. Con un total de 1,036 títulos de aprovechamiento de agua, avalando un volumen de 436 millones 643 mil 287.92 metros cúbicos anuales de agua. En la Figura 2.3 se presentan las empresas mineras con concesiones de agua.

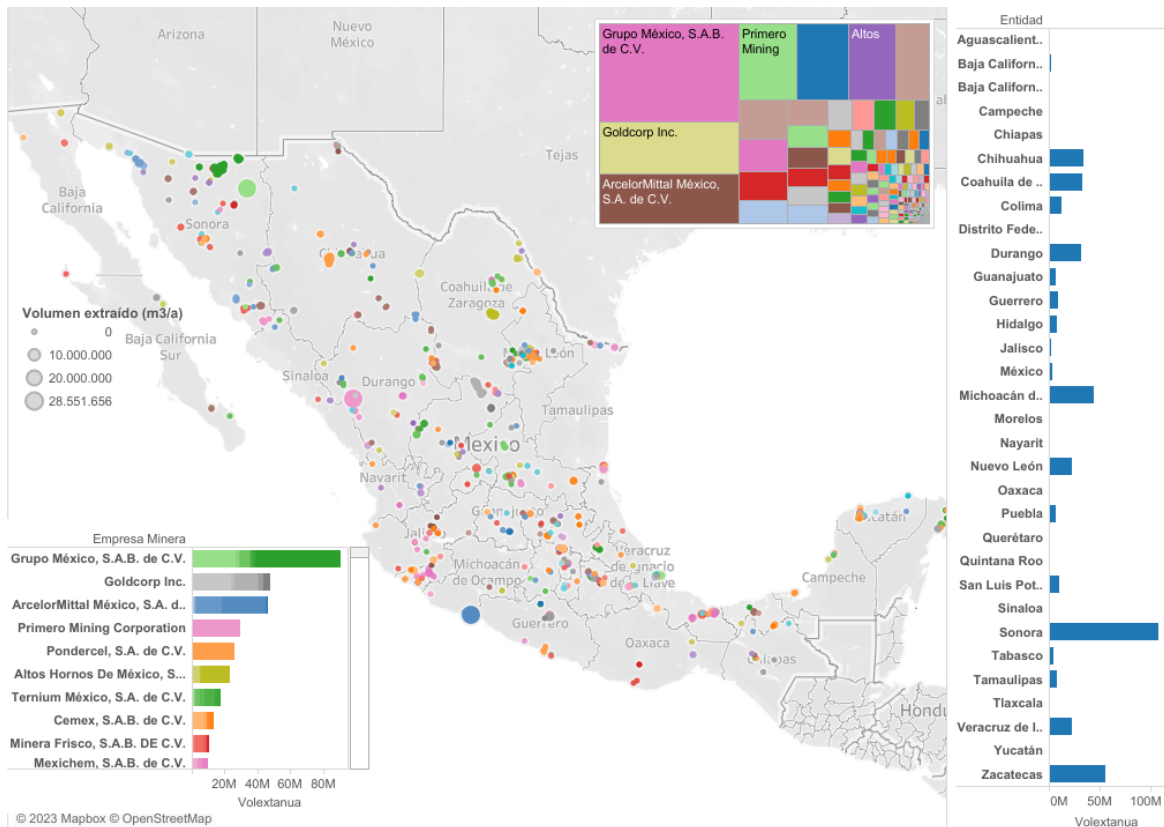


Figura 2.3. Concesiones de agua para la industria minera en 2016 (Llano, 2016)

En ese sentido tan solo 3 empresas mineras consumen 184 millones de metros cúbicos de agua anuales.

Como se había mencionado, el norte del país es la región con mayor actividad minera y también la que más agua emplea. Cerca de la mitad del agua destinada a la minería en el país se extrae de los estados de Sonora, Zacatecas y Michoacán. Si bien se conocen los datos de consumo de agua en la industria minera se ignora el volumen que se transforma en aguas residuales o en DAM y cuánta de esta es tratada (Tablas 2.2 y 2.3).

Tabla 2.2. Top 10 de empresa mineras con mayor consumo de agua en 2016 (Llano, 2016)

Grupo/Razón Social	Volumen extraído millones m ³ /año	Títulos de aprovechamiento de agua
Grupo México, S.A.B. de C.V.	90.62	142
Goldcorp Inc.	47.66	74
Arcelor Mittal México, S.A. de C.V.	45.84	11
Primero Mining Corporation	29.42	4
Pondercel, S.A. de C.V.	26.11	21
Altos Hornos de México, S.A. de C.V.	23.34	29
Ternium México, S.A. de C.V.	16.95	37
Cemex, S.A.B. de C.V.	12.90	48
Minera Frisco, S.A.B. DE C.V.	10.25	36
Mexichem, S.A.B. de C.V.	9.36	22

Tabla 2.3. Top 10 de estados con mayor consumo de agua en la industria minera en 2016 (Llano, 2016)

Estado	Títulos de aprovechamiento de agua	Volumen extraído millones de m ³ /año
Sonora	202	107.87
Zacatecas	98	55.78
Michoacán de Ocampo	9	44.39
Chihuahua	79	34.25
Coahuila de Zaragoza	76	32.53
Durango	29	32.19
Veracruz de Ignacio de la Llave	39	22.90
Nuevo León	102	22.12
Colima	25	12.02
San Luis Potosí	56	10.10

2.1.2. Proceso de extracción de minerales tales como el Pb, Zn, Cu y Fe

La planta minera cooperante en este proyecto de investigación se encuentra al suroeste del Estado de México en el municipio de Zacazonapan. Lleva en operación desde 1994. Es una planta donde se producen concentrados ricos en zinc, plomo y cobre a partir de un yacimiento vulcano-sedimentario de sulfuros (González-Sandoval, 2010). El mineral extraído se somete a diversos procesos de concentración tanto pirometalúrgicos como hidrometalúrgicos en las fundiciones y refinerías. El proceso de concentración que se emplea en la mina de estudio es el de flotación, el cual está acompañado de otras cinco

etapas que son: Trituración, molienda, clasificación, espesamiento y filtración. En la última etapa se obtiene el concentrado con un contenido de humedad del 8%. Los sulfuros metálicos más significativos son de galena (PbS), esfalerita (ZnS), calcopirita (CuFeS₂) y pirita (FeS₂) (Pacheco-Gutiérrez, 2006).

La flotación es una técnica de separación por gravedad y se lleva a cabo por la diferencia de densidad entre la fase continua y la dispersa. Al adicionar un gas o aire en el efluente se promueve la formación de aglomerados, que se basan en distribuir las especies iónicas de metal en las aguas residuales hidrófobas mediante el uso de agentes tensoactivos y la posterior eliminación de estas especies hidrófobas por burbujas de aire. Los xantatos son los colectores más usados en la operación unitaria de flotación de minerales y óxidos (por ejemplo: óxido de cobre, plomo y zinc metálico). El xantato etílico remueve eficientemente por arriba del 87% del metal contenido en solución (Mora et al., 2018). En el proceso de flotación frecuentemente el agua se recicla en circuito cerrado, este procedimiento gradualmente da lugar a perturbaciones en los resultados metalúrgicos debido a la acumulación de reactivos residuales, cambios en la cantidad de sales disueltas (principalmente sulfatos) y aumento en la cantidad de los llamados lodos (Coetzer et al., 2003; Deo y Natarajan, 1998; García et al., 2014; Levay et al., 2001; Liu et al., 2013; Muzenda, 2010). En algunas investigaciones como la de Sandenbergh y Wei (2007) y Shengo et al. (2014) se reporta que las aguas residuales reutilizadas varias veces no presentan efectos adversos en la flotación. Sin embargo, la situación podría ser diferente si se considera el uso de agua residual no tratada durante el proceso de flotación de minerales como el plomo y zinc, pues en este caso, el reciclaje del agua provoca la disminución en la concentración del plomo obteniéndose solamente 62% en comparación con el obtenido cuando se utiliza agua dulce o fresca que es por arriba del 87% (Rao y Finch, 1989). Por otro lado, la concentración del zinc se ha visto afectada, aunque en menor medida, por la variación en la calidad del agua (Liu et al., 2013). En este último estudio se notó una mayor recuperación del zinc en el concentrado que de plomo, lo que muestra explícitamente la pérdida de selectividad que surge también debido al agua residual sin tratamiento utilizada en la operación unitaria de flotación. Por lo anterior, las fluctuaciones de la

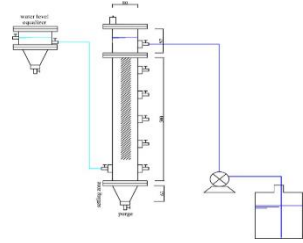
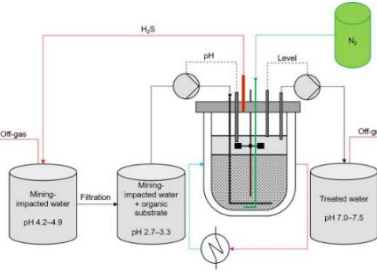
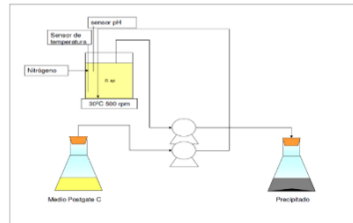
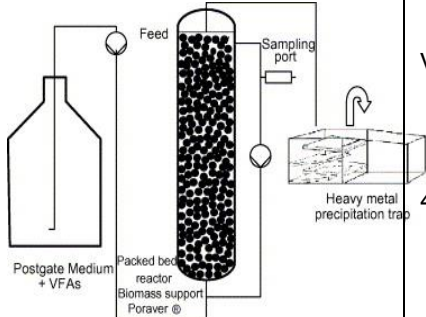
calidad del agua sí influyen en el rendimiento de la flotación, pero en un grado diferente dependiendo del tipo de mineral tratado y el conjunto de reactivos (colectores) utilizados (Liu et al., 2013; Lutandula y Mwana, 2014). La elección de un método de tratamiento del agua residual de la operación unitaria de flotación es una decisión que debe estar justificada con estudios *ad hoc*, porque esto afecta los parámetros clave de la flotación y, por lo tanto, las especificaciones metalúrgicas finales del metal concentrado (Liu et al., 2013).


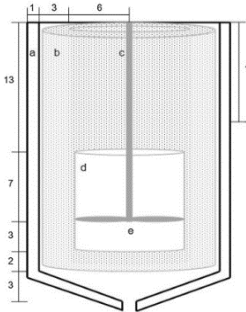
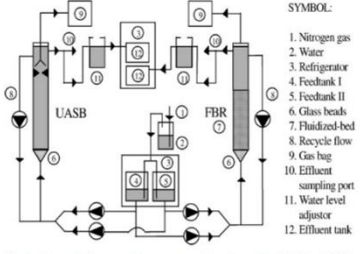
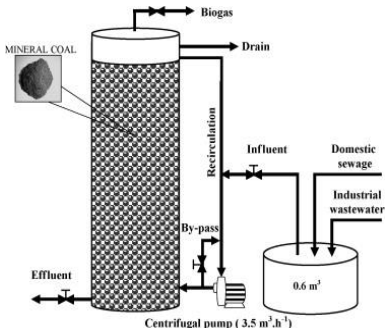
2.2. Principio del sistema de tratamiento biológico anaerobio utilizado para el tratamiento de agua

El agua residual proveniente de la operación unitaria de flotación de la industria minera generalmente contiene iones metálicos disueltos y ácido sulfúrico (Johnson y Hallberg, 2003). Aunque esta corriente de desechos ácidos son un problema ambiental importante, los metales valiosos que contienen pueden recuperarse mediante la reducción de los sulfatos a sulfuros gracias a los microorganismos sulfato-reductores (MSR), seguido de la precipitación de sulfuros metálicos en un bio-reactor (Tabla 2.4) (Huisman et al., 2006; Tabak et al., 2003; Veeken et al., 2003).

Tabla 2.4. Sistema tratamiento biológico anaerobio utilizado para el tratamiento de agua

Reactor	Esquema	Carga	Referencia
<p>Reactor de lecho de lodos anaerobios de flujo ascendente</p> <p><i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB)</i></p>		<p>Volumen de trabajo: 800 mL</p> <p>Lecho de lodos: 400 mL</p>	<p>Castillo-Félix, 2016; Sahinkaya y Gungor, 2010</p>

Reactor	Esquema	Carga	Referencia
<p>Bio-reactores de lecho fijo de flujo descendente</p> <p><i>Down-flow structured bed bioreactors (DFSBR)</i></p>		<p>Volumen de trabajo: 620 ± 8.2 mL</p> <p>Volumen de lodo: 470 ± 8.2 mL</p>	<p>Costa et al., 2021; de Godoi et al., 2017a; de Godoi et al., 2017b</p>
<p>Reactor de biopelícula de flujo ascendente sulfurogénico de baja temperatura</p> <p><i>Sulfidogenic up-flow biofilm reactor at low temperature</i></p>		<p>Volumen de trabajo: 2 L</p> <p>Volumen de lodos: 0.6 L</p>	<p>Virpiranta et al., 2022</p>
<p>Reactor de tanque agitado</p>		<p>Volumen de trabajo 800 mL</p>	<p>Cabrera-Revuelta, 2005</p>
<p>Reactor de lecho empacado anaerobio con flujo ascendente</p> <p><i>Upflow anaerobic packed bed reactor (UAPB)</i></p>		<p>Volumen de trabajo 500 mL</p> <p>100 mL de biomasa enriquecida</p> <p>400 mL de medio de cultivo Postgate C modificado</p>	<p>Alvarez et al., 2007</p>

Reactor	Esquema	Carga	Referencia
<p>Biorreactor anaerobio de lecho fluidificado</p> <p><i>Anaerobic Fluidized Bed Bioreactor (AFBB)</i></p>		<p>Dos tanques con un volumen de 10.5 L</p> <p>Capacidad útil: 4.85 L</p>	<p>Torbaghan y Torghabeh, 2019</p>
<p>Reactor secuencial anaerobio discontinuo</p> <p><i>Anaerobic Sequential Batch Reactor (ASBR)</i></p>		<p>Volumen total: 7 L</p> <p>Volumen de DAM sintética: 5.5 L</p>	<p>Costa et al., 2017</p>
<p>Reactor de lecho de lodos anaerobios de flujo ascendente / Reactor de lecho fluidificado</p> <p><i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket / Fluidized-Bed Reactor UASB / FBR</i></p>	 <p>Fig. 1. Schematic diagram of the process configuration of the UASB and FBR.</p>	<p>Reactor USAB volumen de 2.35 L</p> <p>3 reactores FBR con volúmenes de 0.5, 0.5 y 1.3 L</p>	<p>Kaksonen et al., 2003</p>
<p>Reactor de biopelícula anaerobia de secuenciación discontinua</p> <p><i>Anaerobic sequencing batch biofilm reactor (ASBBR)</i></p>		<p>Volumen total: 1.2 m³.</p> <p>Volumen de carbón mineral: 1.0 m³</p> <p>Volumen de tratamiento por ciclo: 0.6 m³</p>	<p>Sarti et al., 2010</p>

Los sistemas vistos pueden inocularse con un cultivo bacteriano mixto proveniente de diversas fuentes, como lodos de aguas residuales, humedales y sedimentos contaminados con metales pesados o especies de MSR enriquecidos, manteniendo un ambiente biológicamente activo en función de los flujos de entrada y de salida, pudiendo ser procesos aerobios o anaerobios (Hwang y Jho, 2018). Los bio-reactores anaerobios han sido aplicados con éxito a escala industrial para el tratamiento de drenajes ácidos de minas (DAM) utilizando MSR. Además, han sido patentados como el BioSulphide ®, producido por BioteQ Environmental Technologies Inc., Canadá y Thiopaq ®, por Paques, Países Bajos (Ayangbenro et al., 2018).

En la investigación de Castillo-Félix (2016), se menciona que la sulfato-reducción y la precipitación de los sulfuros metálicos puede realizarse en una o dos etapas. Cuando es en una etapa es económico, pero no es viable si el agua es muy ácida o contiene altas concentraciones de metales pesados. Además, los precipitados de sulfuros metálicos dentro del reactor son difíciles de remover. La separación del proceso en: a) sulfato-reducción y b) la precipitación en unidades individuales reduce la toxicidad de los metales y la acidez que afectan directamente al proceso. Además, la separación por etapas puede permitir la selectividad de metales controlando el pH y la concentración H₂S, pero es más costoso debido a que se necesita de instrumentación más compleja.

2.2.1. El reactor de lecho de lodos anaerobios de flujo ascendente (RALLFA) / *Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB por sus siglas en inglés) reactor*

El sistema fue desarrollado por Gatze Lettinga y colaboradores en Holanda en la década de los 70, publicando su primer artículo en los años 80 del siglo veinte (Lettinga et al., 1980). La operación se basa en la actividad autorregulada de diferentes grupos de arqueas o arqueobacterias y bacterias que degradan la materia orgánica y que se desarrollan en forma interactiva formando un lodo biológicamente activo en el reactor. Dichos grupos bacterianos establecen entre sí relaciones simbióticas de alta eficiencia metabólica bajo la forma de gránulos cuya densidad les permite sedimentar en el

digestor. La biomasa permanece en el reactor sin necesidad de soporte adicional. Estos reactores constan de tres partes principales: Sistema hidráulico, lecho de lodos y la cámara superior de acumulación de biogás. Durante el arranque y operación de los reactores anaerobios se recomienda el seguimiento de algunos parámetros fisicoquímicos y el uso de herramientas que permitan evaluar su desempeño, como son: Parámetros de eficiencia, estabilidad, cantidad y calidad del lodo anaerobio, entre otros (Calixto-Cano, 2019). En los reactores tipo RALLFA con MSR, estos se mezclan en el flujo ascendente con el agua a tratar, y los gases producidos durante la sulfato-reducción, permaneciendo principalmente en solución (Leal-Gutiérrez, 2021). Por lo tanto, no se requiere un separador trifásico, pues la producción de biogás es mínima. Por otro lado, la retención de biomasa depende de la granulación; sin embargo, los MSR no se granulan tan bien como los microorganismos metanogénicos y, por lo tanto, se tiene un arrastre de biomasa en el efluente (Weijma et al., 2002). El sistema RALLFA es, por lo tanto, más adecuado como reactor metanogénico que como reactor sulfurogénico (Lens et al., 1998).

2.2.2. Bio-reactores de lecho fijo de flujo descendente / *Down-flow structured bed bioreactors (DFSBR)*

El reactor de lecho fijo de flujo descendente ha sido utilizado por de-Godoi et al. (2017a), para tratar una mezcla de sustratos sintéticos que simulaban un drenaje ácido de mina rico en hierro (DAM) y la fracción soluble de la vinaza de caña de azúcar utilizándola como donante de electrones para la reducción biológica de sulfato, lo que resultó en una demanda química de oxígeno (DQO) del influente cercana a 4000 mg L⁻¹ y una tasa de carga orgánica volumétrica de 4.8 g L⁻¹d⁻¹. La concentración de sulfato se mantuvo cerca de 2000 mg L⁻¹, mientras se aplicó un aumento gradual de la concentración de hierro de 2 a 400 mg L⁻¹. El sistema presentó una caída significativa en la alcalinidad de 2.45 a 1.30 g de CaCO₃ L⁻¹, simultáneamente con la precipitación de sulfuro (HS⁻) inducida por la adición de hierro. Las eficiencias de eliminación de DQO fueron superiores al 93% y mientras que las de sulfatos fueron cercanas al 100%. El precipitado recogido en el fondo del reactor mostró concentraciones crecientes de

sólidos suspendidos fijos (SSF), lo que indica la posibilidad de recuperación de metales del sistema. Finalmente, se pudieron diferenciar las fracciones de alcalinidad debidas a HS^- y HCO_3^- . Este nuevo enfoque proporciona una mejor caracterización de la capacidad amortiguadora en el sistema, principalmente para evitar una sobreestimación del HCO_3^- , producido por el metabolismo de los MSR y para predecir la posible pérdida de alcalinidad por eliminación de sulfuro como lo citan de-Godoi et al. (2017b).

2.2.3. Reactor de biopelícula de flujo ascendente sulfurogénico de baja temperatura / *Sulfidogenic up-flow biofilm reactor at low temperatura*

Los biorreactores sulfurogénicos tienen el potencial para el tratamiento del DAM, incluso a baja temperatura. Se demostró en la investigación realizada por Virpiranta et al. (2022), que si se mantenían condiciones neutras en el reactor y un consorcio mixto de microorganismos sulfato-reductores tolerantes al frío, MSR, cuando se introduce un influente ácido en el reactor se pueden remover simultáneamente los sulfatos y los metales de efluentes mineros ácidos a baja temperatura. El tratamiento de aguas reales impactadas por la minería con concentraciones iniciales de sulfato entre 1580 y 5350 mg L^{-1} y una acidez neutralizada por microorganismos sulfurogénicos. Los metales se precipitaron dentro del reactor fuera de línea o en línea, logrando la reducción de sulfatos, de 1000 a 4500 $\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ a una temperatura de $11.7 \pm 0.2^\circ\text{C}$ (eliminación de sulfato de 43 a 87%). Se descubrió que el consorcio microbiano era robusto y resistente a los cambios, los MSR fueron más abundantes a concentraciones más altas de sulfato (Virpiranta et al., 2022).

2.2.4. Reactor de lecho fluidificado de flujo ascendente y flujo descendente / *Upflow and Downflow Fluidized Bed Reactor (UFBR, DFBR)*

Se estudió el biotratamiento de aguas residuales sintéticas que contienen Cu y Zn en reactores de lecho fluidificado de flujo ascendente y descendente (*DFBR, UFBR*) reductores de sulfato a 35°C . La robustez de los sistemas se estudió aumentando gradualmente las concentraciones de metales de alimentación (concentraciones de

metales totales de 25 a 300 mg L⁻¹) y disminuyendo el pH de la alimentación (hasta 2.0). El lactato se utilizó como fuente de carbono y energía para las bacterias reductoras de sulfato. Después de la puesta en marcha, las eficiencias de reducción de sulfato y de oxidación de DQO fueron del 60 al 86% y del 87 al 95% en *UFBR* y del 40 al 88 y del 55 al 95% en *DFBR*, respectivamente. La relación óptima de DQO/sulfato para la reducción de sulfato fue de 0.85 y 1.25 para *UFBR* y *DFBR*, respectivamente. Aproximadamente el 70% y el 55% de los electrones producidos a partir de la oxidación del lactato se utilizaron para la reducción de sulfato en *UFBR* y *DFBR*, respectivamente. La producción de sulfuros y la capacidad de precipitación de metales de *UFBR* fueron más altas que las de *DFBR*, aunque el régimen de flujo descendente dio la posibilidad de recuperación de metales. Los metales precipitaron más del 99% en ambos reactores. Los análisis de fluorescencia por rayos X (por sus siglas en inglés *XRF*) mostraron que los metales se precipitaron como sulfuros metálicos (Sahinkaya y Gungor, 2010).

2.2.5. Reactor de tanque agitado

En la investigación realizada por Cabrera-Revuelta (2005), se presenta el escalamiento y evaluación del proceso de biooxidación de un residuo de minería aurífera, se realizó una caracterización mineralógica inicial del residuo y se estableció que la fase mineral predominante en el residuo fue la pirita con un 34.1% y el contenido de Fe y S fue de 24.9 y 28.7%, respectivamente, observando además partículas micrométricas de oro diseminadas en la superficie de los sulfuros indicando la cualidad refractaria del mineral¹. La adaptación del agente biológico, *Acidithiobacillus ferrooxidans* mediante una serie de cultivos sucesivos se obtuvo una cepa estable con respecto a su actividad oxidativa y se eliminaron las fases de latencia en las cinéticas de biooxidación. Los

¹ Una cantidad significativa de oro puede estar íntimamente asociada con sulfuros y/o arseniuros, por lo cual recibe el nombre de **mineral** refractario [Vladimir Arias-Arce, Rosa Coronado-Falcón, Luis Puente-Santibañez, Daniel Lovera-Dávila. REFRACTARIEDAD DE CONCENTRADOS AURÍFEROS / REFRACTORY OF GOLD CONCENTRATE, Revista del Instituto de Investigación FIGMMG*. Vol. 8, N.º 16, pp. 5-14 (2005) ISSN: 1561-0888 (impreso) / 1628-8097 (electrónico). Palabras clave: Mineral de oro refractario, concentrados refractarios, oro microscópico, tratamiento de concentrados, pirometalurgia, hidrometalurgia. *Keywords: Gold, concentrated refractory, microscopic gold, treatment of concentrated, pirometallurgy, hydrometallurgy.* (*Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos UNMSM, Lima-Perú). E-mail: iigeo@unmsm.edu.pe]

ensayos preliminares en reactores indicaron que el intervalo de agitación idóneo para el proceso oscila entre 500 y 700 r.p.m, conduciendo a los más altos porcentajes de remoción de hierro y sulfatos disueltos.

2.2.6. Reactor de lecho empacado anaerobio con flujo ascendente / *Upflow anaerobic packed bed reactor (UAPB)*

El objetivo de la investigación de Jong y Parry (2006), fue operar un reactor de lecho empacado anaerobio de flujo ascendente (*UAPB*) que contiene microorganismos sulfato-reductores de (MSR) en condiciones ácidas similares a las que se encuentran en el drenaje ácido de minas (DAM). El *UAPB* opera en flujo continuo y el pH progresivamente fue disminuyendo, demostrando que dicho sistema era capaz de soportar la reducción de sulfatos a valores de pH de 6.0, 5.0, 4.5, 4.0 y 3.5, en un medio sintético que contenía 53.5 mmol L⁻¹ de lactato. Se obtuvieron tasas de reducción de sulfatos de 553-1052 mmol m⁻³ d⁻¹, pero cuando el pH del influente se redujo progresivamente de 6.0 a 4.0 y posteriormente a 3.5 la remoción de sulfatos disminuyó sustancialmente hasta el 1%. Sin embargo, el biorreactor que contenía MSR de varios grupos bacterianos sugiere una interacción sinérgica entre las diferentes poblaciones, *Desulfovibrio*, *Clostridium*, *Citrobacter* y *Cronobacter* y con el orden *Bacteroidales*, *sp.* La comunidad dominante desarrollada en el reactor tipo *UAPB* estuvo compuesta por microorganismos afiliadas a *Desulfovibrio sp.* La interacción sintrófica de los MSR podría ser el factor clave para la reducción de sulfatos y la generación de alcalinidad (Martins et al., 2011) incluso cuando el influente tuviera un pH bajo de 3.5, lo que indicaría que tales sistemas de tratamiento tienen potencial para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con sulfatos y altamente ácidas (Jong y Parry, 2006).

2.2.7. Biorreactor anaerobio de lecho fluidificado / *Anaerobic Fluidized Bed Bioreactor (AFBB)*

El tratamiento de aguas residuales industriales y agrícolas, que tienen el potencial de causar graves riesgos para la salud humana y el ambiente, por medio de procesos

biológicos adquiere una especial importancia al tener menor costo y mayor eficiencia. La remoción de hierro y sulfatos de aguas residuales sintéticas muy salinas se realizó por medio de microorganismos sulfato-reductores (MSR) en condiciones anaerobias para convertir las aguas residuales en un fertilizante químico para usar en suelos salinos y alcalinos. Se aislaron y purificaron tres MSR halófilos de las aguas residuales del primer lavado del algodón mediante el medio de cultivo Postgate C que se complementó con cloruro de sodio y cloruro de magnesio hexahidratado. La cepa con mayor tolerancia al NaCl (HSR973) se asignó a *Desulfovibrio halophilus* sp. Este estudio experimental se realizó en un reactor de lecho fluidificado en condiciones anaerobias. La máxima eliminación lograda fue de 85.3 y 78.4% hierro y sulfatos respectivamente con un tiempo de residencia hidráulica de 24 horas. La concentración de sulfatos en las muestras disminuyó a aproximadamente 20%. La mayor producción de H₂S en condiciones óptimas de funcionamiento fue de aproximadamente 228 mL L⁻¹, esta concentración se cuantificó mediante la oxidación selectiva de H₂S (Kamali et al., 2019). La reducción de la precipitación biológica de sulfatos y hierro por el reactor anaerobio presentó un alto rendimiento. Esta eliminación se acompañó del aumento de alcalinidad durante el proceso, lo que podría mejorar la condición para el tratamiento ácido de aguas residuales. El lodo de sulfuro de hierro producido no era adecuado para su uso como fertilizante químico debido a su falta de separación completa. Sin embargo, el lodo total producido se pudo consumir en suelos salinos y alcalinos para diversos fines después de un tratamiento adicional (Torbaghan y Torghabeh, 2019).

2.2.8. Reactor secuencial anaerobio discontinuo / *Anaerobic Sequential Batch Reactor (ASBR)*

Los sistemas *ASBR* se operaron con diferentes valores de demanda química de oxígeno (DQO) de alimentación y diferentes tasas de carga de DQO a temperatura mesófila de 37°C y a pH controlado. Cuando el *ASBR* operaba en las mejores condiciones, el gas producido contenía alrededor de 34.7% de H₂ y 65.3% de CO₂, sin que se detectara metano. Cuando la DQO de la alimentación excedía los 40,000 mg L⁻¹,

el rendimiento del proceso en términos de producción de hidrógeno disminuyó debido a la toxicidad del potasio y el sulfato (Searmsirimongkol et al., 2011).

En la investigación por Costa et al. (2021), se observó cómo el cobre inhibió la reducción de sulfatos, no obstante, la acumulación de precipitados sedimentados fue del 22%, lo que indicó que es posible la recuperación de metales como precipitados sedimentados. En otro estudio realizado por Costa et al. (2019), se evaluó un reactor de secuenciación discontinua anaerobio diseñado para el tratamiento de DAM, con respecto a su capacidad para adaptarse a un aumento en las concentraciones de metales. Un aumento en la concentración de Fe^{2+} disminuyó la tasa de remoción de sulfato y la tasa de remoción de DQO, el sistema se mantuvo estable durante 48 h en todas las fases de operación, pero posterior al tiempo mencionado declinó su remoción.

2.2.9. Reactor de biopelícula anaerobio de secuenciación discontinua / *Anaerobic sequencing batch biofilm reactor (ASBBR)*

El reactor anaerobio de biopelícula secuencial por lotes (*ASBBR*) es otro sistema que puede ser utilizado para el tratamiento de aguas residuales ricas en sulfatos. En este sistema se utilizó etanol como principal fuente de carbono. Las proporciones de DQO / SO_4^{2-} probadas fueron de 1.8 y 1.5 para tasas de carga de sulfatos de 0.65–1.90 kg SO_4^{2-} / ciclo (ciclo de 48 h). Las eficiencias de remoción de sulfato observadas en todos los ensayos fueron tan altas como 99%. Los inventarios moleculares indicaron un cambio en la composición microbiana y una disminución en la diversidad de especies con el aumento de la concentración de sulfatos. Especies de *beta-proteobacterias* afiliadas a *Aminomonas spp.* y *Thermanaerovibrio spp.* predominaron para 1.0 g SO_4^{2-} L^{-1} . A concentraciones más altas de sulfatos, el grupo bacteriano predominante fue *Delta-proteobacteria*, principalmente *Desulfovibrio spp.* y *Desulfomicrobium spp.* a 2.0 g SO_4^{2-} L^{-1} , mientras que *Desulfurella spp.* y *Coprothermobacter spp.* predominaron a 3.0 g SO_4^{2-} L^{-1} . Estos organismos se han asociado comúnmente con la reducción de sulfato produciendo acetato, sulfuro y azufre (Sarti et al., 2010).

2.3. Principales especies de microorganismos sulfato-reductores (MSR) responsables de lograr la precipitación de metales en un sistema anaerobio

La reducción de sulfatos a sulfuros bajo condiciones de pH neutro ha sido estudiada por van Houten et al. (1994, 1995, 2006) y por Weijma et al. (2002). El potencial de recuperación de sulfuro metálico aumentaría porque los metales pueden precipitarse selectivamente y recuperarse como sulfuros metálicos variando el pH y la concentración de sulfuro (Huisman et al., 2006; Tabak et al., 2003). Otra ventaja de la reducción de sulfato en condiciones ácidas es el requerimiento reducido de un agente neutralizante para aumentar el pH de la corriente de desechos ácidos. Además, los sulfuros podrían recuperarse más fácilmente de la corriente de desechos ya que una mayor cantidad de sulfuros está en forma gaseosa (H_2S) a pH bajo y, en consecuencia, disminuye el costo de la conversión de sulfuro a azufre elemental por oxidación parcial con oxígeno (Buisman y Lettinga, 1990; Janssen et al., 1999).

Los microorganismos sulfato reductores (MSR) son estrictamente anaerobios obteniendo energía para su proliferación a través de la oxidación de sustratos orgánicos empleando a los sulfatos como aceptores de electrones y, como resultado de esto, los sulfatos se reducen a H_2S . Asimismo, emplean iones sulfato para oxidar los productos de la hidrólisis o acetogénesis. Son bacterias tanto heterotróficas, es decir, usando moléculas orgánicas de baja masa molar (como lactato, metanol, etanol, compuestos aromáticos, ácidos dicarboxílicos, etc.), como autotróficas, usando hidrógeno como donador de electrones y CO_2 como fuente de carbono (Poblete-Mier, 2015). Los microorganismos sulfato-reductores (MSR) son clasificados con base en su capacidad para degradar la materia orgánica de manera parcial o total. De acuerdo con esta propiedad pueden ser divididos en dos grupos principales (Nagpal et al., 2000; Visser, 1995).

- a) **Oxidantes incompletos** del sustrato, que generan acetato como producto final. Estos microorganismos utilizan lactato, piruvato, etanol y ciertos ácidos grasos

como fuente de carbono y energía para reducir el sulfato a sulfuro. Bajo condiciones ideales tienen una velocidad de reproducción mucho más rápida que los organismos oxidantes completos y pueden lograr tiempos de duplicación de 3 a 4 horas, si son alimentados con los sustratos que favorecen esta reacción como hidrógeno y lactato. El grupo está constituido por géneros como *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* y *Thermodesulfobacterium*.

- b) **Oxidantes completos** del sustrato a dióxido de carbono y sulfuro. Estos géneros utilizan ácidos grasos, especialmente acetato. Tienen un crecimiento, más bien proliferación o reproducción, muy lento, frecuentemente con tiempos de duplicación mayores a 20 horas. El grupo está compuesto por *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema* y *Desulfobacterium*.

Los microorganismos sulfato reductores de (MSR) facilitan la conversión de sulfato en sulfuro con los sulfuros reaccionando con metales pesados, ahora conocidos como elementos potencialmente tóxicos, para precipitarlos como sulfuros metálicos. Los MSR se desarrollan en entornos anaerobios en un intervalo de pH de 5 a 8. Estas condiciones son esenciales para la eliminación óptima de metales y sulfatos mediante *Bacillus subtilis* S-19, aislado e identificado en el laboratorio, para reducir la concentración de SO_4^{2-} en la solución de lixiviación en un 72% y el pH aumenta de 3.15 a 5.21 después de 21 días, reduciendo también la concentración de sales solubles en la solución de lixiviación (Zhu et al., 2020).

2.3.1. Mecanismos de precipitación de los metales disueltos como sulfuros metálicos en el agua proveniente de la operación unitaria de flotación para interpretar la eficiencia de remoción de los metales de interés de la mina cooperante en un sistema anaerobio mediante MSR

El potencial redox y el pH ácido determinan la forma en la que las especies metálicas se presentan. Por ejemplo, para los metales que se encuentran en fase iónica con un número de oxidación de 2^+ , el pH influye en gran medida en su comportamiento: El Cu

en la Figura 2.4 (Adroer et al., 2020), el Pb en la Figura 2.5 (Ortiz-Reyes, 2020), el Zn en la Figura 2.6 (Molina-Aguirre y Sandoval-Pauker, 2016) y el Fe en la Figura 2.7 (Adroer et al., 2020).

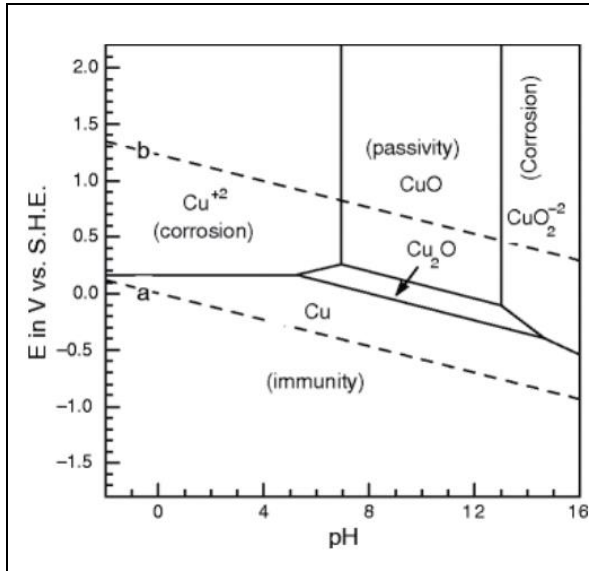


Figura 2.4. Diagrama Eh-pH del sistema Cu-H₂O (Adroer et al., 2020)

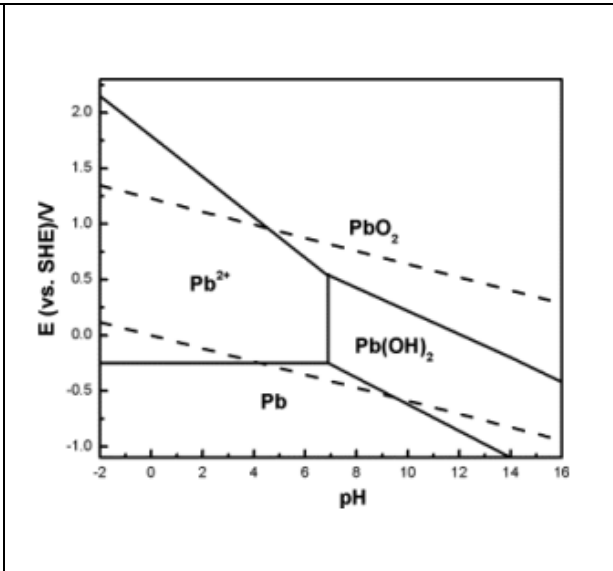


Figura 2.5. Diagrama Eh vs, pH del sistema Pb-H₂O (Ortiz-Reyes, 2020)

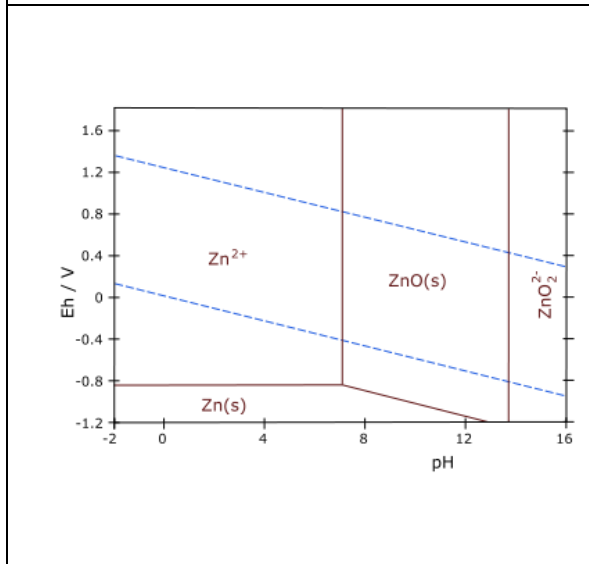


Fig. 2.6. Diagrama Eh vs. pH del sistema Zn-H₂O (Molina-Aguirre y Sandoval-Pauker, 2016)

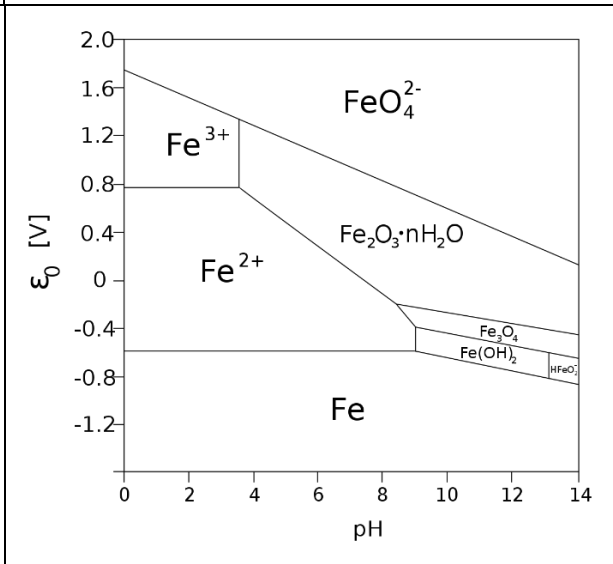


Fig. 2.7. Diagrama Eh vs. pH del sistema Fe-H₂O (Adroer et al., 2020)

Conforme se desplaza el pH hacia la derecha en los diagramas hasta llegar a valores de 6 o 7, aparecen en algunos casos los hidróxidos insolubles. Dichos compuestos precipitarán y darán paso a la posterior eliminación de los metales de la solución. Esto

ocurre en algunos casos durante todo el intervalo de pH hasta los valores de 6 y 7 siendo la especie dominante el ion 2^+ del metal correspondiente la que se uniría con el ion sulfuro para también precipitar y facilitar su eliminación. En la Tabla 2.5 se describen cuáles son las principales especies de microorganismos sulfato-reductores (MSR), más abundantes responsables de lograr la precipitación del metal de interés en un sistema anaerobio.

Tabla 2.5. Principales especies de microorganismos sulfato-reductores (MSR), responsables de la precipitación de metales como el Pb, Zn, Cu y Fe

Microrganismos Sulfato-reductores	Tipo de agua en tratamiento	Donador de electrones	pH	% de Metal precipitado	Referencias	
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> <i>Desulfovibrio sp</i>	Disolución metálica de cromo, níquel y zinc	Lactato de sodio	7.5	92.7 Zn (II) 93 Zn (II)	Cabrera-Revuelta, 2005	
<i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfobacter</i> , <i>Desulfotomaculum</i> , <i>Desulfobacterium</i> , <i>Desulfonema</i> , <i>Desulfococcus</i> , <i>Desulfosarcina</i>	DAM de la mina Bolívar en Bolivia	Ácidos grasos volátiles	7.9 - 8.1	100 Cu > 94 Zn > 92 Pb	Alvarez et al., 2007	
<i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfomicrobium</i> , <i>Desulfobacter</i> , <i>Desulfosarcina</i> , <i>Desulfotomaculum</i> , <i>Thermodesulfobacterium</i>	Disoluciones de $ZnCl_2$	Lactato de sodio	6.8	>95 Zn	Azabou et al., 2007	
<i>Desulfovibrio halophilus sp.</i>	Concentraciones diluidas de aguas residuales del primer lavado de algodón con adición de hierro	Lactato	>7.1	85.3 Fe	Torbaghan y Torghabeh, 2019	
<i>Delta-proteobacterias</i> (<i>Desulfovibrio spp.</i> and <i>Desulfomicrobium spp</i>)	DAM sintética	Etanol	6.84 - 7.48	> 99.2 Fe (II) > 93.3 Cu (II) 100 Zn (II)	Costa et al., 2017	
<i>Desulfovibrio</i> y <i>Desulfotomaculum</i>	Disoluciones de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Lactato	7.6	98-99 Cu	Luptakova y Kusnierova, 2005	
<i>Desulfobulbos</i>	Disolución de $CuSO_4$	Ácido succínico	7.0 – 7.5	36 Cu	Virpiranta a et al., 2022	
	Drenaje ácido de mina real (DAM)			98 Cu 59 Fe 84 Pb 14 Zn		Con adición de NaOH 100 Cu 97 Fe >99 Pb 99 Zn
	Agua contaminada con jarosita (JCW)			53 Cu 30 Fe >88 Pb 47 Zn		pH 7.00 ± 0.1 45 Cu 70 Fe >7 Pb 52 Zn
<i>Cultivos reductores de sulfato</i>	Aguas residuales sintéticas adicionada con SO_4^{2-} , Zn y Fe	Lactato	7.5 y 8.5	99.8 Zn 99.8 Fe	Kaksonen et al., 2003	

Microrganismos Sulfato-reductores	Tipo de agua en tratamiento	Donador de electrones	pH	% de Metal precipitado		Referencias
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> y <i>Desulfomicrobium baculatum</i>	Aguas sintéticas con metales pesados	Etanol	6-8	99 Cu 99 Fe 99 Zn		Sahinkaya et al., 2015
<i>Desulfobulbus</i> y <i>Desulfovibrio</i>	Medio sintético con bajo contenido de nutrientes, se añadió Fe (II) como FeSO ₄ ·7H ₂ O y cobre como CuSO ₄ ·5H ₂ O	Glicerol	7.9 – 5.8	Solo Fe 93.7	>80 Fe >88 Cu	Costa et al, 2021
		Lactato	8.0 – 8.5	>90 Fe y Cu		
		Sacarosa	7.3 - 3.2	Solo Fe 75.6	22.9 Fe 97.9 Cu	
		Glicerol + lactato +	7.5 -6.9	>90 Fe y Cu		
<i>Desulfovibrio</i>	Disoluciones a diferentes concentraciones de Cu, Cd, Ni, Fe, Pb y Zn	Lactato de sodio	7.0	98.9 Cu 94.6 Zn 94.4 Pb 93.9 Fe		Kiran et al., 2017

2.4. Metodologías utilizadas para la identificación de los MSR en un sistema anaerobio

2.4.1. Métodos fenotípicos

Tradicionalmente, la identificación de microorganismos se realiza utilizando pruebas fenotípicas convencionales. Estas son las más difundidas debido a sus costos. Sin embargo, debe reconocerse que las expresiones del fenotipo microbiano (tamaño, forma de las células, esporulación, composición celular, antigenicidad, actividad bioquímica y sensibilidad a los agentes antimicrobianos) dependen con frecuencia de los medios y las condiciones de crecimiento que se han utilizado. Además, las reacciones fenotípicas típicamente incorporan reacciones a diferentes productos químicos o diferentes marcadores bioquímicos. Estos utilizan determinaciones subjetivas y permiten identificar especies a nivel de género y en algunos casos de especie basados en un número pequeño de observaciones y pruebas. La dependencia de las reacciones bioquímicas y los patrones de utilización del carbono introduce desventajas en el logro de una identificación consistente (repetible y reproducible). Aunque las pruebas fenotípicas tradicionales son precisas para las bacterias más comunes, pueden fallar en algunas circunstancias (Lau, 2015; Sandle, 2016).

2.4.2. Medios de cultivo

Los microorganismos deben ser cultivados en medios de cultivo para caracterizar su crecimiento o reproducción, su identificación y determinar su actividad metabólica. El medio de cultivo es una solución acuosa de distintos compuestos que contiene todos los elementos esenciales que demandan los microorganismos para desarrollarse (Aquihuatl-Ramos y Pérez-Chabela, 2004). Los microorganismos anaerobios son muy sensibles al oxígeno, de forma que aislarlos es complicado y riguroso. Por esta razón se hace uso de un medio de cultivo general o enriquecido para que solamente los microorganismos capaces de aprovechar distintas fuentes de carbono o sustratos proliferen para aumentar la biomasa de los microorganismos. Una vez logrado se emplean medios de cultivo específicos y selectivos que contienen nutrientes específicos, sales y condiciones de pH o temperatura que disminuyen la complejidad de los microorganismos (Toscano-Pérez, 2012).

2.4.3. Métodos de contabilización

Existen distintos métodos para contabilizar microorganismos de acuerdo con los diferentes tipos de muestras, las cuales pueden dividirse en métodos directos e indirectos. Los métodos directos hacen un conteo total de microorganismos al considerar a los microorganismos viables como no viables al usar el microscopio. Por otra parte, se tienen los métodos indirectos entre los que se encuentran la técnica de recuento directo en placa o el número más probable (NMP) (Chacón-Garza, 2012).

2.4.3.1. Número más probable

También llamada técnica de dilución en tubo proporciona una estimación estadística de la densidad microbiana presente con base en la probabilidad de que obtener tubos con crecimiento positivo disminuye conforme es menor el volumen de muestra inoculado (DOF, 1994a). Esta técnica ha sido ampliamente usada para la cuantificación de bacterias sulfato reductoras (BSR) debido a su sencillez y su amplio campo de aplicación (Pérez et al., 2017; Shen y Voordouw, 2015; Zamora y Malaver, 2012).

2.4.3.2. Recuento directo en placa

Se utiliza para investigar el contenido de microorganismos viables en una muestra, la cual consiste en contar las colonias, que se desarrollan en el medio de elección después de un cierto tiempo y temperatura de incubación, presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio. El método admite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas contables, pero sujetas a la influencia de varios factores (DOF, 1994b). La demostración y la cuenta de microorganismos puede realizarse empleando medios de cultivo líquidos o sólidos con características selectivas o diferenciales (DOF, 1994c).

2.4.4. Microscopía

2.4.4.1. Microscopio óptico de campo claro

Este tipo de microscopio utiliza la luz visible para iluminar las estructuras celulares, las muestras se visualizan por las pequeñas diferencias de contraste que se da entre la muestra y el medio que la rodea debido a su capacidad de absorber o dispersar la luz en distinto grado. Con el uso de un tipo de tinción, el cual es un método fácil y rápido para mejorar el contraste, favorece la imagen final de la muestra. La tinción de Gram es el procedimiento más usado en la microbiología como primer paso para la caracterización de los microorganismos recién aislados, pues según sea el resultado las bacterias se pueden dividir en 2 tipos: Las Gram positivas las cuales se tiñen de color morado y las Gram negativas que se tiñen de color rosa (Madigan et al., 2015).

2.4.4.2. Microscopía electrónica de barrido

El microscopio electrónico de barrido (*SEM*, del inglés *Scanning Electron Microscopy*) utiliza electrones en lugar de fotones (luz visible) para generar las imágenes de la muestra, sus lentes son electromagnéticas y todo el equipo opera al vacío.

La muestra se cubre con una fina capa de un metal pesado, comúnmente oro, para después un haz de electrones barra una y otra vez la muestra. Los electrones se

desvían por la capa de metal y son recogidos para ser proyectados en un monitor para producir una imagen (Madigan et al., 2015). El resultado es una imagen tridimensional óptima de una célula (micrografía) con la posibilidad de obtener aumentos desde 15 hasta 100,000; sin embargo, solamente es posible observar la superficie del objeto y sus colores son en blanco y negro. Su uso permite la identificación y descripción estructural a nivel celular de los microorganismos (Li et al., 2022).

2.4.4.3. Microscopía confocal

En la microscopía confocal la luz de iluminación y la óptica de recolección de la luz se enfocan en el mismo punto limitado por la difracción de la muestra, es decir, ilumina solamente un punto de la muestra en el detector, en lugar de todo el campo de visión de la lente del objetivo. De esta manera, la muestra iluminada punto por punto no se ve afectada por las secciones que no están en el punto focal por lo que contribuyen muy poco a la sección enfocada, como resultado se tiene una imagen completa de buena calidad sin el problema de la luz desenfocada (Poot-Hernández y Rincón-Heredia, 2022).

En la microscopía con fluorescencia se visualizan muestras que emiten luz de un color diferente al de la luz que han absorbido (Madigan et al., 2015). Algunas células son autofluorescentes es decir contienen sustancias fluorescentes naturales como la clorofila, o bien fueron pigmentadas con un colorante fluorescente, donde Albarado-Y. y Flores-F. (2008), usaron fluoresceína de sodio y naranja de acridina para la diferenciación entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.

2.4.5. Métodos genotípicos

Las técnicas genotípicas estudian el genoma microbiano y, a diferencia de los métodos fenotípicos, no dependen del medio de aislamiento ni de las características de crecimiento del microorganismo. Estos métodos han mejorado considerablemente las bases de datos de diferentes tipos de microorganismos; han abierto un nuevo conjunto de especies y subespecies, así como su reclasificación. En bacterias, hay tres genes

que conforman la funcionalidad del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr). Estos son: 5S, 16S y 23S ARNr. De estos, el gen 16S ARNr se usa más comúnmente para identificar la especie lo que facilita la detección de especies relevantes en el entorno y el estudio de la biodiversidad en un ambiente particular. Los métodos genotípicos utilizan dos alternativas: Hibridación o secuenciación. En la hibridación se utiliza la homología de ADN-ADN (o qué tan bien se unen o hibridan dos hebras de ADN de diferentes bacterias) para determinar la relación de dos microorganismos. En la secuenciación, la razón de los métodos que examinan la región 16S ARNr del genoma es porque se encuentra presente en casi todas las bacterias, a menudo como una familia multigénica u operones; además, de que está altamente conservado, lo que quiere decir que su función a lo largo del tiempo no ha cambiado y también es lo suficientemente grande para fines informáticos (alrededor de 1500 bases) (Sandle, 2016). El proceso de análisis de secuenciación de ácidos nucleicos incluye extraer los ácidos nucleicos, amplificar un segmento del gen 16S ARNr mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), determinar la secuencia y llevar a cabo un análisis asistido por computadora. Esta última etapa implica utilizar programas que comparan y establecen la similitud de secuencias presentes en bases de datos con las secuencias halladas. La PCR es una técnica enzimática *in vitro*, que posibilita la replicación de secuencias específicas de ADN, permitiendo así analizar la composición de comunidades bacterianas mediante la detección y caracterización de secuencias de ácidos nucleicos bacterianos directamente extraídos de muestras ambientales (Ramírez-Gama et al., 2015).

Antes del desarrollo de la secuenciación, se utilizó *PCR-RFLP* (del inglés *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) del gen 16S ARNr para la identificación genética (Lau, 2015).

2.4.6. Métodos basados en proteómica

El número creciente de genomas secuenciados de microorganismos ha permitido la identificación de biomarcadores que pueden aplicarse como medidas indirectas de la

variación de la secuencia del genoma, así como en el desarrollo de técnicas para la caracterización microbiana. Los enfoques basados en proteínas son ejemplo de medidas indirectas de los datos de la secuencia del genoma y representan opciones interesantes a estos métodos (Karlsson et al., 2015).

La proteómica es la caracterización del proteoma, incluyendo expresión, estructura, funciones, interacciones y modificaciones de las proteínas en cualquier etapa. Es una metodología significativa para comprender la función de los genes, aunque es más compleja que la genómica (Aslam et al., 2017).

Es interdisciplinaria ya que es posible gracias a la integración coordinada de la secuenciación del genoma, la separación de proteínas (bioquímica de proteínas en general), la espectrometría de masas y la bioinformática (Brewis y Brennan, 2010). El proteoma es el total de proteínas correspondientes expresadas por el genoma, que refleja la presencia y actividad de todas las proteínas en una célula, tejido y organismo (Karlsson et al., 2015; Zhang et al., 2019).

2.4.7. Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz (*MALDI* en inglés)

Los avances en técnicas como la Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz (*MALDI*) y la Ionización por Electro-Spray (*ESI*), abren posibilidades en el uso de espectrometría de masas para el análisis de proteínas y péptidos. Las cepas estrechamente relacionadas poseen diferencias sutiles en sus genomas y, en consecuencia, en sus proteomas. Se pueden descubrir analizando solamente una parte del proteoma completo que, potencialmente, es expresado por el microorganismo. Por lo tanto, la detección y caracterización (es decir, en una base de datos) de todas las proteínas expresadas por un microorganismo dado es un objetivo final de los análisis proteómicos (Karlsson et al., 2015).

2.4.7.1. Espectrometría de masa de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF en inglés)

La espectrometría de masas se ha convertido en un método muy conocido para la identificación bacteriana (Karlsson et al., 2015; Sloan et al., 2017). *MALDI-TOF* es una técnica para la identificación rápida de microorganismos a bajo costo que implica la ionización de proteínas en una bacteria utilizando un rayo láser y midiendo el tiempo requerido para que cada una de las proteínas ionizadas se mueva en un campo eléctrico utilizando espectrometría de masas. El perfil resultante de la relación masa-carga de las proteínas ionizadas es específico de la especie bacteriana, por lo que es útil para su identificación (Lau et al., 2015). El uso de *MALDI-TOF* en la identificación de microorganismos se ha convertido en un procedimiento de rutina en laboratorios clínicos para reducir los tiempos de entrega, costos y el trabajo en general (Sloan et al., 2017). Se ha demostrado que su principal limitación es el contenido de la base de datos. Con una base de datos completa que cubra tanto las especies bacterianas endémicas en localidades particulares como el número suficiente de cepas para que cada especie controle la variación intraespecífica, podría ser un método eficiente, fácil y económico para la identificación de microorganismos (Appels et al., 2011; Lau et al., 2015).

Si bien se han mostrado técnicas avanzadas para la identificación de MSR a través de ADN, proteínas o el uso de equipos más complejos como el espectrómetro de masas, para esta investigación se hizo uso de técnicas sencillas y de bajo costo para la identificación de microorganismos como son el uso de medios de cultivo y la microscopía para corroborar lo señalado en la literatura con la tesis antecedente de esta (Álvarez-Márquez, 2022).

Con base en este marco teórico en el siguiente capítulo se presenta la metodología seguida en esta investigación experimental.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Agua de estudio procedente de una mina cooperante

Este efluente industrial del proceso de flotación de una mina cooperante, ubicada en el municipio de Zacazonapan, Estado de México, México, fue transportada en contenedores de 19 L de capacidad, desde la mina a los Laboratorios 301, 302 y 303 del Edificio E-3 de la Facultad de Química, sin refrigeración. Una vez en ellos se mantuvo a 4°C en un cuarto frío (Poblete-Mier, 2015). Este efluente posee propiedades fisicoquímicas que lo convierten en un agente muy contaminante para el ambiente. En la Tabla 3.1 se presentan las características de lo que constituye el influente del reactor en estudio.

Tabla 3.1. Datos de caracterización del agua proveniente de la operación unitaria de flotación (Rojas-Torreblanca, 2023)

Parámetro	AF	Parámetro	AF
pH	2.98±0.38	Fe [mg/L]	0.150±0.006
DQO [mg/L]	161±19	Zn [mg/L]	0.668±0.009
Sulfatos [mg/L]	937±159	Cu [mg/L]	0.129±0.004
Nitratos [mg/L]	8182±340	Pb [mg/L]	0.131±0.012
Sulfuros [mg/L]	4.19±1.31	ST [mg/L]	6750±367
Fosfatos [mg/L]	202±40	SVT [mg/L]	1140±155
COT [mg/L]	13.79±2.7	Relación DQO:Sulfatos	0.17

DQO: Demanda química de oxígeno; COT: Carbono orgánico total; ST: Sólidos totales; SVT: Sólidos volátiles totales, AF: Agua obtenida de la operación unitaria de flotación

La alimentación del reactor se realizó diariamente con una solución de 149 mL de agua recolectada en la operación unitaria de flotación en la mina cooperante, 1 mL de ácido láctico y 0.2 g de bicarbonato de sodio (Rojas-Torreblanca, 2023). La mezcla se calienta de la temperatura de refrigeración hasta 28°C y se dosifica en forma de lotes usando una bomba peristáltica marca ISMATEC, modelo ISM847B debido a que el flujo volumétrico es muy bajo, dadas las dimensiones del biorreactor de laboratorio y el tiempo de residencia hidráulica con el que opera, que es de 12.6 días (Quiahua-Salvador, 2023).

3.2. Reactor tipo RALLFA

El reactor empleado está construido de vidrio, con un volumen del sistema de 2.2 L y un volumen de trabajo de 1.9 L, tiene un diámetro externo de 120 mm y una altura de 300 mm (Figura 3.1). En la parte superior tiene un separador de fases líquido-sólido-gas (conocido coloquialmente como campana), que contribuye con la retención de los sólidos en el reactor, a la salida del efluente y a la salida del biogás por arriba. Tiene forma de embudo invertido. Los microorganismos usados para la inoculación provienen de un RALLFA que trata agua residual de la destilación de alcohol a partir de mieles incristalizables de caña de azúcar, conocidas como vinazas (Poblete-Mier, 2015). Está constituido de una zona de reacción en la parte inferior con una alta concentración de biomasa de alta sedimentación (Figura 3.2). Cuenta con recirculación interna de agua caliente para mantener la temperatura de operación de 28 a 30°C. Para minimizar pérdidas de calor del RALLFA al ambiente está enchaquetado con fibra de vidrio y recubierto con aluminio (Figura 3.3). Se utilizó un 1 mL de la capa de microorganismos (coloquialmente denominados lodos), que es la parte bioquímicamente activa del reactor para la inoculación de los diferentes medios de cultivo que se prepararon. La muestra se tomó del punto de muestreo 4 (Figura 3.1), se depositó en un vaso de precipitado estéril y se cubrió con papel aluminio para transportarlo a la cámara con atmósfera controlada.



Fig. 3.1. Reactor tipo RALLFA (Poblete-Mier, 2015)



Fig. 3.2. Inoculación del RALLFA (Poblete-Mier, 2015)

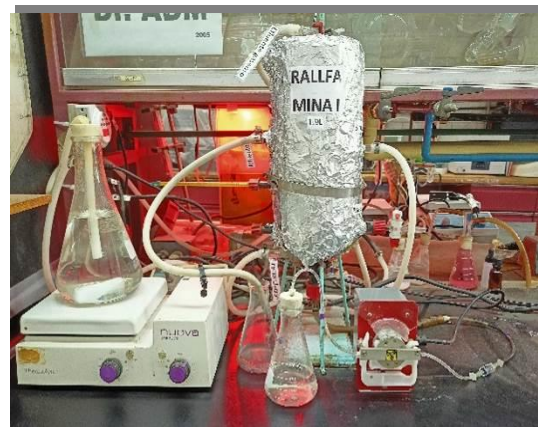


Fig. 3.3. RALLFA con enchaquetado de fibra de vidrio y recubierto con aluminio

3.3. Experimentación

El trabajo experimental que se llevó a cabo para alcanzar el objetivo propuesto se realizó al seguir el diagrama experimental de la Figura 3.4.

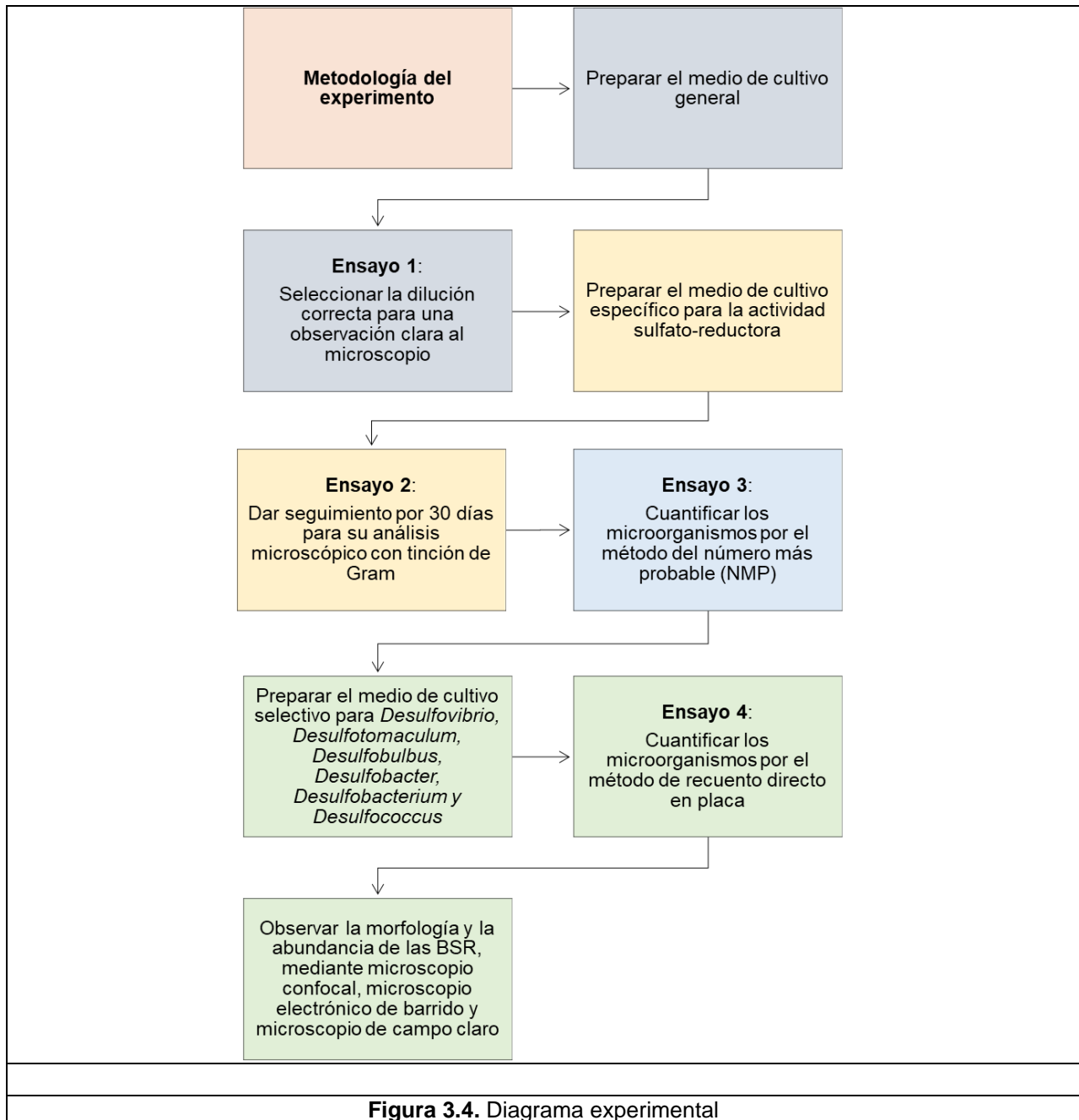


Figura 3.4. Diagrama experimental

3.4. Medios de cultivo

Cada uno de los procedimientos se realiza dentro de una cámara de atmósfera controlada #830-SERIES Compact Glove Boxes (Domestic & Export Models) Marca: PLAS LABS, INC., con atmósfera de N₂, para mantener las condiciones anóxicas (ver glosario donde se define la diferencia entre anóxico y anaerobio) (Figura 3.5). Además, cada medio de cultivo se prepara con agua anóxica la cual se obtiene al hervir agua desionizada dentro de la cámara de atmósfera de N₂, cubierta con papel aluminio previamente perforado con dos orificios permitiendo la entrada del gas dentro del recipiente y la salida del vapor.



Figura 3.5. Cámara de atmósfera controlada

3.4.1. Medio de cultivo general

En la Tabla 3.2 se encuentra la composición de las soluciones minerales 1, 2 y 3, así como la de oligoelementos y vitaminas, mismas que son preparadas con agua anóxica a temperatura ambiente dentro de la cámara de N₂.

Tabla 3.2. Composición de las soluciones individuales del medio de cultivo general (Vergara-Salgado, 2010)

Reactivos	Cantidad	Reactivos	Cantidad
Solución mineral 1		Solución mineral 3	
K ₂ HPO ₄	6 g	KCl	0.67 g
Agua destilada	1000 mL	MgCl ₂ .2H ₂ O	5.50 g
Solución mineral 2		MgSO ₄ .7H ₂ O	6.90 g
KH ₂ PO ₄	6.000 g	NH ₄ Cl	0.50 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.000 g	CaCl ₂ .2H ₂ O	0.28 g
NaCl	12.000 g	K ₂ HPO ₄	0.28 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.600 g	Agua destilada	1000.00 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.160 g	Solución oligoelementos	
Agua destilada	1000.000 mL	Ácido nitrilotriacético	1.500 g
Solución de vitaminas (Wolin's)		MgSO ₄ .7H ₂ O	3.000 g
Biotina	0.00200 g	MnSO ₄ .2H ₂ O	0.500 g
Ácido fólico	0.00200 g	NaCl	0.100 g
Piridoxina	0.01000 g	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.100 g
Tiamina	0.00500g	CoSO ₄ o CoCl ₂	0.100 g
Riboflavina	0.00500 g	CaCl ₂ .2H ₂ O	0.100 g
Ácido nicotínico	0.00500 g	ZnSO ₄	0.100 g
Pantotenato de calcio	0.00500 g	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.001 g
Vitamina B12	0.00001 g	AlK(SO ₄) ₂	0.010 g
Ácido paraaminobenzoico	0.00500 g	H ₃ BO ₃	0.010 g
Ácido lipoico	0.00500 g	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.010 g
Agua destilada	1000.00000 mL	Agua destilada	1000.000 mL

Se mezclan las cantidades mencionadas en la Tabla 3.3 de la solución mineral 1, 2, 3 y oligoelementos, agregando los demás nutrientes especiales para este medio a excepción de la solución de vitaminas. Esterilizar en la autoclave vertical, manual de 3 calores, fabricación nacional, modelo 210, por 20 minutos a 121°C y 1.55 kgf/cm².

Tabla 3.3. Composición del medio de cultivo general (Vergara-Salgado, 2010)

Medio de cultivo general para 1 L de volumen final			
Composición	Cantidad	Composición	Cantidad
Solución mineral 1	50.000 mL	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄).6H ₂ O	0.020 g
Solución mineral 2	50.000 mL	NaHCO ₃	7.500 g
Solución mineral 3	500.000 mL	Acetato de sodio	2.500 g
NaCl	18.000 g	Formiato de sodio	2.500 g
NH ₄ Cl	1.250 g	Extracto de levadura	2.000 g
Solución de oligoelementos	10.000 mL	Tripticasa	2.000 g
Solución de vitaminas	10.000 mL	Cisteína	0.600 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.002 g	Na ₂ S.9H ₂ O	0.600 g

La solución de vitaminas se esteriliza por filtración al vacío dentro de la cámara de atmósfera controlada con una unidad de filtración con soporte placa porosa de Pyrex Merck Millipore y con un filtro de membrana con tamaño de poro de 0.45 μm . Finalmente se mezcla con la disolución anterior esterilizada y se afora a 1 L con agua anóxica.

3.4.2. Medio de cultivo específico para la actividad sulfato-reductora

El medio de cultivo específico para los MSR se obtiene al mezclar las soluciones minerales 1, 2, las concentraciones de resazurina, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, cisteína, ácido bromoetano sulfónico y ácido láctico neutralizado en las cantidades presentas en la Tabla 3.4, se afora con agua anóxica hasta completar 1 L y por último se esteriliza por 20 minutos a 121°C y 1.55 kgf/cm^2 en la autoclave vertical de 3 calores.

Tabla 3.4. Composición del medio de cultivo específico (Vergara-Salgado, 2010)

Medio de cultivo específico para la actividad sulfato-reductora para 1 L de volumen final	
Composición	Cantidad
Solución mineral 1	50.0000 mL
Solución mineral 2	50.0000 mL
Resazurina (0.1%)	1.0000 mL
Solución $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2%)	0.5000 mL
Cisteína	0.5000 g
Ácido bromo etano sulfónico	0.0016 g
Solución de ácido láctico neutralizado	8.5000 mL

3.4.3. Medio de cultivo selectivo para cada una de las bacterias seleccionadas en esta investigación

La composición de las soluciones para preparar cada uno de los medios de cultivo se encuentra descrita en las Tablas 3.5, 3.6 y 3.7.

3.4.3.1. Medio 63: *Desulfovibrio* (Postgate)

Disolver los reactivos de la solución A, llevar a ebullición, después enfriar a temperatura ambiente en atmósfera de N_2 .

Tabla 3.5. Medios de cultivo selectivo para los géneros *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium* y *Desulfococcus* (Atlas, 2010; DSMZ, 2022)

Composición	194: <i>Desulfobulbus</i> sp	195: <i>Desulfobacter</i>	383: <i>Desulfobacterium</i>	2059: <i>Desulfococcus</i> <i>multivorans</i>
Solución A				
Na ₂ SO ₄	3.00 g	3.00 g	3.00 g	3.00 g
KH ₂ PO ₄	0.20 g	0.20 g	0.20 g	0.20 g
NH ₄ Cl	0.30 g	0.30 g	0.30 g	0.30 g
NaCl	1.00 g	21.00 g	21.00 g	7.00 g
MgCl ₂ .6 H ₂ O	0.40 g	3.00 g	3.00 g	1.30 g
KCl	0.50 g	0.50 g	0.50 g	0.50 g
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0.15 g	0.15 g	0.15 g	0.15 g
Solución traza de elementos SL-10	1.00 mL	1.00 mL	1.00 mL	1.00 mL
Solución selenito-Tungstato	1.00 mL	1.00 mL	1.00 mL	1.00 mL
Resazurina (0.1% w/v)	0.50 mL	0.50 mL	0.50 mL	0.50 mL
Agua destilada	942.00 mL	942.00 mL	942.00 mL	932.00 mL
Solución B				
Na ₂ CO ₃	1.50 g	1.50 g	1.00 g	1.50 g
Agua destilada	30.00 mL	30.00 mL	20.00 mL	30.00 mL
Solución C				
Propionato de sodio	1.50 g	-	-	-
Acetato de sodio.3 H ₂ O	-	2.50 g	-	-
Piruvato de sodio	-	-	2.50 g	-
Benzoato de sodio	-	-	-	0.60 g
Agua destilada	10.00 mL	10.00 mL	20.00 mL	20.00 mL
Solución D				
Solución de vitaminas	10.00 mL	10.00 mL	10.00 mL	10.00 mL
Solución E				
Na ₂ S.9 H ₂ O	0.40 g	0.40 g	0.40 g	0.40 g
Agua destilada	10.00 mL	10.00 mL	10.00 mL	10.00 mL

Tabla 3.6. Medios de cultivo selectivo para los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum* (Atlas, 2010; DSMZ, 2022)

Composición	63: <i>Desulfovibrio</i> (Postgate)	63a: <i>Desulfotomaculum</i>
Solución A		
K ₂ HPO ₄	0.50 g	0.50 g
NH ₄ Cl	1.00 g	1.00 g
Na ₂ SO ₄	1.00 g	1.00 g
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0.10 g	0.10 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	2.00 g	2.00 g
DL- Lactato de sodio	2.00 g	-

Composición	63: <i>Desulfovibrio</i> (Postgate)	63a: <i>Desulfotomaculum</i>
Solución A		
Acetato de sodio	-	2.00 g
Piruvato de sodio	-	5.00 g
Extracto de levadura	1.00 g	1.00 g
Resazurina (0.1% w/v)	0.50 g	0.50 g
Agua destilada	980.00 mL	980.00 mL
Solución B		
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0.50 g	0.50 g
Agua destilada	10.00 mL	10.00 mL
Solución C		
Tioglicolato de Sodio	0.10 g	0.10 g
Ácido ascórbico	0.10 g	0.10 g
Agua destilada	10.00 mL	10.00 mL

Tabla 3.7. Composición de las soluciones complementarias del medio de cultivo selectivo (Atlas, 2010; DSMZ, 2022)

Reactivos	Cantidad
Solución traza de elementos SL-10	
HCl (25%)	10.000 mL
FeCl ₂ .4 H ₂ O	1.500 g
ZnCl ₂	0.070 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0.100 g
H ₃ BO ₃	0.006 g
CoCl ₂ .6 H ₂ O	0.190 g
CuCl ₂ .2 H ₂ O	0.002 g
NiCl ₂ 6 H ₂ O	0.024 g
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0.036 g
Agua destilada	990.000 mL

Reactivos	Cantidad
Solución Selenito-tungstato	
NaOH	0.500 g
Na ₂ SeO ₃ .5 H ₂ O	0.003 g
Na ₂ WO ₄ .2 H ₂ O	0.004 g
Agua destilada	1000.000 mL

Adicionar las soluciones B y C, ajustando el pH a 7.8 con NaOH. Agitar constantemente el medio para mantener el precipitado gris suspendido. La mezcla se esteriliza en autoclave por 15 min y 121°C. Modificar el pH del medio en un intervalo de 6.8 – 7.0, si es necesario.

3.4.3.2. Medio 63a: *Desulfotomaculum*

Disolver los reactivos de la solución A, llevar a ebullición, después enfriar a temperatura ambiente. Adicionar las soluciones B y C, ajustar el pH a 7.8 con NaOH. Agitar de forma constante el medio para mantener el precipitado gris suspendido. El medio se esteriliza en autoclave por 15 min y a 121°C. Revisar el pH después de esterilizar y ajustar en un intervalo de 6.8 – 7.0 si es necesario. El procedimiento se realiza en una cámara de atmósfera controlada.

3.4.3.3. Medio 194: *Desulfobulbus sp. (Freshwater)*

El pH de la solución A se ajusta a un valor menor de 6 con una solución de NaHCO₃. La solución B, C y E se esterilizan por separado en una autoclave por 15 min y a 121°C. La solución D se esteriliza por filtración. Las soluciones B a E se agregan a la solución A esterilizada y a temperatura ambiente en las cantidades apropiadas y en la secuencia indicada. El pH final del medio debe encontrarse en un intervalo de 7.1 a 7.4. El procedimiento se realiza en la cámara de atmósfera controlada.

3.4.3.4. Medio 195: *Desulfobacter*

El procedimiento se lleva a cabo en una cámara de atmósfera controlada. La solución A se prepara ajustando el pH a un valor menor de 6 con NaHCO₃. Las soluciones B, C y E se preparan y esterilizan por separado en autoclave por 15 min y a 121°C. La solución D se esteriliza por filtración. Para completar apropiadamente el medio las soluciones B a E se añaden en las cantidades indicadas a temperatura ambiente a la solución A estéril. El pH final del medio debe encontrarse en un intervalo entre 7.1 – 7.4.

3.4.3.5. Medio 383: *Desulfobacterium*

La solución A se prepara ajustando el pH a un valor inferior de 6 con NaHCO₃. La solución B y E se preparan y esterilizan por separado en autoclave. La solución C y D se esterilizan por filtración. Las soluciones B a E se añaden en las cantidades y secuencia apropiadas a la solución A. El pH final del medio debe ser 7.0 – 7.2.

3.4.3.6. Medio 2059: *Desulfococcus multivorans*

La solución A se prepara ajustando el pH a un valor inferior a 6 con NaHCO₃. La solución B y E se preparan y esterilizan por separado en autoclave. La solución C y D se esterilizan por filtración. Las soluciones B a E se añaden en las cantidades y secuencia apropiadas a la solución A. El pH final del medio debe estar en un intervalo de 7.1 – 7.4.

3.5. Preparación de muestras para observar al microscopio

3.5.1. Microscopio electrónico de barrido (MEB) (Vergara-Salgado 2010, Toscano-Pérez 2012)

La preparación de muestras para el MEB debe cumplir el siguiente protocolo:

- a) De la colonia desarrollada en la caja Petri correspondiente al medio de cultivo selectivo, tomar una muestra con un asa bacteriológica esterilizada
- b) Depositar la muestra dentro de tubos Eppendorf de 1.5 mL
- c) Fijar la muestra con glutaraldehído al 3% durante una hora y al finalizar centrifugar por 10 min
- d) Lavar 3 veces con solución amortiguadora (*buffer* en inglés) de fosfatos, centrifugando entre cada lavado desechando el sobrenadante
- e) Adicionar etanol al 30% mezclar de manera uniforme, reposar 10 min y centrifugar por 10 min, desechar el sobrenadante y dejar el precipitado. Repetir 2 veces
- f) El procedimiento anterior se repite una vez con etanol al 50, al 70 y al 100%, esto último se repite 3 veces
- g) Dejar las muestras en alcohol al 100% y etiquetarlas con lápiz para posteriormente llevarlas a secado a punto crítico (Anexo I.2) en el Instituto de Biología de la UNAM
- h) Colocar las muestras en un frasco con gel de sílice para llevarlas a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII), fijar las muestras (Anexo I.3) y observarlas en MEB Marca: JEOL, Modelo: JSM-5900LV

3.5.2. Microscopio confocal (Toscano-Pérez 2012; Vergara-Salgado 2010)

- a) La observación en microscopio confocal se realiza a través de la tinción con fluoresceína de sodio para ello es necesario medir una masa de 12 mg y

disolverla en 12 mL de solución de fosfatos para luego guardarla en un frasco de color ámbar, refrigerarlo y protegerlo de la luz

- b) Utilizar un asa bacteriológica esterilizada para recolectar una muestra de la colonia de la caja Petri con medio de cultivo selectivo y depositarla en un tubo Eppendorf para cada bacteria
- c) Incorporar solución de fosfatos, mezclar la muestra uniformemente, reposar por 10 min y luego centrifugarla. Descartar el líquido sobrenadante y retener el precipitado que contiene los microorganismos
- d) Agregar 1 mL de la solución de fluoresceína preparada anteriormente en el tubo Eppendorf y agitar vigorosamente. Posteriormente incubar en un intervalo de temperatura de 28 a 30°C durante una hora, centrifugar y desechar el sobrenadante
- e) Repetir el inciso C cinco veces para obtener una pastilla de microorganismos (precipitado)
- f) Para su fijación al portaobjetos es necesario colocar entre 100-200 μ L del precipitado y distribuirlo de manera uniforme
- g) Cuando la muestra este completamente seca se agrega una gota de solución al 50% de glicerol y agua
- h) Envolverlas en papel aluminio y llevarlas a la USAII para el análisis estructural de las BSR a través del Microscopio Confocal Marca: OLYMPUS Modelo: FV1000. En el caso de que no se observen inmediatamente al microscopio guardar las muestras en el cuarto frío

3.5.3. Microscopio óptico de campo claro (Rodríguez-Mejía, 2012)

El procedimiento para la observación con tinción de Gram se describe a continuación:
Preparar los colorantes que se usan para la tinción de Gram (Anexo I.4)

- a) Tomar una muestra de los diferentes medios de cultivo por medio de un asa bacteriológica previamente esterilizada y hacer un frotis en un portaobjetos limpio y seco
- b) Fijar la muestra con la llama de un mechero Bunsen pasando el portaobjetos 3 veces y cuidando no exceder la temperatura para no quemar la muestra
- c) Agregar una gota de cristal violeta hasta cubrir el área de la muestra y dejar actuar durante 1 min
- d) Lavar la muestra con agua desionizada o destilada para eliminar el exceso de colorante
- e) Aplicar una gota de Lugol sobre la muestra por 1 min y repetir el inciso d.
- f) Decolorar con etanol durante 20 segundos o hasta que el colorante se haya retirado y repetir el inciso d
- g) Cubrir la preparación con safranina, esperar 1 minuto y lavar como se indica en el inciso d
- h) Inclinar el portaobjetos y dejar que la muestra se seque al aire libre
- i) Observar la muestra en el microscopio óptico de campo claro Velab VE-T50 con el objetivo de 40x
- j) Anotar las observaciones morfológicas y su clasificación por tinción de Gram

3.6. Diseño experimental

3.6.1. Ensayo 1: Selección de la dilución de trabajo

El procedimiento se realiza en la cámara de atmósfera controlada

- a. Tomar 1 mL de lodo del reactor tipo RALLFA colocarlo en un tubo de cultivo y completar con 9 mL de medio de cultivo general, realizar 7 diluciones sucesivas de: 10^{-1} a 10^{-7}
- b. Incubar en una estufa de cultivo Modelo: 9052, Marca: ECOSHEL, por 5 días a 30°C

- c. Después de transcurrir los 5 días, con un asa bacteriológica estéril recolectar una muestra y realizar un frotis sobre el portaobjetos correspondiente a cada dilución del medio de cultivo general
- d. Llevar a cabo una tinción de Gram como se indica en el punto 3.5.3.
- e. Observar las siete muestras al microscopio
- f. Identificar la dilución en la cual las bacterias estén separadas y presenten características físicas claramente definidas

Con los resultados obtenidos, se procede a realizar el segundo experimento.

3.6.2. Ensayo 2: Aislamiento e identificación de las características de proliferación (crecimiento) para las bacterias sulfato-reductoras

El experimento se realiza por triplicado, para facilitar el análisis y mejorar la estimación del error experimental y dentro de una cámara de atmósfera controlada bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 3.8 para aislar las MSR y estudiar sus características de crecimiento.

Tabla 3.8. Condiciones de experimentación del segundo ensayo

Factores	Medio de cultivo (A)	Temperatura (B)	Tiempo (C)
Características	Medio específico para MSR	30°C	30 días

- a. Preparar el medio de cultivo específico para las MSR como se indica en el punto 3.4.2.
- b. Colocar 1 mL del medio de cultivo general a la dilución seleccionada en 30 tubos de cultivo, adicionar 9 mL del medio de cultivo específico para las MSR, para dar un total de 90 tubos que se cierran herméticamente
- c. Los tubos se incuban por 30 días a 30°C. Diariamente se retiran tres tubos para aplica la tinción de Gram (punto 3.5.3.) en un portaobjetos rotulado apropiadamente. Este es observado en el microscopio a 40x

3.6.3. Ensayo 3: Cuantificación de las MSR por medio del método del NMP

El experimento se lleva a cabo bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 3.9 el cual se realizó con tres repeticiones para facilitar el análisis y mejorar la estimación del error experimental.

Tabla 3.9. Condiciones de experimentación del tercer ensayo

Factores	Tipo de Medio (A)	Temperatura (B)	Tiempo (C)	Dilución (D)
Características	Medio específico para MSR	30°C	30 días	15 diluciones

Para cuantificar las MSR presentes en el reactor se aplicó la técnica del NMP con el siguiente procedimiento:

- a. En la cámara de atmósfera controlada preparar el medio de cultivo específico como se indica en el punto 3.4.2.
- b. Sembrar 1 mL de lodos en un tubo de cultivo con medio de cultivo específico y por triplicado en 15 tubos de cultivo. Realizar las diluciones sucesivas con concentraciones de 10^{-1} a 10^{-15} , para dar un total de 45 tubos
- c. Incubar en una estufa de cultivo, por 30 días los tubos de cultivo cerrados herméticamente en un intervalo de temperatura de 28 a 30°C
- d. Contar los tubos que formaron un precipitado negro (tubo positivo) para cada dilución, comparar con la Tabla AI.1 del Anexo I, y obtener el valor del NMP por cada 100 mL.

3.6.4. Ensayo 4: Aislamiento e identificación de las bacterias sulfato-reductoras: *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium* y *Desulfococcus*

Para la determinación de los géneros de bacterias sulfato-reductoras *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium* y *Desulfococcus* se seleccionaron 3 factores: Tipo de medio selectivo (A), temperatura (B), tiempo (C). Una

vez seleccionados los factores el siguiente paso es determinar los niveles para cada uno de los factores, obteniendo los niveles que se muestran en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10. Condiciones experimentales del cuarto ensayo

Factores	Tipo de Medio selectivo (A)	Temperatura (B)	Tiempo (C)
Niveles	<i>Desulfovibrio</i>	30°C	30 días
	<i>Desulfotomaculum</i>		
	<i>Desulfobulbus</i>		
	<i>Desulfobacter</i>		
	<i>Desulfobacterium</i>		
	<i>Desulfococcus</i>		

3.6.4.1. Preparación del inóculo para el sembrado en caja Petri

- a. Preparar 50 mL de medio de cultivo general como se indica en el punto 3.4.1.
- b. Colocar 9 mL de este medio en 3 tubos de cultivo de 10 mL y sembrar 1 mL del lodo en un tubo de cultivo, realizar 2 diluciones con concentraciones: 10^{-1} , 10^{-2} , cerrar herméticamente los tubos e incubar por 5 días a 28°C
- c. Preparar 100 mL del medio de cultivo específico como se indica en el punto 3.4.2.
- d. Tomar 90 mL de este medio y se complementa con los 10 mL del medio de cultivo general con una concentración de 10^{-2} que se incubó, para tener un volumen final de 100 mL. Cerrar herméticamente e incubar por 30 días.

3.6.4.2. Método de cuantificación: Recuento directo en placa

La técnica de recuento directo en placa se llevó a cabo para la cuantificación de los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium* y *Desulfococcus* con el procedimiento que a continuación se describe:

- a) Preparar los medios de cultivo selectivo para las BSR como se indica en el punto 3.4.3.

- b) Disolver 25 g del agar bacteriológico general BD BIOXON en 1 L de agua desionizada con agitación constante y llevar a ebullición de 1 a 2 min, posteriormente esterilizar a 120°C durante 15 minutos
- c) En la cámara de atmósfera controlada mezclar el agar y el medio de cultivo selectivo en una relación de 50/50, en una parrilla con agitación constante para conservar una temperatura de al menos 40°C
- d) Tomar 0.1 mL del inóculo del punto 3.6.4.1. y colocar en las cajas Petri estériles de 100 x 15 mm (Vertido en Placa)
- e) Vaciar la mezcla de agar/medio de cultivo selectivo en dichas cajas Petri y homogenizar. El procedimiento se hace por triplicado y por los 30 días de estudio. Dando un total de 90 cajas Petri para cada medio de cultivo selectivo
- f) Vaciar en una caja Petri la mezcla agar/medio para preparar un blanco
- g) Sellar perfectamente e incubar en un intervalo de 28 a 30°C. Cada día retirar 3 cajas Petri de cada medio de cultivo selectivo y contabilizar las colonias que se formaron
- h) Para asegurar un conteo directo (confiable) el número de colonias debe encontrarse en un intervalo de 30 a 300 (Aquiahuatl-Ramos y Pérez-Chabela, 2004), en caso contrario, el valor será estimado al contar las colonias en un área de 1 cm² y multiplicar por el área total de la caja
- i) En el día 30 se seleccionan 3 colonias de cada medio de cultivo selectivo, cada una de ellas se aislará y se tratará como se indica en el punto 3.5. para su observación en los distintos tipos de microscopio.

3.6.4.3. Cinética de crecimiento exponencial para el medio de cultivo selectivo

Después de contabilizar las colonias como se indica en el punto 3.5.2, anotar el número de colonias que se formaron cada día y sustituir en la ecuación (3.1).

$$\text{Número de bacterias (Bacterias/mL)} = \text{Número de colonias} \times \text{Concentración del medio específico} \quad (\text{Ec. 3.1})$$

Para cada uno de los géneros se aplica la ecuación 3.1 y con el número de bacterias se obtiene el tiempo de generación de un cultivo que crece de forma exponencial (A1.5) mediante las ecuaciones A1.3 y A1.4.

Los resultados obtenidos a partir de la metodología planteada en este capítulo, así como su discusión se muestran a continuación.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Ensayo 1: Medio de cultivo general, selección de la dilución correcta

Los tubos de cultivo inoculados con el lodo del reactor tipo RALLFA presentan una turbidez similar debido a su composición del medio de cultivo general, una cantidad de sedimento abundante, así como una tonalidad verde. Solamente el tubo con la dilución 0 es más oscuro. Las diluciones 0, 4 y 5 presentaron formación de biopelícula (Figura 4.1).

De las diluciones preparadas se observó que la concentración 10^{-1} no es la ideal debido a que se observan estructuras agrupadas, no definidas y algunos cristales no disueltos de los colorantes (Figura 4.2). La concentración 10^{-2} resultó ser la adecuada, ya que permitió visualizar claramente las estructuras morfológicas de los microorganismos con sus características distintivas, sin agrupamientos y con una cantidad adecuada para su identificación fenotípica (Figura 4.3). En contraste a lo observado en la concentración 10^{-3} (Figura 4.4) donde el desarrollo es insuficiente.



Figura 4.1. Tubos de cultivo



Figura 4.2. Dilución 10^{-1}

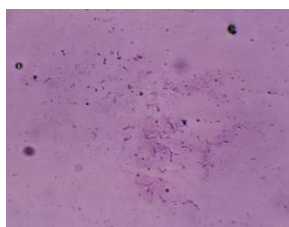


Figura 4.3. Dilución 10^{-2}

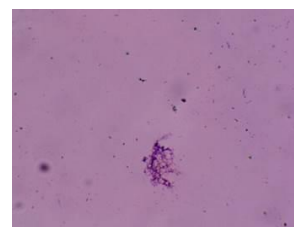


Figura 4.4. Dilución 10^{-3}

Después de realizar la tinción de Gram, se observaron al microscopio con el objetivo de 40x microorganismos en las diluciones 1, 2 y 3 donde se determinó una tendencia en la disminución de la densidad de microorganismos, lo mismo ocurrió con las diluciones 6 y 7, donde se observan bacterias muy aisladas, por lo que se descartaron de manera

inmediata. Sin embargo, las diluciones 4 y 5 al tener una biopelícula se tomó una parte de ella con el asa al fijar la muestra y por ende un incremento en los microorganismos observados.

Las características detalladas durante los 5 días de incubación se presentan en la Tabla All.1 del Anexo All.

El medio de cultivo general permite el desarrollo de una gran variedad de microorganismos (Rodríguez-Martínez y Zhurbenko, 2018) dentro de los cuales crecieron y proliferaron distintas especies dentro de ellos los MSR. Las características morfológicas observadas presentan propiedades descritas por Madigan et al. (2015): Bacilos cortos y gruesos, Gram positivos, bacilos largos y delgados Gram negativos y bacterias gemantes (hifas) Gram positivas. A pesar de que los microorganismos anaerobios en general tienen un desarrollo lento en comparación con las bacterias aerobias (Alcalá et al., 2004) se presume que las MSR se desarrollaron favorablemente por las condiciones de temperatura, pH y atmósfera de N₂.

4.2. Ensayo 2: Medio de cultivo específico para la actividad sulfato-reductora

Con la concentración de 10⁻² seleccionada en el primer ensayo, se realizó la siembra en el medio específico para microorganismos sulfato reductores para aislarlas de los demás microorganismos presentes en los lodos del reactor. Durante la incubación por 30 días se confirmó la presencia y proliferación de los microorganismos de interés. La observación diaria de los tubos de cultivo presentó una progresiva coloración oscura, formación de biopelícula de gran espesor, algunos con una coloración negra, la parte intermedia del medio presenta menor turbidez y en el fondo aumenta la turbidez y una tonalidad gris-negra (Figura 4.5). Esto se debe a que los MSR presentes llevan a cabo la reducción del sulfato que se encuentra en el medio transformándolo a sulfuro (perceptible por su olor azufrado) dando paso al precipitado negro de sulfuro de hierro, FeS (Zamora y Malaver, 2012). En algunos casos, se ha observado que los BSR tienen

la capacidad de formar biopelículas, lo cual contribuye al proceso de captura de nutrientes y mantienen condiciones químicas que ayudan a proteger poblaciones específicas que de otro modo no proliferarían (Atlas y Bartha, 2002; Wargin et al., 2007).



Figura 4.5. Tubos con medio de cultivo específico en el día 30

Con la técnica de la tinción de Gram y su observación al microscopio se presentan las siguientes características generales (Figuras 4.6 y 4.7):

- ✓ Bacilos con distinto grosor y tamaño donde los más amplios se encuentran en mayor cantidad, en su mayoría Gram positivos, pero también se encuentran Gram negativos
- ✓ Formación de agrupaciones como diplobacilos, estreptobacilos y empalizados
- ✓ Cocos en su mayoría Gram negativos y Gram positivos
- ✓ Formación de asociaciones de diplococos y estreptococos
- ✓ En menor medida bacterias gemantes (hifas)

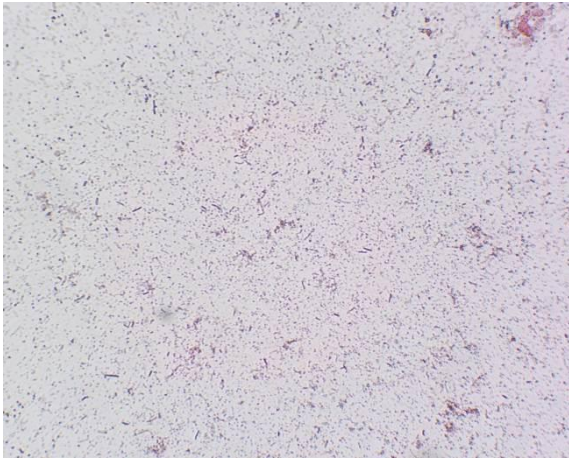


Figura 4.6. Microorganismos observados en el medio de cultivo específico con el objetivo de 40x en el día 30

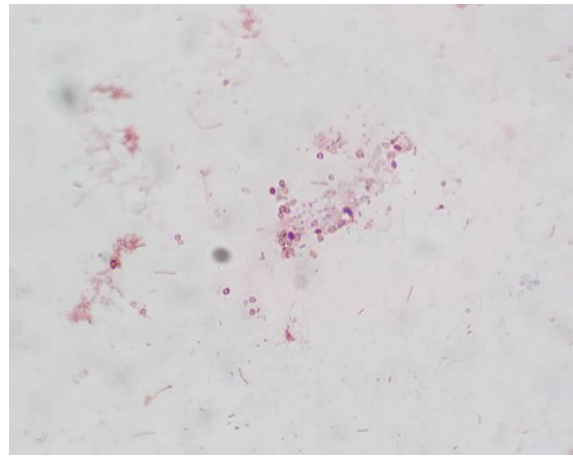


Figura 4.7. Microorganismos observados en el medio de cultivo específico con el objetivo de 100x en el día 30

El periodo entre el día doce y día quince se observó un notable incremento en la carga microbiana y para el día 30, la concentración y la diversidad de microorganismos en el medio de cultivo ascendieron hasta su punto máximo.

El medio de cultivo específico para MSR es óptimo para su desarrollo y proliferación (Espinosa-González, 2014; Rodríguez-Gómez, 1999), presentando distintas características que coinciden con la descripción hecha por Gaylarde y Cook (1990) y por Kushkevych et al. (2021).

Las características a detalle durante los 30 días se presentan en la Tabla AII.2. El medio de crecimiento o desarrollo específico para bacterias sulfato-reductoras contiene un ambiente anaerobio, pH entre 7.1 y 7.3, la presencia de un sustrato como el lactato (donador de electrones), sulfato (aceptor de electrones) y un soporte físico para su crecimiento, estos componentes además de su incubación a 30°C promueven su crecimiento e inhiben otros tipos de microorganismos (Flor-Cevallos, 2012).

4.3. Ensayo 3: Cuantificación de los MSR por el método del NMP

Posteriormente de la incubación por 30 días se observaron las características macroscópicas que se formaron en los tubos de cultivo.

Como ya se había observado en el experimento 2, los tubos de cultivo presentaron un precipitado negro, identificándose como tubos positivos, debido a la formación de FeS, y negativos a los que no contienen precipitado, en algunos casos los tubos negativos eran transparentes en los tubos de cultivo con mayor dilución y en otros casos tenían un color amarillo-anaranjado en el fondo del tubo (Figura 4.8).



Figura 4.8. Tubos con reacción negativa y positiva

En la Tabla 4.1 se muestran los resultados de la prueba de NMP para cada una de las diluciones de trabajo realizadas por triplicado al día 30 de experimentación (Figura 4.9). En la Tabla AII.3, se describen los cambios observados en los tubos diariamente. Se cuantificaron los tubos positivos y se compararon con la Tabla AI.1 estadística del NMP (DOF, 2015). También se tiene la Tabla AII.4 con la cuantificación completa de la prueba.

Tabla 4.1. Número más probable: Resultados de los tubos positivos y negativos

Dilución	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
Número de tubos positivos	3	3	3	3	3	1	2	1
Dilución	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²	10 ⁻¹³	10 ⁻¹⁴	10 ⁻¹⁵	
Número de tubos positivos	1	3	0	0	1	1	1	

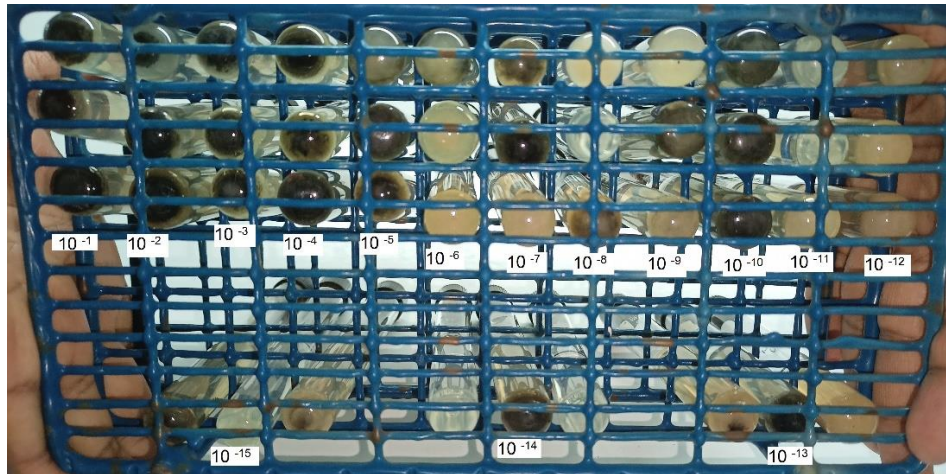


Figura 4.9. Tubos de cultivo con medio específico: Respuesta positiva para la prueba de NMP

Sin embargo, como las diluciones de trabajo son diferentes a las establecidas en las Tabla A1.1, se aplica la siguiente ecuación:

$$\frac{NMP}{100 \text{ mL}} = \frac{10}{V} \times F \left(\frac{NMP}{100 \text{ mL}} \right) \quad (\text{Ec. 4.1})$$

donde:

F = Valor de tablas NMP / 100 mL (DOF, 2015), este se obtendrá de la combinación de tubos positivos y negativos dado el caso en el que más de una dilución muestra 3 tubos positivos y la última da menos de 3, se elige esta última y las dos diluciones anteriores más bajas (Tabla 4.1)

V = Volumen mayor de muestra, para este caso es 10^{-4}

10 = Factor de dilución

Como resultado se obtiene la Tabla 4.2 la cual representa la cantidad de MSR a 30°C presentes en cada 100 mL de lodo del reactor.

Tabla 4.2. Estimación de la concentración de MSR presentes en el lodo

NMP para la combinación (3,3,1)	460 bacterias/100 mL
Ajuste por la dilución	46,000,000 bacterias/100 mL

Al contrastar los resultados observados con las Tablas A1.1, la prueba NMP proporciona una estimación de la concentración de microorganismos presentes en el lodo del reactor, sin embargo, es importante recalcar que como se mencionó en el Capítulo II al ser una estimación no ofrece un recuento exacto de microorganismos (DOF, 1994a) ya que el valor de NMP / 100 mL mostrado en la Tabla 4.2 se podría encontrar en un intervalo de 71 a 2400 debido a su límite de confianza.

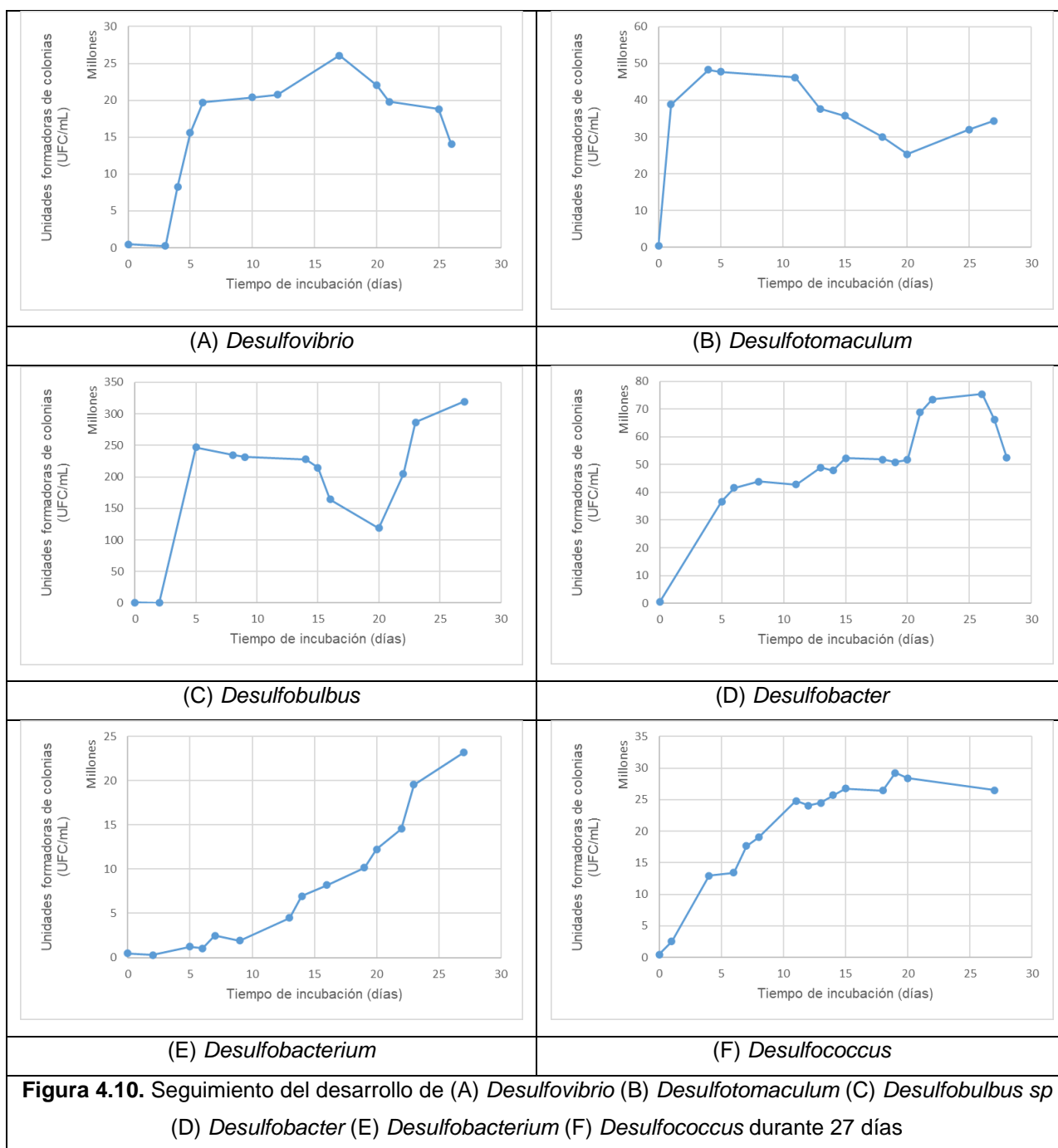
4.4. Ensayo 4: Identificación de bacterias sulfato-reductoras a través de medios de cultivo selectivos

4.4.1. Recuento directo en placa para el medio de cultivo selectivo

El conteo de las colonias en las cajas Petri se llevó a cabo diariamente. El blanco para todos los casos resultó sin contaminación, por lo que se asegura que la preparación de los medios de cultivo y las condiciones de trabajo fueron llevadas a cabo de manera correcta. El conteo directo se hizo para los medios 63a: *Desulfotomaculum* (Tabla AII.5), 195: *Desulfobacter* (Tabla AII.6), 383: *Desulfobacterium* (Tabla AII.7), 2059: *Desulfococcus multivorans* (Tabla AII.8), 63: *Desulfovibrio* (Tabla AII.9), no obstante, el conteo para los medios 63a y 195 se salió del intervalo recomendado. Por otro lado, el conteo para el medio 194: *Desulfobulbus sp* (Tabla AII.10) se hizo por aproximación, el cual tuvo un mayor desarrollo de colonias.

Se calculó la concentración de bacterias presentes de cada género en la muestra de 1 mL de lodo que se tomó del reactor utilizando el promedio de colonias formadas para cada día y aplicando el factor de dilución correspondiente (10^{-4}). Esta concentración se expresó en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) de bacterias anaerobias correspondientes a cada medio de cultivo selectivo incubadas 27 días a 30°C.

La Figura 4.10 muestra el comportamiento de crecimiento en placa de cada género de BSR seleccionadas.



Las características de crecimiento para cada género son las siguientes:

- a. La curva de crecimiento durante 27 días que se obtiene para el género *Desulfovibrio* muestra su máxima concentración en el día 17, para después

decaer hasta el final del estudio. Estudios realizados por Fu et al. (2023) y Xu et al. (2020) reportaron que el crecimiento o desarrollo durante 14 días de los microorganismos *Desulfovibrio desulfuricans* y *Desulfovibrio ferrophilus* muestran su punto máximo en el día 5 y en el día 3, respectivamente. Esto demuestra que la experimentación depende de la especie a estudiar y las condiciones en las cuales se llevó a cabo. Cabe destacar que en la gráfica se observa el mayor desarrollo de colonias hasta el día 5 y, si bien se siguen formando más colonias, el incremento no es tan pronunciado. Machaca et al. (2022) mencionan que son microorganismos que crecen lentamente, tardando entre 4 y 7 días en dar colonias visibles en cultivos

- b. Para el género *Desulfotomaculum* alcanza su mayor concentración en los primeros 4 días de incubación para disminuir hasta el día 20; sin embargo, se comienza a desarrollar otro tipo de colonia de este género, al aumentar nuevamente su concentración. Estudios realizados por Hippe et al. (1997) para la especie *Desulfotomaculum aeronauticum* mostraron que su curva de crecimiento alcanzó su máximo desarrollo en el día 4 y, por otro lado, Chockalingam et al. (2005) obtuvieron una curva de crecimiento para la especie *Desulfotomaculum nigrificans*, donde alcanzaron su máximo en el día 20. Las investigaciones reportadas demuestran que cada especie tendrá diferentes tiempos de reproducción y, en el caso de este estudio, la curva contiene al menos dos especies, que aprovechan desfasadamente los recursos del medio de cultivo
- c. El género *Desulfobulbus* tiene un punto máximo en el día 5 y de igual forma que el género anterior disminuye su concentración hasta día 20 y vuelven a desarrollarse un segundo tipo de colonia para continuar su desarrollo hasta el último día de estudio. Investigaciones realizadas por Bak y Pfennig (1991), estimaron que las colonias continuaron incrementando después de 4 semanas en el medio y otra investigación hecha por Zellner et al. (1996) confirmó la proliferación de este género de bacterias pasados 20 días sin mostrar un decaimiento. Samain et al. (1984) presentaron una curva de crecimiento para la especie *Desulfobulbus elongatus* donde su máximo crecimiento es en el día 4. Es por ello por lo que dado el comportamiento en la gráfica se presume que se

tienen dos tipos de especies siendo necesario proporcionar un tiempo de incubación superior a 27 días que, por cierto, fue el establecido en esta investigación

- d. En el caso del género *Desulfobacter* tiene un desarrollo más lento con respecto a los géneros anteriores alcanzando su punto más alto al día 26, para después disminuir la formación de colonias. Un estudio realizado por Brandt e Ingvorsen (1997) explicó también que para especies de *Desulfobacter halotolerans sp.*, se empezó a observar el crecimiento después de 26 días
- e. El género *Desulfobacterium* no parece alcanzar un punto máximo, ya que debido a su comportamiento el último día de estudio es su concentración más elevada, Brysch et al. (1987) presentaron una curva de crecimiento para la especie *Desulfobacterium autotrophicum* en la cual el crecimiento continuo después de 80 h de incubación. Por otro lado, Heijthuisen y Hansen (1989) estudiaron una cepa de esta bacteria, exponiendo que su crecimiento comienza a descender después de 8 días de incubación. Ambas investigaciones contrastaron negativamente el comportamiento de la gráfica para este género; sin embargo, esto se puede deber a la técnica que se usó para generar la curva de crecimiento la cual para ambos estudios es con espectrofotometría
- f. La curva para el género *Desulfococcus* alcanza su punto de inflexión en el día 19 y posteriormente desciende. Este comportamiento es similar al estudio realizado por Janssen y Schnik (1995) para la especie *Desulfococcus biacutus* donde, dependiendo del sustrato, acetona o 3-hidroxibutirato, su punto máximo de crecimiento fue en los días 28 y 20, respectivamente.

El comportamiento de las curvas en escala aritmética describe las distintas etapas de desarrollo microbiano. Los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfobulbus* presentan etapa de latencia en los días 3 y 2, respectivamente, periodo donde estas bacterias se adaptan al nuevo medio de cultivo, los demás géneros no tienen esta etapa por encontrarse ya en la fase exponencial y su reproducción se da a la misma velocidad (Madigan et al., 2015). La fase estacionaria, etapa en la cual el crecimiento es mínimo o cesa, para el género *Desulfovibrio* se da entre los días 6 a 21, *Desulfotomaculum* entre los días 4 a

11, *Desulfobulbus* del día 5 al 15, *Desulfobacter* y *Desulfococcus* antes de alcanzar su máximo crecimiento tienen esta fase del día 13 al 20 y del día 11 al 18, respectivamente y, luego de su máximo, no presentan fase estacionaria a menos que esta solamente fuera de algunas horas. Finalmente, solamente los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfobacter* y *Desulfococcus* presentan una disminución en el conteo de colonias en los últimos días de incubación. Sin embargo, no se asegura que corresponda a la fase de muerte debido a las condiciones del experimento ya que las colonias formadas no desaparecen, solamente pierden humedad, afectando así el conteo de las colonias para que este número se reduzca, por lo que la técnica de conteo directo en placa no es óptima para establecer una curva de crecimiento con sus distintas fases. En el día 30 se caracterizaron las colonias que se apreciaban a simple vista formadas en cada medio de cultivo selectivo utilizando un microscopio estereoscópico Olympus SD-ILK (Olympus Optical Co. LTD, Japón).

4.4.1.1. Medio 63: *Desulfovibrio*

Las cajas Petri para este medio desarrollaron colonias suspendidas y superficiales. Las primeras crecieron dentro del agar, se distribuyeron en toda la caja, algunas se empalmaron o se ubicaron muy cerca unas de otras y fueron las que se encontraron en mayor proporción (Figura 4.11). Las segundas presentaron una coloración negra en su borde. La morfología colonial se describe a continuación:

a) **Colonias superficiales:** Color blanco (no pigmentadas), con brillo, de 2 mm de tamaño, forma irregular, borde entero, opacas, textura lisa, brillante, elevadas y de consistencia húmeda (suave) (Figura 4.12)

b) **Colonias suspendidas:** Presentan una forma filamentosa, bordes filamentosos, su tamaño va de puntiformes a ser casi imperceptibles a simple vista, textura rugosa y sin pigmentación (Figura 4.13)

Predari et al. (2017) y Machaca et al. (2022) obtuvieron colonias pequeñas de 0.5-1 mm de diámetro, redondas, transparentes, de bordes lisos, brillantes y chatas.

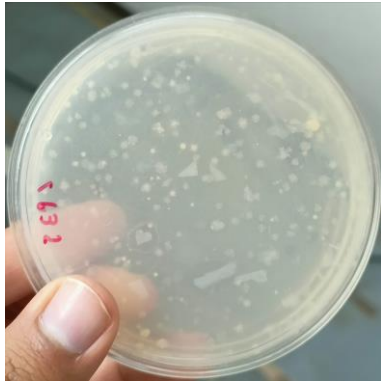


Figura 4.11. Caja Petri del medio 63: *Desulfovibrio*

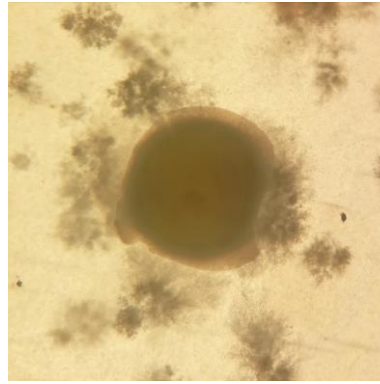


Figura 4.12. *Desulfovibrio* ejemplo de colonia superficial

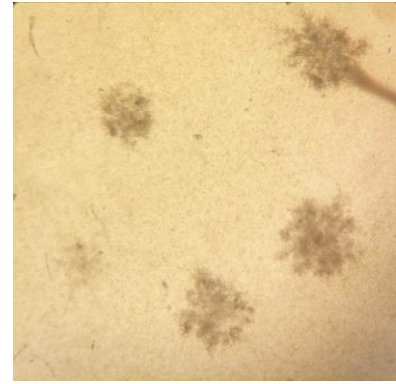


Figura 4.13. *Desulfovibrio* ejemplo de colonia suspendida

4.4.1.2. Medio 63a: *Desulfotomaculum*

Estos microorganismos desarrollaron colonias superficiales en el exterior del agar sin forma definida y con una extensión que cubrió gran parte de la caja Petri (Figura 4.14). Por otro lado, también se formaron colonias suspendidas en el agar donde se apreciaron dos tipos de morfología como se describe a continuación:

- a) **Colonias tipo A:** Color blanco, de forma punteada, borde liso, consistencia húmeda, sin brillo, textura lisa (Figura 4.15)
- b) **Colonias tipo B:** Tamaño más grande que el tipo A, rugosas, forma irregular, borde ondulado, transparente, no pigmentada, convexa (Figura 4.16)

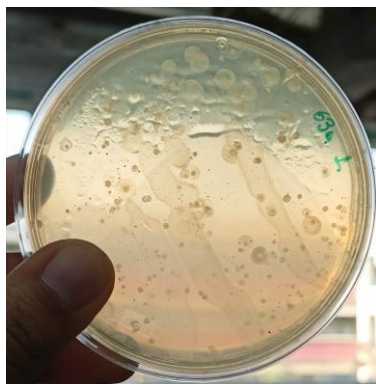


Figura 4.14. Caja Petri del medio 63a: *Desulfotomaculum*

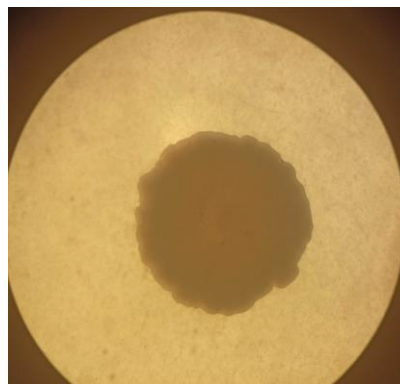


Figura 4.15. *Desulfotomaculum* ejemplo de colonia A

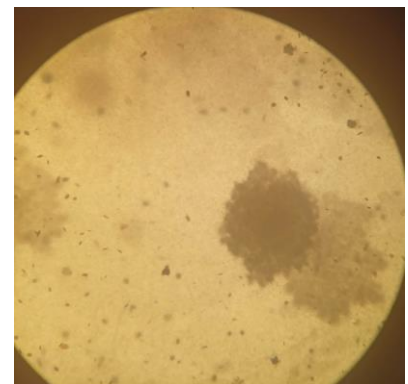


Figura 4.16. *Desulfotomaculum* ejemplo de colonia B

Watanabe et al. (2020) describieron que las colonias formadas en lo profundo del agar eran de color negro; sin embargo, esta característica no se mostró en las colonias descritas, pero se podría asociar a alguna especie en específico.

4.4.1.3. Medio 194: *Desulfobulbus sp*

Las colonias presentes en este medio se encontraron en gran cantidad dentro del agar y algunas de ellas proliferaron en la superficie (Figura 4.17). La descripción morfológica de las colonias dentro del agar es la siguiente:

- a) **Colonias tipo A:** Tamaño puntiforme, con una tonalidad amarilla, de aparente forma circular, borde liso, elevación convexa, de consistencia húmeda, lisa y brillante. Se encontraron también en la superficie, pero en menor medida (Figura 4.18)
- b) **Colonias tipo B:** Tamaño pequeño de alrededor de 1 mm, su abundancia fue menor y se localizaron en el fondo de la caja Petri, de color blanco, forma circular, de borde entero, plana, lisa, sin brillo y de consistencia dura (Figura 4.19)



Figura 4.17. Caja Petri del medio 194: *Desulfobulbus sp.*

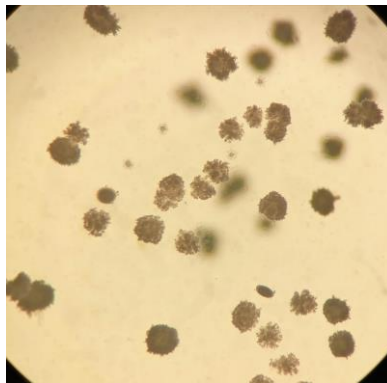


Figura 4.18. *Desulfobulbus sp.* ejemplo de Colonia A

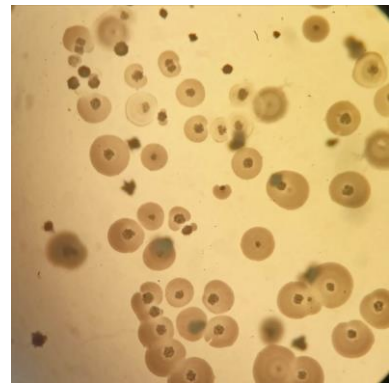


Figura 4.19. *Desulfobulbus sp.* ejemplo de Colonia B

Galushko y Kuever (2019) explican que las colonias de la especie *Desulfobulbus propionicus* en medio de agar anaerobio son de blanquecinas a grisáceas y lisas.

4.4.1.4. Medio 195: *Desulfobacter*

Este tipo de microorganismos formó colonias suspendidas en el agar y en la superficie, su disposición se dio en toda la caja Petri, aunque algunas de ellas se empalmaron al

crecer (Figura 4.20). Se expone la morfología colonial para aquellas desarrolladas en el agar.

- a) **Colonias tipo A:** Presentes en mayor abundancia, eran puntiformes, sin color (blanco), filamentosas, opacas (sin transparencia), brillantes, lisas, elevadas y de consistencia húmeda (Figura 4.21), eran de este tipo las que también se desarrollaron en la superficie
- b) **Colonias tipo B:** Se exhibieron en menor abundancia, sin color, transparentes, su tamaño iba de grandes (3mm) a pequeñas, de forma filamentososa, con borde filamentososo, sin brillo, de textura rugosa y plana (Figura 4.22)

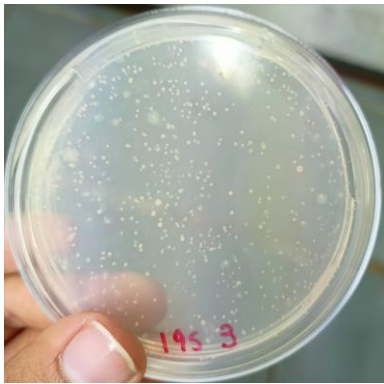


Figura 4.20. Caja Petri del medio 195: *Desulfobacter*

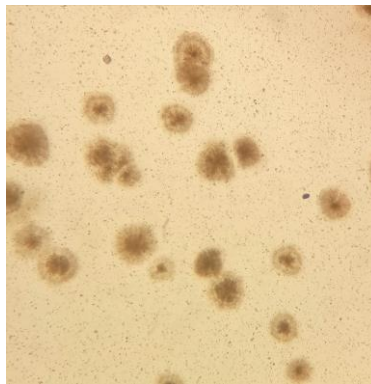


Figura 4.21. *Desulfobacter* ejemplo de Colonia A

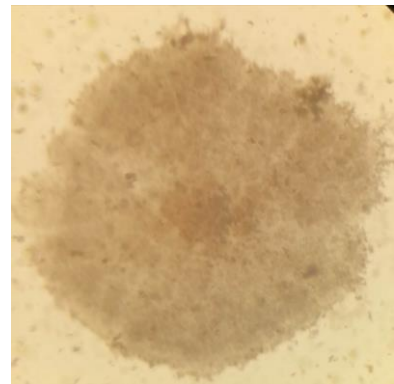


Figura 4.22. *Desulfobacter* ejemplo de Colonia B

4.4.1.5. Medio 383: *Desulfobacterium*

En la caja Petri de este medio se apreció una menor densidad de colonias formadas, con tamaños de 1cm, 3 mm y 1 mm de diámetro (Figura 4.23). Se describe la morfología para 2 tipos de colonias suspendidas en el agar

- a) **Colonias tipo A:** No tuvieron pigmentación (amarilla), forma filamentososa, borde filamentososo, transparencia en el borde y opaca en el centro, con brillo, rugosas, sin elevación (plana) y de consistencia húmeda (suave) (Figura 4.24)
- b) **Colonias tipo B:** Con forma rizoide, borde rizoide, no pigmentadas (blancas), transparentes, con brillo, lisas, elevación plana y consistencia húmeda (suave). Su forma cambió al tener mayor densidad, pues adquirieron forma circular (Figura 4.25)

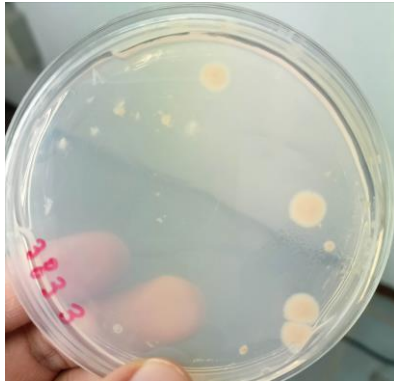


Figura 4.23. Caja Petri del medio 383: *Desulfobacterium*

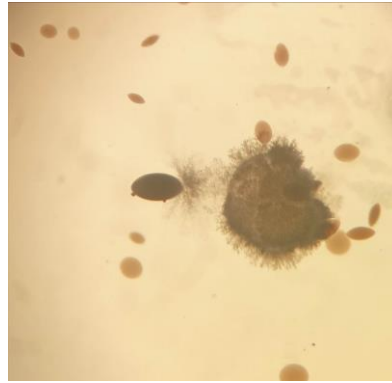


Figura 4.24. *Desulfobacterium*
ejemplo de Colonia A



Figura 4.25. *Desulfobacterium*
ejemplo de Colonia B

4.4.1.6. Medio 2059: *Desulfococcus multivorans*

Las colonias formadas en la caja Petri proliferaron principalmente en una zona reducida de la caja y se ubicaron dentro del agar (Figuras 4.26, 4.27). Su morfología es la siguiente:

- a) **Colonia suspendida:** El tamaño iba de puntiformes (< 1mm) a medianas (2mm), sin coloración (blanca), de forma y borde filamentosos, elevación convexa, de aspecto húmedo, opacas y de aspecto rugoso. A su vez un número reducido de ellas se formaron en la superficie del agar, por lo que se apreció brillo

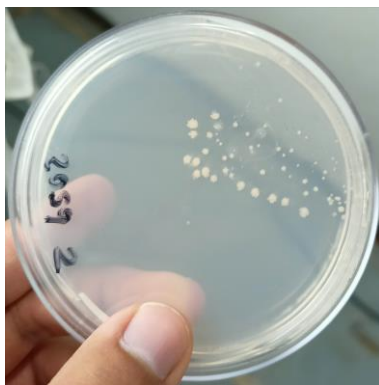


Figura 4.26. Caja Petri del medio 2059:
Desulfococcus multivorans

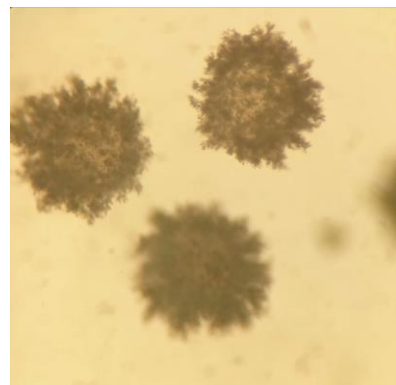


Figura 4.27. *Desulfococcus multivorans*
ejemplo de colonias suspendida

Galushko y Kuever (2019) mencionaron que las colonias para este género, que se forman en medio de agar anóxico, eran de blanquecinas a amarillentas (algunas veces

grisáceas) y tendían a ser viscosas. Vargas-Prieto (2016) expuso que las características macroscópicas de colonias en medio de cultivo BSR-acetato mostraron colonias de 2-3 mm de diámetro, borde definido y brillantes. Estas colonias también crecieron en las capas profundas del agar, y se observó precipitado negro. Estas características pueden corresponder a los géneros *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfotomaculum*, *Desulfococcus* ya que usan el acetato como fuente de carbono.

4.4.2. Cinética de crecimiento exponencial para el medio de cultivo selectivo

En la Tabla 4.3 se recopilaron los datos del número de generaciones y tiempos de generación para cada género de estudio. Se puede notar que los géneros *Desulfobulbus*, *Desulfobacter* y *Desulfotomaculum* presentaron el menor tiempo de generación y, en consecuencia, una mayor concentración de microorganismos al final del período de incubación. Esto sugiere que al cultivar un consorcio microbiano similar al que forma parte del RALLFA, utilizando las mismas condiciones de temperatura, pH y fuente de carbono, es probable que predominen bacterias de estos grupos y como resultado, es posible que estos microorganismos sean más activos en dicho cultivo.

Tabla 4.3. Datos de cinética de crecimiento exponencial para las diferentes bacterias

Bacteria	Número de generaciones	Tiempo de generación G (h)	Máxima concentración alcanzada (UFC/mL)
<i>Desulfobulbus</i>	9.01	13	2.86E+08
<i>Desulfotomaculum</i>	6.67	14	4.82E+07
<i>Desulfobacter</i>	6.46	22	7.54E+07
<i>Desulfovibrio</i>	5.79	71	2.61E+07
<i>Desulfococcus</i>	5.95	77	2.92E+07
<i>Desulfobacterium</i>	5.62	115	2.56E+07

En la Tabla 4.4 se muestran algunas investigaciones donde se identifican los microorganismos propuestos para esta investigación bajo condiciones similares de trabajo: Uso de drenaje ácido de mina (DAM) y biorreactores a escala de laboratorio.

Tabla 4.4. Comparación bibliográfica de los MSR identificados

Microorganismo sulfato-reductor identificado	Condiciones de cultivo usadas en la investigación	UFC/mL en MCS por 30 días	Condiciones óptimas de cultivo (Álvarez-Márquez, 2022)	Título de la Investigación y la mención del microorganismo estudiado	Referencias
<i>Desulfotomaculum</i>	pH: 6.8 - 7.0 T: 28-30°C Fuente de carbono: Acetato de sodio. Piruvato de sodio	3.44E+07	pH: 6.5 – 7.5 T: 30 – 37°C Fuente de carbono: Lactato, Piruvato, Etanol	Precipitation of Zn(II), Cu(II) and Pb(II) at bench-scale using biogenic hydrogen sulfide from the utilization of volatile fatty acids (Precipitación de Zn(II), Cu(II) y Pb(II) a escala de laboratorio usando sulfuro de hidrógeno biogénico procedente de la utilización de ácidos grasos volátiles). "es posible identificar <i>Desulfovibrio</i> -, <i>Desulfobacter</i> -, <i>Desulfotomaculum</i> -, <i>Desulfobacterium</i> -, <i>Desulfonema/Desulfococcus/Desulfosarcina</i> -, basado en el análisis por PCR del gen 16S rDNA obtenidos de las muestras de lodos del reactor anaerobio"	Alvarez et al., 2007
<i>Desulfobulbus</i>	pH: 6.8 – 7.0 T: 28 - 30°C Fuente de carbono: Propionato de sodio	2.05E+08*	pH: 6.6 – 7.5 T: 25 – 40°C Fuente de carbono: lactato, piruvato	Continuous removal of sulfate and metals from acidic mining-impacted waters at low temperature using a sulfate-reducing bacterial consortium (Eliminación continua de sulfato y metales de aguas ácidas impactadas por la minería a baja temperatura utilizando un consorcio bacteriano reductor de sulfato). "Los consorcios BSR se caracterizaron por secuenciación del gen 16S rRNA. La mayoría de las SRB se caracterizaron como <i>Desulfobulbus sp.</i> (Deltaproteobacteria), aunque algunas <i>Desulfovibrio sp.</i> (Deltaproteobacteria) y <i>Peptococcaceae</i> (Firmicutes) también estaban presentes"	Virpiranta a et al., 2022
<i>Desulfobacter</i>	pH: 7.1 – 7.4 T: 28 - 30°C Fuente de carbono: Acetato de sodio	5.17E+07	pH: 6.5 – 7.4 T: 28 – 34°C Fuente de carbono: Acetato, piruvato, etanol	Procesos de bioprecipitación de metales pesados y biorreducción de hierro (III) para el tratamiento de aguas ácidas de minas a escala de laboratorio. "Se detectaron géneros sulfato reductores mediante la técnica molecular de hibridación fluorescente in situ (FISH), donde existió predominancia de <i>Desulfovibrio spp.</i> , <i>Desulfobotulus sapovorans</i> y <i>Desulfovibrio fairfieldensis</i> . Seguidos de: <i>Desulfobacter spp.</i> , <i>Desulfobulbus spp.</i> , <i>Desulfobotulus sp.</i> , <i>Desulfostipes sp.</i> , <i>Desulfomusa sp.</i> y <i>Desulfofrigus</i> y <i>Desulfofaba spp</i> "	Quiroga-Flores, 2015
<i>Desulfobacterium</i>	pH: 7.0 – 7.2 T: 28 - 30°C Fuente de carbono: Piruvato de sodio	1.02E+07	pH: 4 - 6 T: 26 – 29°C Fuente de carbono: Lactato, piruvato, malato	Evaluación de bacterias sulfato reductoras presentes en reactores pasivos durante la remediación de drenajes ácidos de minas. "Amplificación del gen <i>dsrA</i> por qPCR: <i>Desulfobacterium autotrophicum</i> y en tres especies de BSR (<i>Desulfovibrio vulgaris</i> , <i>Desulfomicrobium sp.</i> y <i>Desulfococcus sp.</i>), usualmente reportadas en sistemas de tratamiento pasivo"	Escobar-Restrepo, 2015
<i>Desulfovibrio</i>	pH: 6.8 – 7.0 T: 28 - 30°C Fuente de carbono: Lactato de sodio	1.57E+07	pH: T: 30 – 37°C Fuente de carbono: Lactato, piruvato	Sistemas de humedales para la biorremediación de drenajes ácidos de mina o roca en Ancash - Perú "Se identificarán principalmente los géneros <i>Desulfovibrio</i> y <i>Desulfosarcina</i> "	Palomino-Cadenas, 2007
<i>Desulfococcus</i>	pH: 7.1 – 7.4 T: 28 - 30°C Fuente de carbono: Benzoato de sodio	1.98E+07	pH: 6.7 – 7.6 T: 28 – 35°C Fuente de carbono: Formiato, piruvato, ácidos grasos de cadena corta	Evaluación de los métodos químicos y biogénico para el tratamiento de drenaje ácido de mina a escala de laboratorio "Se logró aislar, cuantificar e identificar un consorcio bacteriano formado por <i>Desulfovibrio</i> , <i>Sulfuromonas</i> y <i>Desulfococcus</i> a partir de las muestras de lodos tomadas en los Pantanos de Villa"	Nina-Chambe, 2008

Se tomaron muestras de las colonias formadas para cada medio de cultivo selectivo, las cuales se prepararon para su observación al microscopio óptico de campo claro Velab VE-T50, confocal FV1000 OLYMPUS y electrónico de barrido JEOL JSM-5900LV y los resultados se muestran a continuación.

4.4.3. *Desulfovibrio*

El género *Desulfovibrio* no esporula, es mesófilo, ya que tiene una temperatura óptima de crecimiento de 25-37°C y puede ser halófilo. Pertenece al filo *Desulfobacterota*, clase *Desulfovibrionia*, orden *Desulfovibrionales*, familia *Desulfovibrionaceae*. Es Gram negativo, caracterizado por su movilidad distintiva a través de uno o más flagelos. Su morfología consiste principalmente en bastoncillos curvados (también llamados “en forma de coma”) de 0.5-1.5 x 2.5-10.0 µm. También pueden ser sigmoideas o espirales, raramente también rectas; la forma puede estar influida por la edad o el entorno y, por tanto, la composición del medio (Gaylarde y Cook, 1990; Kushkevych et al., 2021; Machaca et al., 2022). Las características de la morfología observada por medio de los tres tipos de microscopio se encuentran en la Tabla 4.5.

4.4.4. *Desulfotomaculum*

Este género se encuentra en los sedimentos de las aguas y en los intestinos de los animales. Es uno de los pocos géneros que genera esporas. Esto hace que sea el género dominante en hábitats con condiciones redox variables. Puede ser mesófilo (30-37°C) o termófilo (50-65°C). Pertenece al filo *Firmicutes*, clase “*Clostridia*”, orden *Clostridiales*, familia *Peptococcaceae*. Es Gram positivo, móvil y utiliza un flagelo polar o más flagelos que se proyectan en todas las direcciones (peritricoso). Durante el cultivo puede perder la movilidad. Forma bastoncillos rectos o curvos de 0.3-2.5 x 2.5-15 µm, cuyos extremos pueden ser redondeados o puntiagudos. Las células se presentan de forma individual o en pares. Las endosporas son de ovals a redondas, con una localización terminal o central y hacen que la célula se arquee (Agrawal et al.,

2010; Gaylarde y Cook, 1990; Hagenauer et al., 1997; Kushkevych et al., 2021). En la Tabla 4.6 se describen las características observadas en los tres tipos de microscopio.

Tabla 4.5. Observaciones en los distintos tipos de microscopio para la bacteria: *Desulfovibrio*

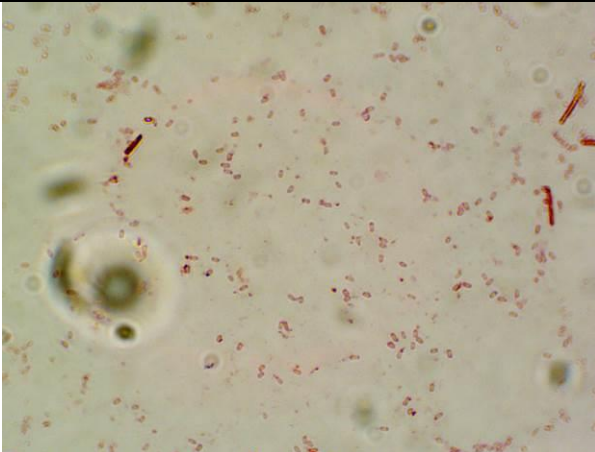
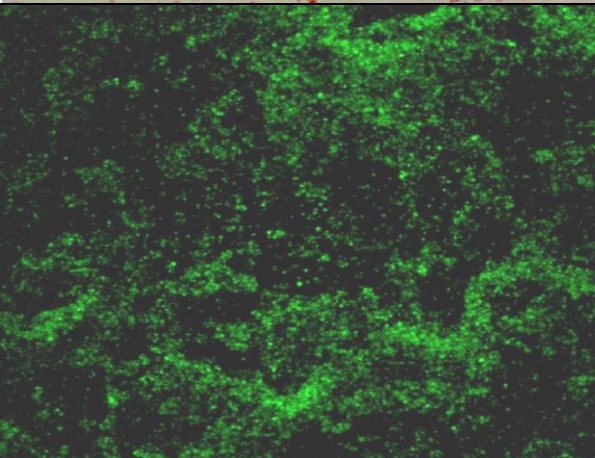

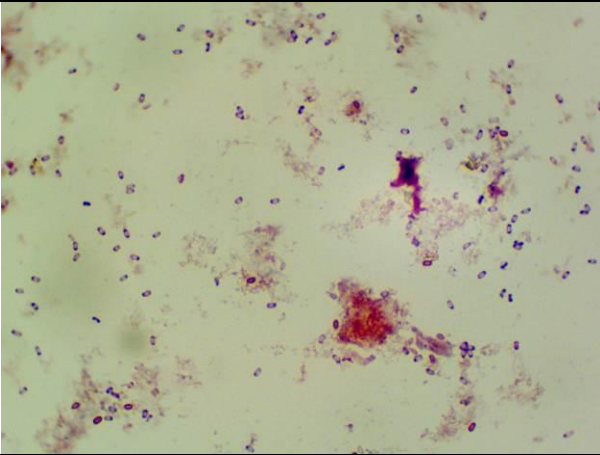
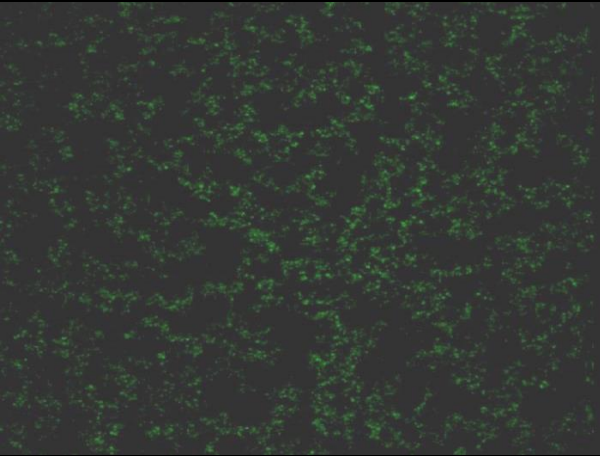
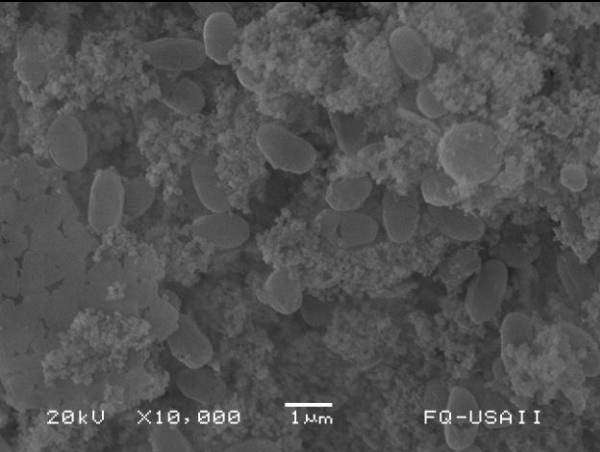
Microscopía	<i>Desulfovibrio</i>	Características
Microscopio óptico de campo claro, observación con tinción de Gram con el objetivo de 100X		Bacilo grueso y pequeños, Gram negativa, formación de algunos diplobacilos
Microscopio confocal, observación por medio de tinción con fluoresceína con el objetivo de 100X		Se confirma la presencia de la bacteria en el medio, presentado la fluorescencia; sin embargo, se observa mayor fluorescencia debido al precipitado del medio
Microscopio electrónico de barrido		Bacilos rectos y ligeramente curvos, miden de 0.6-0.9 x 1.2-1.7 µm

Tabla 4.6. Observaciones en los distintos tipos de microscopio para la bacteria:

Desulfotomaculum

Microscopía	<i>Desulfotomaculum</i>	Características
<p>Microscopio óptico de campo claro, observación con tinción de Gram con el objetivo de 100X</p>		<p>Coco bacilo cortos, curvados, Gram positivas, células individuales o en pares</p>
<p>Microscopio confocal, observación por medio de tinción con fluoresceína con el objetivo de 100X</p>		<p>Confirmación de la presencia de este microorganismo en el medio, con abundancia media</p>
<p>Microscopio electrónico de barrido</p>		<p>Bacilos con bordes redondos miden 0.7-0.8 x 1.1-1.4 µm</p>

4.4.5. *Desulfobulbus*

Este género puede encontrarse en ecosistemas acuáticos, así como en el estómago de rumiantes o estiércol. Pertenece al filo *Proteobacteria*, clase *Deltaproteobacteria*, orden *Desulfobacterales*, familia *Desulfobulbaceae*. El nombre deriva de la palabra “bulbus”, que significa cebolla, a cuya forma se parecen las células de este género. Es mesofílica con una temperatura óptima de crecimiento de 25 a 40°C. No forma esporas. Gram negativo con forma ovoide a bastoncillo, a veces con forma de limón y extremos puntiagudos, que miden 0.6-1.3 x 1.5-3.5 µm. Las células pueden presentarse individualmente, en parejas o en cadenas. Son móviles por un flagelo polar o inmóviles (Agrawal et al., 2010; Gaylarde y Cook, 1990; Kushkevych et al., 2021; Lu et al., 2018). La morfología observada se describe en la Tabla 4.7 para cada uno de los microscopios usados.

4.4.6. *Desulfobacter*

Pertenece al filo *Proteobacteria*, clase *Deltaproteobacteria*, orden *Desulfobacterales*, familia *Desulfobacteraceae*, es una bacteria mesofílica con una temperatura óptima de 28-32°C y no esporula. Es una bacteria Gram negativa, de forma ovalada a bastoncillo, con extremos redondeados, que mide 0.5-2.5 x 1.8-8 µm. Su forma también puede ser ligeramente curvada y algunas especies son pleomórficas. Las células se presentan individualmente o en pares; las cepas marinas tienden a formar grupos. La motilidad la proporciona un flagelo polar, pero algunas son inmóviles porque esta característica puede perderse durante su cultivo (Dordević et al., 2021; Gaylarde y Cook, 1990; Kushkevych et al., 2021; Saleh y Hassan, 2024). La Tabla 4.8 contiene las observaciones vistas por medio de los tres tipos de microscopios.

4.4.7. *Desulfobacterium*

Las células de estas bacterias tienen forma de óvalo a bacilo y miden 0.7-1.5 x 2.0-2.5 µm. Se presentan solitarias o en pares. No se observa la formación de esporas. Son

Gram negativas, estrictamente anaerobias, móviles ya que contienen un único flagelo polar, aunque pocas células muestran motilidad, y mesofílica (temperatura óptima: 28°C).

Tabla 4.7. Observaciones en los distintos tipos de microscopio para la bacteria:

Desulfobulbus sp.


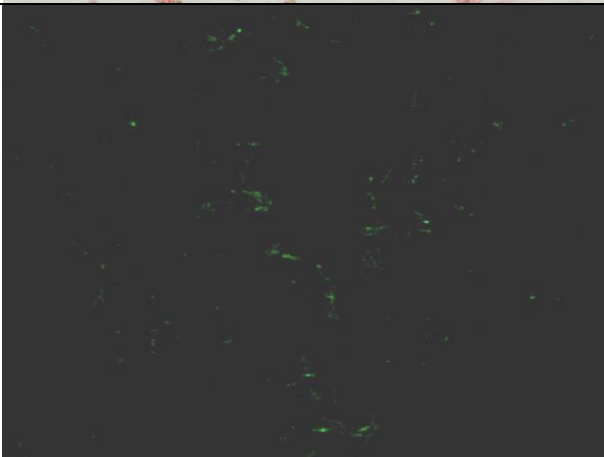
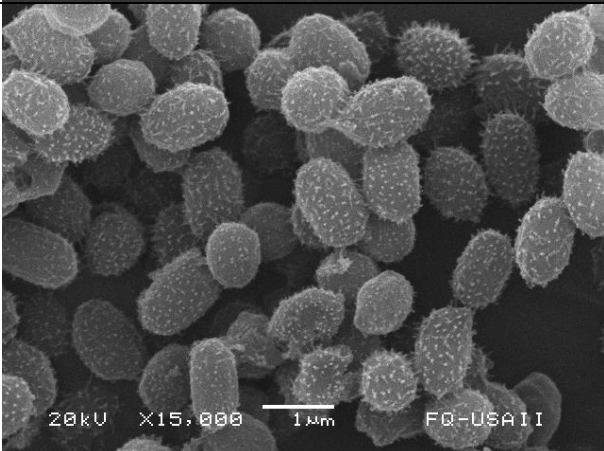
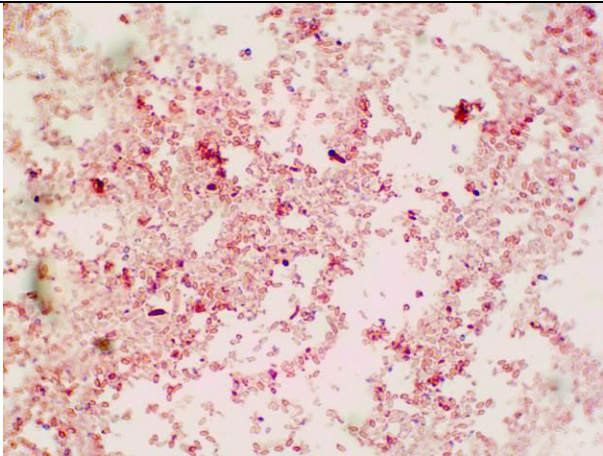
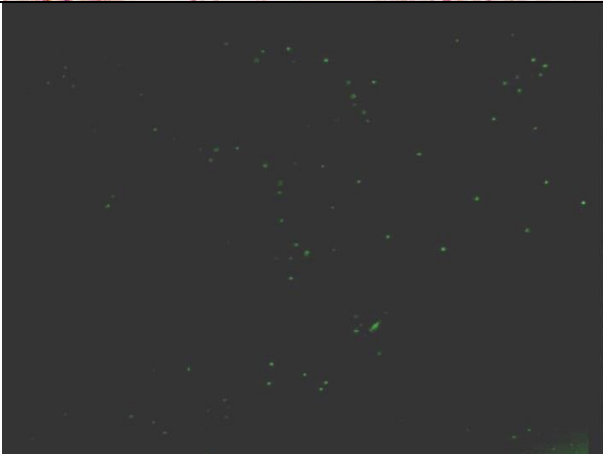

Microscopía	<i>Desulfobulbus sp.</i>	Características
<p>Microscopio óptico de campo claro, observación con tinción de Gram con el objetivo de 100X</p>		<p>Coco bacilos principalmente, Gram negativos formando agrupaciones empalizadas</p>
<p>Microscopio confocal, observación por medio de tinción con fluoresceína con el objetivo de 100X</p>		<p>Baja abundancia de la bacteria estudiada, con la confirmación de su presencia en el medio</p>
<p>Microscopio electrónico de barrido</p>		<p>Forma ovoide con presencia de pilus que miden 0.8 x 1.2-1.3 μm</p>

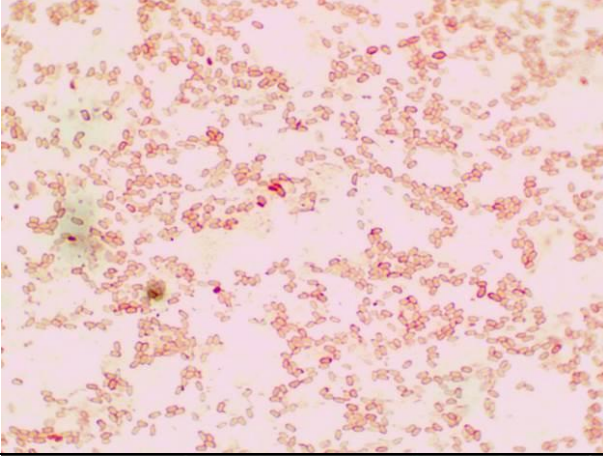
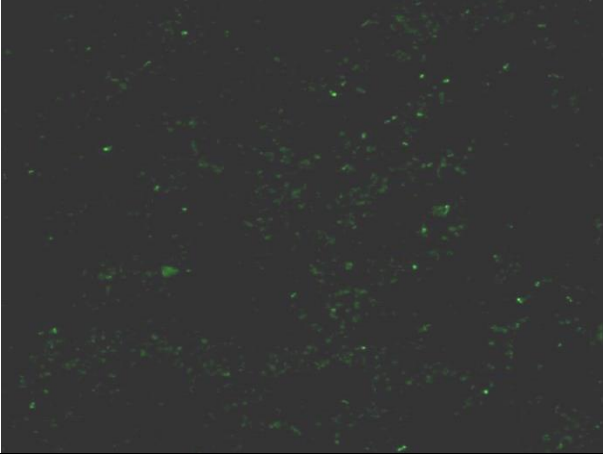

Tabla 4.8. Observaciones en los distintos tipos de microscopio para la bacteria: *Desulfobacter*

Microscopía	<i>Desulfobacter</i>	Características
Microscopio óptico de campo claro, observación con tinción de Gram con el objetivo de 100X		Cocobacilos que forman agrupaciones empalizadas, Gram negativas
Microscopio confocal, observación por medio de tinción con fluoresceína con el objetivo de 100X		Baja presencia de la bacteria en el medio, pero lo suficiente para comprobar con éxito su desarrollo
Microscopio electrónico de barrido		Bastoncillos que miden 0.5 x 1.5-2.2 µm

Pertencen al filo *Desulfobacterota*, clase *Desulfobacteria*, orden *Desulfobacterales*, familia *Desulfobacteriaceae* (Galushko y Kuever, 2019; Rooney-Varga et al., 1998).

Las características descritas se encuentran en la Tabla 4.9.

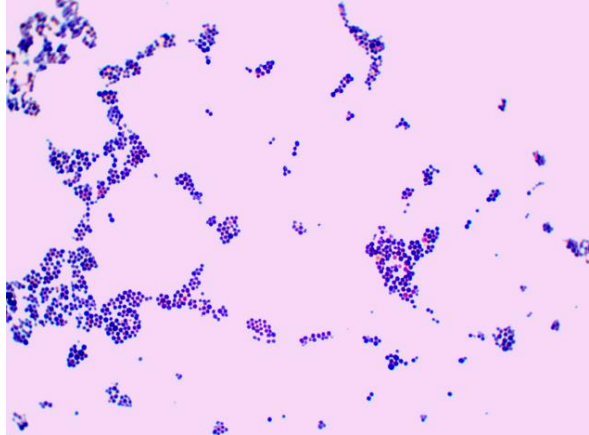

Tabla 4.9. Observaciones en los distintos tipos de microscopio para la bacteria:
Desulfobacterium

Microscopía	383: <i>Desulfobacterium</i> Medium	Características
Microscopio óptico de campo claro, observación con tinción de Gram con el objetivo de 100X		Cocobacilos Gram negativos, se agrupan en cadena o racimo
Microscopio confocal, observación por medio de tinción con fluoresceína con el objetivo de 100X		Baja abundancia de la bacteria en estudio en el medio, pero se confirma su presencia
Microscopio electrónico de barrido		Células ovoides que miden 0.6-0.7 x 1.0-1.4 μm

4.4.8. *Desulfococcus*

Bacteria mesófila con temperatura óptima de 35°C, con forma esférica o en forma de limón, con 1.4-2.3 µm de diámetro, dependiendo del tipo de cepa se puede teñir Gram negativas o Gram positivas, las células pueden formar distintas agrupaciones, pero generalmente se encuentran solas o en pares, no forman esporas y son no móviles. Forma parte del filo *Proteobacteria*, clase *Deltaproteobacteria*, orden *Desulfobacterales*, familia *Desulfococcaceae* (Galushko y Kuever, 2019; Gaylarde y Cook, 1990; Nie et al., 2021). La morfología celular se muestra en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10. Observaciones en los distintos tipos de microscopio para la bacteria: *Desulfococcus multivorans*

Microscopía	2059: <i>Desulfococcus multivorans</i>	Características
Microscopio óptico de campo claro, observación con tinción de Gram con el objetivo de 100X		Cocos Gram positivos con agrupaciones de sarcina, algunos estreptococos y diplococos
Microscopio confocal, observación por medio de tinción con fluoresceína con el objetivo de 100X	No identificada	Sin descripción
Microscopio electrónico de barrido		Células esféricas que miden 0.77-1.05 µm de diámetro

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos durante esta investigación puede decirse que se alcanzaron los objetivos planteados:

- ✓ El medio de cultivo general demuestra ser altamente efectivo para la obtención y cultivo de diversos microorganismos anaerobios, lo que lo convierte en una base sólida para el estudio de las MSR. La elección de una dilución de 10^{-2} brinda la oportunidad de examinar la morfología de manera individual de los microorganismos que componen el lodo del RALLFA
- ✓ Sembrar en el medio de cultivo específico con la dilución 10^{-2} facilita el crecimiento controlado de las MSR en un lapso de 30 días. Estas muestran características macroscópicas y microscópicas que confirman su presencia. Además, considerando las condiciones de temperatura y pH, así como las observaciones microscópicas, se deduce que el dominio principal en este estudio corresponde al reino de las bacterias
- ✓ La cuantificación de las BSR mediante la técnica del NMP al emplear medios de cultivo específicos a 30°C resultó en 46,000,000 bacterias/100 mL
- ✓ El aislamiento de los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium* y *Desulfococcus*, mayormente presentes en la precipitación de metales en el interior del RALLFA se llevó a cabo mediante medios de cultivo selectivo en medio sólido

- ✓ Par el caso de la caracterización de las colonias, la única diferencia notable es la coloración negra que exponen los autores Vargas-Prieto (2016) y Watanabe et al. (2020) pero, fuera de ello, tienen características semejantes a las señaladas en la bibliografía consultada (Galushko y Kuever, 2019; Machaca et al., 2022; Predari et al., 2017)
- ✓ Los resultados de la cinética de proliferación de cada uno de los géneros permiten concluir que el género *Desulfobulbus* seguido de los géneros *Desulfotomaculum* y *Desulfobacter* son los principales microorganismos que se encuentran en este tipo de reactor y, por ende, los que mejor se adaptan a las condiciones con las que opera actualmente
- ✓ El género *Desulfovibrio* presenta las características morfológicas, tamaño, estructuras externas, tipo de tinción de Gram, condiciones de crecimiento similares a lo investigado por los autores Gaylarde y Cook (1990); Kushkevych et al. (2021) y Machaca et al. (2022). Debido a esto se presume que el género presente en el RALLFA es *Desulfovibrio*
- ✓ Los microorganismos correspondientes al género *Desulfotomaculum* descritos por los autores Agrawal et al. (2010), Gaylarde y Cook (1990), Hagenauer et al. (1997) y Kushkevych et al. (2021) tienen características propias del género en estudio. Se supone que este género se encuentra en el RALLFA
- ✓ Las características observadas para el género *Desulfobulbus* y las presentadas por los autores Agrawal et al. (2010), Gaylarde y Cook (1990), Kushkevych et al. (2021) y Lu et al. (2018) son similares y por este motivo se sospecha que es otro género que se desarrolla favorablemente en el RALLFA
- ✓ El género *Desulfobacter* posee características distintivas que son reafirmadas por los autores Dordević et al. (2021), Gaylarde y Cook (1990), Kushkevych et al.

(2021) y Saleh y Hassan (2024), siendo estas las formas observadas en esta investigación, motivo por el cual se conjetura la presencia de los microorganismos *Desulfobacter* en este tipo de reactor

- ✓ Los autores Rooney-Varga et al. (1998) y Galushko y Kuever (2019) describen el género *Desulfobacterium*. Estas características coinciden con las observadas durante el estudio y por ende se figura que también está presente en el reactor anaerobio

- ✓ La descripción de la bacteria del género *Desulfococcus* estudiada concuerda con las investigaciones realizadas por Galushko y Kuever (2019), Gaylarde y Cook (1990) y Nie et al. (2021). Por ello se presume su presencia en la biomasa del reactor.

5.2. Recomendaciones

Con base en los resultados de esta investigación, se pueden sugerir las siguientes modificaciones en la metodología del cuarto experimento para mejorar los resultados obtenidos:

- Realizar una siembra en placa para cada medio de cultivo selectivo para que después del periodo de incubación, de las colonias formadas se tome una sola colonia con las características presuntamente correspondientes al género de interés y hacer una resiembra en el mismo medio de cultivo selectivo para tener un cultivo más puro

- Con este cultivo “puro”, previo al recuento directo en placa, hacer una elección de la dilución correcta, como se hizo en la primera parte de la experimentación para que el conteo de colonias se facilite y se asegure que se encuentre en el intervalo de 30 a 300

- Usar otra técnica para el análisis de la curva de crecimiento como puede ser su estudio con espectrofotometría midiendo la turbidez del medio, la cual cambiará al desarrollarse los microorganismos
- Cambiar la preparación de la muestra para la observación en microscopio confocal con uno más suave para no destruir la estructura, o cambiar la observación con microscopio óptico de alta intensidad en campo oscuro, para discernir los flagelos presentes en las bacterias.

Por otro lado, también se podría aplicar la técnica del NMP para cada medio de cultivo selectivo puro para hacer una comparación con el conteo en placa y cuantificar el número de estos microorganismos presentes en el lodo del RALLFA.

Naturalmente, si se llega a contar en el futuro próximo con las facilidades para usar las técnicas más modernas de identificación, sería excelente aplicarlas para tener mayor certeza de cuáles son los organismos presentes en el reactor en estudio. Actualmente hay problemas en la Unidad de Servicios Analíticos para la Industria y la Investigación, USAII, de la Facultad de Química de la UNAM, debido a una obra en construcción que ha dañado muchos de los equipos existentes.

ANEXO I

Procedimientos experimentales

AI.1. Número más probable (NMP)

Tabla AI.1. Valores de NMP por cada 100 mL de muestra y 95 % de límite de confianza (para diversas combinaciones de resultados positivos cuando se utilizan tres alícuotas de muestra de 10 mL, tres de 1 mL y tres de 0.1 mL) (DOF, 2015)

Número de tubos que dieron reacción positiva			NMP por 100 mL	Límite de confianza al 95%	
3 de 10 mL	3 de 1 mL	3 de 0,1 mL		Inferior	Superior
0	0	0	<3	----	-----
0	0	1	3	< 1	9
0	1	0	3	< 1	13
1	0	0	4	< 1	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	149
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	379
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800
3	3	3	≥2400	-----	-----

AI.2. Secado a punto crítico

El procedimiento a punto crítico se realizó en un desecador de la marca EMITECH K850. Esta técnica ayuda a dejar totalmente secas las muestras sin rastros de alcohol, o de algún otro producto volátil que puede contaminar la columna del microscopio. El procedimiento general es el siguiente:

- a) Las muestras en etanol 100%, se pasan a un sobre de “papel seda” etiquetado con los datos correspondientes, esta muestra siempre se mantiene húmeda en alcohol absoluto
- b) Se prende el aparato y se enfría la cámara con CO₂, cuando la temperatura baja a 0°C, se abre la cápsula y se introducen las bolsas de “papel seda” con las muestras, se cierra y se lavan varias veces con el CO₂ líquido, hasta que no haya residuos de alcohol
- c) Al mirar directamente la ventana de la cámara, se deja el menisco de CO₂ a la altura de la línea roja, se cierran todas las llaves y el tanque de CO₂
- d) Posteriormente se enciende el calentador “Heater Control” (un foco rojo se prende), la cual permite que la presión y la temperatura se incrementen. Cuando estas condiciones son estables (38°C y 86 kPa -1250 psi-), se alcanza el punto crítico del CO₂ (pasa del estado líquido al gaseoso, sin que exista una interfase)
- e) Finalmente, después de que seque la muestra el equipo se apaga y se espera a que la temperatura baje a la temperatura ambiental y la cámara puede ya ser despresurizada lentamente.

AI.3. Etapa final de preparación de la muestra para microscopio electrónico de barrido

Las muestras secadas a punto crítico se montan en un porta muestras de aluminio de 10 mm que contiene cinta de carbón, se recubre con una capa de oro de 20 nm, mediante *sputtering* en el equipo Marca: DENTON VACUUM, Modelo: DESK II.

Después de recubrir la muestra, se deben llevar a cabo observaciones de su morfología utilizando un microscopio electrónico de barrido Marca: JEOL, Modelo: JSM-5900LV.

AI.4. Preparación de los colorantes para tinción

Solución de cristal violeta: Disolver 0.5 g de cristal violeta o violeta de genciana en 100 mL de agua desionizada estéril.

Solución Lugol: disolver 0.3 g de yodo y 0.6 de yoduro de potasio en 100 mL de agua desionizada estéril.

Solución safranina: disolver 0.25 g de safranina en 100 mL de agua desionizada estéril.

AI.5. Cinética de crecimiento o proliferación: Fase exponencial

La relación entre la cantidad de células y las generaciones de un cultivo que crece de manera exponencial puede ser inferida matemáticamente de la siguiente manera.

Se designa como:

x = Número de bacterias al tiempo 0

y = Número de bacterias al tiempo t

t = tiempo en crecimiento o proliferación exponencial

Al tiempo 0 $y = x$

Después de: 1 generación $y = 2x$

2 generaciones $y = (2x) 2 = 2^2 x$

3 generaciones $y = (2^2 x) 2 = 2^3 x$

n generaciones $y = 2^n x$

(Ec. AI.1)

Para calcular n = (número de generaciones)

Resolviendo la ecuación (AI.1) para n se tiene:

$$\log y = \log x + n \log 2$$

$$n = \frac{\log y - \log x}{\log 2} \quad (\text{Ec. AI.2})$$

Si se sustituye en la ecuación anterior $\log 2$ por su valor 0.3010, se tiene que $1/0.3010 = 3.3$

$$n = 3.3 \log y/x \quad (\text{Ec. AI.3})$$

Por lo tanto, mediante la aplicación de la ecuación anterior, es posible calcular el número de generaciones que han transcurrido, siempre y cuando se tenga información sobre la población inicial x y la población posterior al tiempo t .

El tiempo de generación G se calcula como t (el tiempo transcurrido en la fase exponencial para pasar de x a y) dividido por el número de generaciones n .

$$G = t/n \quad (\text{Ec. AI.4})$$

ANEXO II

Datos experimentales

All.1. Ensayo 1: Medio de cultivo general, selección de la dilución correcta

Tabla All.1. Medio de cultivo general: Observación con tinción de Gram
(incubación por 5 días)

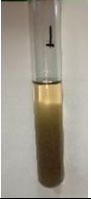




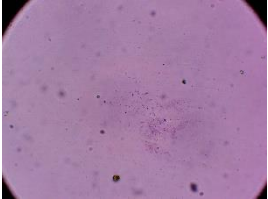
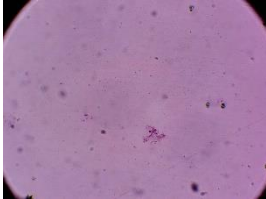
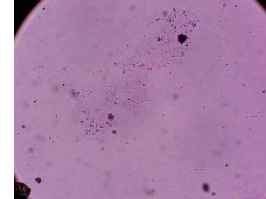


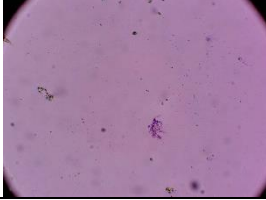
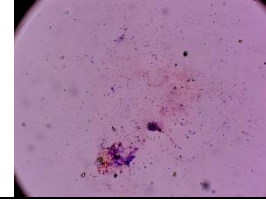

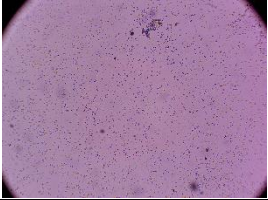

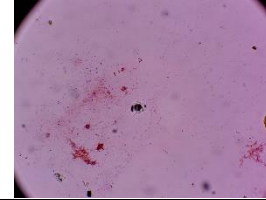

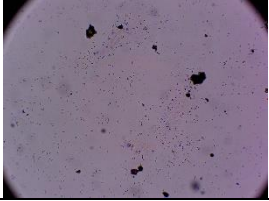
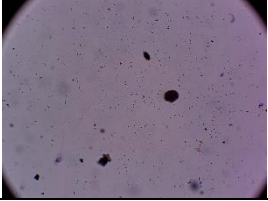
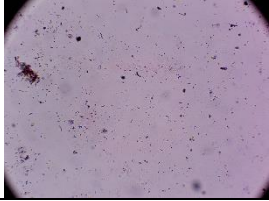

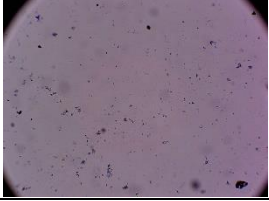





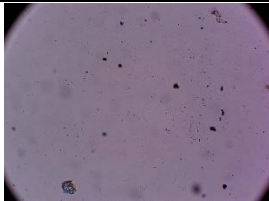
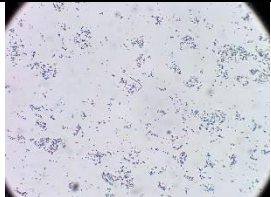
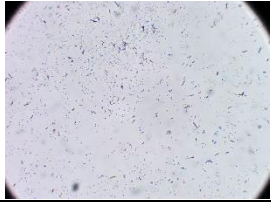


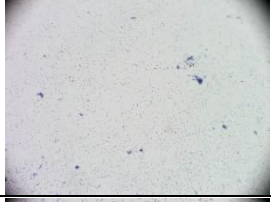



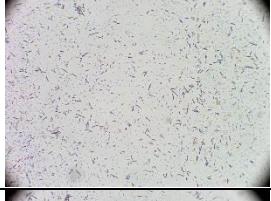

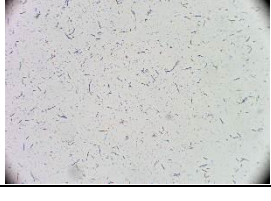

Dilución	1° Campo de observación	2° Campo de observación	3° Campo de observación
 Concentración 10^{-1}	 Hifas y bacilos Gram negativos en gran abundancia	 Hifas y bacilos largos y cortos Gram positivos en gran abundancia	 Bacilos Gram negativos en gran abundancia
 Concentración 10^{-2}	 Hifas, bacilos y cocos Gram positivos en menor abundancia	 Cocos Gram positivos en menor abundancia	 Bacilos Gram positivos en menor abundancia
 Concentración 10^{-3}	 Cocos Gram positivos aislados con poca abundancia	 Cocos y bacilos delgados Gram positivos con poca abundancia	 Cocos Gram negativos y algunos bacilos Gram negativos en gran abundancia
 Concentración 10^{-4}	 Cocos Gram positivos con gran abundancia	 Bacilos y cocos Gram negativos en gran abundancia	 Bacilos Gram negativos en mayor proporción con respecto a los bacilos Gram positivos

Tabla AII.1. Medio de cultivo general: Observación con tinción de Gram (incubación por 5 días)
continúa

Dilución	1° Campo de observación	2° Campo de observación	3° Campo de observación
			
Concentración 10^{-5}	Bacilos, cocos y algunas hifas Gram positivas con gran abundancia	Bacilos, cocos y algunos vibrio Gram positivos en menor abundancia	Bacilos y cocos Gram positivos en gran abundancia
			
Concentración 10^{-6}	Cocos Gram positivos con poca abundancia. Se observan cristales y algunas manchas propias del medio de cultivo	Cocos Gram positivos con poca abundancia y Bacilos Gram positivos en menor proporción	Cocos Gram positivos con baja abundancia. Las manchas propias del reactivo son mayores
			
Concentración 10^{-7}	No se observan microorganismos. Cristales y manchas propias del medio de cultivo	Cristales y manchas de microorganismos. Nulos microorganismos	Algunos cocos y bacilos Gram positivos. Destacan los cristales de la tinción y sustancias propias del medio de cultivo



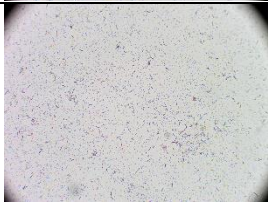

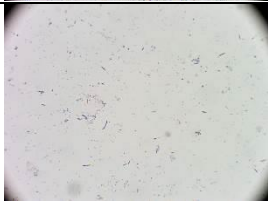
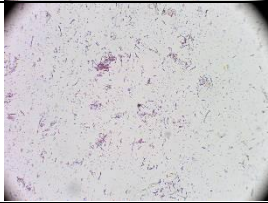

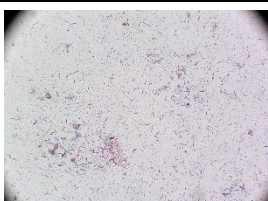

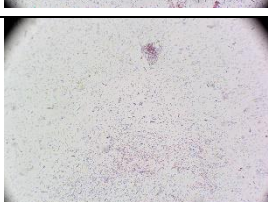

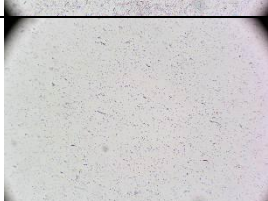
All.2. Ensayo 2: Medio de cultivo específico para la actividad sulfato-reductora

Tabla All.2. Características del medio de cultivo específico para microorganismos sulfato-reductores (Incubación 30 días)

Día	Descripción	Tinción de Gram	Tubo de cultivo
1	Gran cantidad de cocos agrupados, diplococos Gram negativos y algunos bacilos Gram positivos. Los tubos de cultivo transparentes con una ligera tonalidad amarilla		N.O
2	Cocos y bacilos Gram positivos, incremento en el número de bacilos y formación de diplococos. Los tubos de cultivo presentan formación de biopelícula con una mayor turbidez en el fondo con ligera tonalidad gris		
5	Sin observación al microscopio. Los tubos de cultivo muestran una mayor formación de biopelícula, turbidez en el fondo y una tonalidad gris	N.O	
6	Cocos Gram positivos y algunas hifas. Los tubos de cultivo presentan formación de biopelícula con una coloración negra, turbidez en el fondo con una tonalidad gris		
7	Cocos Gram negativos y bacilos Gram positivos, algunas hifas. Agrupaciones como diplococos y estreptobacilos. Los tubos de cultivo presentan formación de biopelícula con una ligera coloración negra y mayor turbidez en el fondo		
8	Mayor formación de bacilos Gram positivos, agrupaciones de diplobacilos y estreptobacilos, cocos Gram negativos y distintas agrupaciones. Los tubos de cultivo presentan formación de biopelícula gruesa negra y un precipitado gris con puntos negros		
9	Bacilos Gram positivos que forman diplobacilos y estreptobacilos, cocos Gram positivos, diplococos y algunas hifas. Los tubos de cultivo presentan un precipitado gris de mayor turbidez con algunos puntos negros y formación de biopelícula de gran tamaño de forma cóncava		

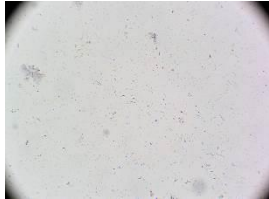

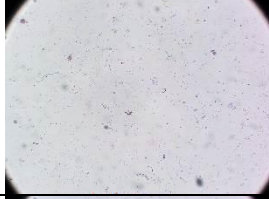
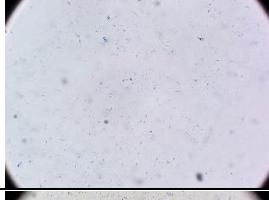


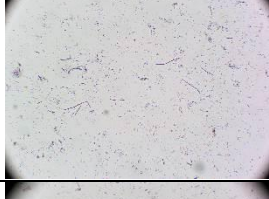

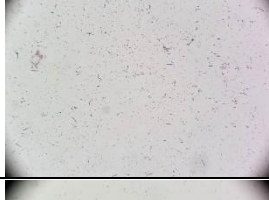



N.O: No observada

Tabla AII.2. Características del medio de cultivo específico para microorganismos sulfato-reductores (Incubación 30 días) continúa

Día	Descripción	Tinción de Gram	Tubo de cultivo
12	Gran formación de cocos, diplococos Gram positivos, pocos bacilos Gram positivos. Los tubos de cultivo presentan una mayor turbidez en el fondo con una tonalidad gris con puntos negros y formación de biopelícula de gran espesor con filamentos negros		
13	Mayor proporción de cocos con respecto a los bacilos. Cocos y diplococos Gram positivos, bacilos y diplobacilos Gram positivos. Tubo de cultivo con precipitado gris y formación de biopelícula de gran espesor		
14	Bacilos Gram negativos con agrupaciones de diplobacilos y estreptobacilos. Cocos y diplococos Gram negativos, los cuales están en mayor proporción con respecto a los bacilos. Algunos bacilos Gram positivos		N.O
15	Bacilos y cocos Gram negativos, agrupaciones de diplobacilos, estreptobacilos. Tubos de cultivo con formación de biopelícula de gran espesor y con filamentos negros, con mayor turbidez en la parte inferior y precipitado negro		
16	Bacilos y cocos Gram negativos, cocos Gram positivos, los cocos están en mayor proporción. Tubos de cultivo con precipitado negro en la interfaz del medio de cultivo líquido y el medio de cultivo con mayor turbidez, la cual tiene una coloración gris. Se presenta formación de biopelícula de gran espesor con filamentos de color negro y de forma cóncava		
19	Bacilos Gram positivos, diplobacilos, cocos Gram negativos, esparcidos por toda el área del frotis. Tubos de cultivo con formación de biopelícula de gran espesor, con filamentos negros, mayor turbidez en el fondo con color gris y zonas de color negro		
20	Cocos Gram positivos en mayor proporción, la cantidad de bacilos Gram positivos, disminuyó y son más delgados que los observados anteriormente. Se encuentran algunas hifas		N.O

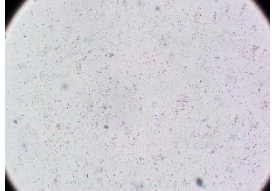
N.O: No observada

Tabla AII.2. Características del medio de cultivo específico para microorganismos sulfato-reductores (Incubación 30 días) continúa

Día	Descripción	Tinción de Gram	Tubo de cultivo
21	Predominan los cocos Gram negativos, bacilos Gram negativos en menor cantidad y algunas hifas. Los tubos de cultivo muestran formación de biopelícula de gran espesor con filamentos de color negro, la turbidez en el fondo del tubo es más gris y muestra muy poco precipitado negro		
22	Mayor presencia de cocos con respecto a los bacilos, dentro de los cuales unos son más gruesos mientras que otros son más delgados. Los cocos y los bacilos son Gram positivos		N.O
23	Cocos y bacilos Gram positivos, mayor proporción de cocos, los bacilos tienen 2 tipos de grosor y se encuentran algunas hifas		N.O
26	Cocos Gram positivos y Gram negativos, bacilos y estreptobacilos Gram positivos. Incremento de hifas. Formación de biopelícula de bajo espesor, formación de precipitado que muestra una mayor turbidez y un color gris, con puntos negros y una coloración general amarilla muy clara		
27	Biopelícula delgada con formación de precipitado negro en la zona de mayor turbidez. Cocos Gram negativos y cocos Gram positivos de mayor tamaño. Aumentó la cantidad de bacilos Gram positivos y estreptobacilos		
28	Cocos Gram positivos de mayor diámetro y cocos Gram negativos más pequeños. Bacilos Gram positivos y forman algunos estreptobacilos. Los tubos de cultivo muestran un precipitado de mayor turbidez y con muestra de precipitado negro. Formaron biopelícula delgada. El color de los tubos en general es amarillo		
29	Cocos Gram positivos y negativos. Bacilos Gram positivos y negativos. Se observa una disminución de la carga bacteriana y principalmente de los bacilos. Tubos de cultivo con formación de precipitado con mayor turbidez con zonas de coloración negra, presentan una biopelícula delgada y la coloración general del tubo de cultivo es ligeramente amarilla		

N.O: No observada

Tabla AII.2. Características del medio de cultivo específico para microorganismos sulfato-reductores. (Incubación 30 días) continúa

Día	Descripción	Tinción de Gram	Tubo de cultivo
30	Cocos Gram positivos y negativos. Bacilos Gram negativos y positivos, los positivos son más gruesos que los negativos. Se observan algunas hifas. Se observa una disminución de la carga bacteriana		N.O

N.O: No observada

AII.3. Ensayo 3: Cuantificación de los MSR por el método del NMP

Tabla AII.3. Seguimiento de la experimentación del número más probable (Incubación por 30 días)




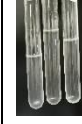
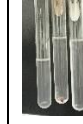

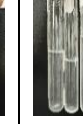




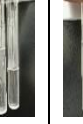


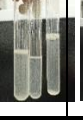
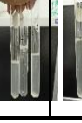
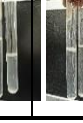
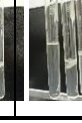

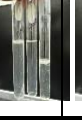
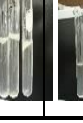
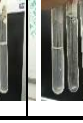


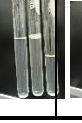


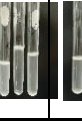
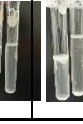
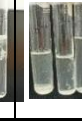

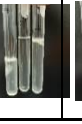
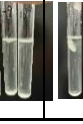
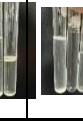
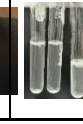

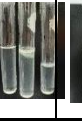









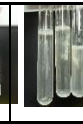


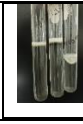


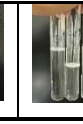





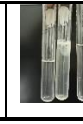
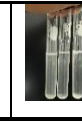

											
Día 1: Todos los tubos de cultivo muestran transparencia											
											
Día 2: Se comienzan a observar una ligera turbidez en los tubos											
											
Día 5: Formación de biopelícula con formación de precipitado. Dependiendo de la concentración la turbidez es mayor											
											
Día 6: Formación de biopelícula delgada sin pigmentación, la concentración más alta ya presenta una pigmentación negra en la biopelícula, presentan turbidez											
											
Día 7: Turbidez mayor en los tubos, y formación de biopelícula delgada											
											
Día 8: Las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} presentan una biopelícula de mayor espesor y con pigmentación negra, las demás diluciones presentan una biopelícula delgada y turbidez alta											

Tabla AII.3. Seguimiento de la experimentación del número más probable (Incubación por 30 días) continúa





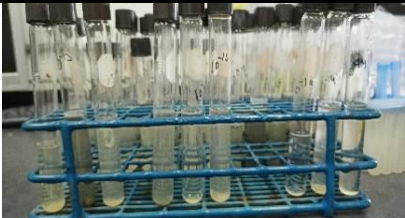









		
<p>Día 9: Las diluciones 10^{-1} a 10^{-4} presentan una coloración más oscura, formación de precipitado y biopelícula, de las diluciones 10^{-5} a 10^{-10} la coloración es más clara con tonos amarillos y turbidez alta. Las diluciones 10^{-11} a 10^{-15} su turbidez es menor y tienen mayor transparencia</p>		
		
<p>Día 12: La turbidez aumento y la biopelícula se hizo más gruesa</p>		
		
<p>Día 14: Se comienzan a diferenciar los tubos positivos de los negativos en las diluciones menos concentradas</p>		
		
<p>Día 15: Precipitado negro en las diluciones 10^{-1} a 10^{-4} y coloración amarilla en los tubos negativos</p>		
		
<p>Día 20: Precipitado negro en las diluciones 10^{-1} a 10^{-5} y formación de precipitado negro en uno o dos de los tubos de cultivo de las diluciones posteriores</p>		

Tabla AII.3. Seguimiento de la experimentación del número más probable (Incubación por 30 días) continúa








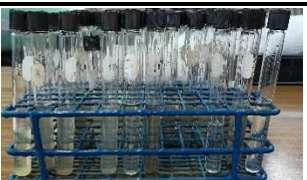










		
Día 21		
		
Día 22		
		
Día 23		
		
Día 26		
		
Día 28		
		
Día 29		

Tabla AII.3. Seguimiento de la experimentación del número más probable (Incubación por 30 días) continúa




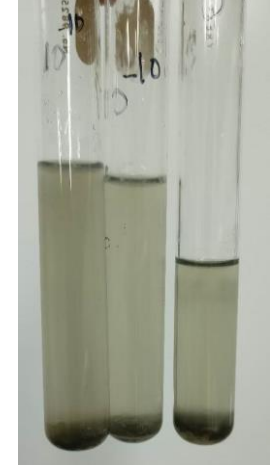

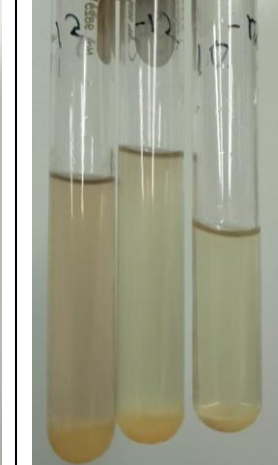


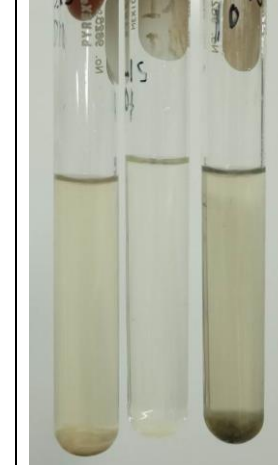
			
<p>Día 33: A partir del día 21 los cambios en los tubos de cultivo fueron mínimos, formación de precipitado negro en los tubos positivos donde la última dilución que tiene todos sus tubos positivos es 10^{-5}, formación de biopelícula y coloración amarilla o transparente para los tubos negativos</p>			

Tabla AII.4. Tubos positivos y negativos para la técnica del número más probable

10^{-1}			10^{-2}			10^{-3}		
+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-4}			10^{-5}			10^{-6}		
+	+	+	+	+	+	-	+	-
10^{-7}			10^{-8}			10^{-9}		
+	-	+	-	-	+	-	+	-

Tabla AII.4. Tubos positivos y negativos para la técnica del número más probable continúa

								
10^{-10}			10^{-11}			10^{-12}		
+	+	+	-	-	-	-	-	-
								
10^{-13}			10^{-14}			10^{-15}		
-	+	-	-	+	-	+	-	+

All.4. Recuento directo en placa para los distintos medios de cultivo selectivo

Tabla All.5. Recuento directo en placa para el Medio 63a: *Desulfotomaculum* por 27 días

Días	Suspendidas				Superficiales		
	63 ^a				63a		
	Caja Petri 1	Caja Petri 2	Caja Petri 3	Promedio	Caja Petri 1	Caja Petri 2	Caja Petri 3
1	486	334	345	388	N/C	N/C	N/C
4	509	450	488	482	N/C	N/C	N/C
5	530	I**	425	478	36	41	18
6	382	386	I**	384	18	19	I**
7	244	363	276	294	68	80	25
8	303	338	336	326	22	25	53
11	483	440	I**	462	35	9	I**
12	243	I**	202	223	4	I**	2
13	407	I**	346	377	42	I**	3
14	237	I**	226	232	39	I**	7
15	I**	252	464	358	I**	4	22
18	342	287	272	300	13	12	15
19	329	394	I**	362	24	20	I**
20	269	144	347	253	16	14	22
21	I**	I**	I**	0	I**	I**	I**
22	I**	I**	I**	0	I**	I**	I**
25	388	I**	253	321	N/C	N/C	N/C
26	87	418	I**	253	8	0	9
27	300	328	404	344	8	3	22

N/C: No contabilizada; I**: Incontable

Tabla AII.6. Recuento directo en placa para el Medio 195: *Desulfobacter* por 28 días

Días	Suspendidas				Superficiales		
	195				195		
	Caja Petri 1	Caja Petri 2	Caja Petri 3	Promedio	Caja Petri 1	Caja Petri 2	Caja Petri 3
1	0	0	0	0	0	0	0
4	686	661	497	615	3	8	17
5	355	356	389	367	25	7	3
6	327	550	372	416	49	26	7
7	197	353	227	259	0	1	3
8	455	417	444	439	37	0	0
11	374	497	415	429	2	6	7
12	232	378	356	322	28	34	16
13	525	526	418	490	1	3	15
14	462	376	597	478	N/C	N/C	N/C
15	509	541	518	523	43	1	1
18	493	473	588	518	27	10	0
19	313	657	557	509	7	16	14
20	519	424	609	517	7	24	41
21	629	791	646	689	4	6	2
22	940	556	711	736	29	13	20
25	N/C	N/C	N/C	0	N/C	N/C	N/C
26	824	853	585	754	16	14	11
27	667	668	655	663	7	1	1
28	345	684	545	525	0	4	1

N/C: No contabilizada

Tabla AII.7. Recuento directo en placa para el Medio 383: *Desulfobacterium* por 27 días

Días	Suspendidas				Superficiales		
	383				383		
	Caja Petri 1	Caja Petri 2	Caja Petri 3	Promedio	Caja Petri 1	Caja Petri 2	Caja Petri 3
1	0	0	0	0	3	4	3
2	0	6	N/C	3	1	2	N/C
5	16	8	13	12	1	0	5
6	10	11	N/C	11	4	2	N/C
7	27	20	28	25	0	2	3
8	N/C	N/C	N/C	0	N/C	N/C	N/C
9	15	20	22	19	1	1	11
12	137	104	115	119	4	20	7
13	35	55	N/C	45	8	9	N/C*
14	99	40	N/C	70	4	1	N/C
15	177	55	N/C	116	9	7	N/C
16	13	200	33	82	0	4	0
19	131	82	92	102	13	4	3
20	207	128	32	122	8	3	7
21	181	329	N/C	255	15	8	N/C
22	113	178	I**	146	2	12	I**
23	201	179	206	195	14	6	1
27	224	239	N/C	232	2	6	N/C

N/C: No contabilizada. I**: Incontable

Tabla AII.8. Recuento directo en placa para el Medio 2059: *Desulfococcus multivorans* por 27 días

Días	Superficiales				Superficiales		
	2059				2059		
	Caja Petri 1	Caja Petri 2	Caja Petri 3	Promedio	Caja Petri 1	Caja Petri 2	Caja Petri 3
1	22	26	27	25	0	1	2
4	171	107	110	129	0	0	2
5	234	338	276	283	4	0	0
6	126	142	134	134	1	1	0
7	152	235	142	176	2	0	0
8	201	195	174	190	0	3	7
11	263	280	201	248	0	24	0
12	262	254	205	240	4	7	0
13	249	240	246	245	0	0	0
14	226	294	251	257	0	0	0
15	182	297	324	268	2	12	7
18	292	231	270	264	1	4	6
19	360	285	232	292	4	4	1
20	303	244	304	284	1	0	0
21	118	178	174	157	0	0	0
22	218	349	206	258	0	0	0
26	97	240	282	206	0	3	2
27	236	258	301	265	2	2	9

Tabla AII.9. Recuento directo en placa para el Medio 63: *Desulfovibrio* (Postgate) por 27 días

Días	Suspendidas				Superficiales		
	63				63		
	Caja Petri 1	Caja Petri 2	Caja Petri 3	Promedio	Caja Petri 1	Caja Petri 2	Caja Petri 3
3	4	0	4	3	0	0	1
4	64	112	73	83	0	0	0
5	91	242	135	156	0	2	0
6	105	222	264	197	0	0	0
7	113	73	267	151	0	1	0
10	225	242	145	204	0	0	0
11	169	142	216	176	1	0	0
12	194	214	215	208	1	0	1
13	191	109	203	168	1	0	0
14	119	120	157	132	1	0	0
17	244	242	296	261	1	0	0
18	118	372	165	218	0	3	0
19	267	340	140	249	0	0	0
20	205	202	254	220	0	0	0
21	186	165	243	198	0	0	0
25	136	159	270	188	0	0	0
26	140	185	96	140	0	0	0
27	176	185	191	184	1	0	2

Tabla AII.10. Recuento directo en placa para el Medio 194: *Desulfobulbus* sp. por 27 días*

Días	Suspendidas				Superficiales		
	194				194		
	Caja Petri 1	Caja Petri 2	Caja Petri 3	Promedio	Caja Petri 1	Caja Petri 2	Caja Petri 3
1	0	0	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0	0
5	1068	3668	2664	2467	40	15	30
6	670	1026	1457	1051	65	20	36
7	2460	1090	I**	1775	20	10	I**
8	2460	1859	2714	2344	4	5	32
9	1809	2262	2880	2317	93	7	6
12	1859	1090	1960	1636	6	121	7
13	2362	420	1658	1480	5	52	3
14	2613	2060	2161	2278	9	47	49
15	1859	1859	2714	2144	0	47	9
16	2161	1407	1357	1642	93	56	6
19	2060	2211	1155	1809	13	0	0
20	653	1055	1860	1189	1	20	38
21	2261	2864	2311	2479	84	83	50
22	2311	2714	1105	2043	32	0	14
23	2311	4785	1507	2868	16	97	6
26	N/C	N/C	N/C	0	N/C	N/C	N/C
27	3920	2463	I**	3192	19	1	I**

*Conteo por aproximación. N/C: No contabilizada. I**: incontable

ANEXO III

Disposición controlada de los residuos producidos durante la investigación

En el transcurso de la experimentación que se llevó a cabo en esta investigación se produjeron distintos residuos que podrían tener un impacto directo en el ambiente. Su procedencia se muestra en la Figura AIII.1.

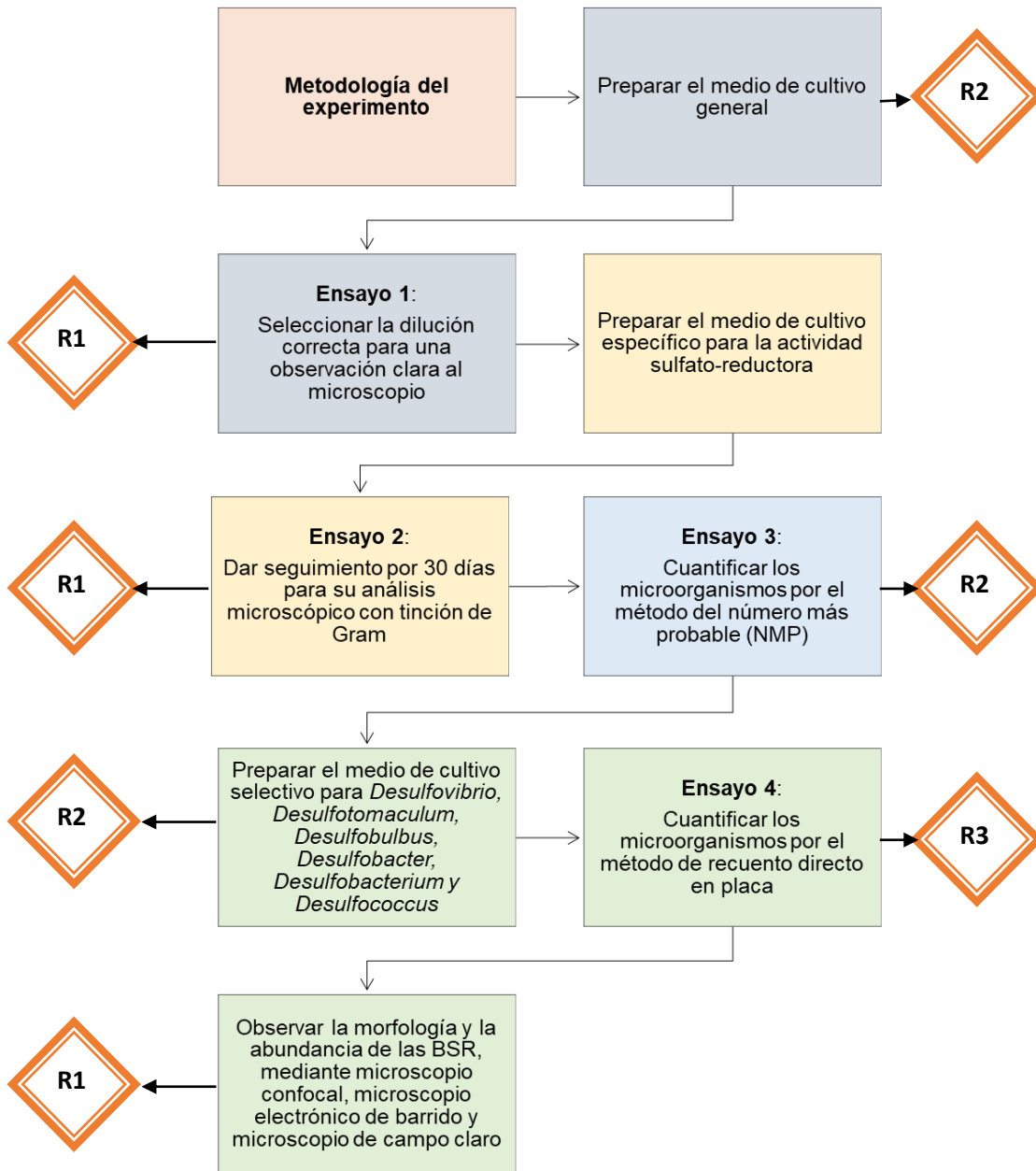


Figura AIII.1. Generación de residuos en cada etapa del experimento

Los pasos requeridos para asegurar una adecuada disposición de los residuos son los siguientes

R1: Tinción Gram. Cada uno se coloca en un recipiente de plástico bien etiquetado para ser trasladado a la Unidad de Gestión Ambiental (UGA) de la Facultad de Química para su disposición controlada.

R2: Medio de cultivo y lodos sobrantes. Estos residuos se colocan en un recipiente de vidrio para llevar a cabo su esterilización en la autoclave de 3 calores a 121°C y 1.55 kg/cm² por 20 minutos, para después verterse en el humedal que se tiene entre el Edificio E-3 donde están los laboratorios y el Circuito de la Investigación Científica ya que, al ser nutrientes, ayudan al crecimiento de las plantas.

R3: Cajas Petri. Se colocan en bolsas de residuos peligrosos sólidos biológico-infecciosos bien etiquetados para su traslado al Laboratorio 1-A, Anexo de Incubación y Esterilización, Departamento de Biología, Edificio A de la Facultad de Química para su disposición controlada.

BIBLIOGRAFÍA

- Adroer, N., Lladó, J., Bodas, J., Ruiz, J., Ramos, N., Pereira, H. 2020. Inhibición de la corrosión en circuitos cerrados de refrigeración en presencia de aluminio. *Industria Química*. (76):42-48.
https://www.adiquimica.com/wp-content/uploads/2020/03/Articulo_InhibicionCorrosion_sinanuncio.pdf
- Agrawal, A., Vanbroekhoven, K., Lal, B. 2010. Diversity of culturable sulfidogenic bacteria in two oil-water separation tanks in the north-eastern oil fields of India. *Anaerobe*. 16(1):12-18, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.04.005>.
- Albarado-Y., L., Flores-F., E. 2008. Evaluación de la coloración diferencial de fluorescencia modificada en *Pseudomonas* spp. aisladas de suelo. *Kasmera*. 36(1): 17-27.
- Alcalá, L., Betriu, C., García-Sánchez, J.E., Reig, M. 2004. 16. Bacterias Anaerobias. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
<https://www.seimc.org/documentos-cientificos/procedimientos-microbiologia/2a-edicion/page/4> 17/05/2023
- Alvarez, M.T., Crespo, C., Mattiasson, B. 2007. Precipitation of Zn (II), Cu (II), and Pb (II) at bench-scale using biogenic hydrogen sulfide from the utilization of volatile fatty acids. *Chemosphere*. 66(9):1677-1683.
- Álvarez-Márquez, D.E. 2022. Identificación de especies de microorganismos sulfato reductores (MSR) en un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA) recibiendo un efluente ácido con trazas de Pb, Zn, Cu y Fe de la operación unitaria de flotación. Tesis profesional de Ingeniería Química, Facultad de Química, UNAM. Defensa: Noviembre 25, 2022. Ciudad de México, México.
132.248.9.195/ptd2022/septiembre/0831281/Index.html

- Appels, L., Lauwers, J., Degrève, J., Helsen, L., Lievens, B., Willems, K., Van-Impe, J., Dewil, R. 2011. 'Anaerobic'² digestion in global bio-energy production: Potential and research challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 15(9):4295-4301. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.07.121>.
- Aquihuatl-Ramos, M.A., Pérez-Chabela, M.L. 2004. *Manual de Prácticas del Laboratorio de Microbiología General*. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, 118 pp. Ciudad de México, México.
- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M.A., Khurshid, M., Rasool, M.H. 2017. Proteomics: Technologies and their applications. *Journal of Chromatographic Science*. 55(2):182-196. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>.
- Atlas, R.M. 2010. *Handbook of Microbiological Media*. CRC Press Taylor and Francis Group, 4^a ed., 2036 pp. Boca Ratón, Florida, Estados Unidos.
- Atlas, R.M., Bartha, R. 2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Addison-Wesley Iberoamericana. 4a. ed. Ciudad de México, México.
- Ayangbenro, A.S., Olanrewaju, O.S., Babalola, O.O. 2018. Sulfate-reducing bacteria as an effective tool for sustainable acid mine bioremediation. *Frontiers in Microbiology*. 9:1986.
- Azabou, S., Mechichi, T., Sayadi, S. 2007. Zinc precipitation by heavy-metal tolerant sulfate-reducing bacteria enriched on phosphogypsum as a sulfate source. *Minerals Engineering*. 20(2):173-178.
- Backer, L.C. 2000. Assessing the acute gastrointestinal effects of ingesting naturally occurring, high levels of sulfate in drinking water. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 37(4):389-400.
- Bak, F., Pfennig, N. 1991. Sulfate-reducing bacteria in littoral sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiology Letters*. 85(1):43-52.
- Balintova, M., Demcak, S., Holub, M. 2015. Precipitation and bacterial sulphate removal from mine water-sulphate reduction. In *Advances and Trends in Engineering Sciences and Technologies: Proceedings of the International Conference on*

² *Anaerobic* en inglés o anaerobio en español es un adjetivo que implica que no hay oxígeno molecular como en el aire (alfa privativa, *aero*=aire y *bios*=vida). La digestión, como se dio su definición en el glosario, es un término dado a un proceso en condiciones anaerobias en el organismo normalmente de mamíferos y extendido por los(as) químicos(as) a reacciones anaerobias en el laboratorio. Por ello, es un pleonasma adicionar el adjetivo anaerobio a la digestión (nota de la asesora)

- Engineering Sciences and Technologies. May 27-29, 2015, Tatranské Matliare, High Tatras Mountains-Slovak Republic. P. 239. CRC Press. Estados Unidos.
- Bernatchez, S., Anoop, V., Saikali, Z., Breton, M. 2018. A microbial identification framework for risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*. 116:60-65. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.040>
- Bologo, V., Maree, J.P., Louw, W.J. 2010. Treatment of mine water for sulphate and metal removal using magnesium hydroxide and barium hydroxide. Water Institute of South Africa. file:///C:/Users/Dra%20Duran/Downloads/WISA2010-P011.pdf
- Brandt, K.K., Ingvorsen, K. 1997. *Desulfobacter halotolerans* sp. nov., a halotolerant acetate-oxidizing sulfate-reducing bacterium isolated from sediments of Great Salt Lake, Utah. *Systematic and Applied Microbiology*. 20(3):366-373. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(97\)80004-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(97)80004-5)
- Brewis, I., Brennan, P. 2010. Proteomics technologies for the global identification and quantification of proteins. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 80(10):1-44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381264-3.00001-1>
- Brysch, K., Schneider, C., Fuchs, G., Widdel, F. 1987. Lithoautotrophic growth of sulfate-reducing bacteria, and description of *Desulfobacterium autotrophicum* gen. nov., sp. nov. *Archives of Microbiology*. 148:264-274. <https://doi.org/10.1007/BF00456703>
- Buisman, C.J.N., Lettinga, G. 1990. Sulphide removal from anaerobic waste treatment effluent of a papermill. *Water Research*. 24(3):313-319. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(90\)90006-R](https://doi.org/10.1016/0043-1354(90)90006-R)
- Cabrera-Revuelta, G. 2005. Estudio de procesos para la solubilización y precipitación de iones metálicos contaminantes mediante bacterias azufre-oxidantes y sulfato-reductoras. Tesis, Universidad de Cádiz, Facultad de Ciencias, Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente. Cádiz, España.
- Calixto-Cano, K.L. 2019. Caracterización química del efluente líquido proveniente del proceso de flotación de una planta minera sometido a un tratamiento biológico mediante un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA). Tesis Profesional de Ingeniería Química. Facultad de Química, UNAM. Defensa: Febrero 25, 2019. Ciudad de México, México.

<http://132.248.9.195/ptd2019/febrero/0785179/Index.html>

- Castillo-Félix, M.A. 2016. Bioprecipitación de metales pesados en un reactor de lecho de lodos anaerobios de flujo ascendente (*UASB*). Tesis Profesional de Ingeniería Química. División de Ingeniería, Universidad de Sonora. Defensa: Octubre 14, 2016. Hermosillo, Sonora, México. <http://hdl.handle.net/20.500.12984/1823>
- Chacón-Garza, L.E, Villarreal-Sánchez, J.A., Villarreal-López, J.L. 2012. Comparación de dos modos de número más probable (NMP) con la cuenta viable en placa (CVP) y evaluación de la calidad del agua de la ciudad de Saltillo, Coahuila. Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.
- Chockalingam, E., Sivapriya, K., Subramanian, S., Chandrasekaran, S. 2005. Rice husk filtrate as a nutrient medium for the growth of *Desulfotomaculum nigrificans*: Characterisation and sulfate reduction studies. *Bioresource Technology*. 96(17): 1880-1888. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.032>
- Coetzer, G., du-Preez, H.S., Bredenhann, R. 2003. Influence of water resources and metal ions on galena flotation of Rosh Pinah ore. *Journal of the Southern African Institute of Mining and Metallurgy*. 103(3):193-207.
- CONAGUA. 2019. Estadísticas del Agua en México 2019. Comisión Nacional del Agua. <https://www.gob.mx/conagua/acciones-y-programas/publicaciones-estadisticas-y-geograficas-60692>
- CONAGUA. 2018. Atlas del agua en México Edición 2018. Comisión Nacional del agua. <https://files.conagua.gob.mx/conagua/publicaciones/Publicaciones/AAM2018.pdf>
- Costa, J.M., Rodriguez, R.P., Sancinetti, G.P. 2017. Removal sulfate and metals Fe^{+2} , Cu^{+2} , and Zn^{+2} from acid mine drainage in an anaerobic sequential batch reactor. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 5(2):1985-1989.
- Costa, J.M., Rodriguez, R.P., Sancinetti, G.P. 2019. Anaerobic batch reactor treating acid mine drainage: Kinetic stability on sulfate and COD removal. *Journal of Water Process Engineering*. 31: 100825.
- Costa, R.B., Godoi, L.A.G., Braga, A.F.M., Delforno, T.P., Bevilaqua, D. 2021. Sulfate removal rate and metal recovery as settling precipitates in bioreactors: Influence of electron donors. *Journal of Hazardous Materials*. 403: 123622.

- de-Godoi, L.A.G., dos-Santos, C.E.D., Foresti, E., Damianovic, M.H.R.Z. 2017b. Evaluating and refining alkalinity calculations due to sulfide and bicarbonate accessed by titration in anaerobic sulfate-reducing bioreactors. *Water, Air, & Soil Pollution*. 228(9):1-12.
- de-Godoi, L.A.G., Foresti, E., Damianovic, M.H.R.Z. 2017a. Down-flow fixed-structured bed reactor: An innovative reactor configuration applied to acid mine drainage treatment and metal recovery. *Journal of Environmental Management*. 197:597-604.
- Deo, N., Natarajan, K. A. 1998. Studies on interaction of *Paenibacillus polymyxa* with iron ore minerals in relation to beneficiation. *International Journal of Mineral Processing*. 55(1):41-60.
- DOF. 1994a. Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable. Diario Oficial de la Federación. Poder Ejecutivo Federal. Estados Unidos Mexicanos.
- DOF. 1994b. NORMA Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Diario Oficial de la Federación. Poder Ejecutivo Federal. Estados Unidos Mexicanos.
- DOF. 1994c. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Diario Oficial de la Federación. Poder Ejecutivo Federal. Estados Unidos Mexicanos.
- DOF. 2009. DIARIO OFICIAL (Primera Sección). Modificación del inciso 0, el encabezado de la Tabla 13, el último párrafo del Anexo B y el apartado Signo decimal de la Tabla 21 de la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema general de unidades de medida. CUARTO. - Se modifica el encabezado de la Tabla 13 para quedar como sigue: Tabla 21 - Reglas para la escritura de los números y su signo decimal. Signo decimal. El signo decimal debe ser una coma sobre la línea (,) o un punto sobre la línea (.). Si la magnitud de un número es menor que la unidad, el signo decimal debe ser precedido por un cero. Diario Oficial de la Federación: Jueves 24 de septiembre de 2009. Poder Ejecutivo Federal. Estados Unidos Mexicanos.
- DOF. 2015. Norma Mexicana NMX-AA-042-SCFI-2015. Análisis de Agua - Enumeración de Organismos Coliformes Totales, Organismos Coliformes Fecales (Termotolerantes) y *Escherichia coli* – Método del Número más Probable en Tubos

Múltiples (Cancela a la NMX-AA-42-1987). Secretaría de Economía. Diario Oficial de la Federación, 18 de abril de 2016. Poder Ejecutivo Federal. Estados Unidos Mexicanos.

Dordević, D., Jančíková, S., Vítězová, M., Kushkevych, I. 2021. Hydrogen sulfide toxicity in the gut environment: Meta-analysis of sulfate-reducing and lactic acid bacteria in inflammatory processes. *Journal of Advanced Research*. 27:55-69.

<https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.003>

DSMZ. 2022. List of media for microorganisms. Leibniz Institute, DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH.

<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/microorganisms/culture-technology/list-of-media-for-microorganisms> 24/06/2022

Dutta, P.K., Rabaey, K., Yuan, Z., Rozendal, R.A., Keller, J. 2010. Electrochemical sulfide removal and recovery from paper mill anaerobic treatment effluent. *Water Research*. 44(8):2563-2571.

Escobar-Restrepo, M.C. 2015. Evaluación de bacterias sulfato reductoras presentes en reactores pasivos durante la remediación de drenajes ácidos de minas. Tesis para optar por el título de Magister en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. 115 pp. Bogotá, D.C., Colombia.

<https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/20631>

Espinosa-González, T. 2014. Reducción del contenido de sulfatos en aguas residuales usando un sistema de laboratorio que simula un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología experimental). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Defensa: Enero 9, 2015. 145 pp. Ciudad de México, México.

Fernando, W.A.M., Ilankoon, I.M.S.K., Syed, T.H., Yellishetty, M. 2018. Challenges and opportunities in the removal of sulphate ions in contaminated mine water: A review. *Minerals Engineering*. 117:74-90.

Flor-Cevallos, D.E. 2012. Estudio de factibilidad del diseño de un sistema biológico-físico-químico (BFQ) para el tratamiento de drenajes ácidos de mina a escala laboratorio. Tesis profesional. Repositorio Universidad San Francisco de Quito. Quito, Ecuador. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/1875>

- Fu, Q., Wei, B., Xu, J., Qin, Q., Bai, Y., Yu, C., Sun, C. 2023. Corrosion mechanism of *Pseudomonas stutzeri* on X80 steel subjected to *Desulfovibrio desulfuricans* under elastic stress and yield stress. *Corrosion Science*. 216: 111084.
<https://doi.org/10.1016/j.corsci.2023.111084>
- Galushko, A., Kuever, J. 2019. *Desulfobulbus*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Trujillo, M.E., Dedysh, S., DeVos, P., Hedlund, B., Kämpfer, P., Rainey, F.A., Whitman, W.B., eds. Published by John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01023.pub2>
- García, V., Häyrynen, P., Landaburu-Aguirre, J., Pirilä, M., Keiski, R.L., Urtiaga, A. 2014. Purification techniques for the recovery of valuable compounds from acid mine drainage and cyanide tailings: application of green engineering principles. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 89(6):803-813.
- Gaylarde, C., Cook, P. 1990. New rapid methods for the identification of sulphate-reducing bacteria. *International Biodeterioration*. 26(5):337-345.
- González-Sandoval, M.R. 2010. Procesos de oxidación de sulfuros en una presa de jales. 2010. Tesis Doctoral. Tesis de doctorado en Ingeniería (Ingeniería Química, Procesos). Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería de la UNAM. Facultad de Química. Defensa: Noviembre 30, 2010. Ciudad de México, México.
http://132.248.9.195/ptb2010/junio/0659293/0659293_A1.pdf
- Hagenauer, A., Hippe, H., Rainey, F. A. 1997. *Desulfotomaculum aeronauticum* sp. nov., a sporeforming, thiosulfate-reducing bacterium from corroded aluminium alloy in an aircraft. *Systematic and Applied Microbiology*. 20(1): 65-71.
[https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(97\)80049-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(97)80049-5)
- Heijthuijsen, J.H.F.G., Hansen, T.A. 1989. Anaerobic degradation of betaine by marine *Desulfobacterium* strains. *Archives of Microbiology*. 152:393-396.
<https://doi.org/10.1007/BF00425179>
- Hippe, H., Hagenauer, A., Kroppenstedt, R.M. 1997. Menadione requirement for sulfate-reduction in *Desulfotomaculum aeronauticum*, and emended species description. *Systematic and Applied Microbiology*. 20(4):554-558. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(97\)80026-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(97)80026-4)

- Huisman, J.L., Schouten, G., Schultz, C. 2006. Biologically produced sulphide for purification of process streams, effluent treatment and recovery of metals in the metal and mining industry. *Hydrometallurgy*. 83(1-4):106-113.
<https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.03.017>
- Hwang, S.K., Jho, E.H. 2018. Heavy metal and sulfate removal from sulfate-rich synthetic mine drainages using sulfate reducing bacteria. *Science of the Total Environment*. 635:1308-1316. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.231>
- Iakovleva, E., Mäkilä, E., Salonen, J., Sitarz, M., Wang, S., Sillanpää, M. 2015. Acid mine drainage (AMD) treatment: Neutralization and toxic elements removal with unmodified and modified limestone. *Ecological Engineering*. 81:30-40.
- Ido, A., Kaneta, M. 2020. Fish oil and fish meal production from urban fisheries biomass in Japan. *Sustainability*. 12(8):3345.
- Jain, M., Khan, S.A., Pandey, A., Pant, K.K., Ziora, Z.M., Blaskovich, M.A. 2021. Instructive analysis of engineered carbon materials for potential application in water and wastewater treatment. *Science of The Total Environment*. 148583.
- Janssen, A.J.H., Lettinga, G.D., de-Keizer, A. 1999. Removal of hydrogen sulphide from wastewater and waste gases by biological conversion to elemental sulphur: Colloidal and interfacial aspects of biologically produced sulphur particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 151(1-2):389-397.
- Janssen, P.H., Schnik, B. 1995. Catabolic and anabolic enzyme activities and energetics of acetone metabolism of the sulfate-reducing bacterium *Desulfococcus biacutus*. *Journal of Bacteriology*. 177(2):277-282.
<https://doi.org/10.1128/jb.177.2.277-282.1995>
- Johnson, D.B., Hallberg, K.B. 2003. The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology*. 154(7):466-473.
- Jong, T., Parry, D.L. 2006. Microbial sulfate reduction under sequentially acidic conditions in an upflow anaerobic packed bed bioreactor. *Water Research*. 40(13): 2561-2571.
- Kaksonen, A.H., Riekkola-Vanhanen, M.L., Puhakka, J.A. 2003. Optimization of metal sulphide precipitation in fluidized-bed treatment of acidic wastewater. *Water Research*. 37(2): 255-266. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00267-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00267-1)

- Kamali, F., Eskandari, M.M., Rashidi, A., Baghalha, M., Hassanisadi, M., Hamzehlouyan, T. 2019. Nanorod carbon nitride as a carbo catalyst for selective oxidation of hydrogen sulfide to sulfur. *Journal of Hazardous Materials*. 364:218-226.
- Karlsson, R., Gonzales-Siles, L., Boulund, F., Svensson-Stadler, L., Skovbjerg, S., Karlsson, A., Davidson, M., Hulthe, S., Kristiansson, E., Moore, E. 2015. Proteotyping: Proteomic characterization, classification, and identification of microorganisms - A prospectus. *Systematic and Applied Microbiology*. 38(4):246-257. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.006>
- Kiran, M.G., Pakshirajan, K., Das, G. 2017. Heavy metal removal from multicomponent system by sulfate reducing bacteria: Mechanism and cell surface characterization. *Journal of Hazardous Materials*. 324:62-70.
- Kushkevych, I., Hýžová, B., Vítězová, M., Rittmann, S.K.-M.R. 2021. Microscopic methods for identification of sulfate-reducing bacteria from various habitats. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(8): 4007. <https://doi.org/10.3390/ijms22084007>
- Lau, S.K.P., Teng, J.L.L., Ho, C.C., Woo, P.C.Y. 2015. Gene amplification and sequencing for bacterial identification. In *Methods in Microbiology*. Vol. 42. Elsevier Ltd. 1st ed. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2015.04.003>
- Leal-Gutiérrez, M.J. 2021. Biotransformación de sulfatos a sulfuros a escala de laboratorio en un reactor de lecho de lodos de flujo ascendente: Análisis termodinámico empleando exergía. Tesis de Maestría en Ingeniería (Ingeniería Química, Procesos). Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería de la UNAM. Facultad de Química. Defensa: Octubre 8, 2021. Ciudad de México, México. <http://132.248.9.195/ptd2021/agosto/0814227/Index.html>
- Lens, P.N.L., Visser, A., Janssen, A.J.H., Pol, L.H., Lettinga, G. 1998. Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 28(1):41-88.
- Lettinga, G., van Velsen, A.F.M., Hobma, S.W., de-Zeeuw, W., Klapwijk, A. 1980. Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnology and Bioengineering*. 22(4):699-734. <https://doi.org/10.1002/bit.260220402>

- Levay, G., Smart, R.S.C., Skinner, W.M. 2001. The impact of water quality on flotation performance. *Journal of the South African Institute of Mining and Metallurgy (South Africa)*. 101(2):69-75.
- Li, J., Liu, P., Menguy, N., Benzerara, K., Bai, J., Zhao, X., Leroy, E., Zhang, C., Zhang, H., Liu, J., Zhang, R., Zhu, K., Roberts, A.P., Pan, Y. 2022. Identification of sulfate-reducing magnetotactic bacteria via a group-specific 16S rDNA primer and correlative fluorescence and electron microscopy: Strategy for culture-independent study. *Environmental Microbiology*. 24(11):5019-5038.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.16109>
- Lin, J., Zuo, J., Ji, R., Chen, X., Liu, F., Wang, K., Yang, Y. 2012. Methanogenic community dynamics in anaerobic co-digestion of fruit and vegetable waste and food waste. *Journal of Environmental Sciences (China)*. 24(7): 1288-1294.
[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)60927-3](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60927-3)
- Liu, W., Moran, C.J., Vink, S. 2013. A review of the effect of water quality on flotation. *Minerals Engineering*. 53:91-100.
- Llano, M. 2016. Concesiones de agua para las mineras. Heinrich-Böll-Stiftung (Fundación Heinrich-Böll de Alemania). Ciudad de México. México y el Caribe.
<https://mx.boell.org/es/2016/02/17/concesiones-de-agua-para-las-mineras>
- Lu, X., Ni, J., Zhen, G., Kubota, K., Li, Y. 2018. Response of morphology and microbial community structure of granules to influent COD/SO₄²⁻ ratios in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating starch wastewater. *Bioresource Technology*. 256:456-465. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.055>
- Luptakova, A., Kusnierova, M. 2005. Bioremediation of acid mine drainage contaminated by SRB. *Hydrometallurgy*. 77(1-2):97-102.
- Lutandula, M.S., Mwana, K.N. 2014. Perturbations from the recycled water chemical components on flotation of oxidized ores of copper—The case of bicarbonate ions. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2(1):190-198.
- Machaca, M., Bodean, M.L., Montaña, S., García, S.D., Stecher, D., Vay, C.A., Almuzara, M.N. 2022. Descripción de un caso de sepsis abdominal por *Desulfovibrio desulfuricans*. *Revista Argentina de Microbiología*. 54(4):314-317.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.05.002>

- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A. 2015. BROCK. Biología de los microorganismos. Pearson Educación, S.A., 14ª ed., 1136 pp. Madrid, España.
- Martins, M., Faleiro, M.L., Silva, G., Chaves, S., Tenreiro, R., Costa, M.C. 2011. Dynamics of bacterial community in up-flow anaerobic packed bed system for acid mine drainage treatment using wine wastes as carbon source. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 65(1):78-84.
- Molina-Aguirre, G.E., Sandoval-Pauker, C.F. 2016. Estudio de la degradación fotocatalítica de colorantes azoicos con el uso de dióxido de titanio (TiO₂) y óxido de zinc (ZnO) inmovilizados en soportes poliméricos. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Escuela Politécnica Nacional. Quito, Ecuador.
- Mora, E., Magalhaes-Baltar, C., Pinos, V., Benachour, M. 2018. Remoción de plomo de un efluente sintético vía flotación iónica utilizando xantato. *Maskana*. 9(1):31-39. <https://doi.org/10.18537/mskn.09.01.04>
- Muzenda, E. 2010. An investigation into the effect of water quality on flotation performance. *World Acad. Sci. Eng. Technol*. 69:237-241.
- Nagpal, S., Chuichulcherm, S., Livingston, A., Peeva, L. 2000. Ethanol utilization by sulfate-reducing bacteria: An experimental and modeling study. *Biotechnology and Bioengineering*. 70(5):533-543.
- Nie, W., Ding, J., Xie, G., Tan, X., Lu, Y., Peng, L., Liu, B., Xing, D., Yuan, Z., Ren, N. 2021. Simultaneous nitrate and sulfate dependent anaerobic oxidation of methane linking carbon, nitrogen and sulfur cycles. *Water Research*. 194: 116928. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116928>
- Nina-Chambe, M. 2008. Evaluación de los métodos químico y biogénico para el tratamiento de drenaje ácido de mina a escala de laboratorio. Caso: Mina Cerro de Pasco. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 105 pp. Lima, Perú. <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/802>
- Ortiz-Reyes, T. 2020. Tratamiento de un suelo contaminado con escorias de plomo, mediante las técnicas de lavado y encapsulamiento. Tesis de Maestría, Universidad

Autónoma Metropolitana (México). Unidad Azcapotzalco. 92 pp. Coordinación de Servicios de Información.

[http://zaloamati.azc.uam.mx/bitstream/handle/11191/7181/Tratamiento de un suelo contaminado Ortiz Reyes T 2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://zaloamati.azc.uam.mx/bitstream/handle/11191/7181/Tratamiento_de_un_suelo_contaminado_Ortiz_Reyes_T_2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Pacheco-Gutiérrez, L.A. 2006. Propuesta de reaprovechamiento integral del agua de proceso de una empresa minera empleando sistemas biológicos anaerobios. Ciudad de México, México. Tesis de Maestría en Ingeniería (Ingeniería Química, Procesos). Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería de la UNAM. Facultad de Química. Defensa: Junio 30, 2006. Ciudad de México, México.

<http://132.248.9.195/pd2006/0606818/0606818.pdf>

Palomino-Cadenas, E.J. 2007. Sistemas de humedales para la biorremediación de drenajes ácidos de mina o roca en Ancash - Perú. Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias Ambientales. Universidad Nacional de Trujillo, Escuela de Postgrado, Programa Doctoral en Ciencias Ambientales. 97 pp. Trujillo, Perú.

<https://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/5359>

Pedrozo-Acuña, A. 2022. La minería y su consumo de agua. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. DOI: 10.24850/b-imta-perspectivas-2022-32

Pérez, N., Schwarz, A., Urrutia, H. 2017. Tratamiento del drenaje ácido de minas: estudio de reducción de sulfato en mezclas orgánicas. Tecnología y Ciencias del Agua. 8(1):53-64. <https://doi.org/10.24850/j-tyca-2017-01-04>

Pichtel, J., Bradway, D.J. 2008. Conventional crops and organic amendments for Pb, Cd and Zn treatment at a severely contaminated site. Bioresource Technology. 99(5):1242-1251.

Poblete-Mier, C.A. 2015. Arranque y operación de un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA) para el tratamiento de un efluente proveniente del proceso de flotación de una planta minera. Tesis Profesional de Ingeniería Química. Facultad de Química, UNAM. Defensa: Noviembre 30. Ciudad de México, México. <http://132.248.9.195/ptd2015/noviembre/0738039/Index.html>

Poot-Hernández, A.C., Rincón-Heredia, R. 2022. Microscopio confocal: Consideraciones prácticas para adquirir imágenes de buena calidad. Memoria del XLIX Taller

de Actualización Bioquímica. Facultad de Medicina, UNAM. Ciudad de México, México.

Predari, S.C., de-Paulis, A.N., Bertona, E., Guevara-Núñez, D., Suárez, J.P., Castello, L. 2017. *Anaerobiospirillum succiniciproducens* y *Desulfovibrio desulfuricans* en 2 casos de bacteriemias insidiosas. Revista Argentina de Microbiología. 49(2):146-152. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.12.008>

Prior, T., Giurco, D., Mudd, G., Mason, L., Behrisch, J. 2012. Resource depletion, peak minerals, and the implications for sustainable resource management. Global Environmental Change. 22(3):577-587. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2011.08.009>.

Quiahua-Salvador, G. 2023. Estudio de la reducción del contenido de sulfatos, SO_4^- , a sulfuros sobre la precipitación de metales del efluente líquido de la etapa de flotación de una planta minera en un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA). Tesis Profesional de Ingeniería Química. Facultad de Química, UNAM. Defensa: Agosto 03, 2023. Ciudad de México, México. <http://132.248.9.195/ptd2023/julio/0843358/Index.html>

Quiroga-Flores, R. 2015. Procesos de bioprecipitación de metales pesados y bio-reducción de hierro (III) para el tratamiento de aguas ácidas de minas a escala laboratorio. Tesis para obtener el grado de *Magister Scientiarum* en Ciencias Biológicas y Biomédicas, Mención Biotecnología. Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas, Instituto de Investigaciones Farmaco-Bioquímicas 'Luis Enrique Terrazas Siles'. 180 pp. La Paz, Bolivia. <https://repositorio.umsa.bo/handle/123456789/17429>

Rao, S.R., Finch, J.A. 1989. A review of water re-use in flotation. Minerals Engineering. 2(1):65-85.

Ramírez-Gama, R.M., Urzúa-Hernández, M.C., Camacho-Cruz, A., Tsuzuki-Reyes, G., Esquivel-Cote, R. 2015. Técnicas básicas de microbiología y su fundamento. Trillas. Ciudad de México, México.

- Rodríguez-Gómez, B.E. 1999. Fisiología, bioquímica y ecología de bacterias sulfato reductoras. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. 53 pp. Ciudad de México, México.
- Rodríguez-Mejía, M.L. 2012. Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas (3^a ed.). Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Texcoco, México.
- Rodríguez-Martínez, C., Zhurbenko, R. 2018. Manual de Medios de Cultivo (4.^a ed.). Centro Nacional de Biopreparados, 357 pp. Mayabeque, Cuba.
- Rojas-Torreblanca, F. 2023. Comparación del desempeño de dos reactores anaerobios de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA) para la transformación de sulfatos a sulfuros usando microorganismos sulfato-reductores a nivel de laboratorio. Tesis de Maestría en Ingeniería (Campo del Conocimiento: Ingeniería Ambiental, Campo Disciplinario: Procesos). Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería. UNAM. Defensa: Agosto 4, 2023. Ciudad de México, México.
- Rooney-Varga, J.N., Sharak-Genthner, B.R., Devereux, R., Willis, S.G., Friedman, S.D., Hines, M.E. 1998. Phylogenetic and physiological diversity of sulphate-reducing bacteria isolated from a salt marsh sediment. *Systematic and Applied Microbiology*. 21(4):557-568. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(98\)80068-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(98)80068-4)
- Sahinkaya, E., Gungor, M. 2010. Comparison of sulfidogenic up-flow and down-flow fluidized-bed reactors for the biotreatment of acidic metal-containing wastewater. *Bioresource Technology*. 101(24):9508-9514.
- Sahinkaya, E., Yurtsever, A., Toker, Y., Elcik, H., Cakmaci, M., Kaksonen, A.H. 2015. Biotreatment of As-containing simulated acid mine drainage using laboratory scale sulfate reducing upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Minerals Engineering*. 75:133-139. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mineng.2014.08.012>
- Saleh, H.S., Hassan, A.I. 2024. Innovative sustainable technologies for biocorrosion inhibitors in oil and gas fields. *Encyclopedia of Solid-Liquid Interfaces*. First Edition, pp. 624-634. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85669-0.00032-5>
- Salgado-Bernal, I., Carballo-Valdés, M.E., Martínez-Sardiñas, A., Cruz-Arias, M., Durán-Domínguez, C. 2012. Interacción de aislados bacterianos rizosféricos con metales de importancia ambiental. *Revista Tecnología y Ciencias del Agua*. 3(3):83-95.

- Samain, E., Dubourguier, H.C., Albagnac, G. 1984. Isolation and characterization of *Desulfobulbus elongatus* sp. nov. from a mesophilic industrial digester. Systematic and Applied Microbiology. 5(3):391-401.
[https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(84\)80040-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(84)80040-5)
- Sandenbergh, R.F., Wei, Y. 2007. The influence of water quality on the flotation of the Rosh Pinah Complex lead-zinc sulfides. In The 4th Southern African Conference on Base Metals. The S. Afr. Inst. Min. Metall. Pp. 45-55. South Africa.
- Sandle, T. 2016. Microbial identification. Pharmaceutical Microbiology. Essentials for Quality Assurance and Quality Control. Pp. 103-113. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100022-9.00009-8>
- Sarti, A., Pozzi, E., Chinalia, F.A., Ono, A., Foresti, E. 2010. Microbial processes and bacterial populations associated to anaerobic treatment of sulfate-rich wastewater. Process Biochemistry. 45(2):164-170.
- Searmsirimongkol, P., Rangsunvigit, P., Leethochawalit, M., Chavadej, S. 2011. Hydrogen production from alcohol distillery wastewater containing high potassium and sulfate using an anaerobic sequencing batch reactor. International Journal of Hydrogen Energy. 36(20):12810-12821.
- Shen, Y., Voordouw, G. 2015. Primers for *dsr* genes and most probable number method for detection of sulfate-reducing bacteria in oil reservoirs. In: Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols. McGenity, T., Timmis, K., Nogales, B., eds. Springer Protocols Handbooks. Springer, Berlin, Heidelberg, República Federal de Alemania.
https://doi.org/10.1007/8623_2015_72
- Shengo, L.M., Gaydardzhiev, S., Kalenga, N.M. 2014. Assessment of water quality effects on flotation of copper-cobalt oxide ore. Minerals Engineering. 65:145-148.
- Shin, H.S., Oh, S.E., Lee, C.Y. 1997. Influence of sulfur compounds and heavy metals on the methanization of tannery wastewater. Water Science and Technology. 35(8):239-245.
- Sloan, A., Wang, G., Cheng, K. 2017. Traditional approaches versus mass spectrometry in bacterial identification and typing. Clinica Chimica Acta. 473:180-185.

- Tabak, H.H., Scharp, R., Burckle, J., Kawahara, F.K., Govind, R. 2003. Advances in biotreatment of acid mine drainage and biorecovery of metals: 1. Metal precipitation for recovery and recycle. *Biodegradation*. 14(6):423-436.
<https://link.springer.com/content/pdf/10.1023/A:1027332902740.pdf>
- Tong, K., Zhang, Y., Chu, P.K. 2013. Evaluation of calcium chloride for synergistic demulsification of super heavy oil wastewater. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 419:46-52.
- Torbaghan, M.E., Torghabeh, G.H.K. 2019. Biological removal of iron and sulfate from synthetic wastewater of cotton delinting factory by using halophilic sulfate-reducing bacteria. *Heliyon*. 5(12): e02948.
- Toscano-Pérez, D. 2012. Estudio de la diversidad filogenética de arqueas metanogénicas en tres reactores tipo RALLFA operando a 45, 55 y 65°C para el tratamiento de vinazas. Tesis profesional de Química Farmacéutica Biológica. Facultad de Química, UNAM. Defensa: Diciembre 4. 110 pp. Ciudad de México, México.
- US EPA. 2017. Secondary Drinking Water Standards: Guidance for Nuisance Chemicals. <https://www.epa.gov/sdwa/secondary-drinking-water-standards-guidance- nuisance-chemicals>
- Van Houten, B., Woshner, V., Santos, J.H. 2006. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair*. 5(2):145-152.
- Van Houten, R.T., Elferink, S.J.O., van Hamel, S.E., Pol, L.W.H., Lettinga, G. 1995. Sulphate reduction by aggregates of sulphate-reducing bacteria and homo-acetogenic bacteria in a lab-scale gas-lift reactor. *Bioresource Technology*. 54(1):73-79.
- Van Houten, R.T., Pol, L.W.H., Lettinga, G. 1994. Biological sulphate reduction using gas-lift reactors fed with hydrogen and carbon dioxide as energy and carbon source. *Biotechnology and Bioengineering*. 44(5):586-594.
- Vargas-Prieto, J.P. 2016. Evaluación preliminar de la presencia de bacterias sulfato reductoras con capacidad de metilar mercurio en la Quebrada La Porquera, de la Localidad de Ciudad Bolívar, Bogotá. Tesis de Maestría en Ciencias – Microbiología

(Campo del Conocimiento: Microbiología Ambiental). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

- Veeken, A.H., Akoto, L., Pol, L.W.H., Weijma, J. 2003. Control of the sulfide (S^{2-}) concentration for optimal zinc removal by sulfide precipitation in a continuously stirred tank reactor. *Water Research*. 37(15):3709-3717. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00262-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00262-8)
- Ventorino, V., Romano, I., Pagliano, G., Robertiello, A., Pepe, O. 2018. Pre-treatment and inoculum affect the microbial community structure and enhance the biogas reactor performance in a pilot-scale biodigestion of municipal solid waste. *Waste Management*. 73:69-77. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.12.005>
- Vergara-Salgado, S. 2010. Identificación de bacterias metanogénicas y sulfato-reductoras en tres reactores de lecho de lodo de flujo ascendente (RALLFA) operando a 45, 55 y 65°C. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. 96 pp. Ciudad de México, México.
- Verla, A.W., Verla, E.N., Adowei, P., Briggs, A., Horsfall Jnr, M. 2014. Quality assessment of vegetable oil industry effluents in Port Harcourt, Rivers State, Nigeria. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*. 14:179-189.
- Virpiranta, H., Sotaniemi, V.H., Leiviskä, T., Taskila, S., Rämö, J., Johnson, D.B., Tanskanen, J. 2022. Continuous removal of sulfate and metals from acidic mining-impacted waters at low temperature using a sulfate-reducing bacterial consortium. *Chemical Engineering Journal*. 427:132050.
- Visser, A. 1995. The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. Doctoral dissertation. Wageningen University, Países Bajos.
<https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/200073>
- Wargin, A., Olańczuk-Neyman, K., Skucha, M. 2007. Sulphate-Reducing bacteria. Their properties and methods of elimination from groundwater. *Polish Journal of Environmental Studies*. 16(4):639-644.
- Watanabe, M., Fukui, M., Kuever, J. 2020. *Desulfotomaculum*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–6. Published by John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.

<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00661.pub2>

- Weijma, J., Gubbels, F., Hulshoff Pol, L.W., Stams, A.J.M., Lens, P., Lettinga, G. 2002. Competition for H₂ between sulfate reducers, methanogens, and homoacetogens in a gas-lift reactor. *Water Science and Technology*. 45(10):75-80.
- Xu, Z., Zhang, T., Wan, H., Liu, H., Gu, T., Liu, H. 2023. Accelerated development of Ti-6Al-4V microbial corrosion triggered by electroactive sulfate-reducing *Desulfovibrio ferrophilus* biofilm in enriched artificial seawater containing soluble electron shuttle. *Corrosion Science*. 220: 111306. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2023.111306>
- Younger, P.L., Banwart, S.A., Hedin, R.S. 2002. Mine water hydrology, pollution, remediation. Springer Science+ Business Media, B.V. <https://doi.org/10.1007/978-94-010-0610-1>
- Zamora, A.C., Malaver, N. 2012. Methodological aspects for the culture and quantification of heterotrophic sulfate-reducing bacteria. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 32(2):121-125.
- Zellner, G., Busmann, A., Rainey, F.A., Diekmann, H. 1996. A syntrophic propionate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium from a fluidized bed reactor. *Systematic and Applied Microbiology*. 19(3):414-420. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(96\)80071-3](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(96)80071-3)
- Zhang, C., Jeong, C.B., Lee, J.S., Wang, D., Wang, M. 2019. Transgenerational proteome plasticity in resilience of a marine copepod in response to environmentally relevant concentrations of microplastics. *Environmental Science & Technology*. 53(14):8426-8436.
- Zhu, Q., Hu, Z., Ruan, M. 2020. Characteristics of sulfate-reducing bacteria and organic bactericides and their potential to mitigate pollution caused by coal gangue acidification. *Environmental Technology & Innovation*. 20: 101142. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101142>.