



UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO

Campus Guanajuato
División de Ingenierías



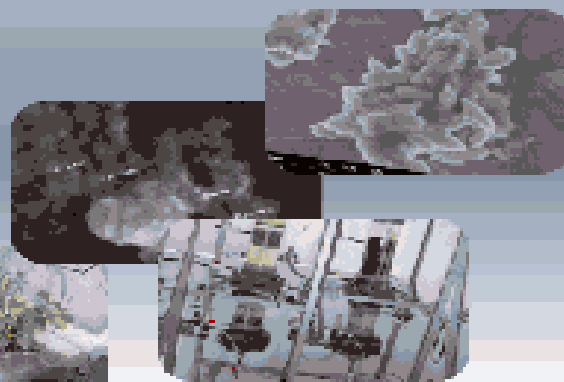
2do. Simposio Internacional de Bioingeniería Ambiental - SIBA

24 al 26 de septiembre del 2014

SIBA, el ambiente de discusión y de intercambio de conocimiento entre expertos, profesores e estudiantes, en el área de procesos aplicados en la Ingeniería Ambiental.



- Metodologías Innovadoras aplicadas a Bioprocesos
- Tratamiento de Residuos
- Tecnologías Anaerobias y Aerobias
- Energía
- Bioprocesos
- Nanotecnología
- Bioremediación
- Biotecnología
- Tratamiento de Agua



Organización:

Grupo Académico de
Manejo, Biotecnología y
Gestión Ambiental

Departamento de Ingeniería Civil
División de Ingenierías
Campus Guanajuato

www.ugto.mx

<http://www.di.ugto.mx/SIBA>



“BIOINGENIERÍA AMBIENTAL”

ISBN: 978-907-241-330-2



9 786072 413304

DR. © 2014 Universidad de Guanajuato

Memorias del Segundo Simposio Internacional de Bioingeniería Ambiental,
organizado por el “Grupo de Investigación de Bioingeniería, Biotecnología y
Gestión Ambiental”

Guanajuato, Guanajuato, México

24 al 26 de Septiembre de 2014

“BIOINGENIERÍA AMBIENTAL”
Primera edición 2014

D.R.© 2014 Universidad de Guanajuato
Lascaraín de Retana 5. Zona Centro.
Guanajuato, Gto. CP. 36000

Edición: Grupo de Investigación “Bioingeniería, Biotecnología y Gestión Ambiental”
Arodí Bernal Martínez
Germán Cuevas Rodríguez
Sergio Antonio Silva Muñoz
Elcia M. Souza Brito

ISBN: 978-607-441-330-4

ÍNDICE

LA PARTICIPACIÓN DE LA UNIVERSIDAD PÚBLICA EN EL DESARROLLO COMUNITARIO

Felipe Marias Gloria, Patricia Campos Rodríguez y Floy Juárez Sandoval..... 1

BIOSORPTION OF CU (II) AND PB (II) IN AQUEOUS SOLUTIONS USING PACKED COLUMNS WITH BIOSOLIDS (B) AND PYROLYSIS DERIVED BIOCHAR (BC)

Ortiz-Prado Jorge A.^{1,2}, Acosta-Slane Damaris¹, Lozoya-Márquez Luis A.¹, Gómez-Vargas
Ramón¹, González-Sánchez Guillermo¹..... 14

CARACTERIZACIÓN DE UN DESECHO AGROINDUSTRIAL MEXICANO PARA SU EMPLEO COMO MATERIAL PUZOLÁNICO

Victor Jiménez-Quero^{1,2}, Pedro Montes-García..... 23

DESARROLLO DE UN BIOPROCESO ANAEROBIO PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA LÁCTEA Y LA GENERACIÓN DE BIOGÁS

Luz Branda Montes Tat Crespo, Arold Bernal Martínez y Germán Cuevas Rodríguez..... 30

REMOCIÓN DE HIERRO DISUELTU EN AGUA UTILIZANDO PET MODIFICADO QUÍMICAMENTE COMO AGENTE ADSORBENTE

T. V. Cervantes Melesio¹, F. A. Horta Rangel², M. A. Ramírez Morales¹, G. Cruz Jiménez¹,
R. Navarro Mondóvil², U. Morales Almaraz^{2,3,4}..... 37

SECADO DE BIOMASA ALGAL EN SECADOR SOLAR

Morono Funes José Saul, Davalos Navarrete Silkmirio, Valle Morono Andrés, Cervantes
Torre-Marín Gemma..... 44

ESTIMACIÓN RESPIROMÉTRICA DEL RENDIMIENTO HETERÓTROFO DEL MODELO ASMI PARA UNA PTAR EN CHIAPAS

Valeria Zuerth Cudiño¹, Cristina Blanco González¹, Josué Chanona Soto¹ y Gustavo Yáñez
Ocampo¹..... 52

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS NATIVAS DE UN RESIDUO INDUSTRIAL HIPERSALINO E HIPERALGALINO, CON ALTO CONTENIDO DE CROMO Y OTROS METALES

Jesús Fernando López Vázquez¹, Pamela Romo Rodríguez¹, J. Félix Gutiérrez Corona¹... 57

MODELADO MATEMÁTICO DE UN PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

Javier Ulises Hernández-Bellrán¹, Ivette Michelle Navarro-Guillermo¹, Kara Cervantes-
Quintero¹, Héctor Hernández-Escobedo²..... 60

ELABORACIÓN DE CELDAS SOLARES TIPO GRÄTZEL EMPLEANDO SENSIBILIZADORES DE DIFERENTE PROCEDENCIA

Mónica Cedeño Alaniz^{1a}, Juan Carlos Baltazar Vera², Rosalba Fuentes Ramírez³ 69

CÁLCULO DE EMISIONES DE GASES DE EFECTO INVERNADERO DE LA UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA DEL IPN

Andrés Varga Moreno, Miguel Ángel Tapia Bustos, Cristina Ortega Noroal, Gamma Cervantes Torre-Marín¹..... 74

CONCRETE WITH RAW POLYETHYLENE TEREPHTHALATE

Luis Flores Chavez Valencia¹, Claudia Hernandez Bango², Miguel Angel Manrique Ibarra², Antonio Castro Lozano¹..... 83

BIOCOMPATIBILIDAD DE COMPOSITOS ÓSEOS - OSTEÓBLASTOS HUMANOS

M. Sabanero López^{1a}, L. L. Flores Yavtencio¹, Z. Miranda Rodríguez¹, G. Barbosa Sabanero², C. Peña Barba³..... 86

COMPARACIÓN ENTRE UNA MEMBRANA PLANA Y UNA MEMBRANA DE FIBRA HUECA EN LA ELIMINACIÓN DE MACRONUTRIENTES PRESENTES EN AGUA RESIDUAL SINTÉTICA EN UN BIORREACTOR HÍBRIDO

Marcos A. Silva, Germán Cuevas^{1a}..... 90

ALTERNATIVA PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA TEXTIL EN LA REGIÓN SUR DEL ESTADO DE GUANAJUATO

J. Merced Martínez Rosales¹, Miam Rocío Contreras García¹, Antonio Pérez Nieto² y Gabriela Arroyo Figueroa²..... 97

PET MODIFICADO QUÍMICAMENTE COMO AGENTE ADSORBENTE DE MN(II) EN MEDIO ACUOSO

M. M. Mamboejo Lara¹, L. Arroyo Álvarez¹, F. A. Horta Rangel², M. A. Ramírez Morales¹, G. Cruz Jiménez¹, U. Morales Ávarez^{2,3a}.....102

RECICLAJE DE CELULARES POR SOLVÓLISIS PARA RECUPERAR METALES

Lorena Eupania Sánchez Cadena¹, Zafarino Gamito Arroyo², Marco Alberto González Lara³, Benedito Quiroz G.⁴, Oscar Cornejo A.⁵.....109

REMOCIÓN DE CR(VI) EN BAJAS CONCENTRACIONES PRESENTE EN AGUA MEDIANTE EL EMPLEO DE BIOMASA DE ORIGEN NATURAL

Pablo Carriona Medina¹, Juan Jesús Seralín Muñoz¹, Francisco Agustín Vdó García¹, Francisco Javier Acevedo Aguller², Leticia López Martínez².....115

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS NATIVAS DE RESIDUOS INDUSTRIALES CON ALTO CONTENIDO DE METALES

Crávez Elías Arelia Fabiola¹, Romo Rodríguez Pamela¹, Gutiérrez Corona J. Félix^{1a}.....121

DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE DISEÑO EN SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Brett González¹, Alejandra Cruz¹128

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *TRAMETES VERSICOLOR* EN PRESENCIA DE FURADAN®, BOSCALID (CANTUS)® Y QUINTACENO®

Fátima Cjeda-Rodríguez¹, Héctor G. Nuñez², Blanca F. Gómez³, Noé Saldana⁴,
Graciela M. L. Ruiz-Aguilar⁵134

TRATAMIENTO VÍA FENTON DE AGUA RESIDUAL PROVENIENTE DE UNA INSTITUCIÓN EDUCATIVA

Peo a Abgal Martínez Aldape¹, Carlos J. Escudero S.²139

EFFECT OF THE WALNUT SHELL PECANERA IN GYPSUM

Luz Elías Chávez Valencia¹, Claudia Hernández Barriga², Martín Alejandro Moreno Hernández³, Cesar Leonardo Ruiz Jaime⁴144

ISOLATION OF SULFATE-REDUCING BACTERIA FOR POTENTIAL BIOREMEDIATION OF METAL-CONTAMINATED EFFLUENTS

María Fernanda Pérez Bernal¹, Jéssica Jazmín Gómez Marmolejo¹, Fátima M.S. Brito¹, Germán Cuevas Rodríguez¹148

EVALUACIÓN DE UN CONSORCIO BACTERIANO Y UN EFLUENTE DE BIODIGESTOR ANAEROBIO PARA LA PRODUCCIÓN DE LOMBRICOMPOSTA

Elsa A. Guerrero, Héctor G. Nuñez, Víctor Ojalde-Portuga, Vicente J. Álvarez, Rafael Veloz Graciela M. L. Ruiz-Aguilar⁵153

APPLICATION OF MICROCULTURE FOR BACTERIAL ISOLATION FROM INDUSTRIAL RESIDUE CONTAMINATED BY HEXAVALENT CHROMIUM

Mariana Pérez Medina^{1a}, Carolina Alejandra Martínez Gutiérrez^{2a}, Reyna Edith Padilla-Hernández³, Julio Cesar Valdeir Negreiros¹, Germán Cuevas Rodríguez⁴, Fátima M.S. Brito^{5a}158

ASLAMIENTO DE BACTERIAS ANAEROBIAS DEL LAGO ALKALINO DEL CRÁTER DEL RINCÓN DE PARANGUEO

Rivera Martínez, Laura Guadalupe^{1a}, Cuevas-Rodríguez, Germán², Maím Olaf³, Brito Elcia M. S.²163

USING TILLANDSIA USNEOIDES AS BIOMARKER OF HEAVY METALS IN THE ATMOSPHERE: GUANAJUATO TUNELS

Rodrigo Antonio Zárate-Santoyo¹, Fátima M.S. Brito¹, Adán Lino², Rodrigo Méndez³, Ojalde Malm², Juan P.M. Torres², Germán Cuevas-Rodríguez¹169

ANAEROBIC BIOTRANSFORMATION OF HEXAVALENT CHROMIUM IN BATCH REACTORS

Alba América Moreno González, Sergio Antonio Silva Muñoz, Elcia Souza Brito, Germán Cuevas Rodríguez, Arcel Bernal Martínez175

APPLICATION OF MICROCULTURE FOR BACTERIAL ISOLATION FROM INDUSTRIAL RESIDUE CONTAMINATED BY HEXAVALENT CHROMIUM

Mariana Pérez Medina^{1,2}, Carolina Alejandra Martínez Gutiérrez^{2,3}, Rayna Edith Rodríguez-
Hernández¹, Julio César Valero Negreiros¹, German Cuevas Rodríguez¹, Eliza M.S. Brito^{1,2}

¹Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México (marianapermed@gmail.com); ²Universidad
Autónoma de Baja California, Baja California, México (carolina.mg.sanchez@gmail.com);

³Biología, UNYF, Universidad de Guanajuato, México

⁴Ingeniería Ambiental D.I. Universidad de Guanajuato (emsbrito@gmail.com).

Keywords: Biotechnology, bioprospection, Cr(VI), phylogeny, extremophiles, alkaline.

ABSTRACT

Puebla city is nationally known for its high production of shoes and other leather products. For this activity, this city demands large quantities of hexavalent chromium [Cr(VI)] which are used for tanning the leather. That activity has affected the environment, polluting the water, air and soil of the city. Based on the fact that there are some bacteria capable of surviving on industrial residue, this can be used as a source of microorganisms which are promising to find new biotechnology applications, for example: to help removing this metal from the environment. The purpose of this work was to isolate extremophile bacteria from industrial residue for its future use in bioremediation technology. To fulfill this, industrial residue sediments of the irrigation channels, which had concentrations of Cr(VI) oscillating between 5100 to 7040 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, were prospectated. Using a new approach of bacterial culture on micro-volumes, with LB and NB as culture media, 13 different strains were isolated and morphologically characterized. Our study points out that even sites that seem inhospitable to life, it can host life. In the future, these microorganisms will be used to study the possible physiological adaptations to survive under the extreme conditions observed at this site, and also to gather evidence of their capacities to biotransformation Cr(VI) to Cr(III) and the mechanisms to do this process.

RESUMEN

La ciudad de Puebla es conocida nacionalmente por su alta producción de zapatos y otros artículos de piel. Dicha actividad, hace uso del Cromo hexavalente [Cr(VI)] para curtir la piel, lo que ha generado un gran impacto ambiental que está contaminando el agua, aire y suelo de la ciudad. Debido a que algunas bacterias son capaces de sobrevivir en dichos residuos tóxicos [1], estos pueden servir como fuente de microorganismos con potencial aplicación en biotecnología para la biorremediación de este metal del ambiente. El objetivo de este trabajo fue aislar bacterias extremófilas de un residuo industrial para su futura aplicación biotecnológica. Para cumplir esta, se prospectaron los residuos industriales y los sedimentos de los canales de irrigación de estos, los cuales se encontraban concentraciones de Cr(VI) total que van desde 5100 hasta 7040 μg . Por medio de siembras sólidas en placas petri, con medio de cultivo LB y NB, se logró aislar 13 cepas. Este estudio señala que sitios que parecen completamente inhóspitos, como son los residuos industriales, pueden albergar microorganismos. Como perspectiva futura, dichos microorganismos serán utilizados para estudiar los posibles adaptaciones fisiológicas que los mismos poseen para sobrevivir en dichas condiciones y realizar la biotransformación del Cr(VI) en Cr(III).

INTRODUCCIÓN

La ciudad de León es conocida nacionalmente por su alta producción de zapatos y otros artículos de piel. En esta actividad, hace uso del Cromo hexavalente [Cr(VI)] para curir la piel, ya que por lo general las sales de cromo trivalente (como Cr(OH)₃SO₄) se han utilizado para evitar la degradación de las moléculas de colágeno constituyentes del cuero[2]. La utilización desmedida de esta sal, sin el manejo adecuado de sus residuos, ha generado un gran impacto ambiental que está afectando el agua, aire y suelo de la ciudad. El cromo es un elemento que se encuentra presente de manera natural en rocas, animales, plantas, suelo y gases volcánicos. Funciona químicamente con diversas valencias, siendo las formas trivalente [Cr(III)] y hexavalente, las más estables. El Cr(III) es relativamente inócuo, mientras que el Cr(VI) es considerado la especie más tóxica, ya que esta última es muy hidrosoluble atravesando fácilmente la membrana plasmática. Dentro de la célula el es transformado en formas muy reactivas que interaccionan con el DNA, entre otras moléculas. A largo plazo la exposición al Cr(VI) puede generar problemas de salud, ya que puede actuar tanto como agente mutagénico como carcinógeno [2]. Debido a estas características el Cr(VI) está en la lista de las sustancias tóxicas que deben tener su manejo controlado. En nuestro país esa sal es regida por la Norma Oficial Mexicana-052-Ecología-1993.

Organismos cromatóreductores, tanto eucariotas como procariotas, han sido aislados y probados ser eficientes en la transformación de Cr(VI) a Cr(III). Estudios previos han identificado la presencia de bacterias, tanto en los residuos industriales como en los lixiviados de un residuo industrial de una empresa procesadora de cromina ubicada en el estado de Guanajuato [3]. Utilizando librería de clones, ellos han identificado que estos residuos sirven como microhábitat de diversas especies, con abundancia de las especies *Bacillus subtilis*, *Lysobacter enzymogenes* y *Thiobacillus thiooxidans*. Pero en total han observado 20 especies distintas. Los microorganismos del género *Bacillus* son muy interesantes debido a que tienen la capacidad de producir esporas y han sido aislados de varios sitios con características ambientales extremas; algunos microorganismos del género *Lysobacter* han sido utilizados como fuente de enzimas y los organismos del género *Thiobacillus* han sido aplicados en procesos de biotransformación de metales. Dichas características destacan que estos residuos son muy interesantes, y que pueden ser utilizados como posible fuente de estos microorganismos para una aplicación biotecnológica para la biorremediación de este meta del ambiente. Reducir Cr(VI) a Cr(III) se puede hacer de diversas maneras, pero la reducción bacteriana ha demostrado ser una de las que presenta menor costo y no representa daños al ambiente [3]. Sin embargo, es necesario que los microorganismos estén aislados y estudiados a nivel abstrato. Por ejemplo, cuestiones como ¿cuáles son los mecanismos metabólicos que estos utilizan para la biotransformación?, ¿qué son los productos de esta biotransformación? y ¿cuáles son los impactos que estos microorganismos podrán causar en el caso de que estos lleguen al medio ambiente? Por otro lado, es muy pequeña la cantidad de microorganismos que son aislados del medio ambiente, se estima que es sólo el 1%, y es un reto de la microbiología ambiental aumentar ese número. El objetivo de ese trabajo fue aislar bacterias extremófilas para su futura aplicación biotecnológica en la transformación de metales y metaloides. Se utilizaron técnicas tradicionales de cultivo en medio sólido y microcultivo en placas.

METODOLOGÍA

Sitio de muestreo - Se utilizó como fuente de microorganismos los residuos industriales y los lixiviados de los canales de lixiviación de una empresa procesadora de cromina, ubicada en León, Guanajuato. Se colectó el material en Enero de 2012, inmediatamente fue utilizado como inóculo para un medio mineral líquido, este se mantuvo almacenado a 4°C hasta su utilización.

Medios de cultivo - Se utilizaron los medios de cultivo LB, R2A y NB, con pH controlados de 8-9, y esterilizados en autoclave durante 40min.; donde uno de LB contiene 10g de triptona, 5 g de levadura y 10g de NaCl, y uno de NB contiene 3g de extracto de carne y 5 g de peptona. Para los medios sólidos se utilizó 20g/L de agar bacteriano.

Técnicas de siembra - Inicialmente se realizó un precultivo en medio líquido con 1ml de la suspensión almacenada a 4°C. Después del segundo enriquecimiento en medio líquido se utilizó 10 µl del cultivo para la siembra en placas de petri, las colonias morfológicamente distintas fueron

seleccionadas y aisladas por atracción. Posteriormente cada aislado se transfirió para medio líquido, sin embargo al continuar con morfologías celulares distintas se aplicó la técnica de cultivo en micropaca. Esa consistió, en sembrar las muestras diluidas en paca de EUSA estériles (con 96 pozos). Se realizaron las diluciones de hasta 10^{10} , donde cada pozo contenía 180 μ L de medio de cultivo y 20 μ L de inóculo. Estas se incubaron durante 24h a 30°C. Posteriormente, se observó cada pozo al microscopio óptico para verificar la morfología celular. Los pozos conteniendo una única morfología celular se transfirió para un volumen final de 5 ml y se incubó hasta obtener biomasa. Antes de la extracción del ADN estas se observaron al microscopio óptico para verificar la morfología celular. Se almacenaron estos microorganismos a -20°C en glicerol al 70%.

Extracción del ADN total – Se extrajo el ADN de los aislados con Wizard® Genomic DNA Purification Kit al tanto las indicaciones del proveedor que resumidamente son: a balón de células se le agregan 480 μ L de EDTA a 50mM, 10 μ L de solima y 10 μ L de acromopetidasa, se dejó incubar por 40 min a 37°C, se centrifugó (13000 rpm) y eliminó el sobrenadante. Después, se agregan 600 μ L de solución de lisos nuclear, y se dejó incubar durante 5 minutos a 80°C, inmediatamente se le agregaron 8 μ L de solución RNasa y se dejó incubar a 37°C durante 30 min. Posteriormente se agregaron 200 μ L de solución precipitadora de proteínas, y se incubó en hielo durante 5min. Después centrifugar (13000 rpm por 8 min.) se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, conteniendo 800 μ L de isopropanol que después de mezclado y centrifugado, se eliminó el sobrenadante. A ese, se le adicionaron 600 μ L de etanol al 70%, se centrifugó (13000 durante 2 min.) y se eliminó el etanol. Finalmente se le agregó 100 μ L de solución de rehidratación, se dejó incubar a 65°C durante 1 h, y se almacenó a -20 °C. Se utilizó electroforesis en gel de agarosa 0.5% en TAE 1X para verificar y cuantificar (indirectamente) el ADN extraído. Para la electroforesis se utilizó una cámara horizontal con TAE 0.5X como fase móvil a un voltaje de 80 Volts por 80 min. En cada pozo se aplicó 5 μ L del ADN extraído mezclado con 2 μ L de tampón de carga (0.1 μ g/ μ L, 50 μ g). Igualmente se aplicó 5 μ L de marcador de tamaño molecular (Thermo Scientific® GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder).

Obtención del gen ADN: 16S. – Se utilizó el ADN para amplificar el gen ADN: 16S por medio de una reacción en cadena de polimerasa (PCR). Se utilizó para esto el oligonucleótido universal 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y el oligonucleótido degenerado 907R (5'-GGTCAATTCCTTTTAGT-3', donde R = A ó G) produciendo amplificaciones de aproximadamente 900 pb. Para un volumen reactivo final de 25 μ L se utilizó la siguiente mezcla: Taq Buffer (10X) 2.5 μ L, dNTP (10mM) 0.5 μ L, MgCl₂ (25mM) 2 μ L, oligonucleótidos 8F y 907R (10 μ M) 1.125 μ L, Taq Polimerasa (1.25 U; Fermentas®) 0.125 μ L, y DNA 0.25 – 1.0 μ L. Las condiciones de la reacción de amplificación fueron: 95°C durante 5min para la desnaturalización del ADN; 32 ciclos de 95°C durante 60 segundos, seguidos por calentamiento a 52°C por 45 segundos para el alineamiento de los oligonucleótidos y calentamiento a 72°C durante 30 segundos para la elongación del fragmento; al final se calentó a 72°C durante 10 minutos para una elongación final. El termociclador utilizado fue Biomet®. Los productos de la PCR fueron verificados en electroforesis en gel de agarosa 1.2 % (en TAE 1X), con TAE 0.5X como fase móvil y a un voltaje de 80 Volts por 80 min. En cada pozo se aplicó 5 μ L del producto de PCR mezclado con 2 μ L de tampón de carga (0.1 μ g/ μ L, 50 μ g), y se utilizó como marcador de tamaño molecular el Thermo Scientific® GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder.

El producto de PCR fue purificado con illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare® Life Sciences).

Estudio filogenético – Los productos de PCR purificados se envían a secuenciación en el CINVESTAV IRAPUATO. La PCR se realizó con el oligonucleótido universal 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y se secuenció en la plataforma Sanger. Las secuencias fueron visualizadas y editadas manualmente con el software Iore Bioedit; las secuencias químicas fueron descartadas de análisis. Se comparó a secuencias resultantes con las secuencias depositadas en el NCBI Gene Bank por medio de Blast, con la finalidad de encontrar relaciones superiores a 97% de identidad. Con el software Mafft se compararon secuencias de nuestros aislados con las secuencias de las cepas tipo más cercanas, obteniendo una matriz de alineamiento. Con esta matriz se construyó un árbol filogenético con el software Mega 5.

RESULTADOS Y DISCUSION

A partir de cultivo en medio sólido se observaron varias colonias bacterianas con morfologías delimitadas (amarillas, blancas, cremas, naranjas, de borde liso, de borde rugoso, transparentes, etc.). Después de varias siembras se ha logrado observar una única morfología por placa, obteniendo de esta forma 32 aislados. Sin embargo, la observación microscópica de estas colonias aparentemente aisladas, presentaba diferentes morfologías celulares (Fig. 1A). Fueron varias las tentativas de aislamiento en placa de petri con técnica de extensión, pero siempre las colonias eran idénticas por las morfologías variadas. Hay algunas especies bacterianas que no pueden crecer solas y necesitan de otras para sobrevivir, normalmente eso se debe a que una depende de un producto de la otra. Estas. Hay también microorganismos que en cultivo presentan morfologías distintas, o que difícilmente se diferencian como especies distintas durante el proceso de aislamiento. Sin embargo, ese último no se puede confirmar a partir de la secuenciación. Es decir, que mismo en cultivos aparentemente no están puros, la secuenciación va haber una única secuencia, confirmando que el cultivo está puro, y que la cepa posee esta característica, múltiples morfología celular cuando en cultivo. Estos problemas prácticos dificulta mucho el aislamiento de estos microorganismos, y el trabajo de bioprospección. En el intento de obtener colonias de una única morfología, cuyas células presentarían también una única morfología, se realizó a partir de estas supuestas colonias aisladas, nuevos cultivos en medio líquido.

La técnica aplicada consistió en realizar estos cultivos en pequeños volúmenes de 200 μ L con diluciones seriadas hasta 10^{10} (Fig. 1). Después de un periodo de incubación de 24h, se observa una alícuota de cada microcultivo al microscopio óptico, hasta observar el microcultivo cuyas células presentan una única morfología, que en nuestro caso se encontraban entre las últimas diluciones. En algunos casos la dilución a 10^{10} no resultaba exitosa, por lo que se debía de esa dilución, volver a realizar otra placa y volver a diluir hasta alcanzar a dilución 10^{12} . A pesar de pertenecer a técnica, sabiendo debido la observación microscópica, que son decenas de cultivos a observar, esa presenta buenos resultados, como se puede observar en la foto 2B y 2C que ilustra que en los cultivos presentan células con una única morfología. Hasta la fecha, con esta técnica fue posible obtener 13 cepas, donde 7 se aislaron con el medio LB y 6 con el medio NB. Sin embargo, hay varias que aún se encuentran en proceso de aislamiento.

Una vez aislados, se recupera todo el microcultivo y lo transfiere para 1 mL. Se deja incubar por 15 días, y se le adiciona 5 mL de nuevo medio. Después de observar crecimiento bacteriano, se siembra en medio sólido para la realización de algunas pruebas fisiológicas cotidianas. La tabla 1 se enlistan estas características. Algunos de los aislados no crecen en medio sólido y por lo tanto no se hizo dichas pruebas.

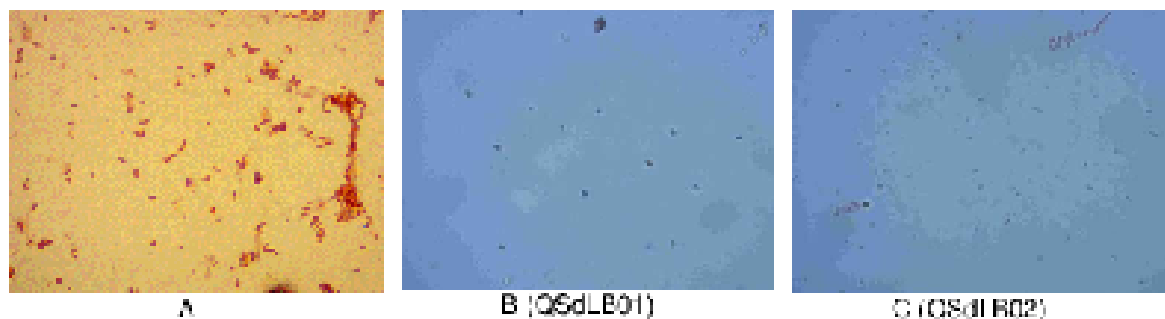


Figura 1. Cultivos en medio sólido y observación microscópica de los aislados antes y después de la técnica de microcultivo en placas. En A se observa tres morfologías celulares: bacilos alargados, coco-bacilos y cocos, y en B y C se ilustran las morfologías (diplococos) observadas después de aplicar la técnica del microcultivo.

Tabla 1. Características de los aislados obtenidos

| Código de la cepa ¹ | Características de la colonia | Características fisiológicas | Características microscópicas de las células |
|--------------------------------|--|------------------------------------|--|
| Q581 R01 | Colonia transparente, circular, borde liso y pequeño | Peroxidasa negativa, gram negativo | Baciliforme, presenta movimiento cuando está en medio líquido |
| Q581 R02 | Colonia color crema circular borde liso | Peroxidasa positiva, gram positivo | Baciliforme, relación diámetro largo 1:3, presenta movimiento cuando está en medio líquido |
| U1 CSILBC1 | No observado | No realizado | Diplococos |

(1) Las primeras letras corresponden al sitio de muestreo (Sedimento de residuo industrial), seguido por las letras del medio de cultivo del cual fueron aisladas (LB o NB) y por fin un número secuencial.

En la figura 2 se ilustra el ADN extraído de los aislados y el gen ADNr 16S amplificado que se envió a secuenciación. Los resultados de la secuenciación no fueron satisfactorios, indicando contaminación por proteínas, lo imposibilitando la realización de secuenciación para los clones de cepas. A continuación, el ADN extraído será dializado en membrana de celulosa (Millipore VSWPC1300 MF) y el gen ADNr amplificado para realizar el estudio filogenético de estos aislados. También, se verificará la resistencia de estos aislados a diferentes concentraciones de cromato.

CONCLUSIONES

La técnica de microcentrífugo hasta la exhaustión se mostró eficiente para aislar microorganismos de difícil separación. Se ha logrado aislar x cepas. Se continuaran aplicar la técnica descrita para separar los microorganismos de los cultivos que aparentemente presentan mezclas de 2 o tres morfología. Todos los aislados se secuenciaron para realizar el estudio filogenético de estos.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo hace parte del proyecto BIOMETAL de Innovación Tecnológica de Cooperación Internacional Francia-México, financiado por CONACYT y ANR (No. 188775).

REFERENCIAS

- [1] Cheung, K., Gu, J (2007) Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodegradation & Biodegradation*, 59(1), 0-15
- [2] Xu, J, Liu M, Li W, Wei X, Xie K, Liu L, Jiang G, Liu H (2011) Reduction of hexavalent chromium by *Pannonibacter phragmitetus* LGSE-09 stimulated with external electron donors under alkaline conditions. *J Hazard Mater* 185:1166-1176
- [3] Brito EMS *et al* (2008) Bacterial biodiversity from anthropogenic extreme environments: a hyper-alkaline and hyper-saline industrial residue contaminated by chromium and iron. *Appl Microbiol Biotechnol* DOI 10.1007/s00383-012-0923-8