

UCH-FC  
B. Ambiental  
S1620  
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE PREGRADO

## Aislamiento de bacterias fotoanoxigénicas con potencial aplicación para la purificación de biogás

Seminario de Título

entregado a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al título de

Biólogo con mención en Medio Ambiente

Camila Pía Saldías Ruiz

Abril 2013

Santiago-Chile

Directora del Seminario de Título: Dra. Margarita Carú

Co-Directora del Seminario de Título: Dra. Julieta Orlando



### INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Camila Pía Saldías Ruiz

#### **“Aislamiento de bacterias fotoanoxigénicas con potencial aplicación para la purificación de biogás”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Biólogo con mención en Medio Ambiente.

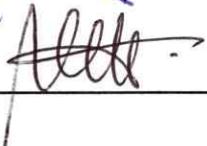
*Dra. Margarita Carú*  
**Directora Seminario de Título**

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  


*Dra. Julieta Orlando*  
**Co-Directora Seminario de Título**

#### **Comisión de Evaluación**

*Dr. Marcelo Baeza*  
**Presidente Comisión**

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_

*Dra. María Teresa Varnero*  
**Evaluador**

Santiago de Chile, 29 de Abril de 2013

## BIOGRAFÍA

Me llamo Camila Pia Saldías Ruiz, oriunda de Curicó, que significa “aguas negras” en mapudungün. Curicó es ciudad productora de frutas y verduras para Chile y el mundo, conocida además por las tortas del milhoja, las bicicletas y los vinos. Ubicada en la región del Maule, donde se encuentra un *hotspot* de biodiversidad mundial, y en donde sistemáticamente se ha talado bosque nativo para plantar monocultivos de pino insigne. Por todo esto es que me siento responsable y orgullosa de ser “provinciana”, y a mis compañeros de carrera, siempre les decía que Santiago no es Chile.



Para haber estudiado Biología Ambiental, algo de mi familia debo haber heredado. De mi papá, agrónomo y funcionario público, siempre escuché las irregularidades y cuoteos políticos, tomé de él las ganas de siempre hacer un esfuerzo por mejorar las cosas en los espacios públicos. De mi mamá, siempre vi racionalidad en el uso de los recursos con que contábamos, en mi casa reciclamos desde niños porque ella nos lo inculcó. Además, los veraneos en carpa, recorriendo Chile, siempre me acercaron a la naturaleza, tan diversa y exuberante. De mis bisabuelos maternos, emprendedores en tiempos de crisis, rescaté el espíritu de lucha. De mi abuela materna, química farmacéutica y de las primeras mujeres científicas, capté la valentía y el amor al trabajo cuando es vocación. De mi abuela más querida, Nubia Camila, profesora rural y madre soltera en tiempos de opresión, tomé la valentía para ser uno mismo y expresar ideas diferentes, a pesar de que el resto discrimine.

Mi llegada a la universidad comienza en Bachillerato, pues no estaba segura de qué estudiar, pero si sabía que me gustaba la biología y la evolución de los seres vivos, el origen de la vida, los increíbles mecanismos de la naturaleza, entre otras cosas (tuve dos o tres profesores que en el colegio me despertaron estos intereses). Luego de terminar Bachillerato, postulé a Ingeniería en Biotecnología Molecular, pues aún estaba llena de miedo respecto al futuro, y creía que esta carrera me aseguraría algún lugar “seguro”. En el camino me di cuenta que me interesaban muchos otros temas, y me dispersé. Sin embargo, en mi dispersión, conocí personas valiosas con quienes desarrollé amistad y proyectos importantes para ir haciendo mi propio camino. Tuve contacto con diferentes personajes universitarios, desde los guardias y jardineros, hasta los profesores y administrativos. Participé de los espacios políticos, pues quería cambiar el mundo. Lo más genial eran las conversaciones *sui generis* (de todos los temas) con profesores y funcionarios a los que yo admiraba o estimaba por sus experiencias de vida.

Luego, me cambié a Biología Ambiental, donde me sentía más cómoda, menos bicho raro. Pude ser yo misma con mis ganas de hacer proyectos de educación ambiental, pues mi convicción era (y es todavía) que la educación ambiental es la madre de las soluciones para lograr vivir en armonía con la naturaleza de la que somos parte.

Ya el último año de carrera, conocí a la profe Margarita y a Julieta, donde comenzaría mi lucha, contra mis inseguridades, mis miedos intelectuales y profesionales. Me puse a trabajar en el laboratorio sin mucha claridad del por qué y para qué, busqué otros nichos siempre buscando respuestas, cosa que siempre me afligió, pues me sentía dividida entre ciencia o gestión, ciencia o educación. Pero a pesar de todo, lo bueno y lo malo sumó, y logré escribir la tesis, y sobre todo logré definir mi rumbo por la educación y la ética ambiental, integrando la experiencia de trabajo científico, para mejorar el mundo inteligentemente, con argumentos y proyectos bien hechos, pues las solas ganas no bastan.



*Dedico este trabajo a mis papás, Camilo y Fabiola, por ser sabios y formarme con amor y libertad.*

*A mis hermanos, Ignacio y Cristián, a mi sobrino Facundo, y a mi cuñada Ximena, por acogerme después un largo y amargo distanciamiento.*

*A Richy de mi corazón, por ser un precioso catalizador para que terminara este proceso, por inspirarme, cuidarme y acompañarme generosamente.*

*Y a mi tía Tatiana, con todo cariño, simplemente por darle una alegría, para que vuelva a Chile.*

## AGRADECIMIENTOS



Agradezco a la profesora María Teresa Varnero, por hacerme parte del proyecto que dio origen a mi seminario de título, a Karina Galleguillos y a Patricio Achondo, por apoyarme en la parte logística de los experimentos, siempre de buena voluntad y con espíritu de equipo.

Agradezco a la profe Margarita y a Julieta, mis directoras de seminario de título, por haberme guiado con tanta paciencia. Pero sobretodo, agradezco la forma en que se entregan día a día a los alumnos y alumnas que se interesan por salir adelante, siempre exigiendo y orientando para que aprendamos a pensar y a tomar decisiones por nosotros mismos, para que seamos conscientes de que nada es regalado, que todo logro se gana con esfuerzo y disciplina, constancia, mucho trabajo, ensayo y error, "fracasos", entre otras cosas. Es muy difícil enseñar, y ellas me enseñaron mucho con su ejemplo de vida

Agradezco a todo el equipo que forma parte del laboratorio donde realicé este trabajo y con quienes pude compartir los momentos alegres y amargos. Juanita con quien desayunaba cuando recién abría el lab. Con Merly, Cata y Made, las más sabias en técnicas químicas, moleculares, y análisis estadísticos!!!, que fueron quienes me ayudaron cuando el camino se ponía difícil. A Felipe, Enrique y Lía, por ser mis amigos, que me escucharon y apoyaron psicológicamente cuando lo necesité.

Agradezco al profe Ramiro Bustamante, por ser mi patrocinador y orientador en los proyectos que realicé de manera extra académica, quien siempre estuvo dispuesto a sacrificar tiempo personal para apoyar iniciativas de educación ambiental, quien me motivó a seguir mi vocación por hacer proyectos, y cosas que no eran muy tradicionales para la Facultad de Ciencias.

Agradezco a mi partner, amigo, pololo, Richy de mi corazón, por preocuparse de abrirme los ojos y la cabeza, por "catalizar" este proceso de escribir la tesis, que fue lo más difícil de todo. Realmente yo creía que este trabajo no era digno, y finalmente terminé escribiéndolo y haciéndolo mío. Era una cosa que veía imposible, un infierno, y ahora por fin se convierte en una etapa cumplida.

Agradezco a mi familia, a mis hermanos Nacho y Cristian, a mi cuñada Ximena, a Facu mi sobrino, y a mis papás Camilo y Fabiola, que aceptaron mi alejamiento y apatía durante estos últimos años. Pero por sobre todo, les agradezco a mis papás el amor incondicional, y la libertad para dejar que me dedicara a otras cosas, además de los ramos. Fue el conjunto de experiencias que viví en la U lo que me hizo crecer,

equivocarme, y valorar lo que tengo, para darme cuenta de que soy **extremadamente privilegiada** y por lo mismo responsable de "hacer algo por la patria", con la formación que recibí.

Agradezco al profesor José Rogan, Michael Handford, Juany López y a Maurén Muñoz, de la Dirección de Asuntos Estudiantiles, por apoyar mis ideas y proyectos para la Facultad de Ciencias y el Campus. En especial a ellas dos, partners en las gestiones que habrían sido mucho más burocráticas y lentas de no ser por su ayuda y buena disposición, eficiencia, entusiasmo y espíritu de cooperar con la causa, de una mejor universidad, y de una mejor Facultad de Ciencias.

Me gustaría agradecer a las bibliotecarias Maritza y Gloria, y a don Juan Carlos Machuca, por perdonarme las multas cada vez que me atrasé con los libros, por acceder a favores que les pedía, etc. Son muy entregados a su trabajo y siempre con buena voluntad para ayudar a los demás.

Agradezco a Iris, guardía que renunció, a los jardineros del campus: Tito, don Eustaquio, don Jaime, y don Luis, y a los maestros del taller de Ciencias: don Carlos y don Miguel. Todos ellos fueron solidarios para ofrecer su trabajo en los proyectos de educación ambiental para el campus. Ellos me compartieron su valiosa historia de trabajo, de esfuerzo, de amor por la universidad.

Creo que soy la más afortunada del mundo con todo lo que viví aquí en la Facultad, en el Campus JGM, en la Universidad de Chile, con todos los defectos y virtudes que pueda tener, no hay mayor valor que una multiplicidad de visiones, opiniones, historias, como las que acá se generan. Me queda pendiente el documental de la manifestación por más ciencia para Chile "Morín 2007" y "Morín 2012".

Un abrazo, los quiere en el alma

Camila

Este Seminario de Título se realizó gracias al financiamiento del proyecto FONDEF D0711008.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

|  |           |
|--|-----------|
| ÍNDICE DE TABLAS .....   | VII       |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....  | VIII      |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....  | IX        |
| RESUMEN .....  | X         |
| ABSTRACT.....  | XII       |
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>2</b>  |
| 1.1. ENERGÍAS RENOVABLES: BIOGÁS .....   | 2         |
| 1.2. PURIFICACIÓN DE BIOGÁS .....  | 4         |
| 1.3. BACTERIAS FOTOANOXIGÉNICAS .....  | 6         |
| 1.4. ESTRATEGIAS DE ENRIQUECIMIENTO DE BACTERIAS .....                         | 11        |
| 1.5. OBJETIVOS .....   | 13        |
| 1.5.1. <i>Objetivo General</i> .....   | 13        |
| 1.5.2. <i>Objetivos Específicos</i> .....                                      | 13        |
| <b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>14</b> |
| 2.1. SELECCIÓN DE BACTERIAS FOTOANOXIGÉNICAS .....                             | 14        |
| 2.1.1. <i>Columna de Winogradsky y selección del estrato de interés</i> .....  | 14        |
| 2.1.2. <i>Aclimatación en medio líquido</i> .....                              | 14        |
| 2.1.3. <i>Aclimatación en medio sólido</i> .....                               | 15        |
| 2.2. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....                          | 16        |
| 2.3. ENRIQUECIMIENTO DE LAS BACTERIAS SELECCIONADAS.....                       | 17        |
| 2.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS CULTIVOS SELECCIONADOS .....                        | 18        |
| 2.4.1. <i>Obtención de DNA</i> .....   | 18        |
| 2.4.2. <i>Amplificación por PCR del marcador molecular rDNA 16S</i> .....      | 18        |
| 2.4.3. <i>Amplificación por PCR del marcador funcional pufM</i> .....          | 19        |
| 2.4.4. <i>Análisis de secuencias de los genes rDNA 16S y pufM</i> .....        | 20        |
| 2.5. COMPOSICIÓN BACTERIANA DEL CULTIVO SELECCIONADO.....                      | 21        |
| 2.5.1. <i>Construcción de una genoteca del rDNA 16S</i> .....                  | 21        |
| 2.5.2. <i>Perfiles de RFLP, secuenciación y análisis de secuencias</i> .....   | 22        |
| 2.6. ENSAYO DE PURIFICACIÓN DE BIOGÁS .....                                    | 22        |
| <b>3. RESULTADOS.....</b>  | <b>24</b> |
| 3.1. SELECCIÓN DE BACTERIAS FOTOANOXIGÉNICAS POR TÉCNICAS DE CULTIVO .....     | 24        |
| 3.1.1. <i>Estratificación y selección de microorganismos</i> .....             | 24        |
| 3.1.2. <i>Aclimatación y enriquecimiento de las bacterias de interés</i> ..... | 25        |
| 3.2. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....                          | 26        |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 3.3.      | ENRIQUECIMIENTO DEL CULTIVO DE INTERÉS .....  | 28        |
| 3.3.1.    | <i>Enriquecimiento en cultivo líquido</i> .....   | 28        |
| 3.3.2.    | <i>Enriquecimiento en cultivo sólido</i> .....  | 29        |
| 3.4.      | IDENTIFICACIÓN DE LOS CULTIVOS ENRIQUECIDOS.....  | 30        |
| 3.4.1.    | <i>Obtención de DNA genómico y amplificación del gen rDNA 16S</i> .....                                     | 30        |
| 3.4.2.    | <i>Análisis de las secuencias del gen del rRNA 16S</i> .....  | 31        |
| 3.4.3.    | <i>Amplificación de marcadores moleculares para verificar la presencia del metabolismo de interés</i> ..... | 33        |
| 3.5.      | COMPOSICIÓN BACTERIANA DEL CONSORCIO AISLADO .....  | 35        |
| 3.5.1.    | <i>Perfiles de RFLP</i> .....   | 35        |
| 3.5.2.    | <i>Análisis de secuencias</i> .....   | 37        |
| 3.6.      | ENSAYO DE PURIFICACIÓN DE BIOGÁS .....  | 38        |
| <b>4.</b> | <b>DISCUSIÓN</b> .....  | <b>41</b> |
| 4.1.      | SELECCIÓN Y ENRIQUECIMIENTO DE BACTERIAS FOTOANOXIGÉNICAS .....   | 42        |
| 4.2.      | APLICACIÓN DEL CONSORCIO MICROBIANO A LA PURIFICACIÓN DE BIOGÁS .....                                       | 46        |
| <b>5.</b> | <b>CONCLUSIONES</b> .....   | <b>48</b> |
| <b>6.</b> | <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....   | <b>49</b> |
|           | <b>ANEXO</b> .....  | <b>55</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Composición del medio de cultivo salino estándar .....  | 15 |
| <b>Tabla 2.</b> Composición del medio de cultivo sólido en dos fases. ....  | 16 |
| <b>Tabla 3.</b> Composición del biogás. ....  | 17 |
| <b>Tabla 4.</b> Partidores utilizados en la amplificación del gen rDNA16S.....  | 19 |
| <b>Tabla 5.</b> Partidores utilizados en la amplificación de marcadores funcionales.....  | 20 |
| <b>Tabla 6.</b> Parámetros de crecimiento del cultivo bacteriano.....   | 28 |
| <b>Tabla 7.</b> Comparación de las secuencias del gen del rRNA 16S obtenidas para cada cultivo purificado con secuencias desde la base de datos. .... | 32 |
| <b>Tabla 8.</b> Análisis de los clones de la genoteca del rDNA 16S.....   | 36 |
| <b>Tabla 9.</b> Composición del biogás en presencia y ausencia del consorcio seleccionado crecido en cultivo batch. ....                              | 38 |
| <b>Tabla 10.</b> Rangos de error de los sensores asociados a cada tipo de gas medido.....   | 39 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Árbol evolutivo de organismos fotosintéticos, basado en el análisis del RNA ribosomal 16S. ....  | 8  |
| <b>Figura 2.</b> Esquema de una Columna de Winogradsky estratificada .....  | 12 |
| <b>Figura 3.</b> Columna de Winogradsky. (A) Estratificación después de 2 meses de incubación (B) Región seleccionada correspondiente a Bacterias púrpuras .....    | 24 |
| <b>Figura 4.</b> Medio sólido en dos fases con gradiente de azufre y oxígeno. ....  | 26 |
| <b>Figura 5.</b> Curva de crecimiento en seis condiciones. ....   | 27 |
| <b>Figura 6.</b> Cultivo C <sub>1</sub> enriquecido en medio líquido. ....  | 29 |
| <b>Figura 7.</b> Morfotipos purificados en medio sólido .....   | 30 |
| <b>Figura 8.</b> Electroforesis en gel de los amplicones del marcador molecular rDNA16S. ....   | 31 |
| <b>Figura 9.</b> Cromatogramas de la secuencia del gen del rRNA 16S obtenida para cada cultivo purificado. ....   | 32 |
| <b>Figura 10.</b> Electroforesis en gel del DNA amplificado con partidores para genes funcionales de bacterias fotoanoxigénicas. ....                               | 33 |
| <b>Figura 11.</b> Dendrograma del gen <i>pufM</i> construido utilizando el índice de distancia de Jukes & Cantor y el método de agrupamiento Neighbor-Joining. .... | 34 |
| <b>Figura 12.</b> Perfiles de restricción de las secuencias del rDNA16S en los clones obtenidos. ....   | 36 |
| <b>Figura 13.</b> Abundancia relativa de los géneros más cercanamente relacionados a cada haplotipo de la genoteca del rDNA 16S .....                               | 37 |
| <b>Figura 14.</b> Curva de crecimiento durante el ensayo de purificación de biogás. ....  | 40 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP: adenosina trifosfato

BLAST: basic local alignment search tool

DNA: ácido desoxiribonucleico

dNTPs: desoxiribonucleótidostrifosfato

DO<sub>600 nm</sub>: Densidad óptica a 600 nm

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ERNC: Energía renovable no convencional

NADH: dinucleotido reducido nicotina adenina

NCBI: national center for biotechnology information

NCRE: no Conventional Renewable Energy

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

*pufM*: codifica para la subunidad M del centro de reacción fotosintético de bacterias púrpuras

rDNA 16S: codifica para la subunidad pequeña del gen del RNA ribosomal bacteriano

## RESUMEN

El biogás es una mezcla gaseosa compuesta principalmente de metano y dióxido de carbono, y otros gases traza considerados contaminantes ( $N_2$ ,  $O_2$ ,  $H_2S$ ,  $CO$ , vapor de agua, siloxanos, mercaptanos). Dicha mezcla es producida por la fermentación anaeróbica de materia orgánica, proceso microbiológico que ocurre en ambientes naturales y por medio de diferentes actividades humanas. Su utilización como energía renovable no convencional (ERNC) requiere la remoción de  $H_2S$ , dado su alto poder corrosivo que daña la maquinaria y el sistema de distribución, su efecto nocivo para la salud humana y de otros organismos, y su efecto contaminante ya que su combustión produce óxidos de azufre que generan la lluvia ácida. Entre los métodos para eliminar  $H_2S$  se pueden distinguir dos tipos: los fisicoquímicos y microbiológicos; estos últimos son preferidos dado su bajo costo y mínimo impacto ambiental. Los métodos microbiológicos se fundamentan en la capacidad de los microorganismos de utilizar el  $H_2S$  como dador de electrones para la generación de NADH y ATP en el proceso de fijación de  $CO_2$  por vía fotosintética o quimiosintética. En este trabajo se evaluó la capacidad de remoción de  $H_2S$  de microorganismos fotoanoxigénicos pertenecientes al grupo de las bacterias púrpuras. Para obtenerlos, se enriqueció una muestra de suelo mediante la construcción de una columna de Winogradsky, luego se extrajo el estrato de interés, se cultivó y purificó en condiciones selectivas. Para determinar las condiciones de crecimiento más favorables, se utilizaron tratamientos con distintas fuentes de carbono (acetato y piruvato) y atmósferas gaseosas (biogás y  $CO_2$ ). Se determinó una mayor densidad óptica en medio de cultivo con acetato o piruvato y atmósfera de biogás, no existiendo diferencia significativa entre ambas fuentes de

carbono orgánico. Por lo tanto, se escogió la condición con piruvato y biogás para continuar los ensayos. La capacidad fotoanoxigénica de los cultivos seleccionados en la condición más favorable, se determinó por la presencia de marcadores moleculares, entre ellos el gen *pufM* que codifica para la subunidad M del centro de reacción fotosintético de bacterias púrpuras, y el rDNA 16S para el grupo de bacterias verdes del azufre, verdes no del azufre y heliobacterias. Posteriormente, debido a que el cultivo seleccionado se trató de un consorcio y no de un cultivo puro, se determinó la composición bacteriana del mismo mediante la construcción de una genoteca del gen, rDNA 16S. El análisis de secuencias indica un 69% de abundancia de clones relacionados al género *Rhodopseudomonas*, perteneciente al grupo fotoanóxicos de bacterias púrpuras no del azufre, y en segundo lugar, un 19,5% de clones relacionados al género *Clostridium*, de metabolismo fermentador. Luego, en abundancias menores se detectaron secuencias relacionadas a los géneros *Pseudomonas* (4,5%) y *Achromobacter* (3,0%), de metabolismo quimioorganotrófico. Finalmente, se realizó un ensayo de purificación de biogás utilizando el cultivo seleccionado en un sistema tipo batch en el que se comparó la capacidad de remoción de H<sub>2</sub>S presente en la fase gaseosa a distintos tiempos de incubación. La concentración de H<sub>2</sub>S disminuyó a mayor velocidad en el tratamiento con cultivo de bacterias en relación al tratamiento control sin bacterias. El resto de los componentes del biogás no se vio significativamente afectado por la presencia del inóculo.

## ABSTRACT

Biogas is a gas mixture composed mainly of methane, carbon dioxide, and other trace gases considered contaminants ( $N_2$ ,  $O_2$ ,  $H_2S$ ,  $CO$ , water vapor, siloxanes, mercaptanes). This mixture is produced by the anaerobic fermentation of organic matter, microbiological process that occurs in natural environments by different human activities. Its use as non-conventional renewable energy (NCRE) requires the removal of  $H_2S$ , given its high corrosive damage to machinery and distribution system, its harmful effect on human health and other organisms, and its polluting effect because its combustion produces sulfur oxides which generate acid rain. The methods to remove  $H_2S$  can distinguish two types: the physicochemical and microbiological; the latter are preferred because of their low cost and minimal environmental impact. Microbiological methods are based on ability of microorganisms to use  $H_2S$  as electron donor for generation of NADH and ATP in the process of  $CO_2$  fixation via photosynthesis or chemosynthesis. This study evaluated the  $H_2S$  removal capacity of photosynthetic microorganisms belonging to the group of purple bacteria. To obtain them, a soil sample was enriched by constructing a Winogradsky column; then the layer of interest was extracted, cultivated and purified under selective conditions. To determine the most favorable growth conditions, treatments with two carbon sources (acetate and pyruvate) and gaseous atmospheres (biogas and  $CO_2$ ) were used. A higher optical density in culture medium with pyruvate or acetate in biogas atmosphere was determined, without statistical significant difference between the two organic carbon sources. Therefore, the condition with pyruvate and biogas was chosen to continue testing. The

photoanoxygenic ability of the selected cultures in the most favorable condition was determined by the presence of molecular markers, including the *pufM* gene which encodes the subunit M of the reaction photosynthetic center of purple bacteria, and the 16S rDNA for the group of green sulfur bacteria, green non-sulfur bacteria and heliobacterias. Subsequently, because the selected culture was a consortium rather than a pure culture, its bacterial composition was determined by library construction of the 16S rDNA gene. Sequence analysis indicates 69% of clones were related to the genus *Rhodopseudomonas*, belonging to the photoanoxygenic group of purple non-sulfur bacteria, and in the second place, 19.5% of clones were related to the genus *Clostridium*, of fermenter metabolism. Then in lower abundances detected sequences were related to the genera *Pseudomonas* (4.5%) and *Achromobacter* (3.0%), of chemorganotrophic metabolism. Finally, a biogas purification assay was performed using the selected culture in a batch-type system, in which the H<sub>2</sub>S removal capacity from the gas phase was compared at different incubation times. The H<sub>2</sub>S concentration decreased faster in the treatment with the selected culture in relation to control without bacteria. The other biogas components were not significantly affected by the presence of inoculum.

## 1. INTRODUCCIÓN

La creciente demanda energética, junto a las políticas ambientales para disminuir y mitigar las emisiones de efecto invernadero, han llevado a los países a diversificar su matriz energética (IPCC, 2012). Por esto, el uso de las energías renovables adquiere importancia en políticas y planes de desarrollo a nivel internacional. Chile, por su parte, ha reorientado su matriz con la promulgación de la Ley de Energías Renovables el año 2008, que establece la obligación a empresas generadoras eléctricas de comercializar un 10% de energía proveniente de fuentes renovables no convencionales (ERNC) (Chile, Ministerio de Economía, 2007). El biogás, es un tipo de ERNC y constituye uno de los productos energéticos con alto potencial en Chile, sin embargo uno de los principales obstáculos para su utilización a nivel industrial es su contenido de contaminantes sulfurados, entre ellos el  $H_2S$ . Si bien se han desarrollado tecnologías fisicoquímicas eficaces para remover este compuesto, no cumplen con las exigencias ambientales debido a que generan subproductos contaminantes, además de ser altamente costosas. Por el contrario, la tecnología de biofiltros en base a microorganismos quimiosintéticos y fotosintéticos, es una alternativa efectiva y eficaz en el proceso de purificación de biogás y otros gases sulfurados. En particular, existen grupos microbianos capaces de utilizar el  $H_2S$ , entre ellos las bacterias fotoanóxicas, que reúnen las características metabólicas necesarias para ser aplicados como biofiltros de  $H_2S$ .

### **1.1. Energías renovables: Biogás**

El biogás se define como una mezcla gaseosa compuesta principalmente de metano ( $\text{CH}_4$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y otros gases traza considerados contaminantes ( $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{O}_2$ , vapor de agua, siloxanos). Se considera que la utilización de biogás lleva a la reducción neta de emisiones de efecto invernadero porque de otra forma el metano es liberado a la atmósfera provocando un efecto invernadero 21 veces mayor al  $\text{CO}_2$  (Fredriksson y cols., 2006). Dicha mezcla es producida por la fermentación anaeróbica de materia orgánica, proceso microbiológico que ocurre en ambientes naturales y en diferentes actividades humanas tales como rellenos sanitarios, compostaje comercial, tratamiento de aguas residuales y lodos de la industria agroalimentaria (Abatzoglou y Boivin, 2009).

Estudios recientes indican la factibilidad de incorporar el biogás en el parque generador de electricidad, estimando un potencial de 400 MW de capacidad instalable equivalente al 3,5% de la capacidad nacional, destacando que existe un potencial directo de aproximadamente 150 MW correspondientes a la producción de metano a través de reactores ya existentes (Chamy y Vivanco, 2007). Otro estudio reciente señala que el potencial bruto de biogás es de un 30% del total biomásico (Pontt, 2008).

La producción de biogás se debe al proceso de digestión anaeróbica de la materia orgánica desarrollado por una secuencia acoplada de interacciones microbianas en la que se pueden distinguir cuatro etapas fundamentales: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Weiland, 2010). Cada una de dichas etapas es realizada por distintos consorcios microbianos con requerimientos de nutrientes y condiciones ambientales específicas (Angelidaki y cols., 1993). En la etapa de hidrólisis

un tipo de microorganismos libera al medio extracelular enzimas hidrolíticas que degradan los polímeros insolubles de alto peso molecular tales como proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, que convierten a sus respectivos monómeros simples de bajo peso molecular (aminoácidos, azúcares y ácidos grasos de cadena larga), los cuales quedan biodisponibles para ser oxidados por bacterias fermentadoras, ya sea a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  (sustrato de las bacterias metanógenas), o bien a ácidos grasos volátiles (sustrato de bacterias acetogénicas). Luego, en la etapa acetogénica, los ácidos grasos volátiles son utilizados por microorganismos que producen acetato e  $\text{H}_2$ . Finalmente, arqueas metanógenas utilizan el acetato o  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$  para producir metano, siendo el  $\text{H}_2$  el sustrato limitante de la reacción (Bagi y cols., 2007).

El equilibrio entre las distintas etapas del proceso metanogénico determina la composición y, por ende, la calidad del biogás como combustible. Se entiende por biogás de alta calidad a aquel con mayor contenido de  $\text{CH}_4$  (componente con un alto poder calorífico) y menor contenido de  $\text{CO}_2$  que actúa como diluyente del poder combustible. Diversos estudios han propuesto estrategias para optimizar la producción de biogás, con mayor contenido de  $\text{CH}_4$ , en base al manejo de parámetros como temperatura, tiempo de retención hidráulica, pH, tamaño de las partículas, composición de la materia prima, entre otros (Yadvika y cols., 2004).

Sin embargo, a pesar de que es factible el uso de biogás como ERNC en Chile, de que la legislación exige su uso a nivel industrial y de que es posible optimizar su calidad en la etapa de producción, aún es una fuente de energía cuyo uso no se ha masificado a nivel industrial. Uno de los principales obstáculos para la utilización del biogás es la presencia de contaminantes ( $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{NH}_4^+$ , siloxanos, mercaptanos), por lo

que a gran escala requiere necesariamente de su purificación previa. En este aspecto, el ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) es el contaminante más importante de remover en el proceso de purificación, debido a su alto poder corrosivo (Syed y cols., 2006) que se ve aumentado al reaccionar con el vapor de agua presente en la mezcla formando ácido sulfúrico (Varnero, 2011). El daño que produce se puede observar en las paredes de concreto de los reactores, sistemas de alcantarillado y tuberías de acero (Buisman y cols., 1989). Además de su impacto negativo sobre instalaciones urbanas e industriales, es considerado un gas tóxico para la salud tanto humana como de otros seres vivos. La exposición a este gas se señala como una importante causa de mortalidad en lugares de trabajo, siendo frecuentes los síntomas de intoxicación en emplazamientos industriales donde se han producido fugas accidentales (Strickland y cols., 2003). Además, los productos de oxidación de este gas,  $SO_2$  y  $SO_3$ , son considerados como los principales contribuyentes de la lluvia ácida (Jin y cols., 2005). La concentración de  $H_2S$  en el biogás es variable y dependiendo de las materias primas empleadas en la digestión anaeróbica, puede estar entre 10 a 10.000 ppm (Abatzoglou y Boivin, 2009).

## **1.2. Purificación de biogás**

Considerando por una parte la factibilidad de usar biogás como ERNC y por otra los efectos nocivos de su liberación o combustión cuando está presente el  $H_2S$ , se hace necesario desarrollar tecnologías no contaminantes y de bajo costo para su remoción. Dentro de los métodos de purificación de  $H_2S$  se pueden distinguir dos categorías: los métodos físicoquímicos (absorción y adsorción) y los métodos microbiológicos (microorganismos que consumen los contaminantes y los transforman

a formas menos perjudiciales). Los métodos fisicoquímicos de absorción se basan en la afinidad del  $\text{H}_2\text{S}$  por iones metálicos como  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ; los métodos de adsorción, en cambio, se fundamentan en la adherencia del  $\text{H}_2\text{S}$  sobre diferentes tipos de catalizadores sólidos, como por ejemplo  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , carbón activado o matrices derivadas de lodos (Abatzoglou y Boivin, 2009). Si bien las estrategias de purificación fisicoquímicas son las más utilizadas porque pueden llegar a remover un alto porcentaje del  $\text{H}_2\text{S}$  presente en el biogás, alcanzando incluso el 100% de eliminación (Horikawa y cols., 2004), son consideradas tecnologías de alto costo económico debido a que requieren grandes cantidades de compuestos químicos y condiciones de operación extremas (utilización de altas temperaturas, pH ácidos o básicos para regenerar el estado de oxidación de los compuestos químicos absorbentes). Además, es necesario considerar los costos ambientales asociados a la saturación de catalizadores y a la producción de precipitados de azufre, ambos subproductos contaminantes que deben ser procesados y dispuestos en lugares adecuados.

A diferencia de los métodos de purificación fisicoquímica, los métodos microbiológicos, que utilizan microorganismos para oxidar el  $\text{H}_2\text{S}$ , implican un bajo costo de inversión dada la mínima necesidad de nutrientes, la no utilización de compuestos químicos en grandes volúmenes, y las condiciones de operación que no requieren un alto gasto energético (temperatura ambiente, presión normal). Además, su funcionamiento es inocuo para el medio ambiente ya que no se generan subproductos contaminantes, y en algunos casos al contrario, se genera azufre elemental, un sólido no corrosivo de fácil manipulación y transporte que posee valor comercial pues es utilizado para el procesamiento de fertilizantes (Henshaw y Zhu, 2001). Por lo anterior y debido a la mayor demanda por procesos más económicos y

ambientalmente aceptables, se ha incentivado en Chile la investigación del método de purificación microbiológico, el cual cumple con las características deseables de oxidación de  $H_2S$  con un bajo requerimiento nutricional en condiciones anaeróbicas o microaerófilas, siendo esto último importante considerando que la composición del biogás puede presentar bajos niveles de oxígeno debido a filtraciones en la extracción o durante su transporte hacia los estanques purificadores.

### **1.3. Bacterias fotoanoxigénicas**

La oxidación biológica del azufre es un rasgo filogenéticamente diverso, que se encuentra en microorganismos de metabolismo tanto fotótrofo como quimiótrofo. Ambos tipos de metabolismo utilizan  $H_2S$  como fuente dadora de electrones para la generación de poder reductor y formación de ATP en el proceso de respiración o asimilación de  $CO_2$  (Ghosh y Dam, 2009).

Dichos metabolismos microbianos se distribuyen en los dominios Bacteria (foto y quimiotrofia) y Archaea (quimiotrofia), los cuales llevan a cabo la mitad de los procesos oxidativos del ciclo del azufre (Bruser y cols., 2000). Dentro del dominio Bacteria, existen varios linajes tanto fotótrofos como quimiótrofos capaces de degradar el  $H_2S$  en condiciones aeróbicas, microaerófilas o anaeróbicas. Por el contrario, dentro del dominio Archaea, las especies oxidadoras de  $H_2S$  son quimiótrofas y aeróbicas, restringiéndose al orden Sulfolobales del reino Crenarchaeota (Stetter y cols., 1990; Fuchs y cols., 1980; Huber y Stetter, 2001).

En general, la oxidación de  $H_2S$  por bacterias quimiótrofas ocurre en condiciones aeróbicas con  $O_2$  como aceptor de electrones, o bien en condiciones anaeróbicas con un aceptor alternativo de electrones (Prescott y cols., 2003). Dentro de los taxa

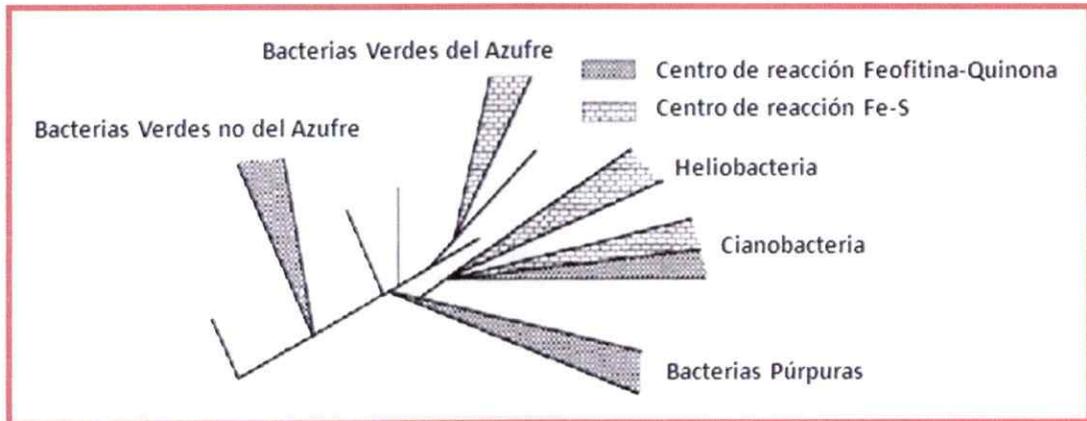
quimiótrofos más utilizados en estudios de remoción de  $H_2S$  desde el biogás, se encuentra el género *Thiobacteria*. En particular la especie *Thiobacillus sp.* ha sido ampliamente utilizada debido a su capacidad de resistir condiciones de estrés (Syed y cols., 2006).

Considerando que los microorganismos quimiolitótrofos crecen limitados por el bajo rendimiento energético molar de los sustratos donadores de electrones, y que generalmente oxidan el  $H_2S$  en condiciones aeróbicas; entonces los microorganismos fotosintéticos serían una alternativa conveniente para oxidar  $H_2S$  y purificar el biogás. Esto debido a su mejor rendimiento y capacidad de crecer en anaerobiosis o microaerofilia.

La capacidad fotosintética se encuentra en cinco linajes bacterianos: Bacterias verdes del azufre (Chlorobiales), Bacterias verdes no del azufre (subgrupo Chloroflexus), Bacterias púrpuras ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  proteobacterias), la familia Heliobacteriaceae y cianobacterias (Figura 1). Con excepción de las cianobacterias, todos los otros linajes realizan fotosíntesis anoxigénica, que no conduce a la formación de oxígeno molecular pues no involucra el clivaje fotoquímico del agua (Frigaard y Dahl, 2009). Este tipo de bacterias son incapaces de utilizar agua como donador de electrones debido a que la arquitectura de su aparato fotosintético sólo les permite usar un donador de electrones con un potencial estándar más negativo que el agua, por ejemplo compuestos reducidos del azufre y otras sustancias presentes en el medio, tal como  $H_2$ ,  $Fe^{2+}$  o compuestos orgánicos de bajo peso molecular (Overmann y García Pichel, 2006).

Este proceso está ampliamente distribuido en el ambiente y cumple un rol importante en el ciclo biogeoquímico del carbono y del azufre. Ocurre principalmente

en sedimentos de lagos que se caracterizan por ser ambientes anóxicos con alta concentración de compuestos reducidos del azufre (Zeng y Jiao, 2007).



**Figura 1.** Árbol evolutivo de organismos fotosintéticos, basado en el análisis del RNA ribosomal 16S. El triángulo achurado en cada rama indica el tipo de centro de reacción encontrado en representantes fotosintéticos. El largo de las ramas no está a escala. (Blankenship, 1992).

La utilización de  $H_2S$  por bacterias fotótrofas anoxigénicas ha sido estudiada principalmente en el género *Chlorobium* del grupo de las bacterias verdes del azufre. En general las bacterias verdes del azufre son fotótrofas obligadas, utilizan  $S^{2-}$ ,  $S^0$  o  $S_2O_3^{2-}$  como donadores de electrones para la reducción de  $CO_2$ . Son las menos versátiles de todos los procariontes fototróficos ya que todas las especies son fotolitótrofas obligadas. En cuanto a su hábitat, dominan bajo la acumulación de bacterias púrpuras, debido a que poseen una capacidad superior para captar la luz disponible. En cuanto a su tolerancia al  $H_2S$ , se ha reportado que toleran una concentración de  $250 \mu M$  en medios de cultivo para enriquecimiento (Overmann, 2006). Por otra parte, se ha reportado que *Cholorobium limicola* o *C. thiosulfatophilum*

serían especies fotótrofas convenientes para purificar el biogás ya que se caracterizan por oxidar  $\text{H}_2\text{S}$  a  $\text{S}^0$ , crecer en condiciones anaeróbicas estrictas, con  $\text{CO}_2$ , luz y nutrientes inorgánicos (Syed y Henshaw, 2003; Henshaw y Zhu, 2001).

Dentro del grupo de las bacterias verdes no del azufre, el grupo *Chloroflexus* corresponde a uno de los filos más antiguos de la ramificación bacteriana. Respecto a su metabolismo, son fotoheterótrofos o fotoautótrofos usando  $\text{S}^{2-}$  como donador de electrones. Sin embargo, se ha demostrado que cultivos fotoautotróficos de *Chloroflexus aurantiacus* que utilizan  $\text{H}_2\text{S}$  o  $\text{H}_2$  como donador de electrones, crecen a una baja velocidad (Pierson y Castenholz, 1974). Crecen de preferencia por fotoheterotrofia utilizando diversos compuestos orgánicos. Esta versatilidad sería la principal causa del abundante crecimiento de *Chloroflexus* en tapetes microbianos junto a cianobacterias (Siervag, 1995).

Otro de los linajes bacterianos de interés, menos estudiados en cuanto a su aplicación para purificar biogás, es el de las bacterias púrpuras. En particular las bacterias púrpuras del azufre (y proteobacterias), están restringidas a hábitats acuáticos caracterizados por su baja tensión de oxígeno, condiciones de luz y concentraciones de sulfuro moderadas. En condiciones óptimas, forman afloramientos coloreados debido a la gran cantidad de pigmentos localizados en la membrana interna (Overmann y García-Pichel, 2006). Las bacterias púrpuras del azufre de la familia Chromatiaceae incluyen miembros fotoautótrofos obligados y también facultativos; todos utilizan  $\text{S}^{2-}$  o  $\text{S}^0$  como donadores de electrones para la fotosíntesis. Los fotótrofos obligados requieren condiciones de anaerobiosis estricta, en cambio los fotótrofos facultativos pueden crecer quimiotróficamente bajo una tensión reducida de oxígeno. Por otra parte, las bacterias púrpuras de la familia Ectothiorhodospiraceae oxidan  $\text{S}^{2-}$ ,

usualmente depositan glóbulos de  $S^0$  fuera de la célula (Frigaard y Dahl, 2009). Respecto a su tolerancia al  $H_2S$ , los miembros de la familia Ectothiorhodospiraceae, al igual que las bacterias verdes del azufre, exhiben 5 a 7 veces más afinidad que aquellos de la familia Chromatiaceae (Van Gemerden y Mas, 1995).

Por su parte, bacterias púrpuras no del azufre ( $\alpha$  y  $\beta$  proteobacterias) se caracterizan por su excepcional versatilidad metabólica. Por esto, son componentes importantes de sistemas de tratamiento de aguas, fotoasimilación y mineralización de una variedad de compuestos orgánicos (Kobayashi y Nakanishi, 1971). Respecto a la generalidad de su metabolismo, las bacterias púrpuras no del azufre (*Rhodopseudomonas sp.* y *Rhodobacter sp.*) son preferentemente fotoheterótrofas bajo condiciones anaeróbicas. Sin embargo, muchas otras pueden crecer fotolitoautotróficamente con  $S^{2-}$  y  $S_2O_3^{2-}$  como donadores de electrones o bien por quimioorganotrofia/quimiolitotrofia (Frigaard y Dahl, 2009). Respecto a su tolerancia al  $H_2S$ , se ha descrito que crecen en concentraciones de 0,4 a 1 mM, hasta 2 mM las más tolerantes (Imhoff, 2006).

Finalmente, heliobacterias son otro tipo de bacterias fotoanoxigénicas, pertenecientes al Phylum Firmicutes dentro del linaje de *Bacillus/Clostridium*. Son formadoras de esporas y su metabolismo es anaerobio estricto, pudiendo crecer fototróficamente, quimiotróficamente por fermentación, oxidando  $S^{2-}$  a  $S^0$ , y fotoheterotróficamente con un número limitado de compuestos orgánicos. Se encuentran principalmente en el suelo y difieren significativamente en sus aspectos ecológicos de las bacterias púrpuras y verdes (Frigaard y Dahl, 2009).

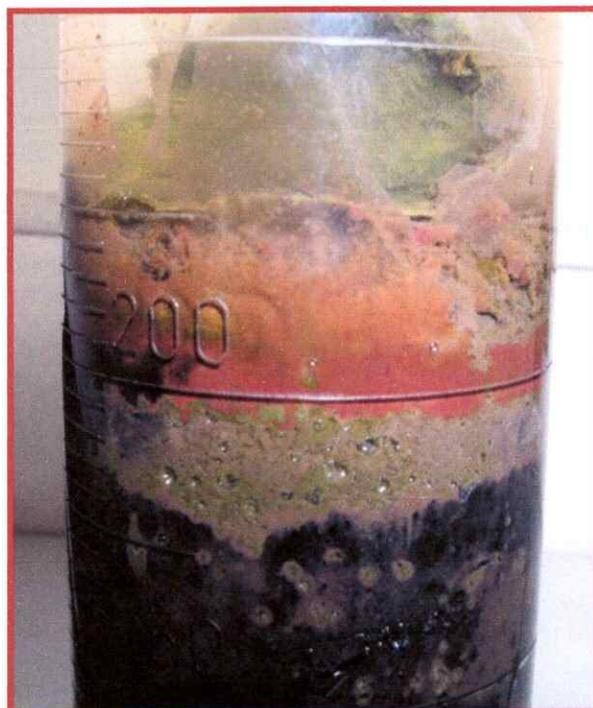
De todos los linajes fotoanoxigénicos mencionados, las bacterias púrpuras además de presentar el metabolismo oxidador de  $H_2S$ , poseen la ventaja de ser

fisiológicamente versátiles ya que pueden crecer en anaerobiosis o microaerofilia y utilizar variadas fuentes de carbono por fotoheterotrofia. De acuerdo a tales antecedentes, se propone evaluar la capacidad de bacterias fotoanoxigénicas púrpuras, para remover el  $H_2S$  presente en el biogás.

#### **1.4. Estrategias de enriquecimiento de bacterias**

En relación a los métodos de obtención de muestras enriquecidas de bacterias fotoanoxigénicas, un diseño de microcosmo clásico es la columna de Winogradsky (Charlton y cols., 1996; Yaşa y cols., 2006). Dicho sistema permite aumentar la inicialmente baja proporción de microorganismos fotoanoxigénicos en una muestra de suelo o lodo. Durante el desarrollo de este microcosmos los microorganismos se estratifican de acuerdo a las condiciones ambientales (gradiente de potencial redox, luminosidad, concentración de sulfuro, de oxígeno, etc.). En la columna hay un continuo reciclaje de azufre que genera microambientes y condiciones abióticas específicas que favorecen la proliferación y mantención de distintos grupos de microorganismos por un periodo de tiempo prolongado. De este modo, se desarrollan bacterias fotoanoxigénicas a distintas alturas de la columna: púrpuras y verdes del azufre en la zona anaeróbica, y bacterias púrpuras y verdes no del azufre en la zona microaerofílica. En la zona más profunda: anóxica y con mayor concentración de azufre reducido, se encuentran bacterias reductoras de sulfato y heterótrofas fermentativas, por el contrario, en el extremo opuesto: aeróbico y con mayor concentración de azufre oxidado, se encuentran algas y cianobacterias de metabolismo heterótrofo y aeróbico (Figura 2). Este es un modelo de ecosistema que imita la situación de una columna anóxica de agua que recibe luz, en el que se produce una zonación semejante a la de

los sedimentos naturales, pero a escala milimétrica (Atlas y Bartha, 1998). De esta forma, cuando se logra la estratificación de microorganismos fotoanoxigénicos en la columna de Winogradsky, entonces es posible seleccionar el estrato de interés para cultivarlo en medios líquidos y sólidos selectivos. A su vez, los medios de cultivo líquido, en sistemas tanto batch (sin recambio de medio), como continuo (con recambio de medio), permiten la aclimatación y purificación de los microorganismos gracias a la adición de nutrientes esenciales para el crecimiento específico de aquellos que realizan fotosíntesis anoxigénica. Así, existen protocolos establecidos para cultivar y aislar bacterias de este tipo (Çetinkaya y cols., 1999; Haskins y Kihara, 1966; Truper, 1970).



**Figura 2.** Esquema de una Columna de Winogradsky estratificada.

Por otra parte, se han descrito métodos eficientes de detección de bacterias fotoanoxigénicas. Un estudio reciente ha reportado el diseño de un set de partidores cuyo blanco es el gen rDNA 16S de bacterias verdes del azufre, bacterias verdes no del azufre, heliobacterias; además de un gen conservado de la fotosíntesis (*pufM*) en bacterias púrpuras y en *Chloroflexus* (Achenbach y cols., 2001). La aproximación molecular basada en PCR presenta la ventaja de ser sensible a la presencia de organismos poco abundantes que podrían jugar un rol ecológico significativo en la comunidad (Achenbach y cols., 2001). En particular el gen *pufM* forma parte del operón *puf* y codifica para la cadena polipeptídica M del centro de reacción fotosintético tipo II (Tank y cols., 2009).

## **1.5. Objetivos**

### **1.5.1. Objetivo General**

Seleccionar bacterias fotoanoxigénicas y determinar su capacidad de remover el H<sub>2</sub>S presente en el biogás.

### **1.5.2. Objetivos Específicos**

1. Seleccionar bacterias fotoanoxigénicas por técnicas de cultivo y verificar la presencia de los microorganismos de interés mediante la amplificación de marcadores moleculares.
2. Identificar la composición del cultivo seleccionado mediante clonación y secuenciación del gen del RNA ribosomal 16S.
3. Determinar la capacidad del cultivo seleccionado de remover H<sub>2</sub>S registrando la composición del biogás en el tiempo.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Selección de bacterias fotoanoxigénicas**

#### **2.1.1. Columna de Winogradsky y selección del estrato de interés**

Se construyó una columna de Winogradsky para obtener bacterias fotoanóxicas. Dicho sistema fue montado en un cilindro de vidrio ( $h = 60$  cm,  $d = 6$  cm), utilizando como relleno una mezcla de lodo a partir de 100 g de suelo tamizado a la que se agregó trozos de papel filtro como fuente de celulosa,  $\text{CaSO}_4$  al 1% como fuente de sulfato,  $\text{Na}_2\text{S}$  al 1% como fuente de azufre reducido y  $\text{CO}_3\text{Ca}$  al 1% como fuente de carbonato y amortiguador. Dos tercios del volumen de la columna se completaron con la mezcla de lodo descrita, el último tercio se cubrió con agua. La columna se mantuvo a temperatura ambiente, expuesta a la luz y después de aproximadamente 2 meses se observó la estratificación de microorganismos esperada.

A partir de la columna construída se seleccionó el estrato de color rojizo (bacterias púrpuras) adherido a las paredes y ubicado en la parte inferior de la columna, donde existe menor disponibilidad de oxígeno y mayor disponibilidad de sulfuros. Para acceder a dicha zona primero se retiró el lodo del centro y luego se raspó la superficie del vidrio con una espátula.

#### **2.1.2. Aclimatación en medio líquido**

Un gramo del estrato recuperado de la columna en el paso anterior, se resuspendió en 10 mL de agua destilada estéril y se inoculó por triplicado en frascos de

20 mL con 10 mL de medio líquido (Tabla 1) y una atmósfera de CO<sub>2</sub> incubados a 25°C, a 150 rpm y con luz permanente durante una semana. El medio de cultivo se recambió 5 veces para aumentar la biomasa y favorecer la aclimatación de las bacterias de interés.

**Tabla 1.** Composición del medio de cultivo salino estándar utilizado para el enriquecimiento de bacterias púrpuras.

| <b>Compuesto</b>       | <b>Concentración</b> |
|------------------------|----------------------|
| MgSO <sub>4</sub>      | 0,2 mM               |
| CaCl <sub>2</sub>      | 0,1 mM               |
| Na-EDTA                | 0,02 mM              |
| NH <sub>4</sub> Cl     | 10 mM                |
| FeSO <sub>4</sub>      | 1,8 mM               |
| NaHCO <sub>3</sub>     | 4 mM                 |
| Na <sub>2</sub> S      | 5 mM                 |
| Vitaminas (*)          | 1 mL/L               |
| Micronutrientes (*)    | 1 mL/L               |
| PBS Buffer fosfato (*) | 5 mM                 |

(\*) solución stock en anexo

### 2.1.3. Aclimatación en medio sólido

Una alícuota de cada cultivo aclimatado en medio líquido se transfirió a un medio sólido de doble fase (Tabla 2), con un gradiente de oxígeno y azufre. Esta estrategia permite, al igual que la columna de Winogradsky, favorecer el crecimiento de las bacterias de interés en la zona inferior del tubo donde se encuentra una mayor disponibilidad de sulfuros y una menor disponibilidad de oxígeno.

**Tabla 2.** Composición del medio de cultivo sólido en dos fases.

| <b>Fase</b>                         | <b>Compuesto</b>                              | <b>Concentración</b> |
|-------------------------------------|---|----------------------|
| Medio base<br>(común a ambas fases) | Na-EDTA                                       | 0,02 mM              |
|                                     | MgSO <sub>4</sub>                             | 0,5 mM               |
|                                     | Micronutrientes (*)                           | 1 mL/L               |
|                                     | CaCl <sub>2</sub>                             | 0,1 mM               |
|                                     | Buffer Fosfato Potasio (*)                    | 5 mM                 |
| Fase Superior                       | Bactoagar                                     | 0,25 g/L             |
|                                     | NaHCO <sub>3</sub>                            | 4 mM                 |
|                                     | NH <sub>4</sub> Cl                            | 10 mM                |
|                                     | Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 0,2 g/L              |
|                                     | FeSO <sub>4</sub>                             | 1,8 mM               |
|                                     | Vitamina B <sub>12</sub>                      | 1 mL/L               |
| Fase Inferior                       | Vitaminas (*)                                 | 1,5 ml/L             |
|                                     | Bactoagar                                     | 1,5 g/L              |
|                                     | Na <sub>2</sub> S                             | 1 mM                 |

(\*) solución stock en anexo.

## 2.2. Selección de las condiciones de crecimiento

Para favorecer el crecimiento de las bacterias de interés se evaluaron 6 condiciones de crecimiento, en un diseño factorial 2 X 3: utilizando dos tipos de atmósferas gaseosas (Biogás (Tabla 3) y CO<sub>2</sub>) y medio de cultivo salino suplementado con tres diferentes fuentes de carbono (piruvato, acetato, sin carbono orgánico).

Cada condición fue ensayada por triplicado y consistió en tubos de 6 mL que contenían 3,5 mL del medio de cultivo a los que se le inocularon 100 µL de un cultivo fresco (DO<sub>600 nm</sub> = 0,4) de las bacterias previamente aclimatadas. El acetato y piruvato (10 mM) se añadieron al medio de cultivo, actuando como fuentes de carbono y además como potenciales dadores de electrones para la fotosíntesis, según indica la literatura (Imhoff, 1995). Para evaluar el crecimiento se registró la densidad óptica a 600 nm cada 2 horas en un espectrofotómetro Spectronic 21.

Para determinar qué condiciones de cultivo favorecen más el crecimiento bacteriano se aplicó el análisis de varianza de una vía a los parámetros entregados por el ajuste de los datos de crecimiento, a la ecuación de Gompertz modificada, en el programa STATISTICA 7. Los parámetros característicos fueron: A=máxima densidad óptica,  $\mu_m$ =velocidad de crecimiento específica máxima y  $\lambda$ =tiempo de latencia.

**Tabla 3.** Composición del biogás.

| <b>Compuesto</b>    | <b>Concentración</b> |
|---------------------|----------------------|
| Metano              | 68 %                 |
| Dióxido de Carbono  | 31 %                 |
| Oxígeno             | 0,1 %                |
| Ácido sulfhídrico   | 750 ppm              |
| Monóxido de Carbono | 28 ppm               |

### **2.3. Enriquecimiento de las bacterias seleccionadas**

Para enriquecer el cultivo con las bacterias seleccionadas en la condición de crecimiento más favorable, se utilizaron dos estrategias: cultivo líquido y cultivo en placa.

El enriquecimiento por cultivo líquido consistió en transferencias sucesivas (5x) del inóculo bacteriano enriquecido, en las condiciones de fuente de carbono y atmósfera establecidas en el punto anterior. Cada vez el cultivo se incubó a 25°C, 150 rpm y en presencia de luz permanente por una semana.

Por otra parte, la estrategia de enriquecimiento en placa consistió en realizar diluciones decimales seriadas de alícuotas del mismo cultivo, usado en la estrategia anterior, y sembrar 100  $\mu$ L de la dilución  $10^{-4}$  en placas con el medio de cultivo salino adicionado con la fuente de carbono seleccionada previamente. El cultivo se dispuso

entre dos capas de medio sólido para asegurar el mínimo contacto con el aire y alcanzar cierto nivel de anaerobiosis. La capa inferior se preparó al 2% de agar y la superior al 1% de agar. Después de una semana de incubación en un recipiente sin oxígeno, las colonias aisladas se transfirieron nuevamente a medio líquido y así sucesivamente (10x).

## **2.4. Identificación de los cultivos seleccionados**

### **2.4.1. Obtención de DNA**

El DNA genómico se obtuvo a partir de 1,8 mL del cultivo enriquecido en medio líquido, según indica el protocolo del kit "Ultraclean Microbial DNA Isolation" (MbioLab Inc.) y se eluyó en 50 µL de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Por otra parte, el DNA de las colonias aisladas se obtuvo por lisis celular de una suspensión de cada colonia en 15 µL de buffer TE, mediante 8 ciclos sucesivos de choques térmicos de 1 min a 98°C / 1 min a 4°C. El DNA obtenido desde los cultivos líquidos y desde las colonias se guardó a -20°C hasta su posterior análisis.

Para comprobar la calidad del DNA genómico se visualizó el producto de purificación mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8,0) y se visualizó por tinción con GelRed™ (Biotium) comparándolo con cantidades conocidas del marcador de peso molecular λ/HindIII (Gibco BRL®).

### **2.4.2. Amplificación por PCR del marcador molecular rDNA 16S**

A partir del DNA obtenido desde los cultivos líquidos y desde las colonias, se amplificó por PCR el gen del rRNA 16S (rDNA 16S), marcador molecular de bacterias,

que codifica para la subunidad menor del ribosoma. Para ello, se utilizaron los partidores universales fD1 y rP2 (Tabla 4). La reacción se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ L, que contenía GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (GoTaq<sup>®</sup> DNA Polimerasa en 1X Green GoTaq<sup>®</sup> Reaction Buffer (pH 8,5), 200  $\mu$ M de cada dNTP y 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>) (Promega) y los partidores en una concentración de 200  $\mu$ M. Se corroboró el tamaño del producto amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en buffer TAE 1X teñido con GelRed<sup>™</sup>, el tamaño de los amplicones se determinó con el estándar de tamaño molecular 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

**Tabla 4.** Partidores utilizados en la amplificación del gen rDNA16S.

| Partidores | Secuencia (5'-3')     | Referencia             |
|------------|-----------------------|------------------------|
| fD1        | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG  | Weisburg y cols., 1991 |
| rP2        | ACGGCTACCTTGTTACGACTT |                        |

#### 2.4.3. Amplificación por PCR del marcador funcional *pufM*

Para verificar la presencia del metabolismo fotoanoxigénico, se amplificó por PCR el gen *pufM* que codifica para la subunidad M del centro de reacción fotosintético distribuido universalmente en el grupo de Bacterias púrpuras. Además, se utilizaron partidores basados en la secuencia del gen rDNA 16S para la detección de grupos fotoanoxigénicos no pertenecientes a este tipo de bacterias, entre ellos: Bacterias verdes del azufre, Bacterias verdes no del azufre, y algunas especies del género *Heliobacteria* (Achenbach y cols., 2001). La secuencia de cada par de partidores y los tamaños esperados de los productos de amplificación se indican en la Tabla 5. La

reacción se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ L, que contenía GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega) y los partidores en una concentración 10  $\mu$ M.

El tamaño de los productos amplificados se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2% como se describió anteriormente.

**Tabla 5.** Partidores utilizados en la amplificación de marcadores funcionales (Achenbach y cols., 2001).

| Grupo Bacteriano        | Partidores | Secuencia (5'-3')    | Tamaño esperado del producto amplificado |
|-------------------------|------------|----------------------|--|
| B. púrpuras             | pufM.557F  | CGCACCTGGACTGGAC     | 229 pb                                   |
|                         | pufM.750R  | CCCATGGTCCAGCGCCAGAA |  |
| B. verdes del azufre    | GS.619F    | GGGGTTAAATCCATGTGCT  | 525 pb                                   |
|                         | GS.1144R   | CAGTTCARTTAGAGTCC    |  |
| B. verdes no del azufre | CFX.856F   | TGCCTTAGCTCACGCGGTAA | 384 pb                                   |
|                         | CFX.1240R  | GCAACGCATTGTCGTGGCCA |  |
| <i>Heliobacteria</i>    | HB.418F    | TCTTCGGATTGTAAACCC   | 741 pb                                   |
|                         | HB.1159R   | CCGGTCGTCCCGGGCA     |  |

#### 2.4.4. Análisis de secuencias de los genes rDNA 16S y pufM

Los productos de PCR del gen rDNA 16S y *pufM* se secuenciaron en un sentido utilizando un Analizador Genético 3730 (Applied Biosystems) (Macrogen Inc.). Las secuencias obtenidas se editaron con el software MEGA 4.1 (Tamura y cols., 2007) y se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) mediante la herramienta bioinformática BLAST-n (Altschul y cols., 1997).

Además, las secuencias del gen *pufM* se alinearon mediante ClustalX v 1.81 (Thompson y cols., 1997) y se construyó un dendrograma con el programa MEGA 4.1 (Tamura y cols., 2007) usando la distancia genética de Jukes & Cantor (Jukes y

Cantor, 1969) y el algoritmo de agrupamiento Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). Para estimar la robustez de los nodos se realizó un análisis de bootstrap de 500 iteraciones.

## **2.5. Composición bacteriana del cultivo seleccionado**

### **2.5.1. Construcción de una genoteca del rDNA 16S**

Para determinar la composición bacteriana de la fracción enriquecida y purificada se construyó una genoteca clonando los amplicones del marcador molecular rDNA 16S. En primer lugar, se purificaron 20  $\mu$ L del producto de PCR del gen con el kit "Ultraclean PCR Clean-up DNA Purification" (MoBioLab, Inc.) y se determinó su concentración comparando la intensidad de las bandas con el marcador de peso molecular 100 bp (Fermentas). El producto purificado se ligó al vector pTZ57R/T (Fermentas) con la enzima T4 DNA ligasa incubando la reacción a 4°C toda la noche. El producto de la reacción de ligación se utilizó para transformar células competentes de *Escherichia coli* JM107 según las indicaciones del kit "InsTAclone TM PCR Cloning" (Fermentas). Las colonias recombinantes se seleccionaron en placas de agar LB-ampicilina (Tryptona 1%, NaCl 1%, extracto de levadura 0,5%, ampicilina 100  $\mu$ g/mL, pH 7), en presencia de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galáctopiranosido) como indicador, e IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tio-galactósido) como inductor del gen *LacZ*. La presencia del inserto se confirmó mediante PCR utilizando los partidores M13f (GACGTTGTAAAACGACGGCC) y M13r (CACAGGAAACAGCTATGACC) a una concentración de 120 nM en GoTaq<sup>®</sup> Master Mix (Promega) y como molde una suspensión de células recombinantes lisadas en 15  $\mu$ L de buffer TE durante 8 ciclos sucesivos de 1 minuto a 98°C y 1 minuto a 4°C.

### 2.5.2. Perfiles de RFLP, secuenciación y análisis de secuencias

La diversidad de secuencias se evaluó mediante perfiles de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Para ello los amplicones se digirieron con 30 U de la enzima de restricción de corte frecuente *HaeIII* (Fermentas) toda la noche a 37°C, seguido de una incubación de 10 min a 65°C para inactivar la enzima. Los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% en buffer TAE 1X y los tamaños de las bandas se compararon con el marcador de peso molecular 50 bp (Gibco BRL<sup>®</sup>) y 100 bp (Fermentas). Se seleccionaron 50 perfiles de RFLP únicos, los cuales se secuenciaron con el analizador genético 3730XL (Applied Biosystems) (Macrogen Inc.). Los clones secuenciados se guardaron en glicerol al 20 % a -80°C (Sambrook y cols., 1989).

Las secuencias de los clones obtenidos se compararon con aquellas disponibles en la base de datos del NCBI mediante el programa BLAST-n (Altschul y cols., 1997). La edición y el alineamiento de las secuencias se realizaron con el programa MEGA 4.1 (Tamura y cols., 2007) como se indicó anteriormente. El análisis de similitud entre las secuencias obtenidas se realizó con el programa MOTHUR 1.24.0. La similitud entre los perfiles de restricción observados se corroboró comparando éstos con los perfiles de restricción obtenidos por digestión *in silico* utilizando la misma enzima (*HaeIII*) en el programa Bioedit versión 7.0.9.0 (Hall, 1999).

### 2.6. Ensayo de purificación de biogás

La capacidad del consorcio seleccionado de remover el H<sub>2</sub>S del biogás se evaluó por triplicado con respecto al tratamiento control (medio de cultivo sin bacterias). Para ello se realizó un ensayo de cultivo en batch utilizando bolsas herméticas de 10 L

cebadas con biogás (cuya composición se indica en la Tabla 3), a las que se les inyectó un volumen de 280 mL de medio salino con piruvato 10 mM y 20 mL de inóculo obtenido de un cultivo fresco ( $DO_{600nm} = 0,5$ ). Las bolsas se incubaron a temperatura ambiente (25°C aprox.) en presencia de luz solar. Luego se registró a los 2, 4, 8 y 14 días de incubación la composición del biogás ( $CH_4$ ,  $H_2S$ ,  $CO_2$ ,  $CO$ ,  $O_2$ ) con un analizador de gases DrägerSensor® Smart CAT Ex (Dräger), a la vez que se determinó el crecimiento bacteriano mediante D.O. a 600 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21.

Considerando los rangos de error de cada sensor, los datos de concentración de  $H_2S$  se ajustaron a una regresión lineal, y las pendientes de cada tratamiento se compararon mediante el test de Mann-Whitney para evaluar la existencia de diferencia significativa entre ellos, utilizando para ello el programa STATISTICA 7.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Selección de bacterias fotoanoxigénicas por técnicas de cultivo

##### 3.1.1. Estratificación y selección de microorganismos

Para lograr la obtención de un cultivo enriquecido de bacterias fotoanoxigénicas se construyó una columna de Winogradsky, cuya estratificación se observó al cabo de dos meses aproximadamente; el aspecto final de la columna se muestra en la Figura 3.



**Figura 3.** Columna de Winogradsky. (A) Estratificación después de 2 meses de incubación (B) Región seleccionada correspondiente a Bacterias púrpuras (área punteada)

La estratificación de microorganismos en la columna se desarrolló debido al gradiente de condiciones fisicoquímicas determinadas por los sustratos agregados inicialmente a la muestra de suelo y por las condiciones de iluminación. La celulosa constituyó una fuente de carbono orgánico para los microorganismos heterótrofos fermentadores; la adición de  $\text{CaSO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{S}$  permitió establecer un gradiente de azufre desde su estado reducido en la zona anaeróbica, hasta su estado más oxidado en la zona aeróbica. El  $\text{CaCO}_3$  aportó como amortiguador y además como fuente de carbono ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) para el metabolismo de bacterias autotróficas anaeróbicas y aeróbicas.

Como se observa en la Figura 3B, la aparición de coloraciones rojas en el borde externo de la columna podría indicar la presencia de pigmentos fotosintéticos que correspondientes a bacterias púrpuras, entre éstas, las bacterias púrpuras del azufre que utilizan la luz como fuente de energía y el  $\text{H}_2\text{S}$  como dador de electrones para la fijación de  $\text{CO}_2$ . La aparición de estas coloraciones se presentó en la zona inferior de la columna, lo que indica que se desarrollaron en condiciones anaeróbicas. También se observaron en esta zona coloraciones verdes, posiblemente debido a bacterias verdes del azufre, y coloraciones negras ( $\text{FeS}$ ) que se podrían atribuir a bacterias sulfato-reductoras.

### **3.1.2. Aclimatación y enriquecimiento de las bacterias de interés**

Las zonas de color rojizo se transfirieron cuidadosamente con una espátula, en condiciones estériles, a un medio de cultivo líquido salino con carbonato,  $\text{Na}_2\text{S}$  y en atmósfera de  $\text{CO}_2$ . Luego, este cultivo se inoculó en tubos con medio sólido en dos fases, con el objetivo de estratificar nuevamente a los microorganismos en un gradiente de oxígeno y  $\text{Na}_2\text{S}$ . La etapa de crecimiento en medio sólido de dos fases se

observa en la Figura 4. El crecimiento de las bacterias seleccionadas se observa mayoritariamente en el agar inferior en que se encuentran condiciones de relativa anaerobiosis y presencia de azufre en forma de ión  $S^{2-}$ .

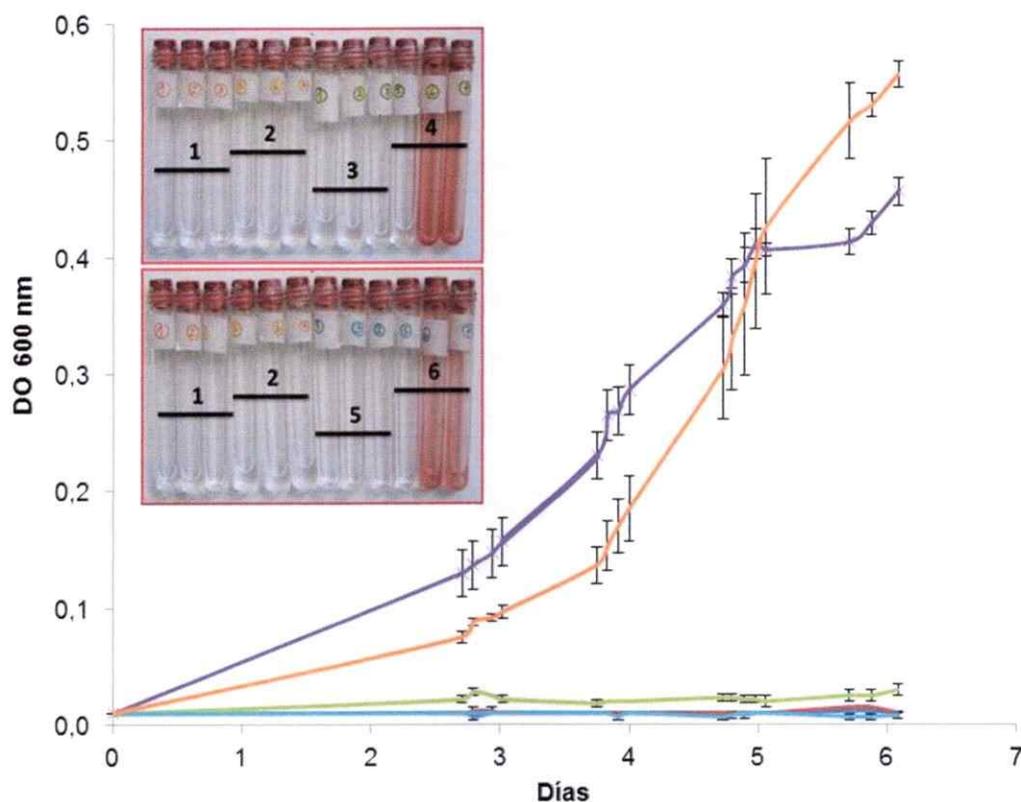


**Figura 4.** Medio sólido en dos fases con gradiente de azufre y oxígeno. La fase inferior contiene agar 1,5 % y  $Na_2S$  1 mM, y la fase superior contiene agar 0,25 % y  $Na_2S_2O_3$  0,8 mM.

### 3.2. Selección de las condiciones de crecimiento

Para definir las condiciones de crecimiento del inóculo seleccionado, se evaluó el efecto de dos fuentes de carbono (acetato y piruvato) en combinación con distintas atmósferas ( $CO_2$  y Biogás). En la Figura 5 se muestra el efecto, sobre el crecimiento bacteriano, de los seis tratamientos aplicados (1: medio salino +  $CO_2$ ; 2: medio salino + biogás; 3: medio salino + piruvato +  $CO_2$ ; 4: medio salino + piruvato + biogás; 5: medio salino + acetato +  $CO_2$ ; 6: medio salino + acetato + biogás). Se observa que sólo aquellos tratamientos con una fuente de carbono orgánico (acetato o piruvato) y atmósfera de biogás permitieron el crecimiento esperado. En el resto de los tratamientos no se observó un crecimiento significativo.

Con los datos de crecimiento, se realizó un ajuste de las curvas de mayor crecimiento (piruvato/biogás y acetato/biogás) utilizando la ecuación de Gompertz modificada para obtener los parámetros característicos:  $A$  (Densidad óptica máxima),  $\mu_m$  (Velocidad específica de crecimiento máxima),  $\lambda$  (Tiempo de latencia). Como se indica en la Tabla 6, según el test de ANOVA de una vía, no existen diferencias significativas entre los parámetros de cada tratamiento. Por lo tanto, se seleccionó una de las dos mejores condiciones de cultivo (medio salino con piruvato en atmósfera de biogás) para continuar con los ensayos posteriores.



**Figura 5.** Curva de crecimiento en seis condiciones. 1: medio salino +  $\text{CO}_2$  (azul), 2: medio salino + biogás (rojo), 3: medio salino + piruvato +  $\text{CO}_2$  (verde), 4: medio salino + piruvato + biogás (morado), 5: medio salino + acetato +  $\text{CO}_2$  (celeste); 6: medio salino + acetato + biogás (anaranjado). Las barras verticales corresponden a las desviaciones estándar de las mediciones, por triplicado, de cada curva.

**Tabla 6.** Parámetros de crecimiento del cultivo bacteriano. A: DO máxima,  $\mu_m$ : velocidad específica de crecimiento máxima,  $\lambda$ : tiempo de latencia.  $R^2$ : coeficiente de correlación. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

| Parámetros de crecimiento        | A       | $\mu_m$ | $\lambda$ | $R^2$   |
|----------------------------------|---------|---------|-----------|---------|
| medio salino + piruvato + biogás | 0,5016a | 0,1386a | 1,8727a   | 0,9854a |
| medio salino + acetato + biogás  | 0,9689a | 0,1847a | 2,8363a   | 0,9795a |

### 3.3. Enriquecimiento del cultivo de interés

A partir del cultivo enriquecido desde la columna de Winogradsky mediante el cultivo en dos fases, se realizó una segunda etapa de enriquecimiento del consorcio de interés mediante dos estrategias: cultivo líquido y cultivo sólido. La primera consistió en sucesivas transferencias en medio líquido, y la segunda consistió en transferencias sucesivas y alternadas en medio sólido y medio líquido para obtener colonias aisladas en medio sólido.

#### 3.3.1. Enriquecimiento en cultivo líquido

El enriquecimiento en cultivo líquido se realizó a partir de 10 mL de medio de cultivo líquido inoculado con 100  $\mu$ L de inóculo bacteriano en las condiciones definidas (medio salino + piruvato + biogás). El cultivo se incubó a 25°C en agitación con luz por una semana, hasta observar crecimiento (turbidez rojiza en el medio), ciclo que fue repetido 5 veces. El cultivo enriquecido, denominado C<sub>1</sub>, presenta una intensa coloración roja como se muestra en la Figura 6.

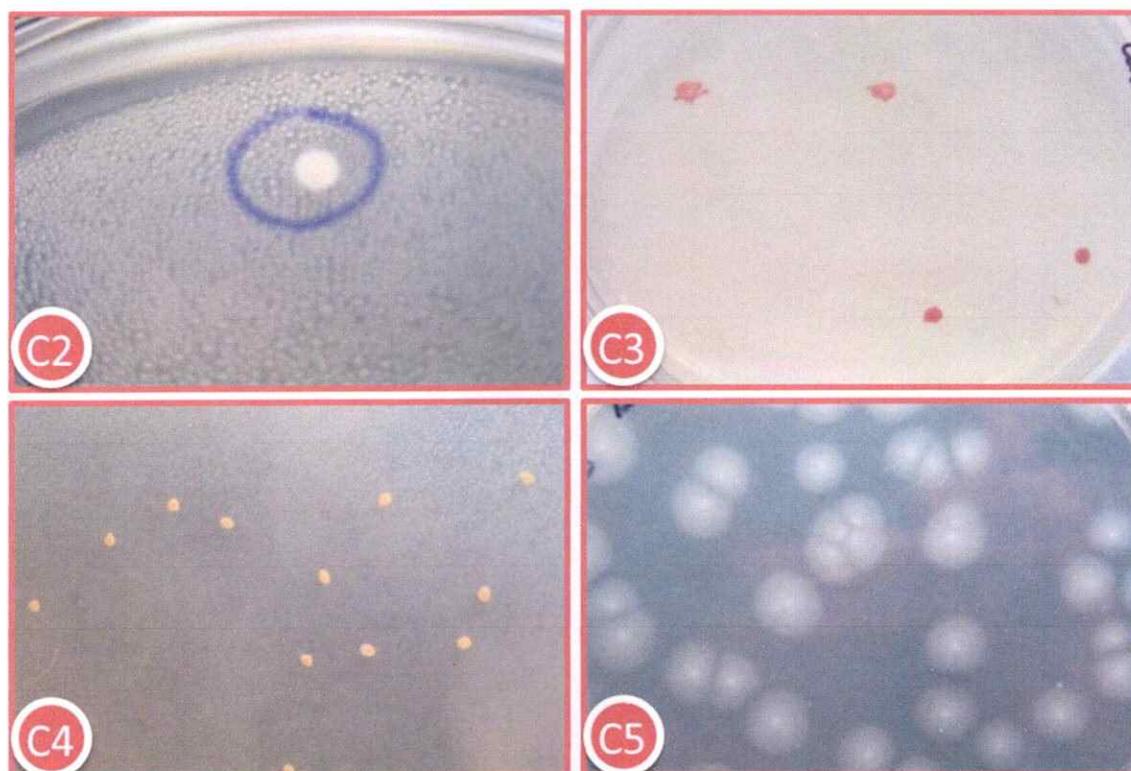


**Figura 6.** Cultivo C<sub>1</sub> enriquecido en medio líquido.

### 3.3.2. Enriquecimiento en cultivo sólido

Para el enriquecimiento en medio sólido, se realizaron diluciones seriadas del cultivo y se sembró en placas la dilución apropiada entre dos capas de medio sólido. Las placas se incubaron en ausencia de oxígeno a temperatura ambiente, hasta observar el crecimiento de colonias aisladas, que fueron reinoculadas en medio líquido de igual composición que las placas (medio salino + piruvato), en atmósfera de biogás. Este ciclo se repitió 10 veces, hasta obtener crecimiento de morfotipos homogéneos, como se observa en la Figura 7. Se lograron obtener 4 morfotipos diferentes: C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub>. El morfotipo C<sub>2</sub> corresponde a colonias de color blanco con halos concéntricos y borde difuso; C<sub>3</sub> a colonias de color rojo intenso, forma circular y borde irregular; el

morfotipo C<sub>4</sub> presentó color anaranjado, con forma ovalada y borde liso; finalmente, el morfotipo C<sub>5</sub> presentó color blanquecino y un núcleo rodeado de un crecimiento difuso.



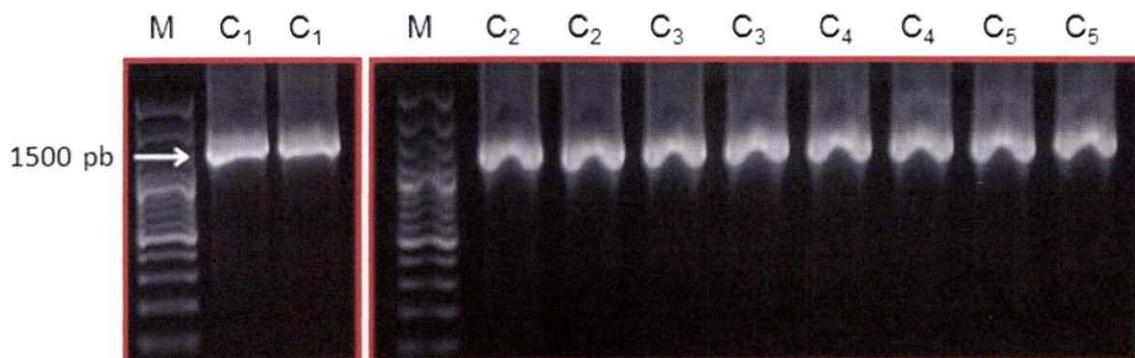
**Figura 7.** Morfotipos purificados en medio sólido con piruvato (parte superior) y las correspondientes fotografías en campo de microscopio óptico en aumento 100X (parte inferior).

### 3.4. Identificación de los cultivos enriquecidos

#### 3.4.1. Obtención de DNA genómico y amplificación del gen rDNA 16S

Los cultivos microbianos se identificaron mediante la secuencia del gen que codifica para el rRNA16S. Para esto se purificó el DNA total a partir de 1,8 mL de cada cultivo. La calidad del DNA genómico obtenido se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%. A partir del DNA genómico, obtenido de cada uno de los cultivos

enriquecidos ( $C_1$ - $C_5$ ), se amplificó por PCR el marcador molecular rDNA 16S y se visualizó el producto amplificado en un gel de agarosa al 1,2%. Se corroboró la presencia del amplificado de tamaño esperado (~1500 bp) para  $C_1$  (cultivo líquido), y para  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$  y  $C_5$  (colonias aisladas en medio sólido). Cada reacción se realizó en duplicado (Figura 8).

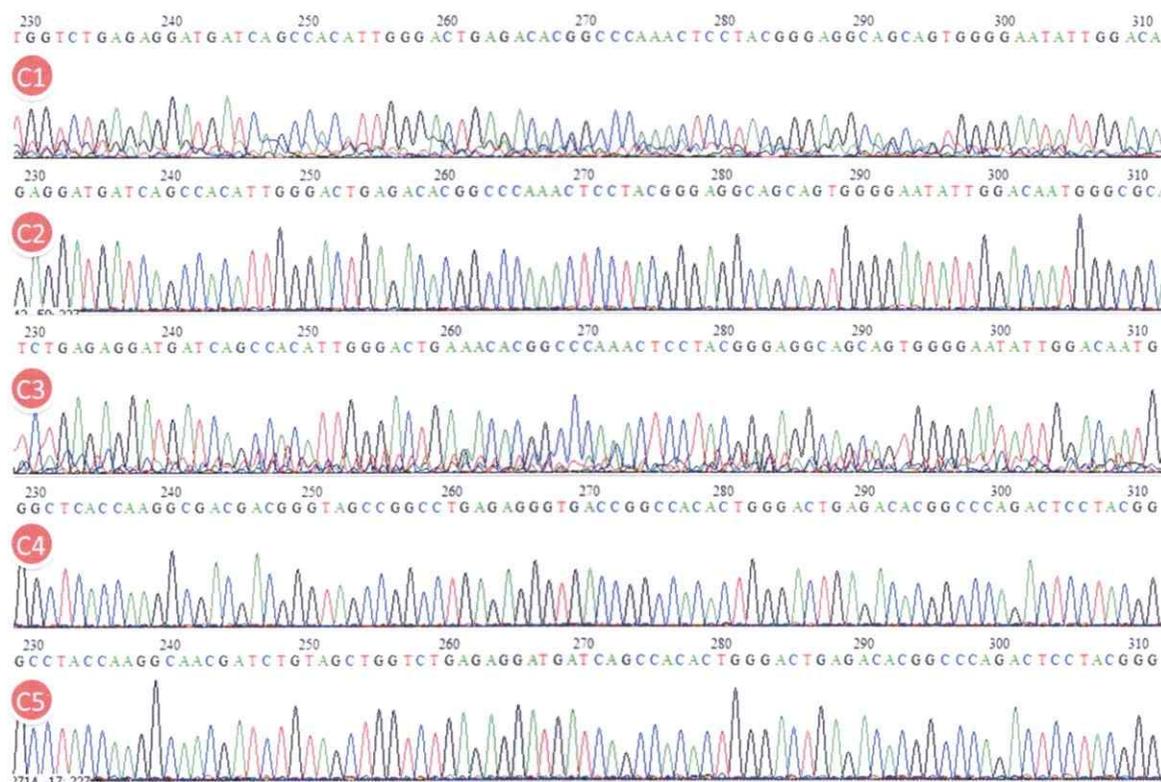


**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los amplicones del marcador molecular rDNA16S amplificado desde el DNA obtenido de cada uno de los cultivos purificados ( $C_1$ - $C_5$ ). M: marcador de tamaño molecular 100 bp.

#### 3.4.2. Análisis de las secuencias del gen del rRNA 16S

Los amplicones de la reacción de PCR para el gen rDNA 16S se secuenciaron. Las secuencias obtenidas se editaron y compararon con secuencias disponibles en la base de datos del NCBI mediante la herramienta bioinformática BLAST-n. El análisis de los cromatogramas muestra que en el caso de los cultivos  $C_1$  y  $C_3$  se trata de un consorcio y no de un cultivo puro (Figura 9). En estos consorcios la secuencia mayoritaria se relaciona al género *Rhodopseudomonas*, perteneciente al linaje de bacterias púrpuras no del azufre (Tabla 7). El resto de los aislados ( $C_2$ ,  $C_4$  y  $C_5$ ) no se

relacionaron a organismos que presenten el metabolismo de interés, relacionándose a organismos principalmente quimioorganotróficos: C<sub>2</sub> al género *Rizhobium*, C<sub>4</sub> al género *Kocuria*, y C<sub>5</sub> al género *Methyloversatilis* (Tabla 7).



**Figura 9.** Cromatogramas de la secuencia del gen del rRNA 16S obtenida para cada cultivo purificado (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>).

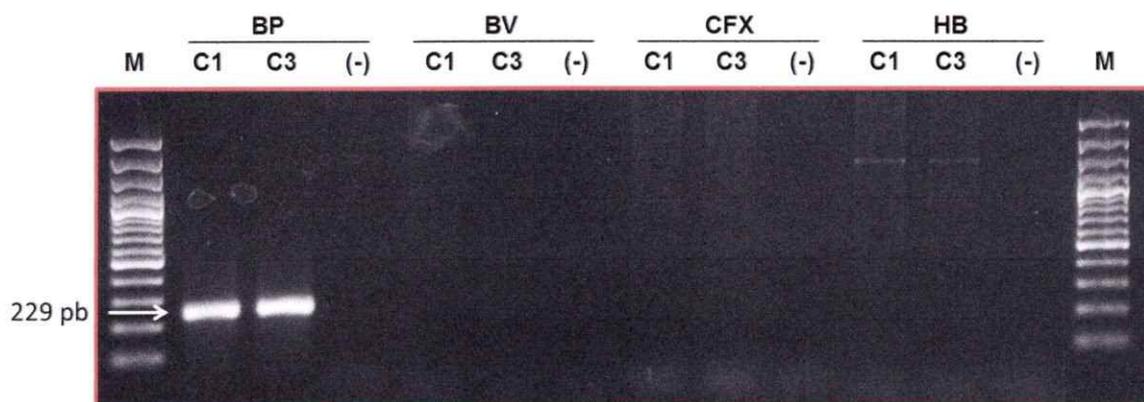
**Tabla 7.** Comparación de las secuencias del gen del rRNA 16S obtenidas para cada cultivo purificado (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>) con secuencias desde la base de datos.

| Cultivo            | % Cobertura | % Identidad | Organismo más relacionado    | Tipo de Metabolismo |
|--------------------|-------------|-------------|------------------------------|---------------------|
| C <sub>1</sub> (*) | 100         | 99          | <i>Rhodopseudomonas</i> sp.  | Fotoanoxigénico     |
| C <sub>2</sub>     | 99          | 99          | <i>Rhizobium</i> sp.         | Quimioorganotrófico |
| C <sub>3</sub> (*) | 100         | 100         | <i>Rhodopseudomonas</i> sp.  | Fotoanoxigénico     |
| C <sub>4</sub>     | 100         | 99          | <i>Kocuria</i> sp.           | Quimioorganotrófico |
| C <sub>5</sub>     | 100         | 99          | <i>Methyloversatilis</i> sp. | Quimioorganotrófico |

(\*) Consorcio microbiano

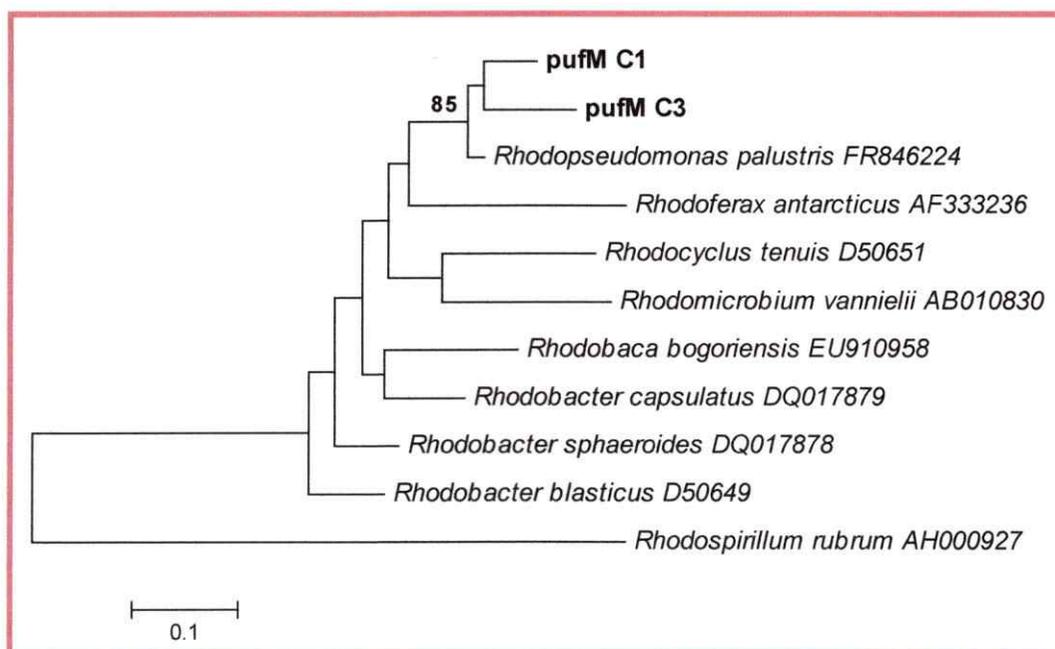
### 3.4.3. Amplificación de marcadores moleculares para verificar la presencia del metabolismo de interés

Para verificar la presencia del metabolismo fotoanoxigénico en C<sub>1</sub> (enriquecido en medio líquido) y C<sub>3</sub> (enriquecido en medio sólido), se amplificó mediante PCR el marcador molecular *pufM*, presente en bacterias púrpuras, y los marcadores basados en la secuencias del gen rDNA 16S para la detección de otros grupos fotoanoxigénicos (bacterias verdes del azufre, bacterias verdes no del azufre, y algunas especies del género *Heliobacteria*). Como se observa en la Figura 10, se obtuvo un producto de amplificación del tamaño esperado (229 pb) con los partidores específicos para bacterias púrpuras. Además, aunque muy tenue, se puede observar un producto de amplificación del tamaño esperado en los carriles correspondientes a Heliobacterias.



**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% del DNA amplificado con partidores para genes funcionales de bacterias fotoanoxidénicas. C<sub>1</sub>: DNA del cultivo purificado en medio líquido, C<sub>3</sub>: DNA del cultivo purificado en medio sólido, (-) indica control negativo sin DNA molde. BP: bacterias púrpuras, BV: bacterias verdes del azufre, CFX: bacterias verdes no del azufre (género *Chloroflexus*), HB: heliobacterias. M: marcador de peso molecular.

Posteriormente se obtuvo la secuencia del producto amplificado con los partidores *pufM* y utilizando secuencias disponibles en la base de datos del NCBI pertenecientes al grupo de bacterias púrpuras, se construyó un dendrograma utilizando el índice de distancia de Jukes & Cantor y el algoritmo de agrupamiento de Neighbor-Joining. El resultado se observa en la Figura 11, que indica que las secuencias del gen *pufM* de C<sub>1</sub> y C<sub>3</sub> forman un grupo definido, con un 85% de robustez, con la secuencia de *Rhodopseudomonas palustris*, una bacteria púrpura no del azufre.



**Figura 11.** Dendrograma del gen *pufM* construido utilizando el índice de distancia de Jukes & Cantor y el método de agrupamiento Neighbor-Joining. Sobre las ramas se muestra el valor de bootstrap mayor a 75 obtenido utilizando 500 réplicas. C1: DNA del cultivo purificado en medio líquido, C3: DNA del cultivo purificado en medio sólido. Los números de acceso de las secuencias de referencia se muestran junto al nombre de cada una.

### 3.5. Composición bacteriana del consorcio aislado

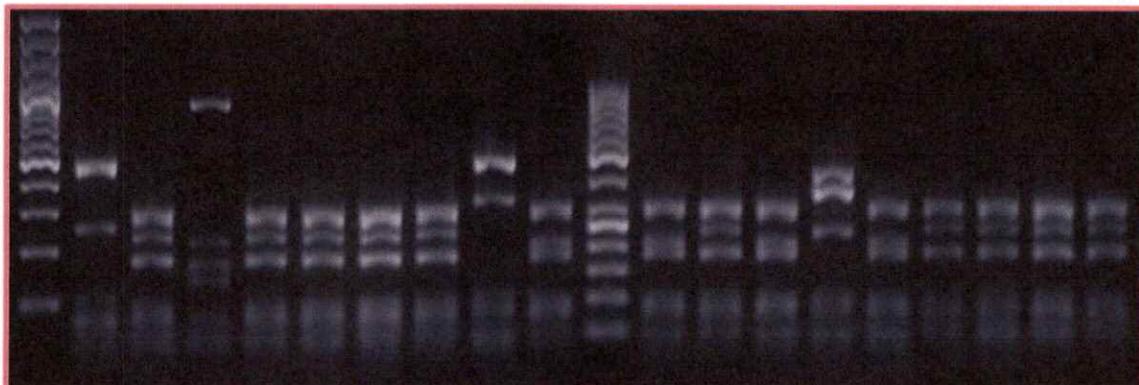
#### 3.5.1. Perfiles de RFLP

Considerando que los cultivos  $C_1$  y  $C_3$  no se purificaron completamente, como puede deducirse por el análisis de los cromatogramas del rDNA 16S, y teniendo en cuenta que ambos cultivos estarían dominados por bacterias relacionadas a *Rhodopseudomonas*, se determinó la composición bacteriana de  $C_1$  mediante la construcción de una genoteca del gen rDNA 16S. Luego de confirmar la obtención del producto de PCR esperado, éste se purificó, se ligó al vector pTZ57R/T y se clonó en *E. coli* JM107. Las colonias seleccionadas por su incapacidad de hidrolizar X-Gal en presencia de IPTG, se lisaron y se confirmó la presencia del inserto mediante PCR, usando los partidores específicos del vector de clonación, M13F y M13R, seguido de una electroforesis en gel de agarosa. El tamaño esperado para estos fragmentos fue de ~1500 bp, obteniendo en total 200 clones positivos.

Para estimar la variabilidad entre los clones se determinaron los perfiles de restricción (RFLP) de los amplicones clonados, a modo de ejemplo se muestra uno de los geles de RFLP en la Figura 12.

El análisis de los perfiles de restricción (RFLP) o haplotipos, usando la enzima de restricción *HaeIII*, reveló 18 haplotipos (H1 al H18) con diferentes frecuencias relativas, y 7 Haplotipos únicos (H19 al H26). Los haplotipos H1 y H2 concentran el 67,5% de abundancia de la genoteca (Tabla 8). Clones pertenecientes a cada perfil de restricción se seleccionaron para secuenciar (Detalle de clones secuenciados en Anexo).

M1 H12 H1 H10 H1 H1 H1 H1 H24 H1 M2 H1 H1 H1 H9 H1 H1 H1 H1 H1



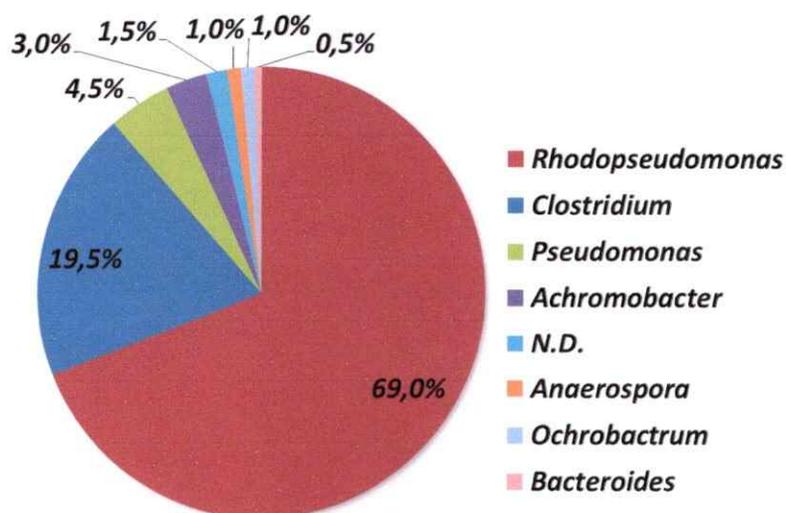
**Figura 12.** Perfiles de restricción en gel de agarosa al 2% de las secuencias del rDNA16S en los clones obtenidos. M1: marcador de peso molecular 100 bp, M2: Marcador de peso molecular 50 bp. Se indican con una H seguida de un número los haplotipos o perfiles de restricción (ej. H1).

**Tabla 8.** Análisis de los clones de la genoteca del rDNA 16S.

| Haplotipo    | Abundancia (%) | Nº Clones obtenidos | Nº clones secuenciados |
|--------------|----------------|---------------------|------------------------|
| H1           | 37,5           | 75                  | 3                      |
| H2           | 28,0           | 56                  | 4                      |
| H3           | 5,5            | 11                  | 6                      |
| H4           | 4,0            | 8                   | 4                      |
| H5           | 3,0            | 6                   | 4                      |
| H6           | 3,0            | 6                   | 4                      |
| H7           | 3,0            | 6                   | 4                      |
| H8           | 2,0            | 4                   | 2                      |
| H9           | 1,5            | 3                   | 2                      |
| H10          | 1,5            | 3                   | 1                      |
| H11          | 1,5            | 3                   | 1                      |
| H12          | 1,0            | 2                   | 2                      |
| H13          | 1,0            | 2                   | 2                      |
| H14          | 1,0            | 2                   | 2                      |
| H15          | 1,0            | 2                   | 1                      |
| H16          | 0,5            | 1                   | 0                      |
| H17          | 0,5            | 1                   | 0                      |
| H18          | 0,5            | 1                   | 0                      |
| H19 - H26*   | 4,0            | 8                   | 8                      |
| <b>Total</b> | <b>100</b>     | <b>200</b>          | <b>50</b>              |

### 3.5.2. Análisis de secuencias

Las secuencias de los clones se editaron y se compararon con secuencias disponibles en la base de datos del NCBI, utilizando la herramienta bioinformática BLAST-n. La composición de la genoteca (Figura 13) está dominada en un 67,5% por los haplotipos H1, H2, H12 y H13 que se asocian al género *Rhodopseudomonas* con un rango de 97 a 99% de identidad y de 94 a 97% de cobertura. Agregando los haplotipos únicos H19, H21 y H23, el género *Rhodopseudomonas* alcanza un 69% de abundancia. Los haplotipos H3, H4, H5, H6, H8 y H14 representan el 18,5% de los clones y se asocian al género *Clostridium* con un rango de 94 al 100% de identidad y de 97 a 100% de cobertura. Agregando los haplotipos únicos H20 y H22, el género *Clostridium* alcanza un 19,5% de representación. En proporción mucho menor (4,5%), se encuentran representados el género *Pseudomonas* y el género *Achromobacter* (3,0%); y en porcentajes del 1,5%, 1,0% y 0,5% se encontraron clones relacionados a los géneros *Ochrobactrum*, *Anaerospora* y *Bacteroides*, respectivamente. La identidad del 1,5% de los clones no pudo ser determinada (N.D.).



**Figura 13.** Abundancia relativa de los géneros más cercanamente relacionados a cada haplotipo de la genoteca del rDNA 16S para el cultivo C<sub>1</sub>.

### 3.6. Ensayo de purificación de biogás

Para estimar la capacidad del cultivo C<sub>1</sub> de remover el H<sub>2</sub>S presente en el biogás, se realizó un ensayo de purificación en cultivo del tipo batch. Para ello, se inoculó 20 mL de cultivo fresco en una bolsa de polietileno (10 L) que contenía 280 mL de medio de cultivo salino con piruvato y una atmósfera de biogás. Las bolsas se incubaron a temperatura ambiente, con exposición a la luz solar, y se registró la composición del biogás y la densidad óptica a 600 nm a diferentes tiempos de incubación (0, 2, 4, 8, 14 días). Los resultados de este ensayo se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Composición del biogás en presencia (inóculo) y ausencia (control) del consorcio seleccionado crecido en cultivo batch (promedio de tres réplicas con desviación estándar).

| Tiempo (días)          |         | 0         | 2           | 4           | 8           | 14         |
|------------------------|---------|-----------|-------------|-------------|-------------|------------|
| CH <sub>4</sub> (%)    | Control | 68 ± 0,0  | 66,3 ± 0,6  | 68 ± 0,0    | 68 ± 0,0    | 71,3 ± 1,2 |
|                        | Inóculo | 68 ± 0,0  | 68 ± 0,0    | 68 ± 0,0    | 68 ± 0,0    | 68 ± 0,0   |
| CO <sub>2</sub> (%)    | Control | 31 ± 0,0  | 29 ± 0,0    | 29 ± 0,0    | 28 ± 0,0    | 27,7 ± 0,6 |
|                        | Inóculo | 31 ± 0,0  | 27 ± 0,0    | 27 ± 0,0    | 28,3 ± 0,6  | 28,0 ± 0,0 |
| CO (%)                 | Control | 27 ± 0,0  | 21,3 ± 0,0  | 21,7 ± 0,0  | 11,7 ± 0,6  | 5,0 ± 0,0  |
|                        | Inóculo | 27 ± 0,0  | 24 ± 0,0    | 20,7 ± 0,6  | 11,3 ± 0,6  | 5,0 ± 0,0  |
| O <sub>2</sub> (%)     | Control | 0,3 ± 0,0 | 0,6 ± 0,0   | 0,9 ± 0,1   | 1,1 ± 0,0   | 0,9 ± 0,0  |
|                        | Inóculo | 0,3 ± 0,0 | 0,5 ± 0,0   | 0,7 ± 0,0   | 0,7 ± 0,0   | 0,8 ± 0,0  |
| H <sub>2</sub> S (ppm) | Control | 585 ± 0,0 | 410,7 ± 1,2 | 367,3 ± 3,1 | 198,3 ± 3,1 | 15,7 ± 0,6 |
|                        | Inóculo | 585 ± 0,0 | 389,3 ± 1,2 | 328,7 ± 1,2 | 161,3 ± 2,5 | 0,0 ± 0,0  |

En la Tabla 10 se indican los rangos de error asociados a cada sensor. Con ellos se puede determinar que el CH<sub>4</sub>, principal componente del biogás, presenta un valor inicial de 68% y que en presencia de bacterias no se ve afectado, mientras que

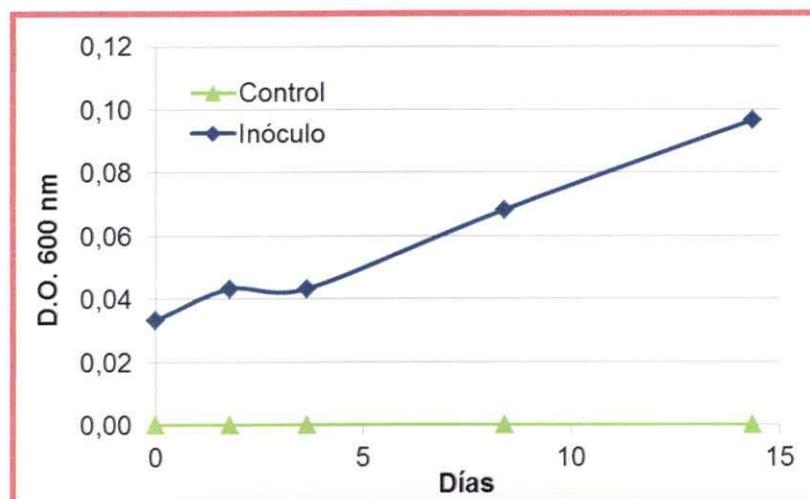
en ausencia de bacterias aumenta levemente a un 71,3%. El CO<sub>2</sub> no varía su concentración inicial al considerar los errores asociados a las mediciones iniciales y finales, alcanzando un valor de 27,7% en el tratamiento control y 27,9% en el tratamiento con inóculo. El CO disminuye su concentración de 27% a 5% en ambos tratamientos. El O<sub>2</sub> presenta un comportamiento inverso al CO, aumentando en ambos tratamientos y llegando a un 0,9% en el control, y a un 0,8% en presencia de inóculo. Por último, el H<sub>2</sub>S disminuye de manera notable en ambos tratamientos, alcanzando un valor de 0 ppm en el tratamiento con inóculo, mientras que en el tratamiento control, se registran aún 16,5 ppm.

**Tabla 10.** Rangos de error de los sensores asociados a cada tipo de gas medido

| <b>Sensor</b>    | <b>Rango de error<br/>(% del valor medido)</b> |
|------------------|--|
| CH <sub>4</sub>  | ± 0,2%   |
| CO <sub>2</sub>  | ± 5,0%   |
| O <sub>2</sub>   | ± 1,0%   |
| CO               | ± 1,0%   |
| H <sub>2</sub> S | ± 5,0%   |

Considerando el límite inferior de detección del sensor de H<sub>2</sub>S (1 ppm), se evaluó estadísticamente la diferencia encontrada entre los tratamientos para este componente del biogás. Para ello, se realizó un análisis de regresión lineal para obtener las respectivas pendientes de los tratamientos y compararlas mediante el test de Mann-Whitney. El resultado del test indica que el tratamiento con inóculo presenta una pendiente de -1,55 con un coeficiente de correlación (R<sup>2</sup>) equivalente a 0,94;

mientras que el tratamiento sin inóculo presenta una pendiente menor de -1,53, con un  $R^2$  igual a 0,96. La diferencia encontrada entre las pendientes es significativa, avalado por un valor de  $p$  menor a 0,05. Como se observa en la Figura 14, el crecimiento bacteriano fue evidente en el tratamiento con inóculo, y ausente en el tratamiento control.



**Figura 14.** Curva de crecimiento ( $DO_{600\text{ nm}}$ ) del tratamiento con inóculo (color azul) y del tratamiento sin inóculo (color verde) durante el ensayo de purificación de biogás.

## 4. DISCUSIÓN

El uso de bacterias en el proceso de purificación de biogás (métodos microbiológicos) ha sido un tema estudiado con diferentes enfoques desde hace más de tres décadas, lo que ha permitido ampliar y actualizar el conocimiento en dos ámbitos principales: condiciones óptimas de crecimiento de las cepas más aptas, y diseño de biorreactores. Desde esta perspectiva, han surgido mayores posibilidades de rentabilizar el escalamiento, tanto así, que a la fecha se registran varias patentes a nivel mundial. Además, se ha hecho un balance de las ventajas y desventajas de esta biotecnología, en los numerosos trabajos de revisión. Los primeros estudios, se enfocaron en evaluar la viabilidad de crecimiento en sistemas de cultivo batch y continuo. Cork y cols. (1983), demostraron por primera vez que una especie fotosintética (*Chlorobium limicola*) era capaz de crecer con nutrientes inorgánicos de un flujo gaseoso continuo. Luego Kobayashi y cols. (1983) evaluarían por primera vez esta misma especie en condiciones controladas de iluminación y potencial redox. Ya en la década de los 90 se realizaron contribuciones en el área de optimización de parámetros (luz, temperatura, pH, nutrientes) y también en aspectos de diseño de los biorreactores. Así, Maka y Cork. (1990) estudiaron en *Chlorobium thiosulfatophilum*, el efecto de la intensidad luminosa, área irradiada y flujo de H<sub>2</sub>S en el metabolismo oxidativo del azufre. Por otra parte, Kim y cols. (1992) realizaron estudios de cinética comparando diferentes tamaños de bioreactor. Asimismo, Kim y cols. (1996) estudiaron un modelo de reactor bidimensional con luz LED, demostrando una

eficiencia 5 veces superior en relación a reactores cilíndricos. Otro aporte lo realizó Basu y cols. (1996), cuando estudiaron la remoción de  $H_2S$  con la especie *C. thiosulfatophilum*, obteniendo 100% de eficiencia y una alta recuperación de  $S^0$ , pero además incorporando un exhaustivo análisis económico, que permitió concluir la rentabilidad del proceso. Finalmente, desde el año 2000 en adelante, se han publicado estudios similares de optimización del proceso, en el que se ha seguido usando como modelo la especie *C. thiosulfatophilum*. En este sentido, existe una fuerte tendencia hacia la especialización y una falta de estudios de exploración, en donde se evalúen nuevos grupos bacterianos fotoanoxigénicos con potencial uso como biofiltros para purificar el biogás y otros gases sulfurados. En este trabajo se estudió el potencial de un grupo bacteriano fotoanoxigénico con fines aplicados en la purificación de biogás, las bacterias púrpuras no del azufre.

#### **4.1. Selección y enriquecimiento de bacterias fotoanoxigénicas**

El consorcio de bacterias fotoanoxigénicas (púrpuras no del azufre) se seleccionó a partir de microcosmos del tipo Winogradsky, y posterior enriquecimiento en cultivo líquido tipo batch en condiciones controladas. En la etapa de selección se formuló un medio de cultivo y condiciones que permitieran un crecimiento inicial rápido, entre ellas la presencia de biogás y fuentes de carbono orgánico que estimulan el crecimiento fotosintético, favoreciendo la fotoheterotrofia. Se sabe que las bacterias púrpuras no del azufre requieren de compuestos de carbono orgánico para crecer más rápido, y los ácidos mono o dicarboxílicos, comúnmente productos finales de la fermentación (como acetato y piruvato) son generalmente los mejores sustratos (Gibson, 1974). Los resultados obtenidos también muestran que el crecimiento con una fuente carbono

orgánica es mejor en presencia de biogás que en una atmósfera de CO<sub>2</sub>. Esto sugiere que alguno de los componentes del biogás puede ser necesario para el crecimiento. En relación a esto, se ha descrito que algunas bacterias púrpuras no del azufre son capaces de tolerar y usar el sulfuro como donador de electrones fotosintético, casos en los cuales se añade al medio de cultivo Na<sub>2</sub>S en concentraciones de 0,4 a 1 mM, o hasta 2 mM para las más tolerantes (Imhoff, 2006). Otro estudio reportó que *R. palustris* tiene la capacidad de crecer en un medio basal suplementado con 0,01% de extracto de levadura y 0,8 mM de sulfuro (Hansen y Gemerden, 1972). El extracto de levadura es fuente de vitaminas y minerales, pero también de carbono orgánico, lo que permitiría suponer que en este trabajo el cultivo podría estar comportándose de la misma manera y que entonces estaría consumiendo el H<sub>2</sub>S proveniente del biogás.

Por otra parte la presencia de pigmentos también está asociada a la presencia de biogás y a las condiciones de cultivo con luz fluorescente. En un estudio reciente se obtienen resultados coincidentes, al comparar el crecimiento y contenido de carotenoides en la especie *R. palustris* variando la fuente de luz, entre ellas incandescente, halógena, fluorescente, LEDs, blanca, amarilla, roja, azul, y verde. Se encontró mayor crecimiento con luz azul y fluorescente, y menor crecimiento con verde y amarilla (Kuo y cols., 2012).

Otro factor selectivo fue la baja tensión de oxígeno generada por el biogás. En este trabajo, se corrobora la condición anaeróbica con el hallazgo de secuencias relacionadas a especies anaerobias estrictas (*Clostridium*). Además, se sabe que bacterias fotoanoxigénicas comienzan a sintetizar pigmentos cuando la tensión de oxígeno es reducida, en particular se ha descrito que las bacterias púrpuras no del

azufre, requieren un umbral especie específico de oxígeno mínimo para desencadenar su formación (Drews y Oelze, 1981; Kiley y Kaplan, 1988).

La presencia de bacterias fotosintéticas anóxicas en el consorcio enriquecido pudo ser demostrada mediante la amplificación de un marcador molecular específico (*pufM*) el cual codifica para la subunidad M del centro de reacción fotosintético distribuido universalmente en el grupo de bacterias púrpuras. Este marcador presenta la ventaja de ser específico de un grupo fisiológico filogenéticamente diverso, lo que ha sido aprovechado en numerosos estudios para detectar bacterias fotoanóxicas en diferentes ambientes tanto naturales como artificiales: superficie de hojas, lagos, agua de mar, lodos activados, entre otros (Atamna-Ismaeel y cols., 2012; Karr y cols., 2003; Waidner y cols., 2008; Hirose y cols., 2012; Liang y cols., 2010). La amplificación de este marcador mediante PCR en combinación con otras técnicas moleculares (PCR cuantitativo, genoteca, DGGE, T-RFLP) se han utilizado para estudiar la diversidad y dinámica de las comunidades bacterianas fotosintéticas (Ying y cols., 2008; Tank y cols., 2011; Ranchou-Peyruse y cols., 2006). Por otra parte, el resultado de la identificación y del análisis de agrupamiento de las secuencias *pufM* obtenidas, fue coherente con los resultados de composición bacteriana obtenidos de la genoteca del gen rDNA 16S, ya que con ambas estrategias la secuencia del marcador se asoció con la especie *R. palustris*. También cabe destacar que con el marcador molecular para Heliobacterias se detectó una tenue amplificación, lo que indicaría presencia de otro grupo fotoanóxico en el consorcio seleccionado, distinto al de bacterias púrpuras. Este resultado también es coherente con los resultados de composición obtenida mediante la genoteca del gen rDNA 16S, en la cual se obtuvieron clones asociados al género *Clostridium*, perteneciente al grupo de Heliobacterias.

La composición bacteriana del consorcio obtenido estuvo dominada por dos géneros: *Rhodopseudomonas* (69%) y *Clostridium* (19,5%). La mayor abundancia, de *Rhodopseudomonas* (género de bacterias púrpuras no del azufre), es un indicador del éxito en la selección y purificación de las bacterias de interés. En particular, la especie *R. palustris*, es conocida por su extraordinaria versatilidad metabólica, ya que es capaz de crecer mediante cuatro estrategias diferentes: i) anaeróbica y fotoautótrofamente ii) anaeróbica y fotoheterótrofamente sobre varias fuentes de carbono, iii) anaeróticamente y en oscuridad por fermentación de azúcares como única fuente de carbono y energía, iv) aeróbica y quimioautotóticamente en oscuridad con H<sub>2</sub> como fuente de energía y poder reductor (Larimer y cols., 2004). Dada su capacidad de crecer en distintas condiciones, se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, y recientemente han obtenido la secuencia de su genoma completo (Larimer y cols., 2004). Se ha reportado que la tolerancia de *R. palustris* al sulfuro es de 0,5 mM, y que lo transforma directamente a sulfato, sin producir intermediarios (Hansen y Gemerden, 1972), lo que explicaría la reducción de sulfuro observada en el biogás de cultivo.

Por otra parte, el género *Clostridium*, se caracteriza por poseer un metabolismo fermentador y anaerobio estricto. En particular se encontraron secuencias relacionadas a las especies *C. tunisiense* (7,5%), *C. xylanovorans* (6%), y *C. mesophilum* (5%). Se ha descrito que las dos primeras fermentan diversos compuestos orgánicos a acetato, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, y que no utilizan sulfato como aceptor de electrones; sin embargo, *C. tunisiense* utiliza azufre como aceptor de electrones y es productor de H<sub>2</sub>S (Thabet y cols., 2004; Mechichi y cols., 1999). Estos resultados sugieren que en el caso de aumentar la fracción de *C. tunisiense*, podría verse amenazada la eficacia del biofiltro para remover H<sub>2</sub>S. No obstante, los consorcios pueden realizar tareas complejas y

eventualmente podrían ser más estables a perturbaciones o condiciones ambientales cambiantes respecto de poblaciones clonales o monoespecíficas (Brenner y cols., 2008). Así también, se sabe que las interacciones interespecíficas jugarían un rol importante en la estabilidad del ensamble microbiano. Estos antecedentes apoyarían la aproximación del uso de consorcios o cultivos mixtos para la purificación de biogás, ya que es posible que el acetato y el  $\text{CO}_2$  producidos por microorganismos fermentadores sea una fuente de carbono adicional para la fracción fotoanoxigénica.

#### **4.2. Aplicación del consorcio microbiano a la purificación de biogás**

En este trabajo, mediante un cultivo mixto de bacterias fotoanoxigénicas, crecido en condiciones ambientales y en un sistema tipo batch, se logró registrar la remoción total del  $\text{H}_2\text{S}$  presente en la mezcla de biogás, desde 585 a 0 ppm ( $\pm 1$  ppm), mostrando diferencia significativa con el tratamiento control (medio de cultivo sin bacterias). Aunque es importante destacar que el tratamiento control también tuvo la capacidad de atrapar  $\text{H}_2\text{S}$ , probablemente por oxidación química de  $\text{H}_2\text{S}$  a sulfato, también es importante mencionar que el biofiltro microbiológico podría presentar la ventaja de no saturarse o tener mayor vida útil que una solución quelante de sulfuro, lo que tiene sin duda, directa relación con los costos de mantención y por ende rentabilidad del proceso. Por otra parte, una mayor eficiencia y eficacia en la extracción de sulfuros se podría conseguir optimizando la función de estos consorcios mejorando las condiciones de cultivo tales como intensidad luminosa, temperatura, pH o condiciones nutricionales que favorezcan el consumo de  $\text{H}_2\text{S}$ . Estudios con *C. thiosulfatophilum*, una bacteria verde del azufre muestra que es altamente eficiente en

reducir el  $H_2S$  cuando se controlaron de manera exhaustiva otras variables como luz, temperatura, pH (Henshaw y cols., 2001).

Otra ventaja comparativa del uso de filtros microbianos como el que se describe en este trabajo, es la producción de biomasa con valor agregado, ya que *R. palustris* tendría un alto potencial como fuente de proteína, suplemento animal y biofertilizante (Carlozzi y cols, 2001; Saikour y cols., 2009).

Adicionalmente, casi todas las especies de bacterias púrpuras no del azufre son capaces de crecer en microaerofilia, las bacterias púrpuras del azufre poseen esta capacidad menos distribuída entre sus miembros, en tanto que las bacterias verdes del azufre y heliobacterias son anaerobias estrictas y el subgrupo Chloroflexus posee una única especie aeróbica facultativa (Overmann y García-Pichel, 2006). La capacidad de las bacterias púrpuras no del azufre de crecer en presencia de bajas concentraciones de oxígeno puede ser un factor que favorece su uso como biofiltro ya que el biogás generalmente contiene un pequeño porcentaje de oxígeno ya sea por el origen de éste o por contaminación posterior a su extracción.

Por otra parte, bacterias fotoanoxigénicas como *Rhodopseudomonas* sp., que exhiben un metabolismo diverso, constituyen un buen recurso microbiano para aplicaciones en biofiltros ya que se pueden producir mayores volúmenes de inóculo cuando se cultivan con fuentes de carbono orgánico para favorecer el metabolismo fotoheterotrófico; a la vez que se podría favorecer el metabolismo anaeróbico fotoautótrofico, lo cual podría reducir parte del  $CO_2$  presente en el biogás (diluyente del poder combustible), además de asimilar el  $H_2S$ .

## 5. CONCLUSIONES

- Los principales factores que determinaron la selección y aislamiento del consorcio enriquecido en bacterias fotoanoxigénicas del grupo de bacterias púrpuras no del azufre fueron: las fuentes de carbono orgánico (piruvato y acetato), el biogás y la luz fluorescente.
- La amplificación del marcador molecular *puflM* corroboró la efectividad del método de selección y enriquecimiento utilizado para obtener bacterias púrpuras desde una muestra ambiental.
- El consorcio bacteriano aislado presenta potencial para la purificación de biogás dado que:
  - Su composición genética estuvo dominada por el género *Rhodopseudomonas*, cuyo metabolismo es asimilador de H<sub>2</sub>S en presencia de fuentes de carbono.
  - El ensayo de reducción de los niveles de H<sub>2</sub>S mostró diferencias significativas entre el tratamiento control y el tratamiento con bacterias.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Atamna-Ismaeel, N., Finkel, O., Glaser, F., Von Mering, C., Vorholt, J., Koblizek, M., Belkin, S. y Beja, O. 2012. Bacterial anoxygenic photosynthesis on plant leaf surfaces. *Environmental Microbiology Reports* 4: 209-216.
- Atlas, R.M. y Bartha, R. 1998. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. 4ª Ed. Addison Wesley. pp. 429.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller W., y Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Abatzoglou, N. y Boivin, S. 2009. A review of biogas purification processes. *Biofuels, Bioproduct and Biorefining* 3: 42-71.
- Acherbach, L., Carey, J. y Madigan, M. 2001. Photosynthetic and phylogenetic primers for detection of anoxygenic phototrophs in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2922-2926.
- Angelidaki, I., Ellegaard, L. y Ahring, B.K. 1993. A mathematical model for dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: focusing on ammonia inhibition. *Biotechnology and Bioengineering* 42: 159-166.
- Bagi, Z., Acs, N., Bálint, B., Horváth, L., Dobó, K., Perei, K.R., Rákhely, G. y Kovacs, K.L. 2007. Biotechnological intensification of biogas production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76: 473-482.
- Basu, R., Clausen, E.C. y Gaddy, J. 1996. Biological conversion of hydrogen sulfide into elemental sulfur. *Environmental Progress* 15: 234-238.
- Blankenship, R. 1992. Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynthesis Research* 33: 91-111.
- Brenner, K., Lingchong, Y. y Arnold, F. 2008. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology* 26: 483-489.
- Bruser, T., Lens, P. y Truper, H. 2000. The biological sulfur cycle. *En: Lens, P.N.L. y Hulshoff, L.W. (eds). Environmental technologies to treat sulfur pollution*. IWA Publishing, United Kingdom. pp. 47-86.
- Buisman, P., Ijspeert, P., Gerahts, G. y Lettixga, G. 1989. Biotechnological process for sulphide removal with sulphur reclamation. *Acta Biotechnologica* 9: 255-267.
- Carlozzi, P. y Sacchi, A. 2001. Biomass production and studies on *Rhodospseudomonas palustris* grown in an outdoor, temperature controlled, underwater tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology* 88: 239-249.

- Çetinkaya, G., Öztürk, A. y Çakmakci, L. 1999. Properties of the *Rhodopseudomonas palustris* strains isolated from an Alkaline Lake in Turkey. *Turkish Journal of Biology* 23: 457-463.
- Cork, D., Garunas, R. y Sajjad, A. 1983. *Chlorobium limicola* forma *thiosulfatophilum*: biocatalyst in the production of sulfur and organic carbon from a gas stream containing H<sub>2</sub>S and CO<sub>2</sub>. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 913-918.
- Chamy, R. y Vivanco, E. 2007. Identificación y clasificación de los distintos tipos de biomasa disponibles en Chile para la generación de biogás. Proyecto Energías Renovables No Convencionales en Chile (CNE/GTZ). pp. 75.
- Charlton, P.J., McGrath, J.E. y Harfoot, C.G. 1997. The Winogradsky plate, a convenient and efficient method for the enrichment of anoxygenic phototrophic bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 30: 161-163.
- Chile. Ministerio de Economía. 2007. Ley 20.257: Introduce modificaciones a la ley general de servicios eléctricos respecto de la generación de energía eléctrica con fuentes de energías renovables.
- Drews, G. y Oelze, J. 1981. Organization and differentiation of membranes of phototrophic bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 22: 1-92.
- Fredriksson, H., Baky, A., Bernesson, S., Nordberg, A., Norén, O. y Hansson, P. 2006. Use of on-farm produced biofuels on organic farms - evaluation of energy balances and environmental loads for three possible fuels. *Agricultural System* 89: 184-203.
- Frigaard, N. y Dahl, C. 2009. Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 54: 103-200.
- Fuchs, G., Stupperich, E. y Eden, G. 1980. Autotrophic CO<sub>2</sub> fixation in *Chlorobium limicola* evidence for the operation of a reductive tricarboxylic acid cycle in growing cells. *Archives of Microbiology* 128: 64-71.
- Gibson, J. 1974. Uptake of C4 dicarboxylates and pyruvate by *Rhodopseudomonas spheroides*. *Journal of Bacteriology* 123: 471-480.
- Ghosh, W. y Dam, B. 2009. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. *Microbiology Reviews* 33: 999-1043.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hansen, T. y Gemerden, H. 1972. Sulfide utilization by purple non sulfur bacteria. *Archives of Microbiology* 86: 49-56.
- Haskins, E. y Kihara, T. 1967. The use of spectrophotometry in an ecological investigation of the facultatively anaerobic purple photosynthetic bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 13: 1283-1293.

- Henshaw, P. y Zhu, W. 2001. Biological conversion of Hydrogen sulphide to elemental sulphur in a fixed-film continuous flow photo-reactor. *Water Research* 35: 3605-3610.
- Hirose, S., Nagashima, K., Matsuura, K. y Haruta, S. 2012. Diversity of Purple Phototrophic Bacteria, Inferred from *pufM* Gene, within Epilithic Biofilm in Tama River, Japan. *Microbes and Environments* 27: 327-329.
- Horikawa, M.S., Rossi, F., Gimenes, M.L., Costa, C.M., y da Silva, M.G. 2004. Chemical absorption of H<sub>2</sub>S for biogas purification. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 21: 415-422.
- Huber, H. y Stetter, K.O. 2001. Sulfolobales. *En: Boone, D.R., Castenholz, R.W. y Garrity, G.M. (eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. Springer, New York, USA. pp. 198.*
- Imhoff, J.F. 1995. Taxonomy and physiology of phototrophic purple bacteria and green sulfur bacteria. *En: Blankenship, R.E., Madigan, M.T. y Bauer, C.E. (eds.). Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, Londres, Moscú. pp. 1-15.*
- Imhoff, J.F. 2006. The phototrophic Alpha-proteobacteria. *En: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. y Stackebrandt, E. (eds.). Prokaryotes. Springer, New York, USA. pp. 41-64.*
- IPCC, 2012. Change mitigation special report of the intergovernmental panel on climate change. Madrugá, R.P., Edenhofer, O. y Sokona, Y. (eds.). Cambridge University Press, United Kingdom, USA. pp. 7.
- Jin, Y., Veiga, M. y Kennes, C. 2005. Effects of pH, CO<sub>2</sub>, and flow pattern on the autotrophic degradation of hydrogen sulfide in a biotrickling filter. *Biotechnology and Bioengineering* 92: 462-471.
- Jukes, T.H. y Cantor, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. *En: Munro, H.N. (ed.). Mammalian protein metabolism. Academic Press, New York. pp. 21-132.*
- Karr, E., Sattley, M., Jung, D., Madigan, M. y Achenbach, L. 2003. Remarkable diversity of phototrophic purple bacteria in a permanently frozen Antarctic lake. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4910-4914.
- Kim, B., Chang, H., Kim, K. y Leet, K. 1992. Growth kinetics of the photosynthetic bacterium *Chlorobium thiosulfatophilum* in a fed-batch reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 40: 583-592.
- Kim, Y., Kim, B. y Chang H. 1996. Desulfurization in a plate-type gas-lift photobioreactor using light emitting diodes. *Korean Journal of Chemical Engineering* 13: 606-611.
- Kiley, P.J. y Kaplan, S. 1987. Cloning, DNA sequence, and expression of the *Rhodobacter sphaeroides* light-harvesting B800-850 genes. *Journal of Bacteriology* 169: 3268-3276.

- Kobayashi, M. y Nakamishi H. 1971. Construction of a purification plant for polluted water using photosynthetic bacteria. *Journal of Fermentation Technology* 49: 817-825.
- Kobayashi, H., Stenstrom M. y Mah, R. A. 1983. Use of photosynthetic bacteria for hydrogen sulfide removal from anaerobic waste treatment effluent. *Water Research* 17: 579-587.
- Kuo, F.S., Chien, Y.H. y Chen, C.J. 2012. Effects of light sources on growth and carotenoid content of photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas palustris*. *Bioresource Technology* 113: 315-318.
- Larimer, F.W., Chain, P., Hauser, L., Lamerdin, J., Malfatti, S. y cols. 2004. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Nature Biotechnology* 22: 55-61.
- Liang, C.M., Hung, C.H., Hsu, S.C. y Yeh, C. 2010. Purple nonsulfur bacteria diversity in activated sludge and its potential phosphorus-accumulating ability under different cultivation conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86: 709-719.
- Maka, A. y Cork, D. 1990. Quantum efficiency requirements for an anaerobic photobioreactor. *Journal of Industrial Microbiology* 5: 337-354.
- Mechichi, T., Labat, M., García, P., Thomas, P. y Patel, B. 1999. Characterization of a new xylanolytic bacterium, *Clostridium xylanovorans* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 22: 366-471.
- Overmann, J. y García-Pichel, F. 2006. The phototrophic way of life. *En: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. y Stackebrandt, E. (eds.). Prokaryotes*. Springer, New York, USA. pp 32-85.
- Overmann, J. 2006. The family Chlorobiaceae. *En: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K., y Stackebrandt, E. (eds). Prokaryotes*. Springer, New York, USA. pp. 359-378.
- Pierson, B.K. y Castenholz, R.W. 1974. Studies of pigment and growth in *Chloroflexus aurantiacus*, a phototrophic filamentous bacterium. *Archives of Mikrobiologie* 100: 283-305.
- Pontt, C. 2008. Potencial de biomasa en Chile. Estudio de contribución de las ERNC al SIC al 2025. pp. 75.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. y Klein, L.A. 2003. *Microbiology*, 5th edition. McGraw-Hill, New York.
- Ranchou-Peyruse, A., Herbert, R., Caumette, P. y Guyoneaud, R. 2006. Comparison of cultivation-dependent and molecular methods for studying the diversity of anoxygenic purple phototrophs in sediments of an eutrophic brackish lagoon. *Environmental Microbiology* 8: 1590-1599.
- Saitou, N. y Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbort Lab, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Syed, M., Soreanu, G., Falletta, P. y Béland, M. 2006. Removal of hydrogen sulfide from gas streams using biological processes - A review. Canadian Biosystem Engineering 48:2.1-2.14.
- Syed, M. y Henshaw, P. 2003. Effect of tube size on performance of a fixed-film tubular bioreactor for conversion of hydrogen sulfide to elemental sulfur. Water Research 37: 1932-1938.
- Stetter, K.O., Fiala, G., Huber, G., Huber, H. y Seegerer, A. 1990. Hyperthermophilic microorganisms. Microbiology Reviews 75:117-124.
- Sirevag, R. 1995. Carbon metabolism in green bacteria. En: Blankenship, R.E., Madigan, M.T. y Bauer, C.E. (eds.). Anoxygenic photosynthetic bacteria. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Países Bajos. pp. 871-883.
- Saikeur, A., Choorit, W., Prasertsan, P., Kantachote, D. y Sasaki, K. 2009. Influence of precursors and inhibitor on the production of extracelular 5- Aminolevulinic Acid and Biomass by *Rhodospseudomonas palustris* KG31. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 73: 987-992.
- Strickland, J., Cummings, A., Spinnato, J., Liccione, J. y Foureman, G. 2003. Toxicological Review of Hydrogen Sulphide. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC.
- Tamura, K., Kumar, S., Dudley, J., y Nei, M. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24: 1596-1599.
- Tank, M., Thiel, V. y Imhoff, J. 2009. Phylogenetic relationship of phototrophic purple sulfur bacteria according to *pufL* and *pufM* genes. International Microbiology 12: 175-185.
- Tank, M., Blümel, M. y Imhoff, J. 2011. Communities of purple sulfur bacteria in a Baltic Sea coastal lagoon analyzed by *pufLM* gene libraries and the impact of temperature and NaCl concentration in experimental enrichment cultures. Microbiology Ecology 78: 428-438.
- Thabet, O.B., Fardeau, M.L., Joulain, C., Thomas, P., Hamdib, M., Garcia, J.L. y Ollivier, B. 2004. *Clostridium tunisiense* sp. nov., a new proteolytic, sulfur-reducing bacterium isolated from an olive mill wastewater contaminated by phosphogypse. Anaerobe 10: 185-190.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., y Higgins, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 24: 4876-4882.
- Trüper, H.G. 1970. Culture and isolation of phototrophic sulfur bacteria from the marine environment. Helgolander wissenschaftliche Meeresuntersuchungen 20: 6-16.

- Waidner, L. y Kirchman, D. 2008. Diversity and Distribution of Ecotypes of the Aerobic Anoxygenic Phototrophy Gene *pufM* in the Delaware Estuary. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 4012-4021.
- Weiland, P. 2010. Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 849-860.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. y Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.
- Van Gemerden, H. y Mas, J. 1995. Ecology of phototrophic sulfur bacteria. *En: Blankenship, R.E., Madigan, M.T. y Bauer, C.E. (eds.). Anoxygenic Photosynthetic Bacteria.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos. pp. 49-85.
- Varnero, M.T. 2011. Manual de Biogás. Proyecto "Chile: Remoción de Barreras para la Electrificación Rural con Energías Renovables". Santiago, Chile. pp. 61.
- Yadvika, Santosh, Sreekrishnan, T.R., Kohli, S. y Rana, V. 2004. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques—a review. *Bioresource Technology* 95: 1-10.
- Yaşa, I., Çadırcı, C., Koçyigit, A. y Öztürk, T. 2006. Enrichment and isolation of anoxygenic phototrophic bacteria in Winogradsky column. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 23: 71-73.
- Ying, Y., Zhenmei, L.V., Min, H. y Cheng, J. 2008. Dynamic changes of microbial community diversity in a photohydrogen producing reactor monitored by PCR-DGGE. *Journal of Environmental Sciences* 20: 1118-1125.
- Zeng, Y. y Jiao, N. 2007. Source environment feature related phylogenetic distribution pattern of anoxygenic photosynthetic bacteria as revealed by *pufM* analysis. *The Journal of Microbiology* 45: 205-212.

## ANEXO

**Tabla A1.** Solución stock de vitaminas para adicionar al medio de cultivo salino estándar utilizado para el enriquecimiento de bacterias púrpuras.

| Compuesto                          | Concentración (mg/100 mL) |
|------------------------------------|---------------------------|
| Cobalamina (B <sub>12</sub> )      | 1                         |
| Inositol (B <sub>8</sub> )         | 100                       |
| Biotina                            | 5                         |
| Ac. Fólico (B <sub>9</sub> )       | 10                        |
| Ac. P-aminobenzoico                | 10                        |
| Ac. Nicotínico                     | 50                        |
| Ca-D-pantotenato (B <sub>5</sub> ) | 10                        |
| Riboflavina (B <sub>2</sub> )      | 10                        |

**Tabla A2.** Solución stock de micronutrientes para adicionar al medio de cultivo salino estándar utilizado para el enriquecimiento de bacterias púrpuras.

| Compuesto  | Concentración (g/L) |
|--|---------------------|
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 0,500               |
| MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O                | 2,280               |
| ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                | 0,500               |
| CU <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O  | 0,025               |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 0,025               |
| CoSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                | 0,045               |
| NiCl <sub>4</sub>                                    | 0,010               |

**Tabla A3.** Solución stock de buffer fosfato para adicionar al medio de cultivo salino estándar utilizado para el enriquecimiento de bacterias púrpuras.

| Compuesto                       | Concentración (M) |
|---------------------------------|-------------------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1                 |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1                 |

**Tabla A4.** Secuencia más cercana a cada una de las secuencias de los clones.

| <b>Clon</b> | <b>% Cobertura</b> | <b>% Identidad</b> | <b>Género más relacionado</b> | <b>Organismo más relacionado</b> |
|-------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| H1.1        | 97                 | 100                | <i>Rhodopseudomonas</i>       | <i>R. palustris</i>              |
| H1.2        | 97                 | 100                | <i>Rhodopseudomonas</i>       | <i>R. palustris</i>              |
| H1.3        | 97                 | 100                | <i>Rhodopseudomonas</i>       | <i>R. palustris</i>              |
| H2.1        | 97                 | 100                | <i>Rhodopseudomonas</i>       | <i>R. palustris</i>              |
| H2.2        | 97                 | 100                | <i>Rhodopseudomonas</i>       | <i>R. palustris</i>              |
| H2.3        | 97                 | 100                | <i>Rhodopseudomonas</i>       | <i>R. palustris</i>              |
| H2.4        | 97                 | 100                | <i>Rhodopseudomonas</i>       | <i>R. palustris</i>              |
| H3.1        | 100                | 94                 | <i>Clostridium</i>            | <i>C. tunisiense</i>             |
| H3.2        | 100                | 94                 | <i>Clostridium</i>            | <i>C. tunisiense</i>             |
| H3.3        | 100                | 94                 | <i>Clostridium</i>            | <i>C. tunisiense</i>             |
| H3.4        | 100                | 94                 | <i>Clostridium</i>            | <i>C. tunisiense</i>             |
| H3.5        | 100                | 94                 | <i>Clostridium</i>            | <i>C. tunisiense</i>             |
| H3.6        | 100                | 94                 | <i>Clostridium</i>            | <i>C. tunisiense</i>             |
| H4.1        | 100                | 95                 | <i>Clostridium</i>            | <i>C. mesophilum</i>             |
| H4.2        | 100                | 94                 | <i>Clostridium</i>            | <i>C. mesophilum</i>             |
| H4.3        | 100                | 95                 | <i>Clostridium</i>            | <i>C. mesophilum</i>             |
| H4.4        | 100                | 95                 | <i>Clostridium</i>            | <i>C. mesophilum</i>             |
| H5.1        | 99                 | 96                 | <i>Clostridium</i>            | <i>C. xylanovorans</i>           |
| H5.2        | 99                 | 96                 | <i>Clostridium</i>            | <i>C. xylanovorans</i>           |
| H5.3        | 99                 | 96                 | <i>Clostridium</i>            | <i>C. xylanovorans</i>           |
| H5.4        | 99                 | 96                 | <i>Clostridium</i>            | <i>C. xylanovorans</i>           |
| H6.1        | 99                 | 96                 | <i>Clostridium</i>            | <i>C. xylanovorans</i>           |
| H6.2        | 99                 | 96                 | <i>Clostridium</i>            | <i>C. xylanovorans</i>           |
| H6.3        | 99                 | 96                 | <i>Clostridium</i>            | <i>C. xylanovorans</i>           |
| H6.4        | 99                 | 96                 | <i>Clostridium</i>            | <i>C. xylanovorans</i>           |
| H7.1        | 100                | 100                | <i>Pseudomonas</i>            | <i>P. citronellolis</i>          |
| H7.2        | 99                 | 99                 | <i>Pseudomonas</i>            | <i>P. citronellolis</i>          |
| H7.3        | 100                | 100                | <i>Pseudomonas</i>            | <i>P. citronellolis</i>          |
| H7.4        | 100                | 92                 | <i>Pseudomonas</i>            | <i>P. citronellolis</i>          |
| H8.1        | 100                | 94                 | <i>Clostridium</i>            | <i>C. tunisiense</i>             |
| H8.2        | 100                | 94                 | <i>Clostridium</i>            | <i>C. tunisiense</i>             |
| H.9         | 100                | 99                 | <i>Achromobacter</i>          | <i>A. xylosoxidans</i>           |
| H10         | 100                | 100                | <i>Pseudomonas</i>            | -                                |

Tabla A4. Continuación.

| Clon  | %Cobertura | %Identidad | Género más relacionado  | Organismo más relacionado |
|-------|------------|------------|-------------------------|---------------------------|
| H11.1 | 99         | 99         | <i>Achromobacter</i>    | -                         |
| H11.2 | 99         | 99         | <i>Achromobacter</i>    | -                         |
| H12.1 | 97         | 100        | <i>Rhodopseudomonas</i> | <i>R. palustris</i>       |
| H12.2 | 97         | 100        | <i>Rhodopseudomonas</i> | <i>R. palustris</i>       |
| H13.1 | 97         | 100        | <i>Rhodopseudomonas</i> | <i>R. palustris</i>       |
| H13.2 | 97         | 100        | <i>Rhodopseudomonas</i> | <i>R. palustris</i>       |
| H14.1 | 100        | 95         | <i>Clostridium</i>      | -                         |
| H14.2 | 100        | 95         | <i>Clostridium</i>      | -                         |
| H15   | 100        | 99         | <i>Ochrobactrum</i>     | -                         |
| H19   | 100        | 99         | <i>Rhodopseudomonas</i> | <i>R. palustris</i>       |
| H20   | 99         | 96         | <i>Clostridium</i>      | <i>C. magnum</i>          |
| H21   | 97         | 100        | <i>Rhodopseudomonas</i> | <i>R. palustris</i>       |
| H22   | 100        | 93         | <i>Clostridium</i>      | <i>C. subterminale</i>    |
| H23   | 100        | 99         | <i>Rhodopseudomonas</i> | <i>R. palustris</i>       |
| H24   | 95         | 96         | <i>Petrimonas</i>       | <i>P. sulfuriphila</i>    |
| H25   | 99         | 98         | <i>Anaerospora</i>      | <i>A. hongkongensis</i>   |
| H26   | 99         | 98         | <i>Anaerospora</i>      | <i>A. hongkongensis</i>   |