

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS METALÓFILAS
RESISTENTES A CROMO HEXAVALENTE CON POTENCIAL
APLICACIÓN EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN**

POR

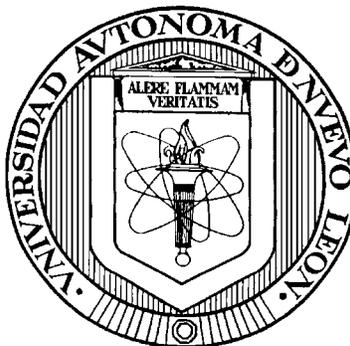
DORA NELLY MENCHACA LÓPEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGÍA**

JULIO, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS METALÓFILAS RESISTENTES
A CROMO HEXAVALENTE CON POTENCIAL APLICACIÓN EN PROCESOS DE
BIORREMEDIACIÓN**

Por

QFB DORA NELLY MENCHACA LÓPEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad en Microbiología Aplicada**

Director de Tesis

DRA. MARIA TERESA GARZA GONZÁLEZ

Co-Director de Tesis

DR. JUAN FRANCISCO VILLARREAL CHIU

**San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México
Julio, 2015**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS METALÓFILAS
RESISTENTES A CROMO HEXAVALENTE CON POTENCIAL
APLICACIÓN EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN**

Aprobación de la Tesis:

Dra. María Teresa Garza González
Presidenta

Secretario

Vocal

Dra. María Aracely Hernández Ramírez
Subdirector de Estudios de Postgrado

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS METALÓFILAS
RESISTENTES A CROMO HEXAVALENTE CON POTENCIAL
APLICACIÓN EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN**

Revisión de la Tesis:

Dra. María Teresa Garza González
Director de Tesis

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu
Co-Director de Tesis

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Comité Tutorial

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez
Comité Tutorial

DEDICATORIA

A mi madre por su apoyo incondicional en el cuidado de mi hija.

A mi esposo, quien siempre estuvo impulsándome a terminar este proyecto.

A mi hija Andrea, quien tuvo que soportar largas horas sin mi compañía, pero que a pesar de ello, al reunirnos, me brindaba su hermosa sonrisa que me llenaba de energía y ánimo día a día.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la fuerza brindada para culminar lo que en algunos momentos me parecía imposible.

A mi Director de Tesis, Dra. María Teresa Garza González, sus conocimientos, su paciencia y su motivación durante el desarrollo de esta investigación y quien gracias a su presencia incondicional, sugerencias, críticas, comentarios y relevantes aportes, ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración.

Al Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu, mi Co-Director de Tesis, por su paciente seguimiento y tiempo compartido de manera generosa durante el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. María Elena Cantú Cárdenas por su apoyo y colaboración profesional, así como también por sus cuidadosas observaciones para el área de estudio.

A la Dra. Elvira Garza González por su apoyo para realizar la caracterización de los aislados de interés, en el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad (LADIME) ubicado en el Hospital Universitario. Así como también a todo su equipo de trabajo por la ayuda brindada durante mi estancia en dicho lugar.

Al Dr. Allan Blanco por los útiles y profesionales aportes para el área de estudio.

A mis compañeras Olga Flores y Verónica Alvarado, así como al personal del Laboratorio de Biotecnología por todo su apoyo brindado.

A la Facultad de Ciencias Químicas y a la Universidad Autónoma de Nuevo León por brindarme la oportunidad de continuar con mi preparación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Con absoluta sinceridad, mi agradecimiento a todos los que hice mención ya que con su aporte hicieron posible esta presentación.

RESUMEN

Dora Nely Menchaca López

Fecha de graduación: Julio, 2015

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de Estudio: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS METALÓFILAS RESISTENTES A CROMO HEXAVALENTE CON POTENCIAL APLICACIÓN EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN

Número de páginas: 132

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Área de Estudio: Biotecnología

Propósito y Método de Estudio: El elemento cromo (Cr) se encuentra de manera natural o antropomórfica en el medio ambiente. Sus formas más estables suelen ser cromo trivalente Cr(III) y cromo hexavalente Cr(VI). Debido a que el Cr(III) no es tóxico en bajas concentraciones, puede considerarse esencial para algunas funciones biológicas. En cambio, el Cr(VI) es altamente tóxico, suele encontrarse comúnmente en forma de cromato (CrO_4^{2-}) y puede introducirse fácilmente en las células bacterianas a través del sistema de transporte de sulfatos. La constante interacción de los microorganismos con iones CrO_4^{2-} , ha inducido a que diversas cepas microbianas desarrollen mecanismos de resistencia. Estudios reportan que los genes *yieF*, *mucD* y *chrA* participan en: la reducción directa de Cr(VI) a Cr(III) por una enzima reductasa, producción de exopolisacáridos con función de quelar metales y en el flujo de iones CrO_4^{2-} del citoplasma al exterior de la célula, respectivamente. En el presente trabajo se realizó una búsqueda bioinformática sobre genes de resistencia a cromo, con el fin de explorar la distribución y diversidad de genes involucrados en la resistencia y bioremediación de cromo mediante herramientas bioinformáticas. A su vez, se ensayaron 16 muestras provenientes de 3 sitios de muestreo clasificados en: prístinos, potencialmente expuestos y expuestos. Posteriormente se aislaron, seleccionaron y caracterizaron las bacterias resistentes mediante secuenciación del ADNr 16S, así como también, se determinó la resistencia a antibióticos de 9 aislados seleccionados. De forma paralela, se realizaron pruebas de remoción de Cr(VI) en medios acuosos y se determinó el posible mecanismo de resistencia.

Contribuciones y Conclusiones: De los genes involucrados en los diversos mecanismos de resistencia a cromo, el gen *chrA* se encontró mayoritariamente en β -proteobacterias, y los genes *yieF* y *mucD* en γ -proteobacterias. Se obtuvieron 23 aislados bacterianos de todas las muestras tratadas, de los cuales, la mayoría provinieron de sitios expuestos. Los porcentajes de remoción de Cr(VI) más altos (por encima del 85 %) se alcanzaron por los aislados ETTIL_R (*Serratia marcescens* y *Enterococcus avium*), ETICH (*Pseudomonas aeruginosa*) Y EAIL (*Enterococcus avium*). Por el contrario, los menores porcentajes de remoción (por debajo del 40%) se obtuvieron con los aislados PRM_A (*Escherichia coli*) y PERM_I (*Enterococcus avium*). Se comprobó la bioacumulación y bioreducción del aislado ETTIL como posible mecanismo de resistencia a Cr(VI). En relación a los antibiogramas realizados, se descartó una posible limitación del empleo de los aislados en procesos de biorremediación, por presentar porcentajes de sensibilidad por encima del 60 %. Con lo anterior, se logró obtener una colección microbiana autóctona con valor académico y de investigación y con potencialidad de uso en el campo de la interacción microorganismo-metal, a fin de generar alternativas viables para la recuperación de sitios contaminados con cromo.

Q.F.B. Dora Nely Menchaca López
Estudiante

Dra. María Teresa Garza González
Asesora

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTADO DE ANEXOS	vi
ABREVIATURAS	vii
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2	6
ANTECEDENTES	6
2.1 Metales pesados y su impacto ambiental	6
2.1.1 Cromo	9
2.2 El cromo y la industria	11
2.3 Los microorganismos y el cromo	14
2.3.1 Ciclo biogeoquímico del cromo	15
2.3.2 Interacción microorganismo-metal	16
2.4 Técnicas de aislamiento e identificación de bacterias resistentes a Cr(VI)	20
2.4.1 Aislamiento de bacterias resistentes a Cr(VI)	20
2.4.1.1 Método de enriquecimiento	20
2.4.2 Determinación de la resistencia a Cr(VI)	20
2.4.2.1 Método de difusión en placa	21
2.4.2.2 Método de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en medio líquido	21
2.5 Métodos para caracterizar bacterias	21
2.6 Aplicación de bacterias resistentes a Cr(VI) en procesos de biorremediación	22
2.6.1 La biorremediación de Cr(VI) por bacterias	22
CAPÍTULO 3	23
HIPÓTESIS	23
CAPÍTULO 4	24
OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo general	24
4.2 Objetivos específicos	24

CAPÍTULO 5	25
METODOLOGÍA	25
5.1 Material, equipo y ubicación del equipo	25
5.2 Soluciones de cromo	27
5.3 Parte experimental	27
5.3.1 Búsqueda bioinformática sobre genes de resistencia	27
5.3.1.1 Distribución de los genes de resistencia a Cr(VI) en los genomas microbianos	27
5.3.1.2 Análisis filogenético	28
5.3.2 Selección de sitios de muestreo	28
5.3.2.1 Nomenclatura de muestras	28
5.3.2.2 Caracterización de las muestras	30
5.3.3 Aislamiento, selección y caracterización de las bacterias con resistencia a Cr(VI)	31
5.3.3.1 Medios de cultivo utilizados	31
5.3.3.2 Aislamiento de bacterias con resistencia a Cr(VI)	32
5.3.3.3 Selección de bacterias con resistencia a Cr(VI)	34
5.3.3.4 Caracterización de bacterias con resistencia a Cr(VI)	38
5.3.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de Antibióticos	44
5.3.4.1 Actividad de los antibióticos frente a microorganismos Gram positivos	44
5.3.4.2 Actividad de los antibióticos frente a microorganismos Gram negativos	44
5.3.5 Determinación del posible mecanismo de resistencia a cromo	45
5.3.6 Evaluación de la capacidad reductora de diversos aislados bacterianos a pH 1	48
5.3.7 Espectros de Infrarrojos con Transformada de Fourier (FTIR) de las biomásas bacterianas en presencia y/o ausencia de Cr(VI)	49
CAPÍTULO 6	51
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
6.1 Búsqueda bioinformática sobre genes de resistencia a cromo	51
6.2 Caracterización de las muestras ambientales	54
6.3 Aislamiento, selección y caracterización de bacterias con resistencia a Cr(VI)	60
6.3.1 Aislamiento de bacterias con resistencia a Cr(VI)	60
6.3.1.1 Caldo de medio Mínimo	60
6.3.1.2 Agar medio Mínimo	61
6.3.1.3 Caldo y agar LB Lenox sin cromo	62
6.3.1.4 Caldo MacConkey	63
6.3.1.5 Agar MacConkey	64
6.3.1.6 Caldo LB Lenox sin cromo	65
6.3.1.7 Agar LB Lenox sin cromo	66
6.3.2 Selección de bacterias con resistencia a Cr(VI)	72
6.3.2.1 Método de difusión en agar	73
6.3.2.2 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en medio líquido	73
6.3.2.2.1. Cinéticas de crecimiento, pH y reducción de Cr(VI) de los aislados bacterianos.	75
1) PRM _A	75
2) PERM _I	77
3) ETICH	79

4) ETTIL_____	81
5) EAIL_____	83
6.3.3 Caracterización de bacterias con resistencia a Cr(VI) _____	87
6.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de Antibióticos _____	89
6.4.1 Actividad de los antibióticos frente a microorganismos Gram positivos ___	89
6.4.2 Actividad de los antibióticos frente a microorganismos Gram negativos __	90
6.5 Determinación del posible mecanismo de resistencia a Cr(VI) _____	93
6.6 Evaluación de la capacidad reductora de las biomasas a pH 1 _____	95
6.7 Espectros de Infrarrojos con Transformada de Fourier (FTIR) de biomasas bacterianas _____	97
CAPÍTULO 7 _____	101
CONCLUSIONES _____	101
CAPÍTULO 8 _____	103
RECOMENDACIONES _____	103
DISPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS GENERADOS _____	104
REFERENCIAS _____	105
ANEXOS _____	114

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Material empleado durante el desarrollo de la tesis	25
Tabla 2. Equipo utilizado para el desarrollo de la tesis	26
Tabla 3. Nomenclatura de muestras	29
Tabla 4. Composición del agua peptonada	31
Tabla 5. Composición del medio Mínimo	31
Tabla 6. Composición del medio MacConkey	32
Tabla 7. Composición del medio LB (lennox)	32
Tabla 8. Escala de McFarland	35
Tabla 9. Condiciones iniciales de experimentación para efectuar las pruebas de resistencia a Cr(VI)	36
Tabla 10. Componentes de la reacción de amplificación	42
Tabla 11. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	42
Tabla 12. Condiciones iniciales de experimentación para evaluar la capacidad reductora (q_r) de las biomasas bacterianas	48
Tabla 13. Productos proteicos de los genes <i>chrA</i> , <i>yieF</i> y <i>mucD</i> en bacterias reductoras de Cr	51
Tabla 14. Características fisicoquímicas de muestras provenientes de SLP	54
Tabla 15. Coordenadas de ubicación de muestras provenientes de SLP	55
Tabla 16. Observación microscópica de muestras en caldo Mínimo a diferentes concentraciones de Cr(VI), empleando tinción Gram	60
Tabla 17. Observación microscópica de colonias cultivadas en agar Mínimo a diferentes concentraciones de Cr(VI), empleando tinción Gram.	61
Tabla 18. Observación microscópica de colonias cultivadas en medio LB Lenox sin Cr(VI), empleando tinción Gram	62
Tabla 19. Observación microscópica de colonias cultivadas en caldo MacConkey a diferentes concentraciones de Cr(VI), empleando tinción Gram	63

Tabla 20. Observación microscópica de colonias cultivadas en agar MacConkey a diferentes concentraciones de Cr(VI), empleando tinción Gram.	64
Tabla 21. Observación microscópica de colonias cultivadas en caldo LB Lenox sin Cr(VI), empleando tinción Gram.....	65
Tabla 22. Observación microscópica de colonias cultivadas en agar LB Lenox sin Cr(VI), empleando tinción Gram.....	66
Tabla 23. Resumen de aislados obtenidos a partir de medio Mínimo	67
Tabla 24. Resumen de aislados obtenidos a partir de medio MacConkey	68
Tabla 25. Aislado seleccionado, lugar de aislamiento, origen, y CMI de Cr(VI).....	75
Tabla 26. Porcentajes de reducción de Cr(VI) para cada aislado en estudio	85
Tabla 27. Porcentajes de reducción de Cr(VI) para diversos microorganismos	86
Tabla 28. Identificación de aislados bacterianos	88
Tabla 29. Evaluación de la actividad de los antibióticos frente a microorganismos Gram positivos y estimación del índice de Resistencia a Múltiples Antibióticos.	89
Tabla 30. Evaluación de la actividad de los antibióticos frente a microorganismos Gram negativos y estimación del índice de Resistencia a Múltiples Antibióticos....	90
Tabla 31. Evaluación de la actividad de los antibióticos frente a microorganismos Gram negativos y estimación del índice de Resistencia a Múltiples Antibióticos....	91
Tabla 32. Capacidad reductora de diversas biomásas.....	96
Tabla 33. Principales grupos funcionales para las ventanas espectrales frecuentemente empleadas en el análisis de muestras microbiológicas	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Similitud estructural de iones sulfato y cromato.	3
Figura 2. Contaminantes involucrados en emergencias ambientales, 2008-2013.....	8
Figura 3. Ciclo biogeoquímico del cromo	15
Figura 4. Mecanismos de resistencia a cromato en células bacterianas	17
Figura 5. Mapa satelital de ubicación de los sitios de muestreo.....	30
Figura 6. Método de enriquecimiento.....	33
Figura 7. Método de difusión en agar.....	35
Figura 8. Método de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en medio líquido	36
Figura 9. Reacción de acomplejamiento de Cr(VI) por 1,5-Difenilcarbazida.....	37
Figura 10. Curva de calibración construida con disoluciones de referencia en el intervalo de concentración de 0.05 mg L ⁻¹ a 1.0 mg L ⁻¹ de Cr(VI).....	38
Figura 11. Proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S	41
Figura 12. Obtención del extracto celular por Ultrasonificación.....	46
Figura 13. Metodología para determinar el posible mecanismo de resistencia	47
Figura 14. Árboles filogenéticos de las proteínas ChrA (A), YieF (B) y MucD (C) construidos por el método Neighbor-Joining empleando MEGA 6.06.....	52
Figura 15. Distribución de la proteína ChrA en diversos filos bacterianos.....	53
Figura 16. Distribución de la proteína MucD en Proteobacterias.....	53
Figura 17. Distribución de la proteína YieF en Gammaproteobacterias	53
Figura 18. Composición metálica de la muestra EAIL (León, GTO)	56
Figura 19. Composición de metales de transición de la muestra EAIL (León, GTO)	56
Figura 20. Composición metálica de la muestra ESIL (León, GTO)	57
Figura 21. Composición de metales de transición de la muestra ESIL (León, GTO)	57
Figura 22. Composición metálica de la muestra ETIL (León, GTO)	58

Figura 23. Composición de metales de transición de la muestra ETIL (León, GTO)	58
Figura 24. Distribución porcentual de las especies biológicas aisladas en relación al sitio de muestreo.....	71
Figura 25. Características de los aislados seleccionados.	72
Figura 26. Cinéticas de remoción de Cr(VI) del aislado PRM _A , en un tiempo de contacto de 240 horas con diferentes soluciones de Cr(VI).....	74
Figura 27. Cinéticas de remoción de Cr(VI) del aislado PERM _I , en un tiempo de contacto de 240 horas con diferentes soluciones de Cr(VI).....	74
Figura 28. Cinética de reducción de Cr(VI) del aislado PRM _A frente a crecimiento bacteriano.	75
Figura 29. Cinética de pH del aislado PRM _A en un tiempo de contacto de 240 horas con y sin cromo.	76
Figura 30. Porcentaje de reducción de Cr(VI) del aislado PRM _A frente a su pH.....	77
Figura 31. Cinética de reducción de Cr(VI) del aislado PERM _I frente a crecimiento bacteriano.....	77
Figura 32. Cinética de pH del aislado PERM _I en un tiempo de contacto de 240 horas con y sin cromo.....	78
Figura 33. Porcentaje de remoción de Cr(VI) del aislado PERM _I frente a su pH.	79
Figura 34. Cinética de reducción de Cr(VI) del aislado ETICH frente a crecimiento bacteriano.....	79
Figura 35. Cinética de pH del aislado ETICH en un tiempo de contacto de 240 horas con y sin cromo.....	80
Figura 36. Porcentaje de reducción de Cr(VI) del aislado ETICH frente a su pH.	80
Figura 37. Cinética de reducción de Cr(VI) del aislado ETTIL frente a crecimiento bacteriano.....	81
Figura 38. Cinética de pH del aislado ETTIL en un tiempo de contacto de 240 horas con y sin cromo.....	82
Figura 39. Porcentaje de remoción de Cr(VI) del aislado ETTIL frente a su pH.	82
Figura 40. Cinética de reducción de Cr(VI) del aislado EAIL frente a crecimiento bacteriano.....	83
Figura 41. Cinética de pH del aislado EAIL en un tiempo de contacto de 240 horas con y sin cromo.	84

Figura 42. Porcentaje de reducción de Cr(VI) del aislado EAIL frente a su pH.	84
Figura 43. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de productos de PCR para la identificación bacteriana.....	87
Figura 44. Porcentajes de actividad de los antibióticos frente a microorganismos Gram positivos.....	92
Figura 45. Porcentajes de actividad de los antibióticos frente a microorganismos Gram negativos.	92
Figura 46. Cinética de reducción extracelular de Cr(VI) del aislado ETTIL a pH 7 y 37 °C	93
Figura 47. Cinética de reducción intracelular de Cr(VI) del aislado ETTIL a pH 7 y 37 °C	94
Figura 48. Cinética de reducción ectocelular de Cr(VI) del aislado ETTIL a pH 7 y 37 °C	94
Figura 49. Variación de la capacidad reductora de las biomasas bacterianas con respecto al tiempo.....	96
Figura 50. Comparación entre los espectros FTIR del aislado EAIL sin tratamiento (línea verde) y con tratamiento (línea amarilla) con Cr(VI).	98
Figura 51. Comparación entre los espectros FTIR del aislado ETTIL sin tratamiento (línea roja) y con tratamiento (línea amarilla) con Cr(VI).	98
Figura 52. Comparación entre los espectros FTIR del aislado ETICH sin tratamiento (línea lila) y con tratamiento (línea amarilla) con Cr(VI).....	99
Figura 53. Comparación entre los espectros FTIR del aislado PRMA sin tratamiento (línea azul) y con tratamiento (línea amarilla) con Cr(VI).....	99
Figura 54. Comparación entre los espectros FTIR del aislado PERMI sin tratamiento (línea naranja) y con tratamiento (línea amarilla) con Cr(VI).	100

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Placas SENSTITRE	114
Anexo 2. Imágenes de los aislados en caldo y agar Mínimo	115
Anexo 3. Imágenes de los aislados en caldo y agar LB Lenox sin Cr(VI).....	122
Anexo 4. Imágenes de los aislados en caldo y agar MacConkey.....	127
Anexo 5. Imágenes de los aislados en caldo y agar LB Lenox sin Cr(VI).....	131

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AI	Agua Industrial
ARN	Ácido Ribonucleico
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CB	Cerrito Blanco
CC	Cuatrociénegas
CH	Charcas
cm ⁻¹	centímetro ⁻¹
COA	Coahuila
Cr	cromo
Cr _t	cromo total
Cr(III)	cromo trivalente
Cr(VI)	cromo hexavalente
CrO ₄ ²⁻	ión cromato
Cr ₂ O ₇ ²⁻	ión dicromato
Cr(OH) ₃	Hidróxido de cromo (III)
CO ₂	Dióxido de carbono
°C	Grados Celsius
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DO	Densidad Óptica
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfato
DPCZ	Difenilcarbazida
E	Expuesto
EA	Emergencias Ambientales
EAA	Espectroscopía de Absorción Atómica
EPA	Environmental Protection Agency
EPS	Exopolisacáridos
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
g	gramos
g L ⁻¹	gramos por Litro
GMS	Grados, Minutos, Segundos

GTO	Guanajuato
h	horas
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente
L	Litros
LB	Lysogeny Broth
L _E	León
LS	La Silla
M	molar
M _A	Marín
MAR	Multiple Antibiotic Resistance
mg g ⁻¹	miligramo por gramo
mg Kg ⁻¹	miligramo por kilogramo
mg mL ⁻¹	miligramo por mililitro
mg L ⁻¹	miligramo por Litro
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
M _I	Mina
min	Minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
m ²	metros cuadrados
N	Concentración Normal
NaCl	Cloruro de sodio
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NLE	Nuevo León
nm	nanómetros
NOM	Norma Oficial Mexicana
P	Prístino
pb	pares de bases
PE	Potencialmente Expuesto
pH	Potencial de Hidrógeno
PLB	Presa La Boca
%	Porcentaje

q _R	Capacidad de reducción
R	Río
RP	Residuos Peligrosos
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
S	Sedimento
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEMARNAT	Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SI	Sedimento Industrial
SISCO	Sistema Informático de Sitios Contaminados
SLP	San Luis Potosí
SO ₄ ²⁻	Ión sulfato
T°	Temperatura
TI	Tierra Industrial
TTI	Tierra-Tela-Industrial
µg	microgramo
µg g ⁻¹	microgramo por gramo
µL	microlitro
µS cm ⁻¹	microsiemens por centímetro
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
WHO	World Health Organization
\bar{X}	Promedio
Z	Zacatón

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, la rápida industrialización y el aumento de la población ha producido un incremento en la utilización de sustancias químicas. Estas son comúnmente vertidas sobre el agua y la superficie terrestre, generando uno de los mayores problemas a nivel mundial, deteriorando constantemente el medio ambiente. Los vertimientos industriales contienen una gran variedad de contaminantes, siendo los metales pesados un grupo que merece especial atención, ya que no son biodegradables y a determinadas concentraciones suelen ser tóxicos para el ser humano y otros organismos (Soni *et al.* 2013). Tal es el caso del cromo, el cual es considerado como un contaminante prioritario, según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés), por tener un amplio uso en distintas actividades industriales (Environmental Protection Agency, 2014). Dentro de estas actividades industriales se encuentran: la metalúrgica, galvanoplastia, acabado de metales, teñido de textiles, curtiembres y fertilizantes, por mencionar algunas (Mishra *et al.* 2012; Mishra y Doble, 2008; Robins *et al.* 2013; Zahoor y Rehman, 2009).

El cromo existe en dos formas estables en el medio ambiente: cromo trivalente Cr(III) y cromo hexavalente Cr(VI) (Das *et al.* 2014). El Cr(III) es adsorbido fácilmente en suelos y es relativamente inmóvil en el sistema

acuático debido a su baja solubilidad. No es tóxico en bajas concentraciones y se considera más bien esencial para algunas funciones biológicas (Zahoor y Rehman, 2009). En cambio, el Cr(VI) representa un tema de preocupación por ser altamente tóxico, mutágeno y teratógeno, tanto en seres humanos como en otros organismos vivos (Mangaiyarkarasi *et al.* 2011; Murugavelh y Mohanty, 2013; Zhitkovich, 2011). La toxicidad del Cr(VI) se puede atribuir a su alta solubilidad en agua y rápida permeabilidad a través de las membranas biológicas y su posterior interacción con proteínas intracelulares y ácidos nucleicos (Chai *et al.* 2009; Kiliç *et al.* 2010; Zou *et al.* 2013).

El Cr(VI) forma el ión cromato (CrO_4^{2-}) al asociarse con el oxígeno. Este ión, al presentar similitud estructural con el sulfato (SO_4^{2-} ; ver Figura 1), puede introducirse fácilmente en las células bacterianas a través del sistema transportador de sulfatos (Thatoi *et al.* 2014). Una vez dentro, el ión cromato forma intermediarios reducidos de cromo que en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) funcionan como catalizadores de una reacción tipo Fenton. Este tiene como característica la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales causan estrés oxidativo y producen peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y ácidos nucleicos, con posterior daño a diferentes organelos celulares (Cheung y Gu, 2007; Rocchetta *et al.* 2012; Sandana *et al.* 2015).

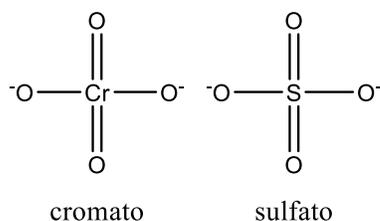


Figura 1. Similitud estructural de iones sulfato y cromato (ChemBioDraw Ultra 13.0).

La Normativa Mexicana, a través de la NOM-001-SEMARNAT-1996, establece 0.5 mg L^{-1} como límite máximo permisible de cromo en descargas de aguas residuales (SEMARNAT, 1997). Además la Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos y la Organización Mundial de la Salud establecen límites de 0.1 y 0.05 mg L^{-1} para la cantidad total de cromo en agua potable (Environmental Protection Agency, 2011; World Health Organization, 1998).

En el caso de suelo, la norma oficial mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 establece 280 mg kg^{-1} de Cr(VI) como concentración de referencia total en suelo para uso agrícola, residencial y/o comercial, mientras que para uso industrial, permite 510 mg kg^{-1} (SEMARNAT, 2007).

Para la remoción del ión cromato de sitios contaminados (especie química más prevalente del Cr(VI)), los procedimientos convencionales son de tipo fisicoquímico e incluyen la reducción química seguida de la precipitación, intercambio iónico o adsorción del residuo sobre carbón activado, alúmina, kaolinita o ceniza. Sin embargo, la mayoría de esos métodos requieren de altos costos energéticos o de cantidades grandes de reactivos y pueden crear otras formas de desechos tóxicos (Zou *et al.* 2013). Además, cuando son aplicados a efluentes industriales constituidos por soluciones metálicas diluidas resultan ser ineficientes (Colin *et al.* 2012).

Debido a que los microorganismos han sido expuestos a metales pesados desde el comienzo de la vida, se considera a la biotecnología como una alternativa sobre los procesos convencionales para la recuperación de metales. Es común que al encontrarse en ambientes contaminados con metales pesados las bacterias muestren adaptación evolutiva, es decir, tienen la capacidad de sobrevivir en presencia de estos metales dada la gran diversidad de mecanismos genéticos de resistencia. Por ende, se asume de manera general que son bacterias resistentes a cromo. De acuerdo a Gadd (1992), la resistencia es “la capacidad de un microorganismo para sobrevivir a los efectos tóxicos de la exposición a las especies metálicas por medio de mecanismos de desintoxicación”. Dentro de estos mecanismos se encuentran transformaciones redox (Sedláček y Kučera, 2010), producción de metabolitos que se unen a metales (Batool *et al.* 2015) y presencia de plásmidos que codifican sistemas transportadores de aniones (CrO_4^{2-} ; He *et al.* 2010).

En base a la literatura, se conoce que varios microorganismos pueden reducir el Cr(VI), tanto en condiciones aerobias y anaerobias (Chai *et al.* 2009; Cheung y Gu, 2007). Bajo condiciones aeróbicas, la reducción del CrO_4^{2-} es catalizada por enzimas solubles codificadas por genes localizados en el cromosoma de distintas bacterias (He *et al.* 2011). Estas enzimas solubles incluyen quinonas reductasas (Eswaramoorthy *et al.* 2012), azorreductasas (Robins *et al.* 2013), flavoproteínas (Ackerley *et al.* 2004) y cromato reductasas NADH-dependientes (Barrera-Díaz *et al.* 2012). Sin embargo, es importante destacar que ninguna de estas reductasas es específicamente inducida por el CrO_4^{2-} (He *et al.* 2011).

Por otro lado, bajo condiciones anaeróbicas, algunas bacterias como *Shewanella putrefaciens* MR-1 (Myers *et al.* 2000), y *Desulfotomaculum reducens* MI-1 (Tebo y Obratzsova, 1998), pueden usar el CrO_4^{2-} como aceptor final de electrones.

Además de la resistencia a Cr(VI) conferida por genes cromosomales, se ha encontrado que plásmidos bacterianos codifican transportadores de membrana, los cuáles, están relacionados con la resistencia a CrO_4^{2-} . Estudios previos reportan en diversas bacterias, la presencia del transportador de cromato ChrA, el cual consta de 13 segmentos transmembrana con los extremos N- y C-terminal localizados en el citoplasma y espacio periplásmico, respectivamente. Se ha establecido que su función está relacionada con el flujo de salida de CrO_4^{2-} (Díaz-Pérez *et al.* 2007; Kiliç *et al.* 2010).

Debido a los altos niveles de contaminación con metales pesados que se presentan en México, particularmente en Monterrey y su área metropolitana, así como al impacto que tienen estos metales en la salud del hombre, al daño ecológico y económico, en este trabajo se aislaron e identificaron microorganismos resistentes a cromo hexavalente a partir de tres sitios clasificados como: prístinos, potencialmente expuestos y expuestos a contaminantes, con el propósito de obtener una colección microbiana autóctona con valor académico–investigación y con potencialidad de uso en el campo de la interacción microorganismo–metal, a fin de generar alternativas viables para la recuperación de cromo de sitios contaminados.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Metales pesados y su impacto ambiental

Los metales constituyen aproximadamente el 75% de los elementos conocidos en la tierra; son de vital importancia para la industria, infraestructura y la vida cotidiana (Gadd, 2010). Desde la revolución industrial, los metales han sido redistribuidos en el medio ambiente, con la acumulación en ecosistemas terrestres y acuáticos que se asocian con efectos adversos sobre la biota y la salud humana (Zhitkovich, 2011). Estrictamente, y desde el punto de vista químico, los metales pesados están constituidos por elementos de transición y post-transición incluyendo algunos metaloides como el arsénico y selenio (SEMARNAT, 2009). Estos elementos se presentan en diferente estado de oxidación en agua, aire y suelo y presentan diversos grados de reactividad, carga iónica y solubilidad en agua. Una forma opcional de nombrar a este grupo es como “elementos tóxicos”, los cuales, de acuerdo a la lista de contaminantes prioritarios de la USEPA, los metales tóxicos son: arsénico, cromo, cobalto, níquel, cobre, zinc, plata, cadmio, mercurio, titanio, selenio y plomo (Environmental Protection Agency, 2014). Se originan a partir de fuentes naturales, tales como rocas y metalíferos minerales e insumos antropogénicos, por ejemplo, la agricultura, metalurgia, producción de energía, la

microelectrónica, la minería, lodos de depuradora y eliminación de residuos (Kamaludeen *et al.* 2003; Murugavelh y Mohanty, 2013).

El impacto ambiental de los contaminantes metálicos en suelos y sedimentos es estrictamente dependiente de la capacidad de acomplejamiento de éstos con componentes del medio ambiente y su respuesta a las condiciones fisicoquímicas y biológicas de su entorno (Barrera-Díaz *et al.* 2012). Los metales son especies químicas no degradables, por tal motivo, una vez volcados al medio ambiente, sólo pueden distribuirse entre los entornos aire-agua-suelo, a veces cambiando su estado de oxidación, o bien pueden incorporarse a los seres vivos (Soni *et al.* 2013).

La Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), clasifica los sitios contaminados en dos tipos: por un lado, los denominados pasivos ambientales, de grandes dimensiones y con obligación de remediación, con problemas causados por el uso industrial del suelo y el manejo inadecuado de los residuos peligrosos (RP) que no fueron remediados oportunamente para impedir la dispersión de los contaminantes. En segundo lugar se encuentran los sitios contaminados causados por emergencias ambientales (EA), cuya atención ocurre cuando la contaminación del sitio deriva de un evento indeseado, que ocurre repentinamente y que tiene como resultado la liberación no controlada, incendio y/o explosión de materiales o RP que afectan la salud humana y el medio ambiente de manera inmediata (SEMARNAT, 2012a). Durante el periodo 2008-2013, se identificaron 627 sitios contaminados por emergencias ambientales, cuyos responsables involucrados en mayor porcentaje fueron los transportistas con 456 emergencias (72.7% del total

registrado), seguidos por Petróleos Mexicanos con 127 (20.3%) y por los ferrocarriles con 12 (1.9%) (SEMARNAT, 2014). Los contaminantes acumulados e involucrados en las emergencias ambientales fueron los hidrocarburos: la gasolina magna con 171 emergencias (27.3%), le sigue el diesel con 141 (22.5%), el combustóleo con 98 (15.6%), la turbosina con 36 (5.7%) y otros contaminantes como ácidos y bases con 32 (5.1%). Con respecto a los metales pesados, se reportaban hasta ese período, 4 emergencias ambientales (ver Figura 2).

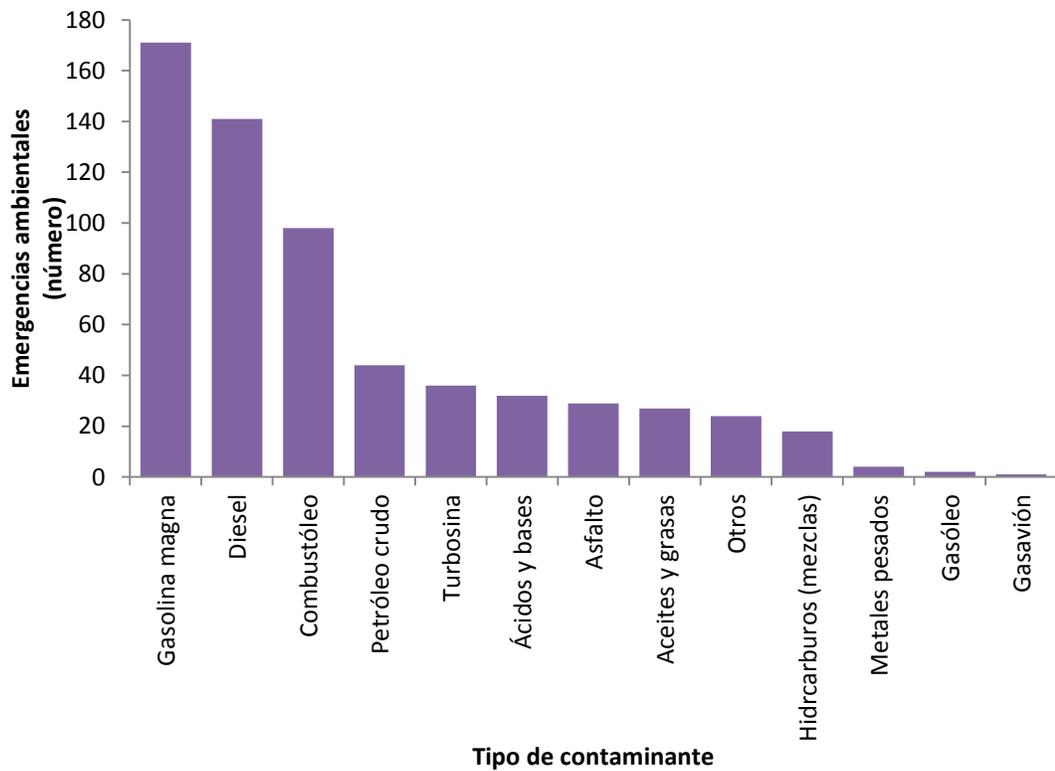


Figura 2. Contaminantes involucrados en emergencias ambientales, 2008-2013 (SEMARNAT, 2014)

En el caso de los sitios considerados como pasivos ambientales, para el periodo 1995-2013 el Sistema Informático de Sitios Contaminados (SISCO) tenía identificados 587 sitios en el territorio nacional. El sistema fue implementado por SEMARNAT, con objeto de conocer y registrar a nivel nacional los sitios contaminados considerados como pasivos ambientales (SEMARNAT, 2012a). Para 2013, las entidades con mayor presencia de sitios identificados y acumulados como contaminados fueron Veracruz (69 sitios), Querétaro (58), Guanajuato (48), Colima (38), estado de México (36), Michoacán (34) y Aguascalientes (31 ; SEMARNAT, 2014).

La SEMARNAT realiza diversas acciones para la gestión de los pasivos ambientales, entre las que se encuentran la evaluación de los programas de remediación de sitios contaminados, que busca determinar las acciones necesarias para eliminar los impactos negativos al medio ambiente debidos a la contaminación por materiales y RP (PROFEPA, 2014a; SEMARNAT, 2012b).

2.1.1 Cromo

El Cr es un metal de transición cuyas especies más estables y abundantes son: la trivalente, Cr(III) y la hexavalente Cr(VI). Es un oligoelemento esencial para los organismos y se produce naturalmente en el medio ambiente, representando el séptimo elemento más abundante en la corteza terrestre, a concentraciones que oscilan entre 100 y 300 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Focardi *et al.* 2013).

Las dos formas de cromo más estables, Cr(III) y Cr(VI), presentes en los suelos tienen diferentes características químicas y físicas. El primero es relativamente inmóvil debido a que tiene una fuerte afinidad para iones con carga negativa y da compuestos poco solubles tales como $\text{Cr}(\text{OH})_3$, y es esencial para mantener los niveles correctos del metabolismo de la glucosa, lípidos y proteínas, entre 50 y 200 μg Cr(III) / día (García, 2006). Mientras que el Cr(VI) se encuentra comúnmente en forma de oxianiones hidrosolubles, cromatos (CrO_4^{2-}) y dicromatos ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), siendo estos compuestos altamente solubles, con capacidad de atravesar fácilmente las membranas biológicas y haciéndolos extremadamente tóxicos (Zou *et al.* 2013). Los compuestos de Cr(VI) son aproximadamente 1,000 veces más citotóxicos y mutagénicos que los compuestos de Cr(III) (Dhal *et al.* 2010). La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) clasifica las sustancias de acuerdo a su condición carcinogénica. En el grupo 1 (carcinógeno humano) se encuentran los compuestos de Cr(VI) y en el grupo 3 (no clasificado como carcinógeno humano) los compuestos de Cr(III) (IARC, 2015). Sin embargo, se ha demostrado que en grandes concentraciones y en formas trivalentes o hexavalentes en el ambiente, el cromo en los seres humanos puede inducir: alergias, irritaciones, eczema, perforaciones nasales y cáncer pulmonar, mientras que en las comunidades microbianas altera su estructura, reduciendo el crecimiento y las actividades enzimáticas relacionadas (Das *et al.* 2014; Elangovan *et al.* 2010).

2.2 El cromo y la industria

La contaminación por sustancias químicas en México representa actualmente, riesgos importantes para la salud en virtud de su amplia distribución. La gran concentración demográfica, así como el acelerado desarrollo industrial y la gran demanda de servicios que esto conlleva, han generado severos problemas ambientales cuya resolución requerirá de un extraordinario esfuerzo colectivo.

Los problemas ecológicos con el Cr(VI) están relacionados con el desarrollo industrial en general y con la industria de cromo en particular. Entre las industrias relacionadas con el cromo destacan: curtiembres, galvanoplastias, metalúrgicas, conservación de la madera, producción de pigmentos y fertilizantes (Dönmez y Koçberber, 2005; Sandana *et al.* 2015); las cuales son consideradas contaminantes para el aire, suelo y las aguas superficiales (Patra *et al.* 2010). De las industrias antes mencionadas, las curtiembres (las cuales comúnmente utilizan sulfato de cromo), representan alta afluencia de cromo a la biosfera (Sharma y Adholeya, 2011). De acuerdo con resultados definitivos de los Censos Económicos, en 2008 existían 10,815 establecimientos dedicados al curtido y acabado de cuero y piel, es decir, crecieron 44.4% respecto al monto registrado en 2003 (INEGI, 2009). Del total de establecimientos dedicados a la industria del curtido, 4,039 empresas se

encuentran en León; 1,676 empresas en la Ciudad de México; 1,238 empresas en Guadalajara y 3,862 empresas en el resto del país. Entre los aspectos más relevantes de la industria del cuero en el ámbito ambiental, se cuenta el alto consumo de agua, sales y productos químicos, así como también, su contaminación y la generación de lodos provenientes del tratamiento de aguas residuales; cuyo manejo inadecuado, ha generado una problemática muy grave.

Un caso de contaminación ambiental con Cr(VI), es el surgido por la empresa “Cromatos de México”, establecida en 1958 en la colonia Lechería, ubicada en el municipio de Tultitlán, Estado de México. La cuál producía pigmentos y sustancias para curtir pieles a partir del mineral cromita (forma natural del cromo). De 1970 a 1975, por su productividad se elevaron los niveles de contaminación, provocando muertes y enfermedades en niños (Castro-Díaz, 2009). En 1976, la Secretaría de Recursos Hidráulicos confirmó la existencia de cromo hexavalente hasta en 5.0 mg L^{-1} , 100 veces más de lo permitido por la NOM. La empresa fue clausurada en 1978, por los altos índices de contaminación provocados en el ambiente. En 1983 la empresa “Cromatos de México”, construyó una superficie de concreto sobre $16,000 \text{ m}^2$, para cubrir 120,000 toneladas de cromo hexavalente. A partir de 1999 el contenedor se agrietó, dejando escapar el contaminante y permitiendo que en el suelo y subsuelo se filtren por las lluvias los contaminantes precipitados, que dañan mantos acuíferos y afectan zonas urbanas e industriales (Montañez, 2011). Después de 30 años de la clausura, el 24 de abril de 2008, la SEMARNAT, informó sobre el inicio del retiro de los residuos contaminantes que permanecieron todo este tiempo en las instalaciones de la empresa. Sin

embargo, falta poner fin a la contaminación de los acuíferos afectados. El 23 de enero del 2012, la SEMARNAT crea un documento público denominado “El Libro Blanco”, con el fin de dejar constancia sobre las acciones emprendidas y los resultados obtenidos de la remediación del predio ubicado en la ex fábrica “Cromatos de México” (SEMARNAT, 2012b).

Otro caso es el protagonizado por la empresa Química Central, S.A. de C.V., la cual nació en 1968 en el Municipio de San Francisco del Rincón, Guanajuato, con el fin de fabricar productos químicos básicos (sulfato básico de cromo, líquido y sólido y dicromato de sodio). Durante casi 40 años, la empresa generó una gran cantidad de contaminantes y fue hasta el año 2006 que implementó una planta de tratamiento de residuos con Cr(VI), cuya función fue reducir el contenido de Cr(VI) a Cr(III), que se encuentra en la montaña de residuos generados por la elaboración del bicromato de sodio, el cual se dejó de producir en el año 1993.

Por diversas irregularidades, entre las que se destacan, almacenar sus residuos peligrosos a cielo abierto sin las condiciones de seguridad que establece la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR), el 4 de junio de 2014, la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA), clausuró la empresa Química Central S.A. de C.V. (PROFEPA, 2014b). Dentro del predio se identificaron cerca de 300,000 toneladas de residuos peligrosos que fueron indebidamente depositados y que derivaron en pasivos ambientales, con los impactos al suelo donde se encuentran depositados, así como otras 40,000 toneladas que ilegalmente fueron enterradas en derecho de vía de ferrocarriles, a 1.5 kilómetros de la

planta. Lo anterior representa un riesgo inminente de desequilibrio ecológico, daño y deterioro grave a los recursos naturales del lugar y a la salud pública. Pues existe una relación positiva entre el riesgo de efectos adversos a la salud y la proximidad de la población a los sitios con contaminantes peligrosos. La preocupación social se explica por la asociación de los materiales y residuos peligrosos con el cáncer, malformaciones congénitas, alteraciones mutagénicas, daños renal y hepático, problemas neurológicos y las enfermedades respiratorias y de pulmón (SEMARNAT, 2013).

Los sitios contaminados considerados como pasivos ambientales, son una tendencia que ha ido en aumento durante los últimos 20 años.

2.3 Los microorganismos y el cromo

Los microorganismos han sido expuestos a metales pesados desde el comienzo de la vida, ya que están íntimamente asociados con los ciclos biogeoquímicos de los metales, donde sus actividades pueden resultar en la movilización o inmovilización dependiendo del mecanismo implicado (Bachate *et al.* 2013).

2.3.1 Ciclo biogeoquímico del cromo

Las especies de Cr(III) pueden ser oxidadas a Cr(VI) por compuestos oxidantes que existen en la tierra, como por ejemplo el dióxido de manganeso. Al mismo tiempo las especies de Cr(VI) pueden ser reducidas también a Cr(III) en presencia de materia orgánica, hierro soluble o compuestos de sulfuro reducidos. Después de la reducción, se produce la precipitación de Cr(III) al reaccionar con otros compuestos y a continuación la adsorción del precipitado formado. La formación de estos complejos presenta una barrera para la liberación y oxidación del Cr(III) a Cr(VI), desapareciendo así la contaminación (Dhal *et al.* 2013). El ciclo biogeoquímico del cromo se representa en la Figura 3.

3.

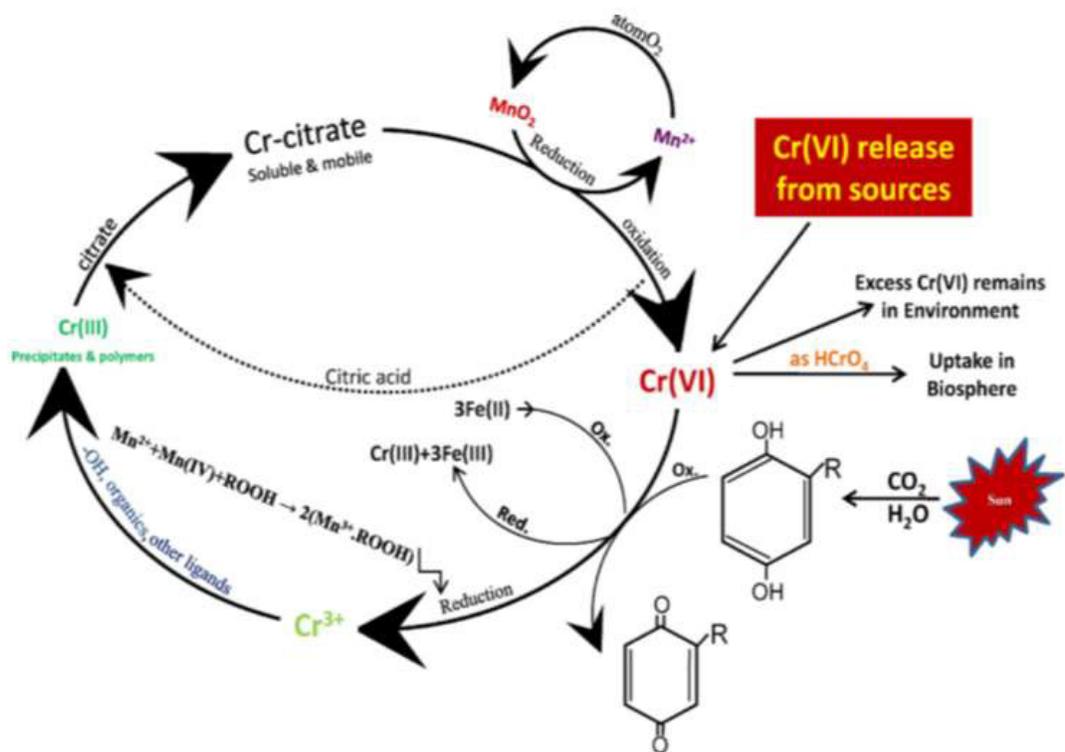


Figura 3. Ciclo biogeoquímico del cromo (Dhal *et al.* 2013).

2.3.2 Interacción microorganismo-metal

El Cr(VI) posee la capacidad de penetrar fácilmente las membranas celulares de eucariotas y procariotas, induciendo estrés oxidativo con posterior daño del ADN (Focardi *et al.* 2013).

Las células microbianas interaccionan con el CrO_4^{2-} a diferentes niveles: pared celular, periplasma y membrana plasmática, hasta el citoplasma y los organelos celulares en el caso de los hongos. Esta interacción tiene como consecuencia la aparición de organismos adaptados al ambiente hostil, debido a que desarrollan mecanismos que les permiten removerlo (Bachate *et al.* 2013).

Las bacterias emplean diferentes mecanismos para contrarrestar la toxicidad del Cr(VI) en el medio ambiente, como: mutaciones en el transportador de sulfatos, reducción extracelular de Cr(VI), enzimas desintoxicantes de las ERO, reducción intracelular de Cr(VI), enzimas que reparan el ADN dañado y un sistema de transporte que ayuda al eflujo de iones cromato al exterior de la célula, lo anterior se representa en la Figura 4.

De manera general dichos mecanismos comprenden:

- a) **La transformación química** (reducción o biotransformación de Cr(VI) a especies reducidas)
- b) **Los sistemas de transporte e incorporación** (bioacumulación)
- c) **La interacción y unión con componentes de la superficie celular** (biosorción de Cr(III) y Cr(VI))

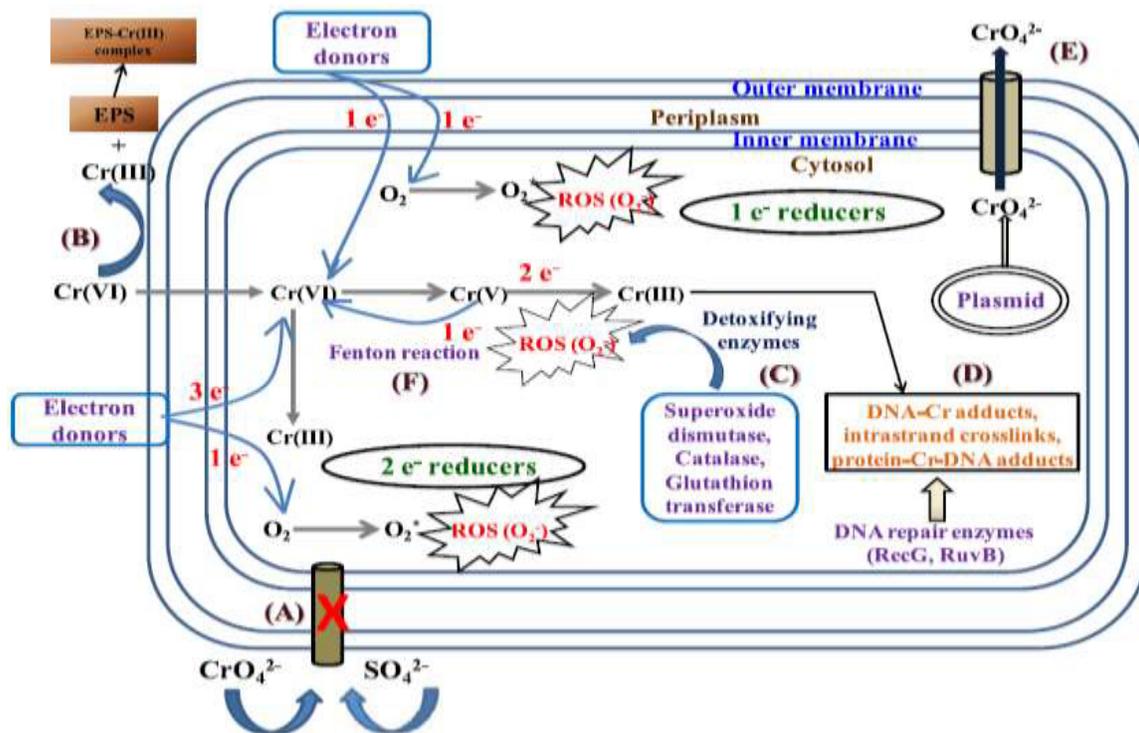


Figura 4. Mecanismos de resistencia a cromato en células bacterianas (Thatoi *et al.* 2014).

a) Transformación química

El principal problema de los metales pesados es que no pueden ser biodegradados. Sin embargo los microorganismos pueden interactuar con ellos transformándolos a especies menos tóxicas, lo cual influye drásticamente en la movilidad del contaminante (Field *et al.* 2013).

Dentro de las células microbianas el Cr(VI) puede ser reducido a Cr(III) por sistemas reductores, que pueden incluir rutas enzimáticas y no enzimáticas. Las rutas enzimáticas, llevadas a cabo bajo condiciones aeróbicas, involucran enzimas codificadas por genes localizados en cromosomas de distintas bacterias como: nitroreductasa en *Escherichia coli* (Ackerley *et al.* 2004), cromato reductasa en *Gluconoacetobacter hansenii* (Jin *et al.* 2012), reductasa

dependiente de NADPH en *Thermus scotoductus* (Opperman *et al.* 2008) y quinona reductasa en *E. coli* (Eswaramoorthy *et al.* 2012). El gen *yieF* de *E. coli* codifica una enzima reductasa soluble que actúa sobre una gran variedad de sustratos, incluyendo Cr(VI ; Ackerley *et al.* 2004). La función de la proteína YieF es transferir de manera simultánea tres electrones al Cr(VI) para producir Cr(III), así como un electrón para la generación de una menor cantidad de ERO (Barak *et al.* 2006). Las rutas no enzimáticas, efectuadas en condiciones anaeróbicas, pueden usar Cr(VI) como aceptor final de electrones, o llevarse a cabo por reacciones químicas asociadas con compuestos como aminoácidos (cisteína), nucleótidos, azúcares, vitaminas, ácidos orgánicos o glutatión (Gutiérrez *et al.* 2010). Un estudio realizado demostró que bacterias sulfato-reductoras de los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium*, pueden usar Cr(VI) como aceptor final de electrones (Chardin *et al.* 2003).

Por otro lado, la reducción extracelular de Cr(VI), en algunos casos, se debe a la producción y excreción de enzimas reductasas, por ejemplo, las flavina reductasas (Cheung y Gu, 2007).

b) Sistemas de transporte e incorporación

Este mecanismo celular involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza al metal pesado presente en el entorno celular con gasto de energía.

Una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, éste es secuestrado por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneínas

o también pueden ser introducidos en una vacuola, como ocurre en hongos. Las metalotioneínas se unen a los iones metálicos evitando sus interacciones con otras proteínas esenciales para los microorganismos (Marrero-Coto *et al.* 2010).

La incorporación de cromato a la célula a través del transportador de sulfato ha sido demostrada en varios tipos de bacterias como *S. typhimurium*, *E. coli*, *P. fluorescens* y *A. eutrophus*. Adicionalmente, en algunas bacterias se ha descrito la existencia de determinantes genéticos de resistencia a CrO_4^{2-} presentes en plásmidos, los cuales codifican transportadores de membrana ChrA que dirigen el flujo de CrO_4^{2-} del citoplasma celular al exterior, en un proceso quimiosmótico dependiente de la cadena respiratoria (Marrero-Coto *et al.* 2010). De ejemplo se menciona el plásmido pMOL28 de *Cupriavidus metallidurans CH34*, el cual, además de codificar el transportador de cromato ChrA, codifica las proteínas ChrC y ChrE que también parecen ser involucradas en la resistencia a CrO_4^{2-} (Ramírez-Díaz *et al.* 2008).

c) **Interacción y unión con componentes de la superficie**

La biosorción se caracteriza por la retención del metal mediante su interacción físico-química con ligandos pertenecientes a la superficie celular. Esta interacción se produce con grupos funcionales expuestos hacia el exterior celular como carboxilos, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilos (Focardi *et al.* 2013). Se ha descrito la captura de cromo en la superficie de bacterias, como resultado de su unión con exopolisacáridos (EPS). Un estudio reporta que el gen *mucD* de *P. aeruginosa* codifica una serín proteasa involucrada en la

regulación transcripcional de los genes que codifican la biosíntesis de alginato, el cual, tiene la función de quelar el Cr(III ; Kiliç *et al.* 2010).

2.4 Técnicas de aislamiento e identificación de bacterias resistentes a Cr(VI)

2.4.1 Aislamiento de bacterias resistentes a Cr(VI)

2.4.1.1 Método de enriquecimiento

Su objetivo es aislar los microorganismos de interés de una comunidad microbiana, mediante el diseño de condiciones de cultivo que favorezcan específicamente su crecimiento.

El principio de este método es controlar los nutrientes necesarios del medio, así como también, las condiciones de incubación (temperatura, agitación, luz, etc.), para apoyar el crecimiento del microorganismo que se desea aislar (Madigan *et al.* 2003).

2.4.2 Determinación de la resistencia a Cr(VI)

La resistencia a la presencia de metales ha sido evaluada por el método de difusión en agar y en medio líquido por la determinación de la concentración mínima inhibitoria (Focardi *et al.* 2013; Long *et al.* 2013).

2.4.2.1 Método de difusión en placa

El uso de éste método es con el objetivo de hacer una selección de microorganismos capaces de crecer en presencia de Cr(VI ; Madigan *et al.* 2003). Consiste en inocular el microorganismo en estudio sobre la superficie de una placa de agar. Posteriormente son colocados sobre la superficie del agar discos de papel filtro impregnados con cantidades estandarizadas de Cr(VI). Se incuban por un cierto tiempo y a determinada temperatura. Luego de este período de incubación se observa si hay crecimiento microbiano alrededor de la zona cercana al papel filtro impregnado con Cr(VI), en esta zona se encuentra la mayor concentración del metal (Forbes *et al.* 2009).

2.4.2.2 Método de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en medio líquido

La concentración mínima inhibitoria es la concentración mínima de una sustancia necesaria para impedir el crecimiento microbiano (Madigan *et al.* 2003). En este caso, la CMI se determinará como la concentración mínima de Cr(VI) que inhibe el crecimiento de microorganismos.

2.5 Métodos para caracterizar bacterias

Para poder identificar las diferentes especies bacterianas resistentes a metales pesados se utilizan los criterios de identificación basados en las características morfológicas de las colonias, características microscópicas así como las pruebas bioquímicas. Además se han reportado métodos de

identificación más precisos basados en la amplificación del ARNr 16S mediante PCR, con la posterior secuenciación de los nucleótidos del amplicón empleando iniciadores y terminadores adecuados, los cuáles producirán fragmentos que se analizarán por electroforesis en geles de poliacrilamida (Murugavelh y Mohanty, 2013). La identificación de la secuencia del ARNr 16S se realiza por su comparación con diversas secuencias depositadas en distintas bases de datos, con el fin de establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos (Rahman y Singh, 2014).

2.6 Aplicación de bacterias resistentes a Cr(VI) en procesos de biorremediación

2.6.1 La biorremediación de Cr(VI) por bacterias

La biorremediación, que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos resistentes para eliminar metales tóxicos, representa una importante oportunidad de tener métodos seguros, económicos y amigables con el medio ambiente. Muchos investigadores han reportado una gran variedad de bacterias reductoras de cromo, por ejemplo, *Bacillus* (Mangaiyarkarasi *et al.* 2011), *Cellulomonas* (Field *et al.* 2013), *Microbacterium* (Soni *et al.* 2013), *Panninobacter* (Xu *et al.* 2011), *Shewanella* (Ravindranath *et al.* 2011). En general, la reducción de Cr(VI) a Cr(III) es un proceso potencial para la recuperación de los sitios contaminados con cromo (Sandana *et al.* 2015).

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS

En fuentes naturales donde se concentra cromo hexavalente se pueden encontrar microorganismos nativos que han desarrollado resistencia a éste, algunos de los cuales pueden presentar potencial para la biorremediación de sitios contaminados con este metal.

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Aislar e identificar bacterias resistentes a Cr(VI) a partir de tres sitios de diferentes regiones de la República Mexicana para su posible empleo en procesos de biorremediación.

4.2 Objetivos específicos

1. Seleccionar los sitios de muestreo.
2. Realizar una búsqueda bioinformática sobre genes de resistencia a cromo.
3. Aislar bacterias resistentes a Cr(VI).
4. Obtener los cultivos puros de los aislados.
5. Realizar las pruebas de resistencia a Cr(VI).
6. Realizar pruebas de remoción de Cr(VI) en medios acuosos.
7. Identificar los aislados que presentaron mayor resistencia.
8. Determinar el posible mecanismo de resistencia.

CAPÍTULO 5

METODOLOGÍA

5.1 Material, equipo y ubicación del equipo

TABLA 1
MATERIAL EMPLEADO DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS

Material	Modelo	Marca
Barra magnética	F37110-0078	BEL-ART
Bureta graduada	K-17027F	KIMAX
Cajas Petri	370	PHOENIX BIOMEDICAL
Espátula	223	MARYLAND
Espátula acanalada	MARYL09043	MARYLAND
Gradilla de alambre	AE-018B	AESA
Gradilla para microtubos	HS29025F	HEATHROW SCIENTIFIC
Micropipetas sencillas	VA-100, VA-700, VA-500, VA-800 y VA-600	ACCUMAX
Matraces ErlenMeyer	K-26500 y K-26500	KIMAX
Matraces ErlenMeyer	P-4980 y P-4980	PYREX
Matraces volumétricos	K-28017 y K-28017	KIMAX
Matraces volumétricos	P-5680 y P-5680	PYREX
Mechero Bunsen	AE-022	AESA
Papel Filtro #1 y #4	1001-125 y 1004-150	WHATMAN
Pipetas bacteriológicas	K-37035K y K-37079	KIMAX
Pipetas volumétricas	K-37004, K-37004 y K-37004	KIMAX
Pipeteador manual	F37911-1025	BEL-ART
Pinza para disección	1404	MARYLAND
Probeta	K-20026	KIMAX
Puntas para micropipeta	0030073061 y 0030073100	EPPENDORF
Tubos tipo Falcon	430828	CORNING
Tubos PCR	3745	CORNING
Vasos de precipitados	K-14000	KIMAX
Viales criogénicos	430659	CORNING

El equipo empleado para el desarrollo de esta investigación, se encuentra en el Laboratorio de Biotecnología 1 ubicado en el tercer piso del edificio CELAES de la Facultad de Ciencias Químicas (Ver Tabla 2).

TABLA 2
EQUIPO UTILIZADO PARA EL DESARROLLO DE LA TESIS

Equipo	Modelo	Marca
Agitador tipo vórtex	M-63215	THERMOLYNE
Autoclave automática	2540M	TUTTNAUER
Autoclave	CV300	AESA
Autoclave	25X-1	ALLAMERICAN
Balanza analítica	PA214	OHAUS
Campana de Flujo Laminar		LABCONCO
Congelador vertical	CVPS-15MO	TOR-REY
Estufa de secado	3513	LABLINE
Espectrómetro de Absorción Atómica (EAA) ^a	GBC-932AA	GBC SCIENTIFIC
Espectrofotómetro de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) ^a	SPECTRUM ONE	PERKIN ELMER
Espectrofotómetro UV-Vis	GENESYS 20	THERMO SPECTRONIC
Homogeneizador ultrasónico	CL-18	FISHER SCIENTIFIC
Incubadoras con agitación	516 Y 1575	SHEL-LAB
Incinerador de asas bacteriológicas	OXFORD	LABWARE
Liofilizadora	FREEZONE 6	LABCONCO
Microcentrífuga	5415D	EPPENDORF
Microcentrífuga refrigerada ^b	IEC MICROLITE RF	THERMO ELECTRON CORPORATION
Microscopio óptico binocular		ZEISS
Plancha de calentamiento con agitación	SP131325	THERMO SCIENTIFIC
Potenciómetro	ORION 3-STAR	THERMO SCIENTIFIC
SENSITITRE ^b	ARIS® 2X	THERMO SCIENTIFIC
Termociclador ^b	TC-512	TECHNE

^a Equipo ubicado en el Laboratorio de Química Industrial. Facultad de Ciencias Químicas.

^b Equipo ubicado en el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad (LADIME). Hospital Universitario

5.2 Soluciones de cromo

Para las pruebas preliminares: se preparó una solución stock de Cr(VI) de 1,000 mg L⁻¹ disolviendo 0.282 g de K₂Cr₂O₇ en 100 mL de agua desionizada.

Las concentraciones de Cr(VI) requeridas en los ensayos se prepararon diluyendo la solución stock.

Para las pruebas de resistencia: se prepararon las soluciones de Cr(VI) ensayadas a partir de un estándar de cromo de 1,000 mg L⁻¹ (Chromium Standard for AAS 1,000 mg L⁻¹ FLU02733M250).

5.3 Parte experimental

Se desarrolló en 5 etapas principales: búsqueda bioinformática sobre genes de resistencia, selección de sitios de muestreo, aislamiento, selección y caracterización de los microorganismos resistentes, determinación del posible mecanismo de resistencia y pruebas de remoción de Cr(VI) en medios acuosos.

5.3.1 Búsqueda bioinformática sobre genes de resistencia

5.3.1.1 Distribución de los genes de resistencia a Cr(VI) en los genomas microbianos.

Genes representativos de los diversos mecanismos implicados en la resistencia a Cr(VI), incluyendo *chrA* (*Cupriavidus metallidurans* CH34; GI:56550646), *yieF* (*Escherichia coli*; GI:388479524) y *mucD* (*Pseudomonas*

aeruginosa; *Gl: 12963467*), fueron empleados como sondas para BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), bajo los siguientes criterios de búsqueda: base de datos de proteínas de referencia (*refseq_protein*), matrix BLOSUM62, un valor E esperado de 1×10^{-99} y un número máximo de 1,000 secuencias.

5.3.1.2 Análisis filogenético

Las secuencias bacterianas de valor E esperado (1×10^{-99}) fueron recuperadas y analizadas, donde los resultados de las secuencias fueron alineados usando el programa MEGA 6.06, y los árboles filogenéticos fueron contruidos usando el método Neighbor-Joining bajo el modelo de Poisson.

Sólo se incluyen las secuencias bacterianas que llevan el dominio conservado de cada clase de genes de resistencia a cromo, por tanto, se excluyen los genomas de plantas, hongos y animales, desde el inicio de la búsqueda. Para validar y comparar los resultados de BLAST, se incluyó el gen que codifica la proteína Recombinasa A (*Gl:408795401*) de *E. coli*. La recombinasa A se empleó como control negativo ya que se considera omnipresente en los organismos vivos y es necesaria para la reparación genética.

5.3.2 Selección de sitios de muestreo

5.3.2.1 Nomenclatura de muestras

La investigación se efectuó a partir de muestras provenientes de los estados de Coahuila (COA), Guanajuato (GTO), San Luis Potosí (SLP) y Nuevo León (NLE).

Las muestras fueron tomadas de agua y sedimentos de sitios prístinos (Cuatro Ciénegas, COA y Marín, NLE), de aguas y sedimentos de sitios potencialmente expuestos (Presa La Boca, NLE, Mina, NLE, y Rio la Silla, NLE), y de agua, sedimento y tierra industrial de una curtiembre (León, GTO), así como también de agua y sedimentos procedentes de zonas cercanas a la industria minera (Charcas, SLP, Cerrito Blanco, SLP y Zacatón, SLP). Las muestras fueron recolectadas y procesadas en base a las normas mexicanas.

En la Tabla 3 se resumen el número de muestras analizadas, clave, lugar de procedencia y estado de agregación.

TABLA 3
NOMENCLATURA DE MUESTRAS

No. Muestra	Clave	Lugar	Estado
1	PRCC	Cuatrociénegas, COA	Líquido
2	PSCC	Cuatrociénegas, COA	Sedimento
3	PESPLB	Presa la Boca, NLE	Sedimento
4	PERLS	Rio la Silla, NLE	Líquido
5	PERM _I	Mina, NLE	Líquido
6	PRM _A	Marín, NLE	Líquido
7	ETTIL	León, GUA	Sólido
8	EAICH	Charcas, SLP	Líquido
9	ETICH	Charcas, SLP	Sólido
10	ETIZ	Zacatón, SLP	Sólido
11	EAICB	Cerrito Blanco, SLP	Líquido
12	ETICB	Cerrito Blanco, SLP	Sólido
13	EAIZ	Zacatón, SLP	Líquido
14	ETIL	León, GTO	Sólido
15	ESIL	León, GTO	Sedimento
16	EAIL	León, GTO	Líquido

Las claves de identificación fueron desarrolladas basándose en los siguientes tres criterios:

1. Sitio

P: Prístino
PE: Potencialmente
Expuesto
E: Expuesto

2. Origen

R: Río
S: Sedimento
TI: Tierra Industrial
TTI: Tierra-Tela Industrial
SI: Sedimento Industrial
AI: Agua Industrial

3. Lugar

CC: Cuatrociénegas
PLB: Presa La Boca
LS: La Silla
M_i: Mina
M_A: Marín
L: León
CH: Charcas
CB: Cerrito Blanco
Z: Zacatón

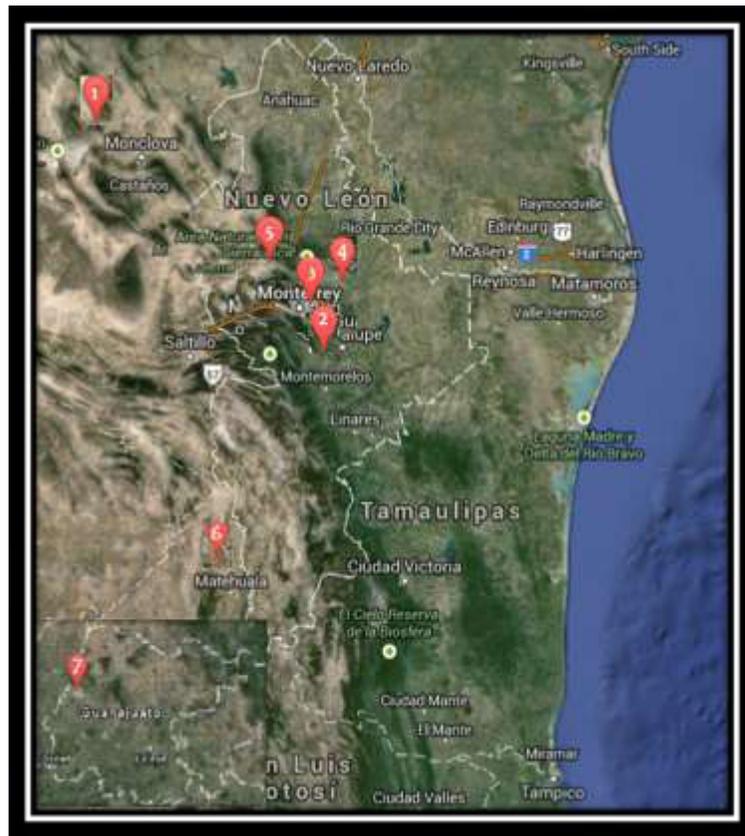


Figura 5. Mapa satelital de ubicación de los sitios de muestreo. 1) Cuatro Ciénegas, COA 2) Presa La Boca, NLE 3) Río la Silla, NLE 4) Marín, NLE 5) Mina, NLE 6) SLP 7) León, GTO

5.3.2.2 Caracterización de las muestras

Las muestras provenientes de León, Guanajuato, se mandaron analizar por ICP-MS (Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente). La metodología utilizada fue EPA 6020A-2007.

Además se cuentan con datos de las características fisicoquímicas de las muestras provenientes de San Luis Potosí, así como también las coordenadas de ubicación de los sitios de muestreo.

5.3.3 Aislamiento, selección y caracterización de las bacterias con resistencia a Cr(VI)

5.3.3.1 Medios de cultivo utilizados

TABLA 4
COMPOSICIÓN DEL AGUA PEPTONADA

Composición	(g L ⁻¹)
Peptona de caseína	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato sódico dibásico	3.5
Fosfato potásico monobásico	1.5
pH	7.0±0.2

TABLA 5
COMPOSICIÓN DEL MEDIO MÍNIMO

Composición	(g L ⁻¹)
Peptona de caseína	20.0
Cloruro de potasio	8.5
Cloruro de magnesio	6.0
Sulfato de amonio	0.005
Cloruro de calcio	0.001
Citrato de amonio y hierro	0.001
Cristal violeta	0.001
pH	7.2±0.2

TABLA 6
COMPOSICIÓN DEL MEDIO MACCONKEY
(MERCK)

Composición	(g L ⁻¹)
Peptona de gelatina	20.0
Lactosa	10.0
Bilis de buey desecada	5.0
Púrpura de bromocresol	0.01
pH	7.2±0.2

TABLA 7
COMPOSICIÓN DEL MEDIO LB (LENNOX)
(DIFCO)

Composición	(g L ⁻¹)
Triptona	10.0
Extracto de levadura	5.0
Cloruro de sodio	5.0
pH	7.2±0.2

5.3.3.2 Aislamiento de bacterias con resistencia a Cr(VI)

Para el aislamiento bacteriano de las muestras, en primera instancia, se efectuaron preparaciones de las muestras (2% y 10%) con agua peptonada (pre-enriquecimiento) con el objetivo de restaurar las células dañadas por procesos fisicoquímicos. Posteriormente, las muestras se inocularon en medios selectivos líquidos (Mínimo y MacConkey) suplementados con diversos volúmenes de Cr(VI) adquiridos a partir de un stock de 1,000 mg L⁻¹ de K₂Cr₂O₇, para la obtención de distintas concentraciones finales de Cr(VI) en el medio de cultivo (10 mg L⁻¹, 30 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹ y 70 mg L⁻¹), con el fin de favorecer el crecimiento de las bacterias de interés. Los cultivos se incubaron a 37 °C

durante 48 horas y con una agitación de 150 rpm (ver Figura 6). Se observaron las características del crecimiento (formación de gas, viraje de la coloración del medio, etc.; ver Tablas 23 y 24).

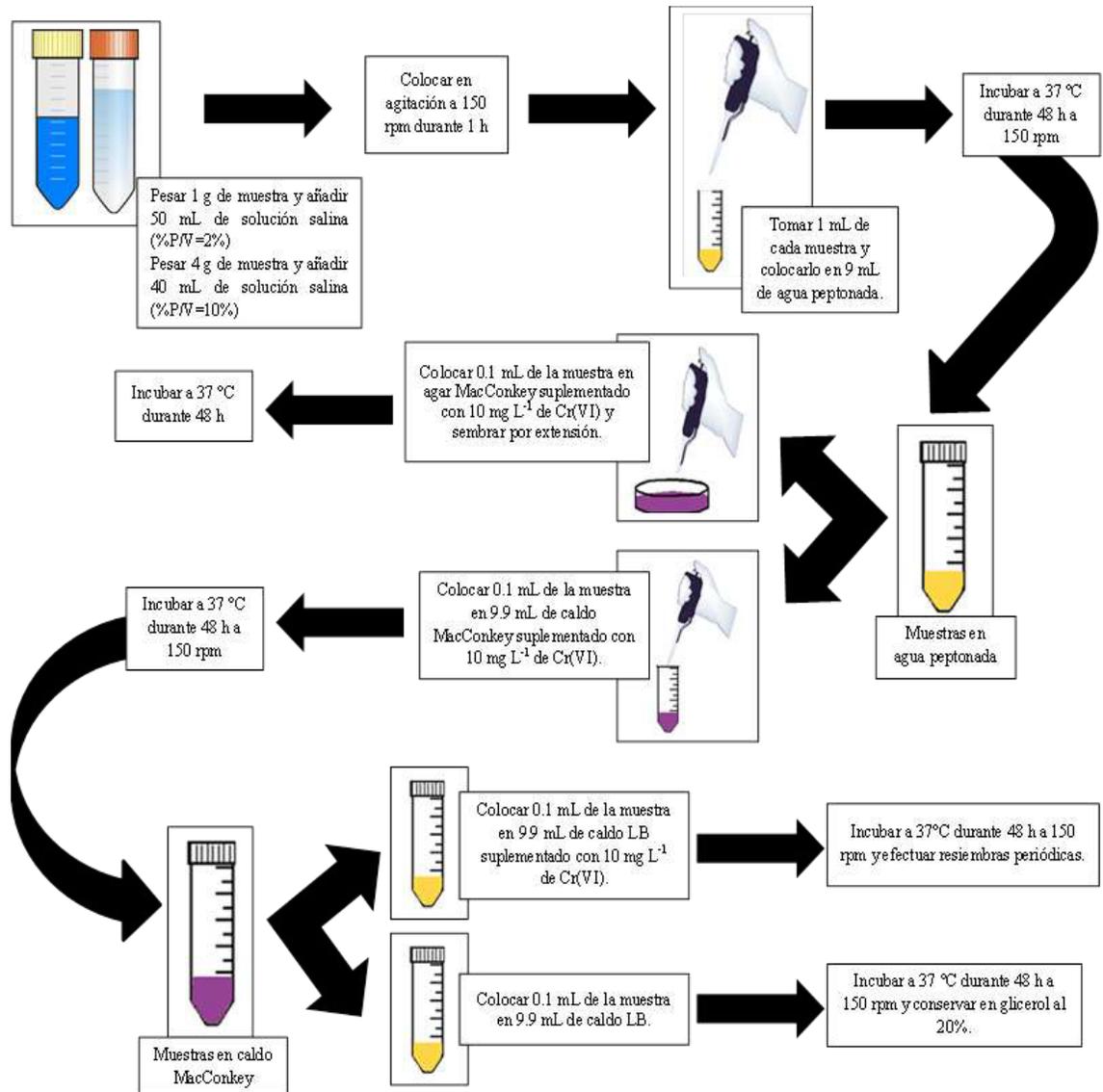


Figura 6. Método de enriquecimiento

Posteriormente, se llevó a cabo el aislamiento de las colonias empleando el método de siembra por estría por agotamiento en los medios sólidos selectivos

suplementados con la disolución de Cr(VI) empleada. Se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se observó el crecimiento de las colonias, tanto su morfología macroscópica como microscópica (ver Tablas 17 y 20).

Este método nos sirvió para obtener cultivos puros de las cepas de interés. Luego del aislamiento, se hizo una transferencia de las colonias a medio LB sin cromo, con el objetivo de observar el comportamiento morfológico a nivel macro y microscópico (ver Tablas 18 y 22), así como también, efectuar el método de conservación en glicerol al 20% a una temperatura de -20 °C. Además, las muestras se transfirieron a medio LB con 50 mg L⁻¹ de Cr(VI) para conservación por resiembra periódica.

5.3.3.3 Selección de bacterias con resistencia a Cr(VI)

Con el objetivo de evaluar la resistencia a Cr(VI) se emplearon los métodos de difusión en agar y concentración mínima inhibitoria (CMI) en medio líquido (Focardi *et al.* 2013; Long *et al.* 2013). Se emplearon disoluciones de Cr(VI) desde 10 a 1,000 mg L⁻¹ preparadas a partir de un estándar de Cr(VI) de 1,000 mg L⁻¹ para la impregnación de los discos de papel filtro Whatman #4, y se usó caldo LB Lenox suplementado con cada disolución de Cr(VI) para llevar a cabo las pruebas de CMI en medio líquido. Los blancos para todos los ensayos se prepararon en caldo LB enriquecido con las distintas disoluciones empleadas de Cr(VI) y sin inocular con las especies biológicas ensayadas, esto para observar la posible reducción abiótica.

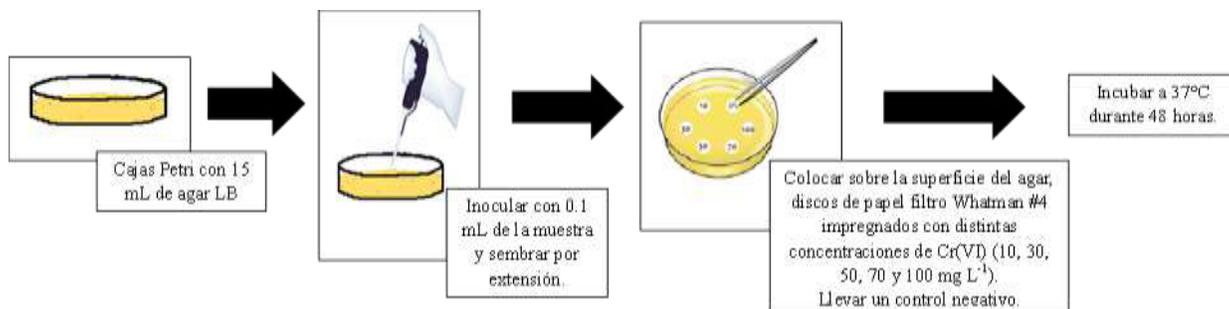


Figura 7. Método de difusión en agar

Para el método de difusión en agar (ver Figura 7), se tomó 0.1 mL de suspensión bacteriana ajustada previamente a una absorbancia de 0.4 ± 0.002 empleando el tubo #2 de la Escala de McFarland (ver Tabla 8) y se inoculó en cajas Petri con 15 mL de agar LB Lenox y, se colocaron sobre la superficie del agar discos de papel filtro Whatman #4 impregnados con 8 μ L de cada disolución de Cr(VI) empleada.

TABLA 8
ESCALA DE MCFARLAND

Tubo	BaCl ₂ 2H ₂ O 1% (mL)	H ₂ SO ₄ 1% (mL)	UFC/mL	DO ₆₂₅
1	0.1	9.9	3.0×10^8	0.235
2	0.2	9.8	6.0×10^8	0.398
3	0.3	9.7	9.0×10^8	0.516
4	0.4	9.6	1.2×10^9	0.692
5	0.5	9.5	1.5×10^9	0.826

Para las pruebas de CMI en medio líquido (ver Figura 8), se prepararon series de tubos con 9.9 mL de medio LB Lenox con concentraciones crecientes de las disoluciones de Cr(VI) empleadas. Cada serie se inoculó con 0.1 mL de suspensión bacteriana con una absorbancia inicial conocida.

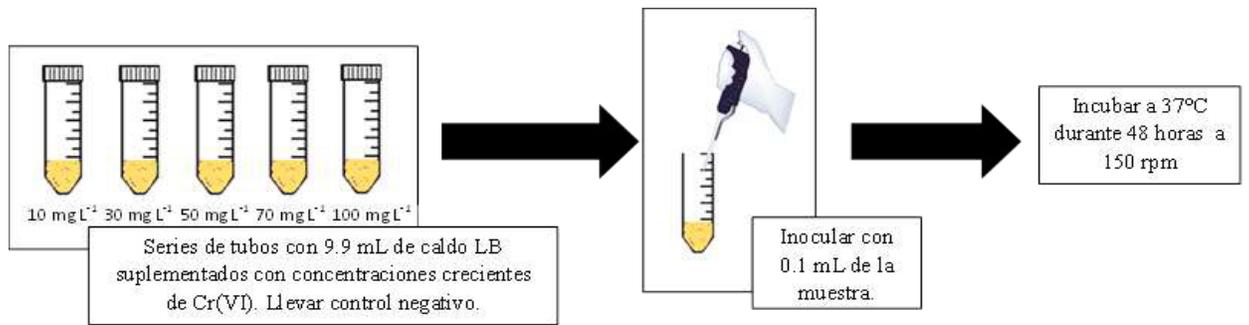


Figura 8. Método de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en medio líquido

Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 horas y las series de tubos se incubaron a 37 °C con agitación de 150 rpm durante 10 días, transcurrido este último periodo de tiempo, se determinó la concentración celular por método espectrofotométrico a 625 nm.

TABLA 9

CONDICIONES INICIALES DE EXPERIMENTACIÓN PARA EFECTUAR LAS PRUEBAS DE RESISTENCIA A Cr(VI)

Aislado	DO _{625 nm}	pH inóculo
PRM _A	0.401	6.57
PERM _I	0.400	6.44
ETICH	0.400	6.98
ETIL	0.400	6.48
EAIL	0.402	6.13

El criterio de selección se estimó sobre la base de la intensidad del desarrollo bacteriano alrededor de los discos y la CMI se determinó como la concentración mínima de Cr(VI) que inhibió el crecimiento microbiano. A la par se llevaron a cabo las pruebas de remoción de Cr(VI) para las distintas disoluciones de Cr(VI) antes mencionadas.

Se estudió la reducción de Cr(VI) mediante la toma de muestras a distintos intervalos de tiempos, se centrifugaron a 3,500 rpm durante 15 min y se cuantificó el Cr(VI) remanente en solución mediante el método colorimétrico de la 1,5-difenilcarbazida (DPCZ ; SCFI, 2015). El método se basa en una reacción de óxido reducción donde el cromo hexavalente Cr(VI) reacciona con la 1,5-difenilcarbazida en medio ácido para dar Cr³⁺ y 1,5-difenilcarbazona de color violeta que se lee espectrofotométricamente a 540 nm (ver Figura 9). La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de cromo hexavalente.

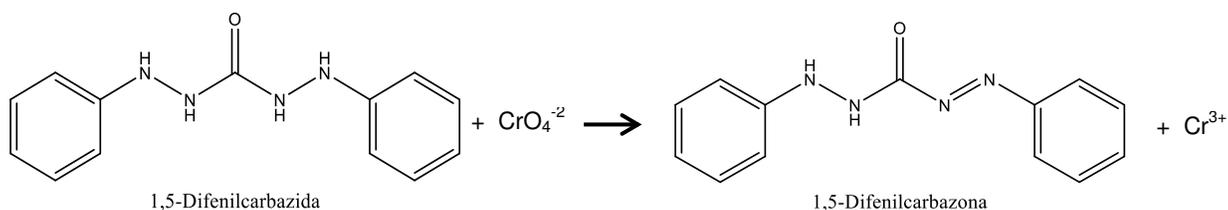


Figura 9. Reacción de acomplejamiento de Cr(VI) por 1,5-Difenilcarbazida (ChemBioDraw Ultra 13.0).

Para el cálculo de la concentración de Cr(VI) de las muestras ensayadas, se elaboró una curva de calibración con disoluciones de referencia en el intervalo de concentración de 0.05 mg L⁻¹ a 1.0 mg L⁻¹ de Cr(VI), la curva de calibrado se muestra en la Figura 10.

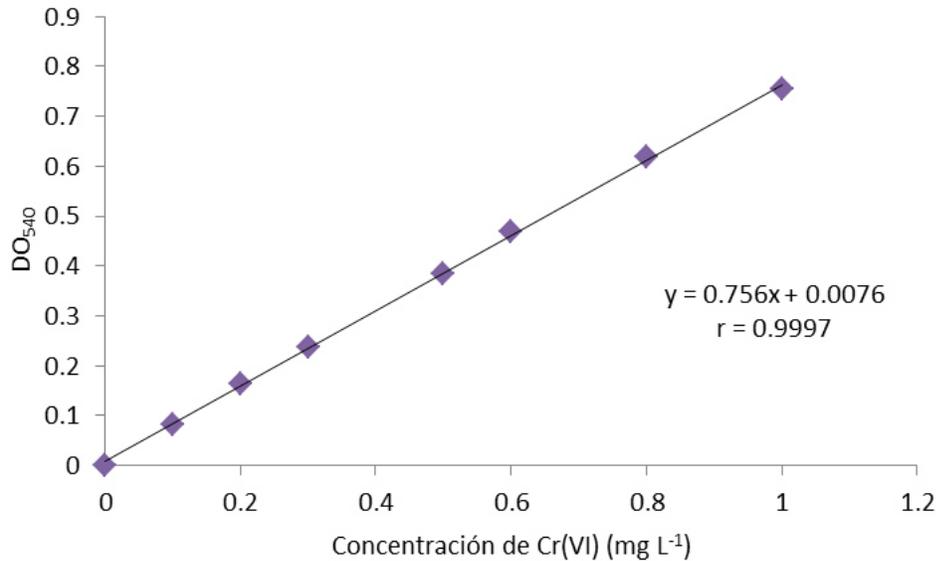


Figura 10. Curva de calibración construida con disoluciones de referencia en el intervalo de concentración de 0.05 mg L⁻¹ a 1.0 mg L⁻¹ de Cr(VI).

Además se monitoreó el pH mediante potenciometría. Todos los experimentos se realizaron con tres réplicas.

5.3.3.4 Caracterización de bacterias con resistencia a Cr(VI)

Para la identificación de los aislados bacterianos, se utilizaron los criterios basados en las características microscópicas, características morfológicas de las colonias y pruebas bioquímicas preliminares (catalasa, oxidasa, Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer y Citrato), según el Manual de Bergey's (Garrity, 2009a; Whitman, 2009). Además, se empleó el equipo automatizado SENSITITRE® ARIS® 2X para determinar características metabólicas de los aislados mediante el uso de dos distintas placas estandarizadas SENSITITRE™, una para bacterias Gram positivas y otra para bacterias Gram negativas (*Ver Anexo 1*).

La inoculación y la lectura de estos paneles es de forma automática, los datos obtenidos se incorporan en un ordenador, el cual proporciona, con un índice alto de fiabilidad, la identificación a nivel de especie de cada microorganismo. Los paneles empleados, además de contener los sustratos cromogénicos liofilizados para el desarrollo de las pruebas bioquímicas, contenían diversos antimicrobianos a distintas concentraciones, con lo que se realizó de manera simultánea la identificación y antibiograma del microorganismo objeto de estudio.

Por último, se realizaron ensayos moleculares para la obtención del producto ARN16s, el cual, al ser posteriormente purificado se mandó secuenciar para la confirmación de las especies ensayadas.

Para la identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S (ver Figura 11), en primera instancia, las 9 cepas aisladas de interés se cultivaron en agar sangre y se incubaron a 37 °C por 24 h, a partir de este crecimiento se procedió a la extracción de ADN genómico por lisis enzimática. El método de extracción consistió en:

1. Resuspender colonias de cultivo joven en 200 μ L de Tris-HCl 100 mM y añadir 150 μ g Lisozima.
2. Incubar a 37 °C/2 h en el caso de bacterias Gram negativas y toda la noche para bacterias Gram positivas.
3. Añadir 200 μ L de TE 1X con SDS al 1% y 6 μ L de proteinasaK (10 mg mL⁻¹) e incubar a 55 °C/2 h/Baño María.
4. Agregar 250 μ L de fenol saturado y mezclar por inversión.

5. Agregar 250 μL de SEVAG (Cloroformo: Alcohol isoamílico) y mezclar.
6. Añadir 100 μL de TE 1X.
7. Agitar por inversión 5 min y centrifugar a 14,000 rpm durante 8 min.
8. Transferir fase acuosa a otro tubo.
9. Volver a extraer con 250 μL fenol saturado y mezclar por inversión.
10. Agregar 250 μL de SEVAG y mezclar.
11. Añadir 100 μL de TE 1X.
12. Agitar por inversión 5 min y centrifugar a 14,000 rpm durante 8 min.
13. Transferir fase acuosa a otro tubo.
14. Añadir 2.33 volúmenes de etanol absoluto hasta formación de hebra ADN, dejar precipitar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ toda la noche.
15. Centrifugar 5 min a 14,000 rpm y lavar 2 veces con etanol al 70%.
16. Secar en el concentrador 5 min, hasta pastilla seca.
17. Resuspender en 100 μL de TE 1X.
18. Incubar en baño de agua a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.
19. Cuantificar por espectrofotometría o con fluorómetro.

Una vez extraído el ADN, se llevó a cabo la mezcla de los componentes de la reacción de amplificación. Los componentes de la mezcla se detallan en la Tabla 10.

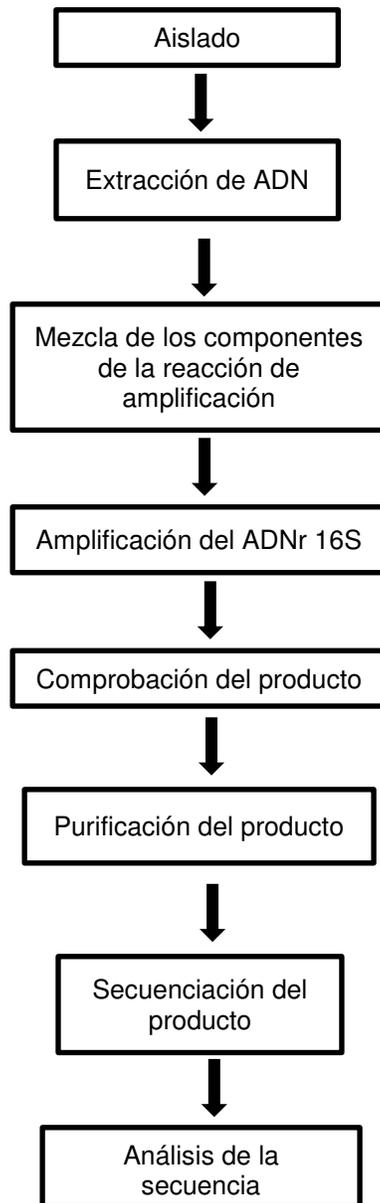


Figura 11. Proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S

TABLA 10**COMPONENTES DE LA REACCIÓN
DE AMPLIFICACIÓN**

PCR ADNr 16S	
Reactivos	1 Reacción (50 µL)
dNTP's	1.0 µL
Buffer	5.0 µL
MgCl ₂	3.0 µL
H ₂ O	33.5 µL
Primer F	2.0 µL
Primer R	2.0 µL
Taq	0.5 µL
ADN	3.0 µL

Posteriormente se empleó un termociclador para efectuar la amplificación del ADNr 16S, gracias a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las condiciones de la PCR se resumen en la Tabla 11.

TABLA 11**CONDICIONES DE LA REACCIÓN EN CADENA
DE LA POLIMERASA (PCR)**

Tiempo	Temperatura	Ciclos
3 minutos	94 °C	1
45 segundos	94 °C	35
45 segundos	50 °C	
45 segundos	72 °C	
3 minutos	72 °C	1

Una vez terminada la amplificación, se procedió a la comprobación del producto mediante la realización de una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, para asegurar la presencia de un único fragmento del tamaño adecuado, obtenido de cada una de las 9 cepas ensayadas.

Antes de continuar con el siguiente paso, los productos de PCR se purificaron mediante el método de precipitación con etanol, con el objetivo de eliminar subproductos, cebadores y dNTP's contaminantes que impidan la secuenciación.

El método de precipitación con etanol consistió en:

1. Transferir cada producto de PCR (50 μ L) a un tubo eppendorf de 1.5 mL con 5 μ L de Acetato de Sodio 3M (pH 4.6) y 100 μ L de etanol al 95%.
2. Homogenizar la mezcla por agitación en vórtex y mantener a -20 °C durante 30-40 min.
3. Centrifugar por 20 min a 14,000 rpm y descartar sobrenadante.
4. Lavar con 300 μ L de etanol al 70% y agitar en vórtex.
5. Centrifugar en frío (4 °C) por 10 min a 14,000 rpm y descartar sobrenadante.
6. Dejar secar toda la noche.
7. Resuspender en 50 μ L de agua estéril grado molecular.

Una vez comprobada la pureza de los productos de PCR, se procedió al envío de las 9 muestras al Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (UNAM), ubicado en Cuernavaca, para que se efectuara la secuenciación. La última etapa consistió en la comparación por alineamiento de las secuencias de cada aislado seleccionado, con las secuencias depositadas en el banco de genes (GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov) mediante el programa computacional BLAST del sitio <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> para verificar la similitud de las secuencias obtenidas con las reportadas previamente para diversas bacterias. De este modo se logró la identificación bacteriana hasta nivel de especie.

5.3.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de Antibióticos

5.3.4.1 Actividad de los antibióticos frente a microorganismos Gram positivos

Se emplearon 4 aislados bacterianos para la evaluación de la resistencia a 14 antibióticos mediante el empleo del equipo automatizado SENSITITRE® ARIS® 2X. Cada microorganismo se cultivó en agar sangre y se incubó a 37 °C por 24 h, a partir de este crecimiento se procedió a la realización de la prueba.

Los antibióticos evaluados fueron: Amoxicilina/Ac. Clavulánico (AUG), Ampicilina (AMP), Eritromicina (ERI), Levofloxacino (LEVO), Linezolid (LZD), Nitrofurantoína (NIT), Norfloxacino (NOR), Penicilina (PEN), Quinupristin/Dalfopristin (SYN), Teicoplanina (TEI), Tetraciclina (TET), Vancomicina (VAN).

5.3.4.2 Actividad de los antibióticos frente a microorganismos Gram negativos.

Se emplearon 5 aislados bacterianos para la evaluación de la resistencia a 22 antibióticos mediante el empleo del equipo automatizado SENSITITRE® ARIS® 2X. Cada microorganismo se cultivó en agar sangre y se incubó a 37 °C por 24 h, a partir de este crecimiento se procedió a la realización de la prueba.

Los antibióticos evaluados fueron: Amikacina (AMIK), Ampicilina (AMP), Aztreonam (AZA), Cefalotina (FAL), Cefepime (FEP), Ceftazidima (FTA), Cefuroxima (FUR), Ciprofloxacino (CIP), Cloranfenicol (CHLOR), Gentamicina

(GEN), Imipenem (IMP), Levofloxacin (LEVO), Meropenem (MER), Nitrofurantoin (NIT), Norfloxacin (NOR), Ofloxacin (OFL), Piperacillin (PIP), Piperacillin/Tazobactam (P/T), Tetracycline (TET), Ticarcillin/Ac. Clavulanic (T/AC), Tobramycin (TBM), Trimethoprim/Sulfamethoxazole (SXT).

5.3.5 Determinación del posible mecanismo de resistencia a cromo

Una vez que se analizaron los resultados de remoción de Cr(VI) de los microorganismos evaluados, se seleccionaron los aislados (ETTIL y EAIL para continuar con los estudios subsecuentes) en base a su capacidad de remoción de Cr(VI).

Esta etapa del estudio consistió en dar seguimiento al crecimiento de los microorganismos seleccionados y emplear sus productos para colocarlos en contacto con una disolución de Cr(V). Para realizar lo anterior, se prepararon por duplicado matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de caldo LB Lenox suplementado con 10 mg L^{-1} de Cr(VI), se inocularon con 2 mL de cultivos previamente reactivados y se incubaron a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y 150 rpm hasta por 72 h. Transcurrido este tiempo, la biomasa producida se centrifugó a 3,200 rpm durante 15 min. El sobrenadante recolectado se utilizó para evaluar la existencia de reducción extracelular mediante la preparación de una serie de 11 tubos Falcón con 19 mL de sobrenadante y 1 mL de stock de $1,000 \text{ mg L}^{-1}$ para una concentración final de 50 mg L^{-1} . Los tubos se incubaron durante 10 días a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y 150 rpm. Se sacrificaron tubos cada 24 h para determinar Cr(VI) y Cr

total (Cr_t) por espectrofotometría UV-Vis y EAA, respectivamente. La biomasa se colocó en contacto con una solución de 50 mg L^{-1} de $Cr(VI)$ en dos diferentes estados (cruda y liofilizada) para observar cualquier variación posible. Se preparó una serie de 11 tubos Falcón con 12.5 mg de biomasa y se les agregó 25 mL de la solución de $Cr(VI)$ a cada uno. Los tubos se incubaron durante 10 días a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y 150 rpm. Se sacrificaron tubos cada 24 h para seguir evaluando el crecimiento por espectrofotometría (625 nm) y posteriormente ser centrifugados a 3,200 rpm durante 15 min con el fin de obtener nuevamente biomasa y sobrenadante. La biomasa se lisó por Ultrasonificación (ver Figura 12) empleando el Homogeneizador ultrasónico Fisher Scientific para posteriormente determinar $Cr(VI)$ y Cr_t por espectrofotometría UV-Vis y EAA, respectivamente.

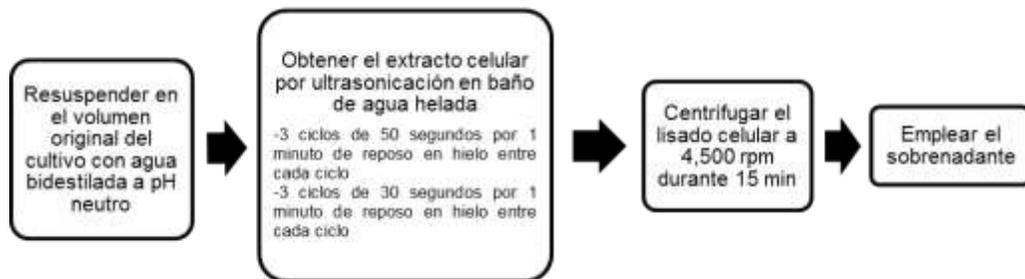


Figura 12. Obtención del extracto celular por Ultrasonificación

Al sobrenadante recolectado también se le determinó $Cr(VI)$ y Cr_t . Con lo anterior se buscó determinar si el mecanismo de resistencia a cromo se debía a una reducción intracelular, en el caso de la biomasa lisada, o a una reducción ectocelular en el caso del sobrenadante recolectado.

En la Figura 13 se presenta la metodología detallada para la determinación del mecanismo de resistencia.

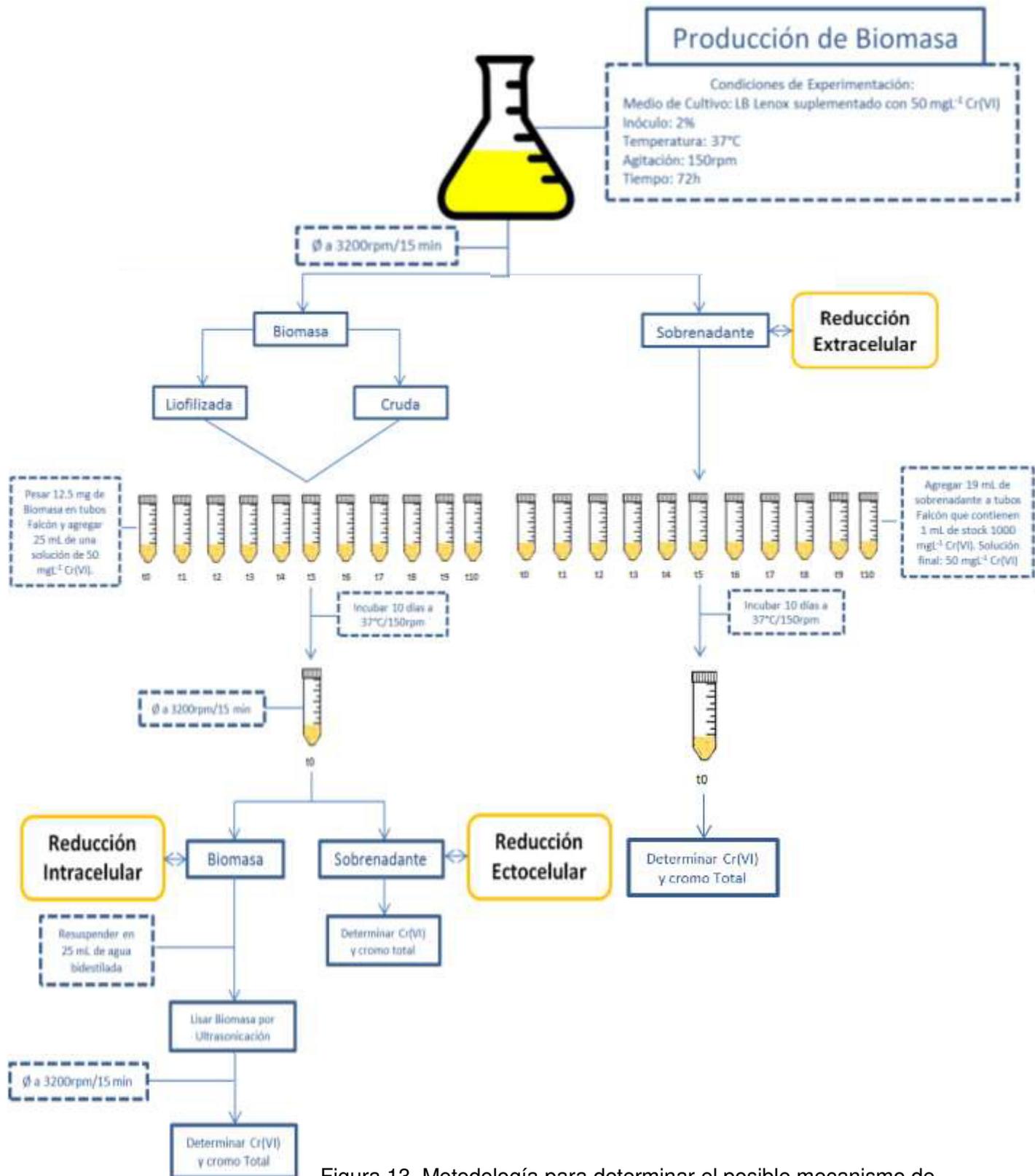


Figura 13. Metodología para determinar el posible mecanismo de resistencia

5.3.6 Evaluación de la capacidad reductora de diversos aislados bacterianos a pH 1

Adicionalmente, se evaluó la capacidad reductora de Cr(VI) de las biomásas liofilizadas, las cuales fueron obtenidas de los aislados PRM_A, PERM_I, ETICH, EAIL Y ETTIL. Para la producción de biomasa, se prepararon por duplicado matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de caldo LB Lenox, se inocularon con 2 mL de cultivos previamente reactivados y se incubaron a 37 °C y 150 rpm hasta por 72 h. Transcurrido este tiempo, las biomásas obtenidas se centrifugaron a 3,200 rpm durante 15 min para posteriormente ser liofilizadas. Se pesó 0.01 g de biomasa correspondiente a cada microorganismo en estudio, y se puso en contacto con 20 mL de una solución de 500 mg L⁻¹ de Cr(VI) a pH 1. Los tubos se incubaron durante 10 días a 37 °C y 150 rpm. Cada 24 h se tomaban alícuotas de las muestras para determinar Cr(VI) por espectrofotometría UV-Vis. Los parámetros de experimentación se resumen en la Tabla 12.

TABLA 12

CONDICIONES INICIALES DE EXPERIMENTACIÓN PARA EVALUAR LA CAPACIDAD REDUCTORA (q_R) DE LAS BIOMASAS BACTERIANAS

Biomasa (g L ⁻¹)	[Cr(VI)] ₀ (mg L ⁻¹)	pH ₀	Tiempo de contacto (h)	Volumen agregado (mL)	Temperatura (°C)
0.5	500	1.08	240	20	37

La capacidad reductora de la biomasa (mg de metal por g⁻¹ de biomasa) es calculada de acuerdo con la Ecuación 1 (Torres, 2007):

$$q = \frac{V(C_0 - C_f)}{m} \quad (1)$$

Dónde:

q- capacidad reductora de la biomasa (mg de metal por g⁻¹ de biomasa)

V- Volumen de la solución que contiene la biomasa (L)

m- concentración de la biomasa (g)

C₀- concentración inicial del metal (mg L⁻¹)

C_f- concentración del metal en disolución en función del tiempo (mg L⁻¹)

La eficiencia del proceso de reducción se calculó por medio del porcentaje de remoción con la Ecuación 2 (Torres, 2007).

$$\% = \frac{(C_0 - C_f)100}{C_0} \quad (2)$$

Dónde:

C₀- concentración inicial del metal (mg L⁻¹)

C_f- concentración del metal en disolución en función del tiempo (mg L⁻¹)

5.3.7 Espectros de Infrarrojos con Transformada de Fourier (FTIR) de las biomosas bacterianas en presencia y/o ausencia de Cr(VI)

Para la obtención de los espectros FTIR, se emplearon las biomosas liofilizadas de los aislados PRM_A, PERM_I, ETICH, EAIL Y ETTIL, tanto en contacto con Cr(VI) como sin contacto.

Para la producción de biomasa, se prepararon por duplicado matraces Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 100 mL de caldo LB Lenox sin cromo y con cromo (50 mg L^{-1}), se inocularon con 2 mL de cultivos previamente reactivados y se incubaron a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y 150 rpm hasta por 72 h. Transcurrido este tiempo, las biomásas obtenidas se centrifugaron a 3,200 rpm durante 15 min para posteriormente ser liofilizadas.

Las biomásas liofilizadas se analizaron con el equipo de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) ubicado en el laboratorio de Química Industrial. Los espectros se registraron de $4,000$ a 600 cm^{-1} , usando 4 cm^{-1} de resolución y 18 escaneos. A su vez, se realizó un pre-procesamiento de datos, es decir, se corrigió la línea base y se efectuó una normalización y suavizado de los mismos, ya que la remoción de ciertos efectos físicos causados por la dispersión de la luz, variación en la línea base y el ruido aleatorio, es de vital importancia en el análisis y caracterización de muestras biológicas (Gerbino, 2013).

CAPÍTULO 6

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Búsqueda bioinformática sobre genes de resistencia a cromo

En base al estudio bioinformático efectuado, se realza que los genes *chrA*, *yieF* y *mucD*, involucrados en los diversos mecanismos de resistencia a cromo, están ampliamente distribuidos en diversos filos bacterianos, en su mayoría, aquellos pertenecientes al grupo bacteriano de *Proteobacterias*, específicamente las clases beta (β) y gamma (γ ; ver Figura 14).

Diversas investigaciones reportan la presencia de estos genes en: *Ochrobactrum tritici* (Morais *et al.* 2011), *Lysinibacillus fusiformis* (He *et al.* 2011) y *Enterobacter cloacae* (Harish *et al.* 2012), por mencionar algunos (ver Tabla 13).

TABLA 13

PRODUCTOS PROTEICOS DE LOS GENES *chrA*, *yieF* Y *mucD* EN BACTERIAS REDUCTORAS DE Cr

Proteína	Microorganismo	Referencia
ChrA	<i>Ochrobactrum tritici</i>	Morais <i>et al.</i> 2011
	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	Ramírez-Díaz <i>et al.</i> 2008
YieF	<i>Escherichia coli</i>	Ackerley <i>et al.</i> 2004
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	He <i>et al.</i> 2011
MucD	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kiliç <i>et al.</i> 2010
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Harish <i>et al.</i> 2012

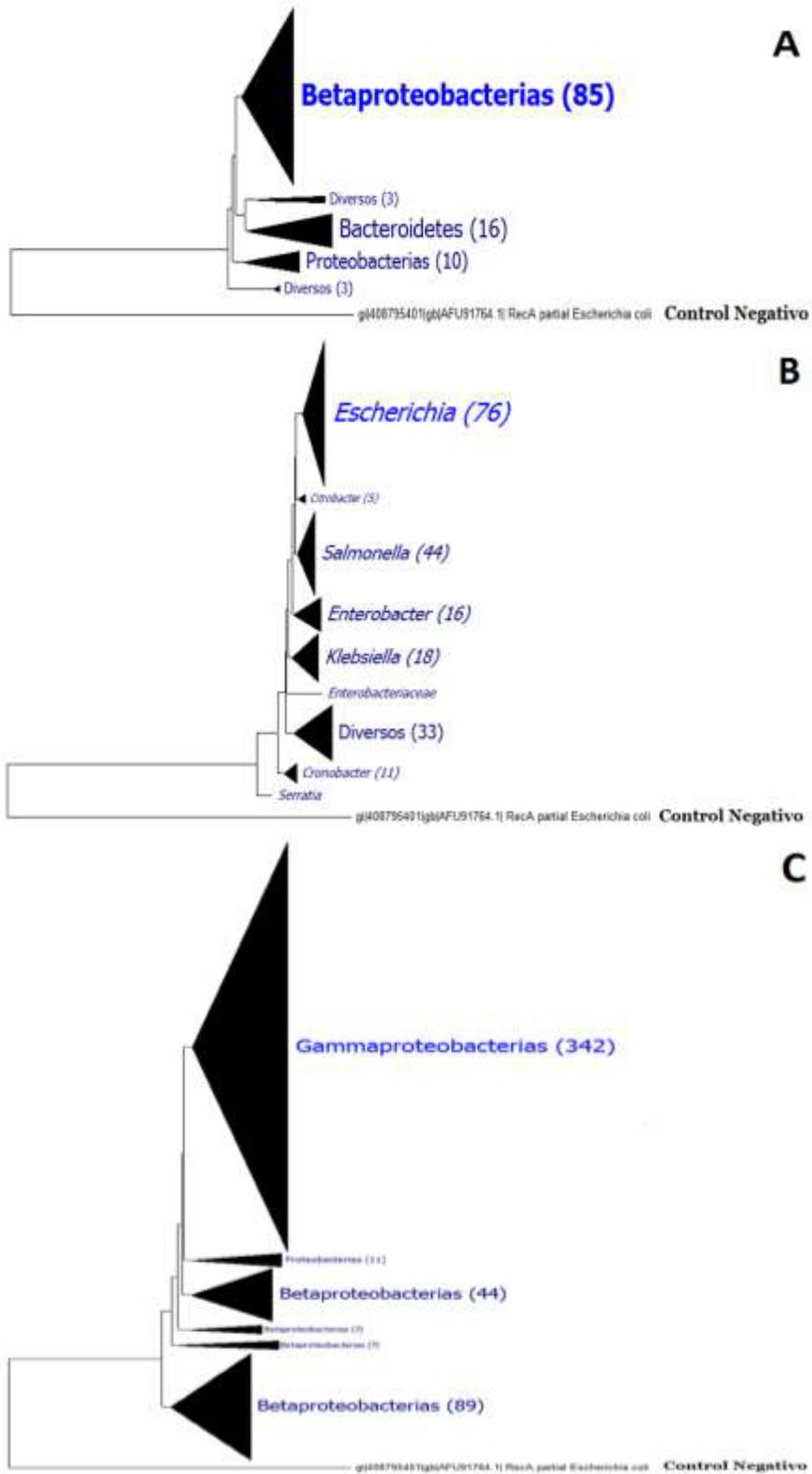


Figura 14. Árboles filogenéticos de las proteínas ChrA (A), YieF (B) y MucD (C) construidos por el método Neighbor-Joining empleando MEGA 6.06.

Se destaca que la mayor distribución del gen *chrA*, cuyo producto proteico está encargado del flujo de iones cromato al exterior de la célula, se encuentra principalmente en *Betaproteobacterias* (ver Figura 15), mientras que los productos proteicos de los genes *yieF* y *mucD* que reducen Cr(VI) a Cr(III) y producen exopolisacáridos, respectivamente, son más frecuentes en *Gammaproteobacterias* (ver Figuras 16 y 17).

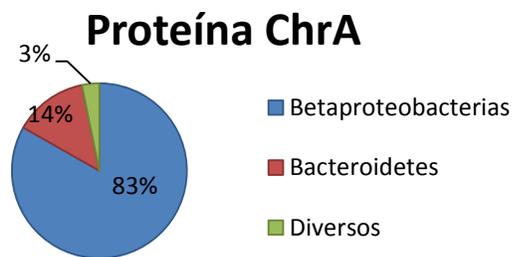


Figura 15. Distribución de la proteína ChrA en diversos filos bacterianos. ■ *Betaproteobacterias* (83%), géneros más representativos: *Burkholderia* y *Cupriavidus*. ■ *Bacteroidetes* (14%), género más representativo: *Flavobacterium*. ■ *Diversos* (3%), género más representativo: *Paenibacillus* perteneciente al filo Firmicutes.

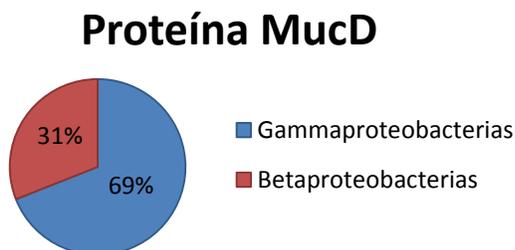


Figura 16. Distribución de la proteína MucD en Proteobacterias. ■ *Gammaproteobacterias* (69%), géneros más representativos: *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Marinobacter* y *Thioalcalivibrio*. ■ *Betaproteobacterias* (31%), género más representativo: *Burkholderia*.

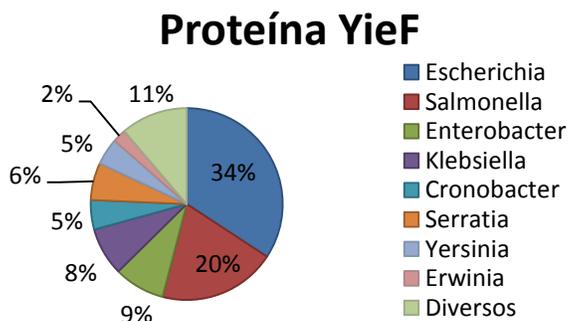


Figura 17. Distribución de la proteína YieF en *Gammaproteobacterias*. ■ *Escherichia* (34%), ■ *Salmonella* (20%), ■ *Enterobacter* (9%), ■ *Klebsiella* (8%), ■ *Cronobacter* (5%), ■ *Serratia* (6%), ■ *Yersinia* (5%), ■ *Erwinia* (2%), ■ *Diversos* (11%)

Lo anterior nos encaminó a la realización de un aislamiento dirigido, ya que al contar estas clases de bacterias con características específicas, se emplearon medios de cultivo selectivos con la finalidad de aislar directamente bacterias resistentes a cromo. A su vez, esta estrategia de análisis minimizó la inversión de tiempo y costos de materia prima, que se habrían malgastado si se hubiera realizado el método de prueba y error, el cual no aseguraba un resultado positivo.

6.2 Caracterización de las muestras ambientales

En las Tablas 14 y 15, se resumen las características fisicoquímicas, así como las coordenadas de ubicación de las muestras provenientes de SLP, respectivamente.

TABLA 14

CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE MUESTRAS PROVENIENTES DE SLP

Parámetro	Charcas (CH)	Cerrito Blanco (CB)
Oxígeno	8.06 mg L ⁻¹	8.64 mg L ⁻¹
pH	8.56	7.64
T°	17.7 °C	15.1 °C
Conductividad electrolítica	657 μS cm ⁻¹	2184 μS cm ⁻¹
NaCl	372 mg L ⁻¹	1385 mg L ⁻¹

TABLA 15	
COORDENADAS DE UBICACIÓN DE MUESTRAS PROVENIENTES DE SLP	
MUESTRAS SLP	Coordenadas GMS (Grados, Minutos, Segundos)
Cerrito Blanco	
1	23° 39' 57.200" N , 100° 34' 35.100" W
2	23° 39' 56.900" N , 100° 34' 35.900" W
3	23° 39' 56.000" N , 100° 34' 35.100" W
4	23° 39' 56.700" N , 100° 34' 35.700" W
5	23° 39' 56.900" N , 100° 34' 34.800" W
6	23° 39' 56.600" N , 100° 34' 35.400" W
Zacatón	
1	22° 49' 54.200" N , 102° 2' 35.600" W
2	22° 49' 54.200" N , 102° 2' 32.100" W
3	22° 49' 30.800" N , 102° 2' 15.900" W
4	22° 49' 32.400" N , 102° 2' 19.600" W
5	22° 49' 32.100" N , 102° 2' 18.100" W
6	22° 49' 32.200" N , 102° 2' 17.200" W
7	22° 49' 29.500" N , 102° 2' 19.700" W
8	22° 49' 29.300" N , 102° 2' 17.800" W
Charcas Agua	23° 6' 3.200" N , 101° 4' 56.100" W
Charcas Suelo	23° 6' 17.700" N , 101° 4' 40.600" W

Los resultados obtenidos de las muestras provenientes de León, Guanajuato caracterizadas por ICP-MS, indican la presencia de diferentes concentraciones de: Aluminio, Antimonio, Arsénico, Bario, Berilio, Bismuto, Cadmio, Calcio, Cobalto, Cobre, Cromo, Estaño, Estroncio, Fierro, Fósforo, Litio, Magnesio, Manganeso, Molibdeno, Níquel, Plata, Plomo, Potasio, Selenio, Sodio, Talio, Titanio, Uranio, Vanadio, Zinc y Zirconio.

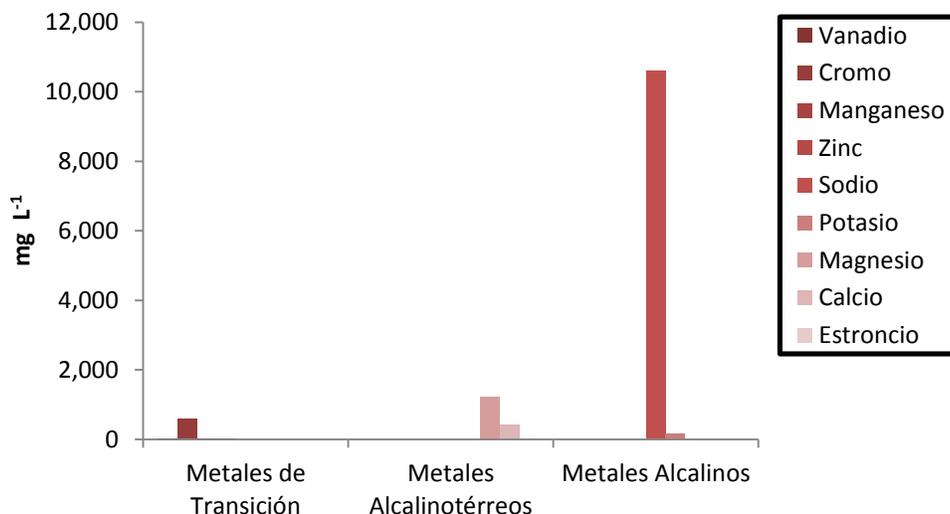


Figura 18. Composición metálica de la muestra EAIL (León, GTO)

En la Figura 18 se observa alta concentración de metales alcalinos, en especial sodio, con una concentración de $10,584 \text{ mg L}^{-1}$.

La muestra EAIL, resultó con la concentración más alta de cromo (585 mg L^{-1}) con respecto a las otras muestras caracterizadas. Dicha concentración se representa en la Figura 19.

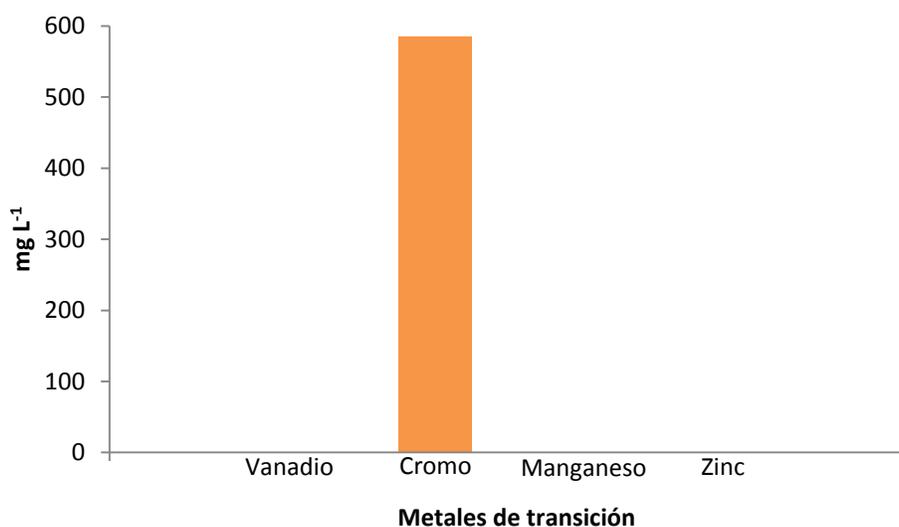


Figura 19. Composición de metales de transición de la muestra EAIL (León, GTO)

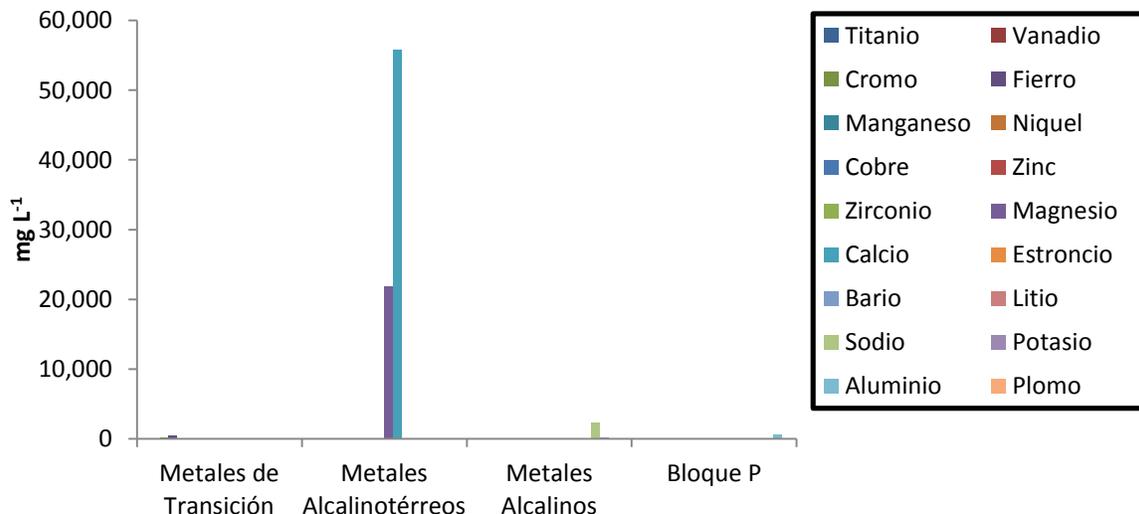


Figura 20. Composición metálica de la muestra ESIL (León, GTO)

En la Figura 20 se destaca la alta concentración en calcio y magnesio de la muestra ESIL, con valores de 55,870 mg L⁻¹ y 21,795 mg L⁻¹, respectivamente.

Al igual que la muestra anterior, ESIL también contiene el metal de interés, con una concentración de 186 mg L⁻¹ de cromo (ver Figura 21).

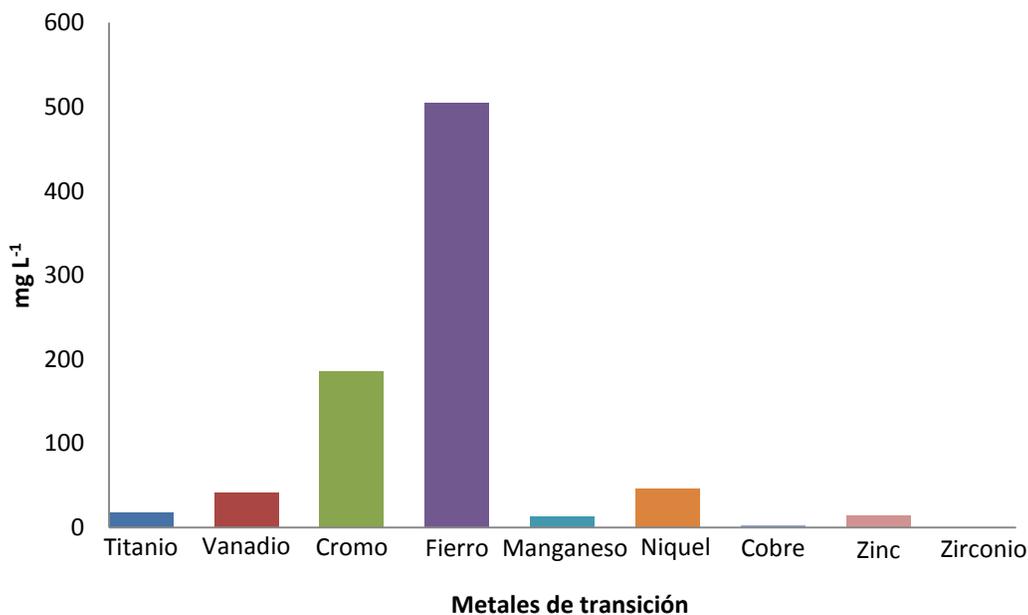


Figura 21. Composición de metales de transición de la muestra ESIL (León, GTO)

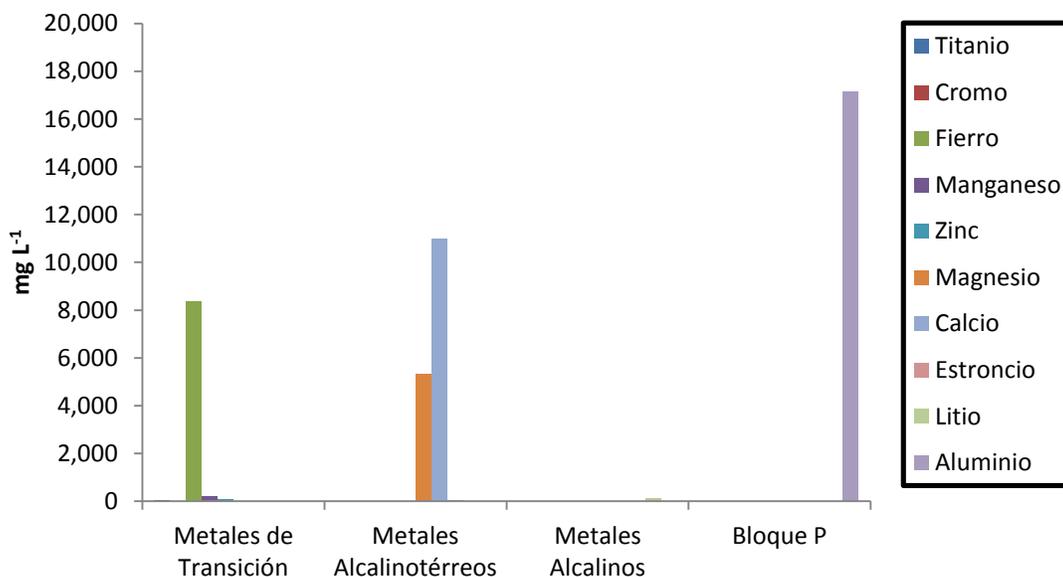


Figura 22. Composición metálica de la muestra ETIL (León, GTO)

La muestra ETIL presentó la más alta concentración de metales de transición, como se puede ver en la Figura 22 en relación a las otras muestras, sin embargo, la cantidad de cromo que contenía resultó ser la más baja ($< 2,00 \text{ mg L}^{-1}$), tal cual se observa en la Figura 23.

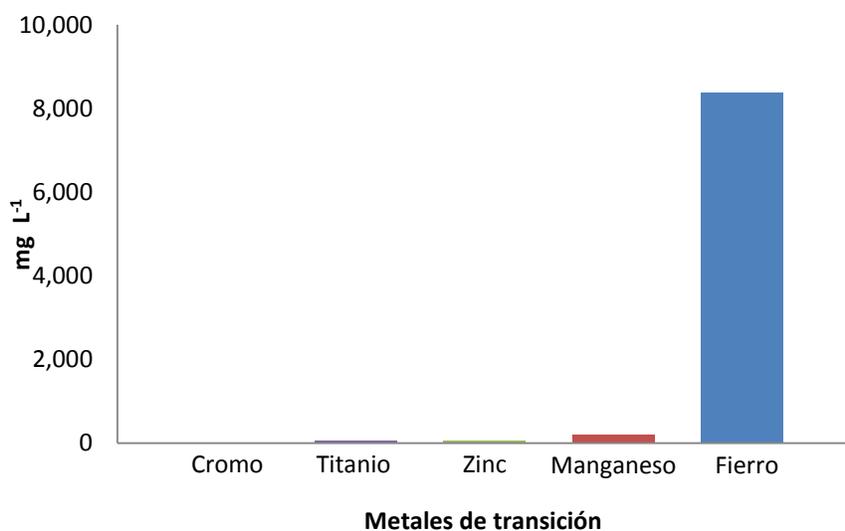


Figura 23. Composición de metales de transición de la muestra ETIL (León, GTO)

En general, las muestras EAIL, ESIL y ETIL, contienen una gran cantidad de metales y/o metaloides con cantidades variables, destacando las más altas concentraciones para metales alcalinos, alcalinotérreos y del bloque *P*, respectivamente, con concentraciones decrecientes de cromo. A pesar de la variabilidad en la concentración de cromo de las muestras tratadas, se obtuvieron aislados bacterianos capaces de crecer en presencia de dicho metal.

Grupos de investigación, reportan el aislamiento y la identificación de microorganismos tanto de sitios contaminados como de aquellos ecosistemas no contaminados o prístinos, cuya característica principal es la capacidad que exhiben para resistir y/o reducir Cr(VI) (Murugavelh y Mohanty, 2013; Schmieman *et al.* 1998; Turick *et al.* 1996). Los microorganismos que poseen la habilidad de reducir Cr(VI) son usualmente llamados bacterias reductoras de cromo (CRB) (Coleman, 1988).

Es de suma importancia recalcar que los microorganismos localizados en ambientes contaminados con diversos metales, son naturalmente resistentes a dichos metales. Lo anterior ha sido reportado por Das *et al.* (2013) en una investigación que reveló la capacidad que poseen las bacterias aisladas de suelos de minas de cromita, a resistir la presencia de Cr(VI), así como también de otros metales pesados. Por lo tanto, las bacterias aisladas poseen potencial para la biorremediación de sitios contaminados con diversos metales.

6.3 Aislamiento, selección y caracterización de bacterias con resistencia a Cr(VI)

6.3.1 Aislamiento de bacterias con resistencia a Cr(VI)

6.3.1.1 Caldo de medio Mínimo

TABLA 16

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE MUESTRAS EN CALDO MÍNIMO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Cr(VI), EMPLEANDO TINCIÓN GRAM.

Aislado	10 mg L ⁻¹ Cr(VI)	30 mg L ⁻¹ Cr(VI)
PRCC	Bacilos Gram (+)	Bacilos Gram (+)
PSCC	Bacilos Gram (+)	Bacilos Gram (+)
PESPLB	Bacilos Gram (+) esporulados Bacilos Gram (-)	Bacilos Gram (+) esporulados Bacilos Gram (-)
PERLS	Bacilos Gram (+)	Bacilos Gram (+)
PERM _I	Cocos Gram (+) Bacilos Gram (-)	Cocos Gram (+) Bacilos Gram (-)
PRM _A	Bacilos Gram (+)	Bacilos Gram (+)
ETTIL	Cocos Gram (+) Bacilos Gram (-)	Cocos Gram (+) Bacilos Gram (-)
Nota. Ver Anexo 2		

6.3.1.2 Agar medio Mínimo

TABLA 17

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE COLONIAS CULTIVADAS EN AGAR MÍNIMO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Cr(VI), EMPLEANDO TINCIÓN GRAM.

Aislado	10 mg L ⁻¹ Cr(VI)	30 mg L ⁻¹ Cr(VI)
PRCC	Bacilos Gram (+)	Bacilos Gram (+)
PSCC	Bacilos Gram (+)	Bacilos Gram (+) (Morfología irregular)
PESPLBa	Cocos Gram (+)	Cocos Gram (+)
PESPLBc	Bacilos Gram (+) esporulados	Bacilos Gram (+) esporulados (Morfología irregular)
PERLS	Bacilos Gram (+)	Bacilos Gram (+)
PERM _i	Bacilos Gram (+)	Bacilos Gram (+)
PRM _A	Bacilos Gram (+)	Bacilos Gram (+)
ETTILc	Bacilos Gram (-) y (+)	Bacilos Gram (-) y (+)
ETTILp	Bacilos Gram (-) Bacilos Gram (+) alargados	Bacilos Gram (+) (Morfología irregular)
Nota. Ver Anexo 2		

6.3.1.3 Caldo y agar LB Lenox sin cromo

TABLA 18

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE COLONIAS CULTIVADAS EN MEDIO LB LENOX SIN Cr(VI), EMPLEANDO TINCIÓN GRAM

Aislado	Morfología y Gram
PRCC	Bacilos Gram (+) cortos y alargados
PSCC	Bacilos Gram (+) cortos con endosporas. Algunas células se aprecian hinchadas y otras con incrustaciones.
PESPLBa	Bacilos pequeños Gram (+) Los bacilos son tan pequeños que podrían confundirse con cocos.
PESPLBc	Estreptobacilos Gram (+) con endosporas Bacilos Gram (-) Se observa una especie de red en el fondo
PERLS	Bacilos Gram (+)
PERM _I	Bacilos Gram (-) y (+) cortos
PRM _A	Estreptobacilos Gram (+) con endosporas Se aprecia especie de red en el fondo Bacilos Gram (-) pequeños
ETTILc	Bacilos Gram (+) cortos. Bacilos Gram (-) Interferencia por sustancia viscosa
ETTILp	Bacilos Gram (+) cortos y alargados. Bacilos Gram (-) Se aprecia una especie de red en el fondo
Nota. Ver Anexo 3	

Las colonias aisladas del cultivo en medio Mínimo suplementado con la máxima concentración de Cr(VI) en la que presentaron crecimiento, se inocularon en medio LB Lenox sin cromo para la observación del comportamiento macro y microscópico.

6.3.1.4 Caldo MacConkey

El segundo aislamiento se desarrolló empleando medio MacConkey, el cuál se inoculó con las muestras originales.

TABLA 19

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE COLONIAS CULTIVADAS EN CALDO MACCONKEY A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Cr(VI), EMPLEANDO TINCIÓN GRAM

Aislado	10 mg L ⁻¹ Cr(VI)	30 mg L ⁻¹ Cr(VI)
PSCC	Bacilos Gram (+) Bacilos Gram (-)	Bacilos Gram (+) Bacilos Gram (-)
PERM _I	Bacilos Gram (-)	Bacilos Gram (-)
PRM _A	Bacilos Gram (+) y (-) con endosporas	Bacilos Gram (+) y (-) con endosporas
EAICH	Bacilos Gram (+) Bacilos Gram (-) pequeños Levaduras	Bacilos Gram (+) Bacilos Gram (-) pequeños Levaduras
ETICH	Bacilos Gram (-) Levaduras	Bacilos Gram (-) Levaduras
ETIZ	Bacilos Gram (-) alargados	Bacilos Gram (-) alargados
EAICB	Bacilos Gram (-) pequeños	Bacilos Gram (-)
ETICB	Bacilos Gram (-) con endosporas	Bacilos Gram (-) con endosporas
EAIZ	Bacilos Gram (-)	Bacilos Gram (-)
ETTIL	Bacilos Gram (+) Bacilos Gram (-) cortos	Bacilos Gram (-) y (+)
ETIL	Cocobacilos Gram (+) irregulares. Bacilos Gram (-) pequeños.	Cocobacilos Gram (+) irregulares. Bacilos Gram (-) pequeños.
EAIL	Cocobacilos Gram (-) pequeños y (+)	Cocobacilos Gram (-) y (+) pequeños.

Nota: Ver Anexo 4

6.3.1.5 Agar MacConkey

TABLA 20

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE COLONIAS CULTIVADAS EN AGAR MACCONKEY A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Cr(VI), EMPLEANDO TINCIÓN GRAM.

Aislado	10 mg L ⁻¹ Cr(VI)	30 mg L ⁻¹ Cr(VI)
PSCC	Bacilos Gram (+) Bacilos Gram (-)	Bacilos Gram (+) Bacilos Gram (-)
PERM _I	Bacilos Gram (-) con endosporas	Bacilos Gram (-) con endosporas
PRM _A	Bacilos Gram (+) y (-) con endosporas	Bacilos Gram (+) y (-) con endosporas
EAICH	Bacilos Gram (+) Bacilos Gram (-) pequeños Levaduras	Bacilos Gram (+) Bacilos Gram (-) pequeños Levaduras
ETICH	Bacilos Gram (-) con endosporas. Pigmento verde Levaduras	Bacilos Gram (-) con endosporas. Pigmento verde Levaduras
ETIZ	Bacilos Gram (-) alargados	Bacilos Gram (-) alargados
EAICB	Bacilos Gram (-)	Bacilos Gram (-)
ETICB	Bacilos Gram (-)	Bacilos Gram (-)
EAIZ	Bacilos Gram (-) con endosporas	Bacilos Gram (-) con endosporas
ETTIL _L	Bacilos Gram (+) esporulados en cadena.	Bacilos Gram (+)
ETTIL _R	Bacilos Gram (-) en cadena. Colonia con pigmento rojo.	Bacilos Gram (-) en cadena. Colonia con pigmento rojo.
ETIL	Bacilos Gram (+) cortos e irregulares. Bacilos Gram (-) pequeños.	Bacilos Gram (+) cortos e irregulares. Bacilos Gram (-) pequeños.
ESIL	Bacilos Gram (-) alargados. Bacilos Gram (+) muy pequeños.	Bacilos Gram (-) alargados. Bacilos Gram (+) muy pequeños.
EAIL	Bacilos Gram (-) pequeños.	Bacilos Gram (-) pequeños.
Nota: Ver Anexo 4		

Las colonias aisladas de los cultivos en medio MacConkey suplementados con la máxima concentración de Cr(VI) en la que presentaron crecimiento, se

inocularon en medio LB Lenox sin cromo, con fines de observar cambios en el comportamiento micro y macroscópico, así como también de conservación.

En el caso de PSCC se empleó el cultivo líquido como inóculo.

6.3.1.6 Caldo LB Lenox sin cromo

TABLA 21

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE COLONIAS CULTIVADAS EN CALDO LB LENOX SIN Cr(VI), EMPLEANDO TINCIÓN GRAM

Aislado	Morfología y Gram
PSCC	Bacilos Gram (+) cortos. Hay interferencia. Célula estresada.
PERM _I	Bacilos Gram (-) pequeños con incrustaciones.
PRM _A	Bacilos Gram (+) cortos y alargados. Bacilos Gram (-) pequeños
EAICH	Bacilos Gram (-) pequeños.
ETICH	Bacilos Gram (-)
ETIZ	Bacilos Gram (-) pequeños.
EAICB	Bacilos Gram (-) cortos
ETICB	Bacilos Gram (-) cortos y en cadena.
EAIZ	Bacilos Gram (+) pequeños Bacilos Gram (-) cortos
ETTIL	Bacilos Gram (-) pequeños.
ETIL	Bacilos Gram (-) cortos con endosporas. Bacilos Gram (+) alargados
EAIL	Bacilos Gram (-) cortos y alargados con endosporas. Se agrupan en cúmulos.
Nota: Ver Anexo 5	

6.3.1.7 Agar LB Lenox sin cromo

TABLA 22

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE COLONIAS CULTIVADAS EN AGAR LB LENOX SIN Cr(VI), EMPLEANDO TINCIÓN GRAM.

Aislado	Morfología y Gram
PSCC	Bacilos Gram (+) Algunas células se aprecian hinchadas
PERM _I	Bacilos Gram (-) pequeños, cortos y alargados Bacilos Gram (+)
PRM _A	Bacilos Gram (+) cortos y alargados Bacilos Gram (-) pequeños
EAICH	Bacilos Gram (-) pequeños
ETICH	Bacilos Gram (-) cortos Colonia con pigmento verde
ETIZ	Bacilos Gram (-) cortos y pequeños
EAICB	Bacilos Gram (-) cortos
ETICB	Bacilos Gram (-) cortos y en cadena
EAIZ	Bacilos Gram (+) pequeños Célula muy estresada Bacilos Gram (-) cortos
ETTIL _L	Bacilos Gram (+) esporulados en cadena
ETTIL _R	Bacilos Gram (-) pequeños en cadena Colonia con pigmento rojo
ETIL	Bacilos Gram (+) cortos e irregulares Célula muy estresada Bacilos Gram (-) pequeños
EAIL	Bacilos Gram (-) alargados Bacilos Gram (+) muy pequeños
ETIL	.Bacilos Gram (-) pequeños
Nota: Ver Anexo 5	

En la Tabla 23 se resumen los aislados obtenidos del primer aislamiento en medio Mínimo diseñado.

TABLA 23
RESUMEN DE AISLADOS OBTENIDOS A PARTIR DE MEDIO MÍNIMO

Aislado	Lugar	[Cr (VI)] mg L ⁻¹	Observaciones		Gram
			Medio Mínimo	Medio LB	
PRCC	Cuatrociénegas	10, 30, 50, 70	Crecimiento +++ Precipitado lila	Crecimiento +++ Viscosidad	Bacilos Gram (+)
PSCC	Cuatrociénegas	10, 30, 50, 70	Crecimiento +++ Precipitado lila	Crecimiento + Tarda mucho en desarrollarse	Bacilos Gram (+)
PESPLB _A	Presa la Boca	10, 30, 50, 70	Precipitado lila Olor desagradable	Crecimiento +++ Precipitado amarillo	Bacilos Gram (+)
PESPLB _C	Presa la Boca	10, 30, 50, 70	Precipitado lila Olor desagradable	Crecimiento +++	Bacilos Gram (+) Esporulado Bacilos Gram (-)
PERLS	Río la Silla	10, 30, 50, 70	Crecimiento +++ Precipitado lila	Crecimiento +++ Viscosidad/Hebras	Bacilos Gram (+)
PERM _i	Mina	10, 30, 50, 70	Formación de gas Tubo lila Olor desagradable	Crecimiento +++	Bacilos Gram (+) Bacilos Gram (-)
PRM _A	Marín	10, 30, 50, 70	Formación de gas Tubo lila Olor desagradable	Crecimiento +++	Bacilos Gram (+) Esporulado Bacilos Gram (-)
ETIL _C	Tenerías	10, 30	Crecimiento +++ Precipitado lila	Crecimiento +++ Viscosidad	Bacilos Gram (+) Bacilos Gram (-)
ETIL _P	Tenerías	10, 30	Crecimiento +++ Precipitado lila	Crecimiento +++ Formación de nata	Bacilos Gram (+) Bacilos Gram (-)

Total 9 cepas (4 son Gram positivas y 5 son consorcios)

En la Tabla 24 se resumen los aislados obtenidos del segundo aislamiento en medio MacConkey.

TABLA 24

RESUMEN DE AISLADOS OBTENIDOS A PARTIR DE MEDIO MACCONKEY

Aislado	Lugar	[Cr (VI)] mg L ⁻¹	Observaciones		Gram
			Medio MacConkey	Medio LB	
PSCC	Cuatrociénegas	10, 30, 50	Crecimiento + Tarda mucho en desarrollarse	Crecimiento +++ Formación de nata y hebras	Bacilos Gram (+) Bacilos Gram (-)
PERM _I	Mina	10, 30, 50	Crecimiento +++ Viraje del indicador Formación de nata	Crecimiento +++	Bacilos Gram (-)
PRM _A	Marín	10, 30, 50	Crecimiento +++ Viraje del indicador Formación de nata	Crecimiento +++	Bacilos Gram (+) Bacilos Gram (-)
EAICH	San Luis Potosí	10, 30	Crecimiento +	Crecimiento +++ Formación de nata	Bacilos Gram (-)
ETICH	San Luis Potosí	10, 30, 50	Crecimiento +++ Viraje del indicador	Crecimiento +++ Viscosidad y formación de hebras Medio color verde a las 20 h de incubación	Bacilos Gram (-)
ETIZ	San Luis Potosí	10, 30	Crecimiento +++ Viraje del indicador	Crecimiento +++ Viscosidad Formación de nata	Bacilos Gram (-)
EAICB	San Luis Potosí	10, 30	Crecimiento +++ Viraje del indicador	Crecimiento +++ Viscosidad	Bacilos Gram (-)
ETICB	San Luis Potosí	10, 30	Crecimiento ++	Crecimiento +++ Viscosidad Formación de nata	Bacilos Gram (-)
EAIZ	San Luis Potosí	10, 30	Crecimiento +	Crecimiento +++ Viscosidad Partículas	Bacilos Gram (-)
ETTIL _L	Tenerías	10, 30	Crecimiento ++ Viscosidad Viraje del indicador	Crecimiento +++	Bacilos Gram (+)
ETTIL _R	Tenerías	10, 30	Crecimiento ++ Viscosidad Viraje del indicador	Crecimiento +++	Bacilos Gram (+) Bacilos Gram (-)
ETIL	León	10, 30, 50	Crecimiento +++ Viraje del indicador	Crecimiento +++	Bacilos Gram (-)
EAIL	León	10, 30, 50	Crecimiento ++ Partículas	Crecimiento +++ Partículas	Bacilos Gram (-) Bacilos Gram (+)

Total

13 cepas (1 es Gram positiva, 8 son Gram negativas y 4 son consorcios)

El aislado ESIL sólo se desarrolló en medio sólido, y a través de la tinción Gram se conoce que es un consorcio formado por bacilos alargados Gram (-) y bacilos pequeños Gram (+).

La morfología de los microorganismos provenientes de cada muestra empleada, fue cambiando a lo largo de los ensayos realizados. Se observaron características como producción de gas, alta viscosidad y/o viraje del indicador. Tanto la producción de gas, como el viraje del indicador, se deben a la formación de CO₂ y a la fermentación de la lactosa con posterior producción de ácido, esto último condujo al viraje del indicador de pH del color púrpura a amarillo. Lo anterior es característico de enterobacterias (Garrity, 2009b). Diversos investigadores han reportado bacterias provenientes de la familia *Enterobacteriaceae* con capacidad de reducir cromo, por ejemplo, *E. coli* (Eswaramoorthy *et al.* 2012), *Enterobacter* sp. (Rahman y Singh, 2014), y *Serratia* sp. (Srivastava y Thakur, 2012). En cuanto a la alta viscosidad que presentaron algunas muestras, se presume que fue por la formación de EPS. Los EPS son metabolitos producidos por los microorganismos que no sólo les proporciona protección frente a condiciones ambientales hostiles, sino también les ayuda en su fijación a una gran variedad de superficies abióticas y bióticas (Kumar *et al.* 2011). En bacterias, los EPS son localizados en la superficie celular o fuera de la superficie de la célula, independientemente de su origen; cuyos grupos ionizables forman complejos con iones metálicos resultando en la quelación del metal (Kılıç y Dönmez, 2008). Grupos de investigación han reportado diversas bacterias para la eliminación de Cr(VI) de su entorno, gracias a su capacidad de producir EPS. Dentro de las cuales se mencionan: *Stenotrophomonas* sp. (Morel *et al.* 2009), *Pseudomonas putida* (Dogan *et al.*

2011), *Enterobacter cloacae* (Harish *et al.* 2012) y *Bacillus subtilis* (Bakiyaraj *et al.* 2014).

En el primer experimento se utilizó un medio de cultivo mínimo diseñado para promover el desarrollo de microorganismos Gram negativos, por la presencia de cristal violeta como inhibidor de la flora Gram positiva. El resultado fue la obtención de consorcios, así como de cepas Gram positivas. Esto último se debe, a que la falta de sales biliares en el medio diseñado, no permite la selectividad deseada, pues no inhibe la flora Gram positiva, ni tampoco estimula el desarrollo de Gram negativas, ya que es un nutriente esencial de las mismas.

El medio MacConkey utilizado en el segundo ensayo, es un medio selectivo y diferencial, que en teoría debe inhibir a la mayoría de los microorganismos Gram positivos. Su composición consiste en peptona, lactosa, bilis de buey y púrpura de bromocresol. La peptona es la fuente de aminoácidos, así como de otros factores de crecimiento, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, la bilis de buey estimula el crecimiento de las bacterias coliformes e inhibe a la mayoría de la flora Gram positiva, por último, el púrpura de bromocresol es el indicador de pH. En este caso, se obtuvieron en su mayoría consorcios microbianos, y se inhibió o estimuló el desarrollo de Gram positivas y negativas respectivamente. Cabe recalcar que la presencia de distintas concentraciones de Cr(VI) en los medios empleados es el factor clave en los experimentos realizados, ya que el microorganismo se ve afectado notablemente y su propiedad de crecer en presencia de altas concentraciones de Cr(VI) puede depender de sus propiedades estructurales y bioquímicas, así como de adaptaciones fisiológicas y/o genéticas. Investigadores han reportado que los genes involucrados en la reducción de Cr(VI)

pueden encontrarse en plásmidos como se observa en *Desulfovibrio desulfuricans* G20 (Zou *et al.* 2013) y *Synechococcus elongatus* (Aguilar *et al.* 2011) o pueden estar situados en el ADN cromosómico, por ejemplo, el gen que codifica la proteína NemA en *E.coli* (Robins *et al.* 2013).

En esta investigación se obtuvieron en total 23 aislados: 5 Gram positivos, 8 Gram negativos y 10 consorcios. De los 23 aislados, 9 provienen de los ensayos en los que se empleó medio de cultivo Mínimo y los 14 restantes empleando el medio selectivo MacConkey.

En la Figura 24 se relaciona el porcentaje de especies biológicas aisladas con los sitios de muestreo.

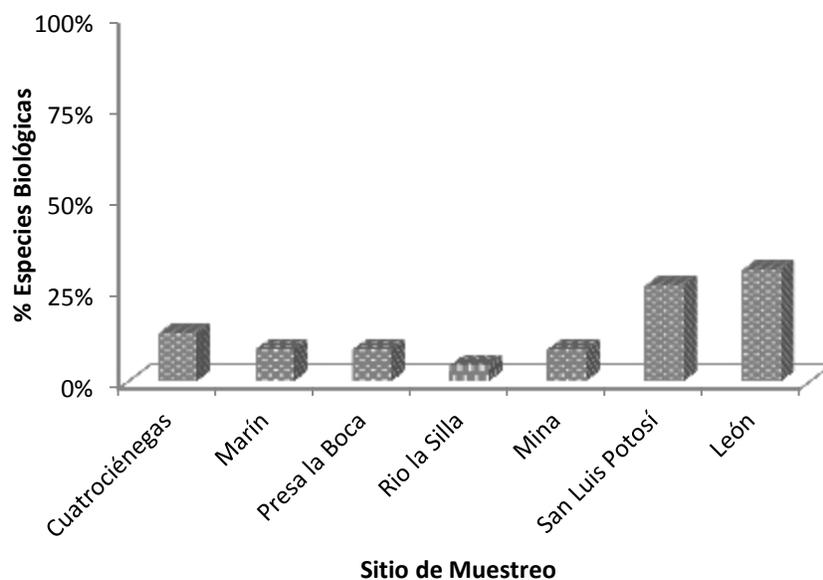


Figura 24. Distribución porcentual de las especies biológicas aisladas en relación al sitio de muestreo.

La mayor cantidad de especies biológicas obtenidas provienen de León, sitio clasificado como expuesto a metales pesados, recalcando que las bacterias provenientes de estos sitios, son naturalmente resistentes.

6.3.2 Selección de bacterias con resistencia a Cr(VI)

Se seleccionaron 5 cepas para efectuar las pruebas de resistencia a Cr(VI) (PRM_A, PERM_I, ETTIL_R, ETICH y EAIL) en base a los sitios de muestreo, a los resultados obtenidos en el estudio bioinformático, así como también al comportamiento macro y microscópico de cada especie biológica.

Aislado	PRM _A	PERM _I	ETICH	ETTIL _R	EAIL
Gram	Bacilos (-)	Consortio	Bacilos (-)	Consortio	Consortio
Morfología Macroscópica					

Figura 25. Características de los aislados seleccionados.

6.3.2.1 Método de difusión en agar

En las pruebas de difusión en agar las especies fueron capaces de crecer alrededor de los discos de papel filtro impregnados con las diversas concentraciones de Cr(VI). En el caso de PRM_A y PERM_I se observó una creciente disminución del desarrollo bacteriano a partir de 99.47 mg L⁻¹ de Cr(VI), y se apreció un pequeño halo de inhibición desde 599.74 mg L⁻¹ y 698.94 mg L⁻¹ respectivamente, observándose como un doble halo. Las especies ETICH, ETTIL_R y EAIL presentaron un crecimiento uniforme en el extenso del agar LB en todas las concentraciones de Cr(VI) empleadas. ETICH tuvo aspecto mucoso y con desarrollo de pigmento verde, mientras que ETTIL no presentó su pigmento rojo característico desarrollado en ausencia de Cr(VI). EAIL creció normalmente en el extenso de la caja Petri.

6.3.2.2 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en medio líquido

La CMI se determinó como la concentración mínima de Cr(VI) que inhibió el crecimiento microbiano, y se obtuvo mediante la realización de las cinéticas de remoción de Cr(VI) de diversas disoluciones empleadas para cada aislado en estudio. En las Figuras 26 y 27 se observan de ejemplo la CMI de los aislados PRM_A y PERM_I cuyos valores fueron de 507.14 mg L⁻¹ y 603.70 mg L⁻¹ de Cr(VI), respectivamente.

A la par de la CMI, se efectuaron cinéticas de crecimiento en presencia y ausencia de cromo y cinéticas de pH de los aislados en estudio.

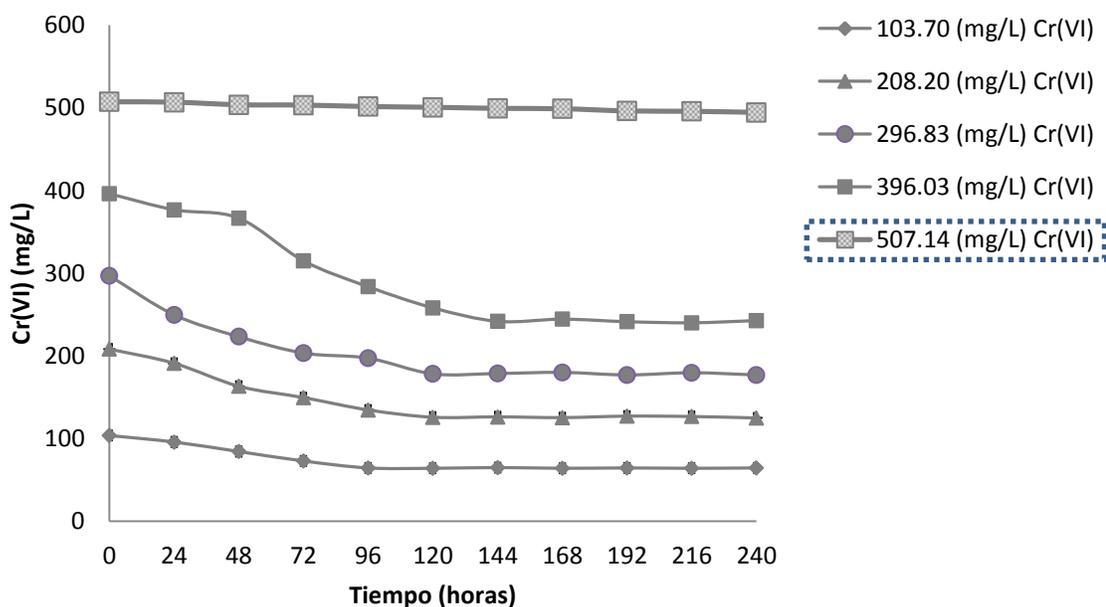


Figura 26. Cinéticas de remoción de Cr(VI) del aislado PRM_A, en un tiempo de contacto de 240 horas con diferentes soluciones de Cr(VI).

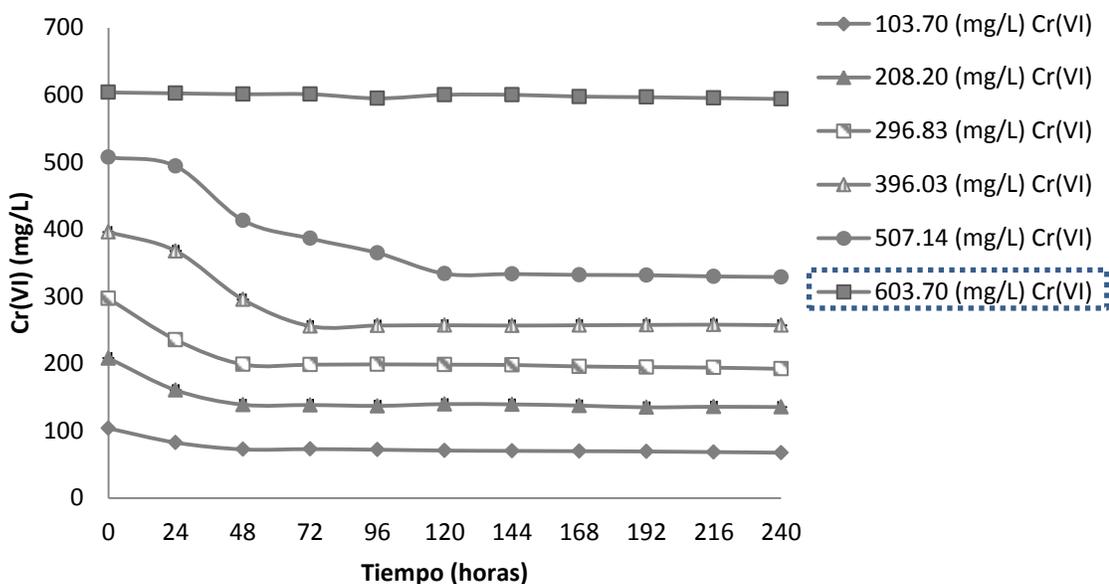


Figura 27. Cinéticas de remoción de Cr(VI) del aislado PERM_I, en un tiempo de contacto de 240 horas con diferentes soluciones de Cr(VI).

Los resultados de la CMI en medio líquido para cada aislado en estudio, se resumen en la Tabla 25.

TABLA 25

AISLADO SELECCIONADO, LUGAR DE AISLAMIENTO, ORIGEN, Y CMI DE Cr(VI).

Sitio	Aislado	Lugar	Origen	CMI (mg L ⁻¹)
Prístino	PRM _A	Marín, NLE	Río	507.14
Potencialmente Expuesto	PERM _i	Mina, NLE	Río	603.70
Expuesto	ETTIL _R	León, GUA	Tierra-Tela Industrial	603.70
	ETICH	Charcas, SLP	Tierra Industrial	603.70
	EAIL	León, GUA	Agua Industrial	909.26

6.3.2.2.1. Cinéticas de crecimiento, pH y reducción de Cr(VI) de los aislados bacterianos.

1) PRM_A

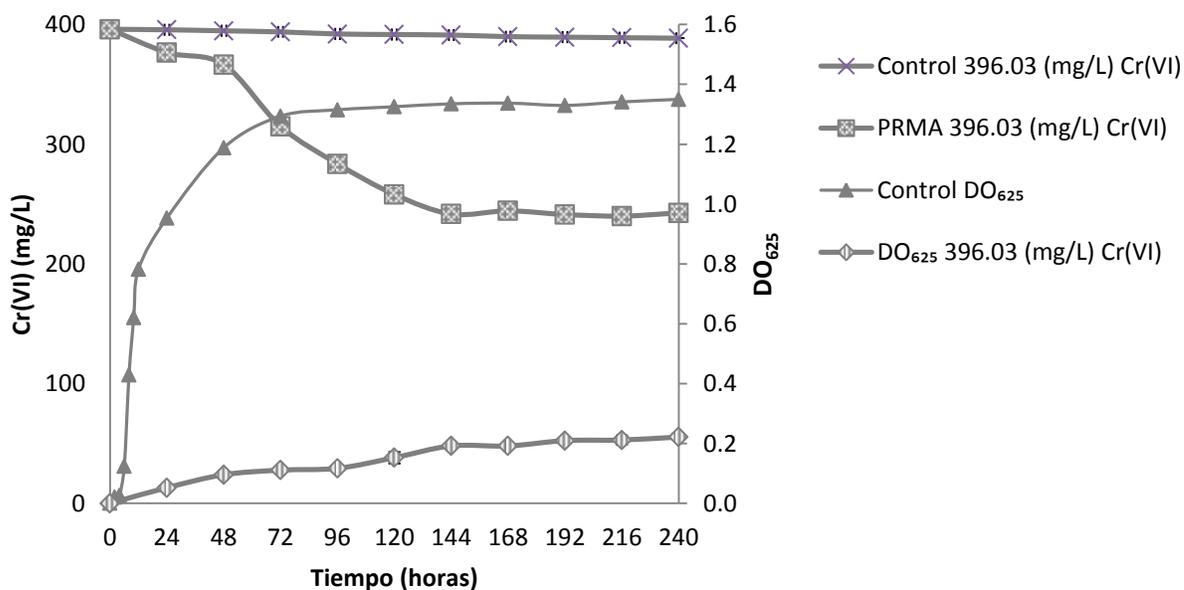


Figura 28. Cinética de reducción de Cr(VI) del aislado PRM_A frente a crecimiento bacteriano.

En la Figura 28 se aprecia la cinética de reducción de Cr(VI) tanto en condiciones abióticas como bióticas, así como también se observa su cinética de crecimiento en presencia y ausencia de la máxima solución de cromo resistida (396.03 mg L^{-1}).

Las cinéticas de pH del aislado PRM_A en presencia y ausencia de Cr(VI), así como también, la cinética de pH de la solución de Cr(VI) sin inocular se observan en la Figura 29.

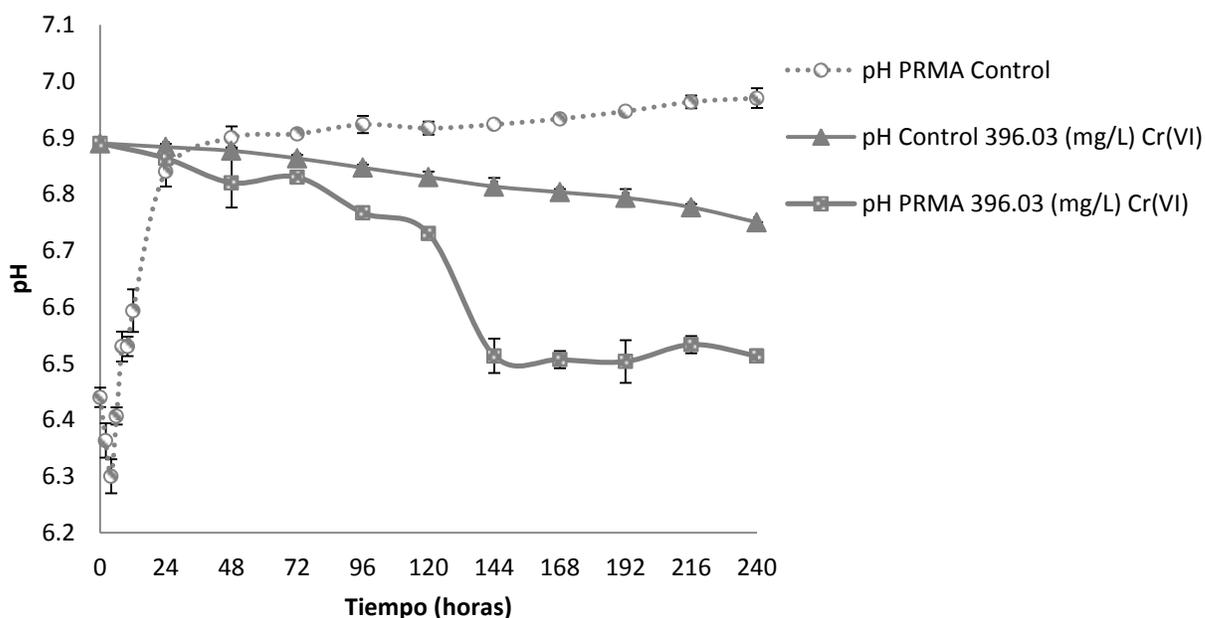


Figura 29. Cinética de pH del aislado PRM_A en un tiempo de contacto de 240 horas con y sin cromo.

El crecimiento del aislado PRM_A así como el pH, se observaron drásticamente disminuidos en la máxima concentración de Cr(VI) resistida, en comparación con sus cinéticas control, sin embargo, se obtuvo un porcentaje de reducción por encima del 37% (ver Figura 30).

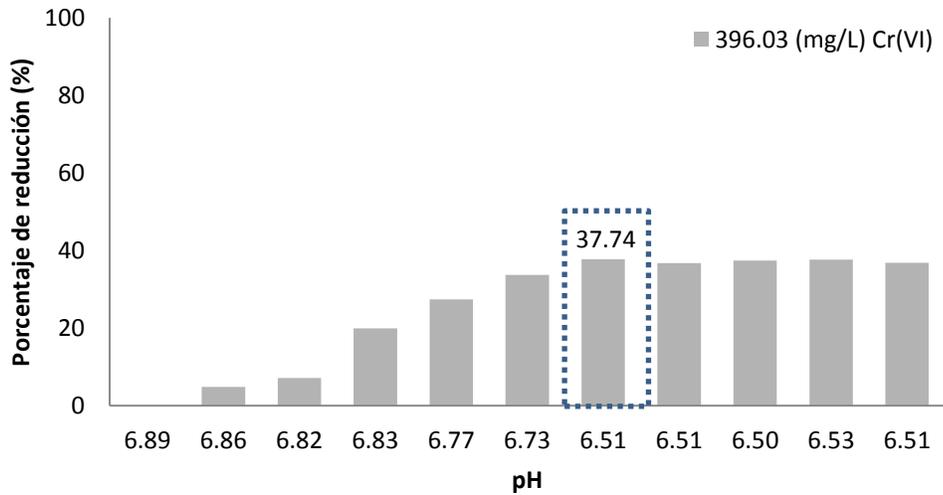


Figura 30. Porcentaje de reducción de Cr(VI) del aislado PRM_A frente a su pH.

El mayor porcentaje de reducción obtenido fue de 37.74% y se alcanzó a las 144 h a un pH de 6.51.

2) PERM_I

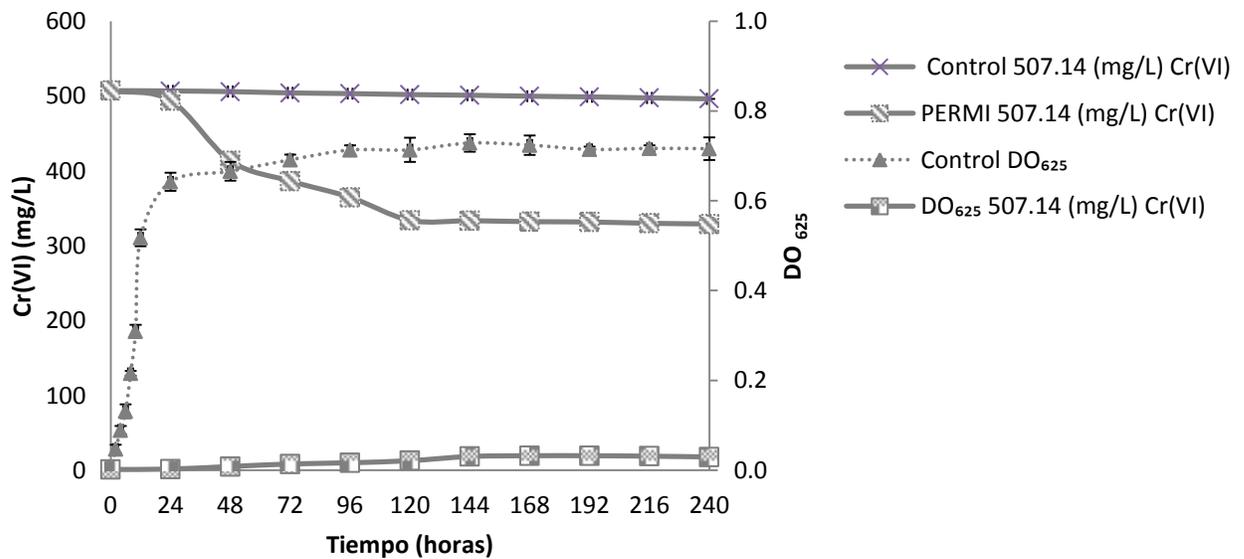


Figura 31. Cinética de reducción de Cr(VI) del aislado PERM_I frente a crecimiento bacteriano.

En la Figura 31 se observa que el crecimiento del aislado PERM_I disminuyó radicalmente en comparación con su cinética control, sin embargo, se obtuvo un porcentaje de reducción del 33% (ver Figura 33).

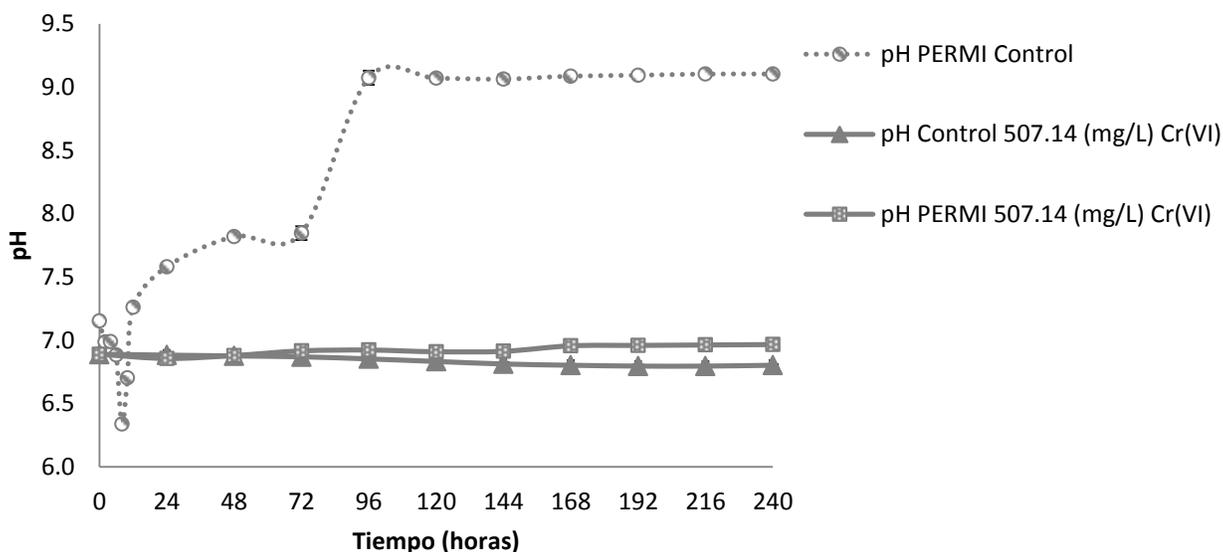


Figura 32. Cinética de pH del aislado PERM_I en un tiempo de contacto de 240 horas con y sin cromo.

En cuanto a la cinética de pH del aislado PERM_I en contacto con Cr(VI), se observó una drástica disminución y un ligero aumento de la misma, en comparación con sus controles biótico y abiótico, respectivamente.

En la Figura 33 se visualiza que el mayor porcentaje de reducción del aislado PERM_I fue de 33.12% y fue alcanzado a las 120 horas de contacto y a un pH de 6.91.

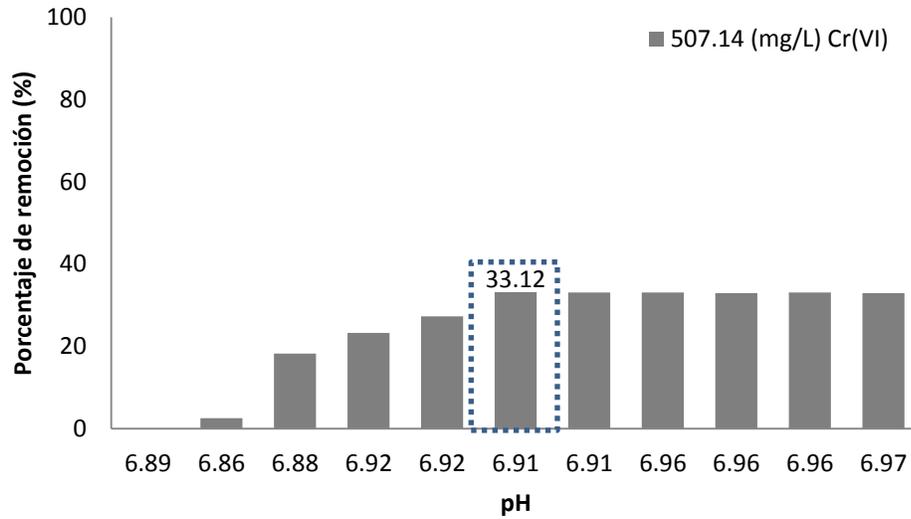


Figura 33. Porcentaje de remoción de Cr(VI) del aislado PERM₁ frente a su pH.

3) ETICH

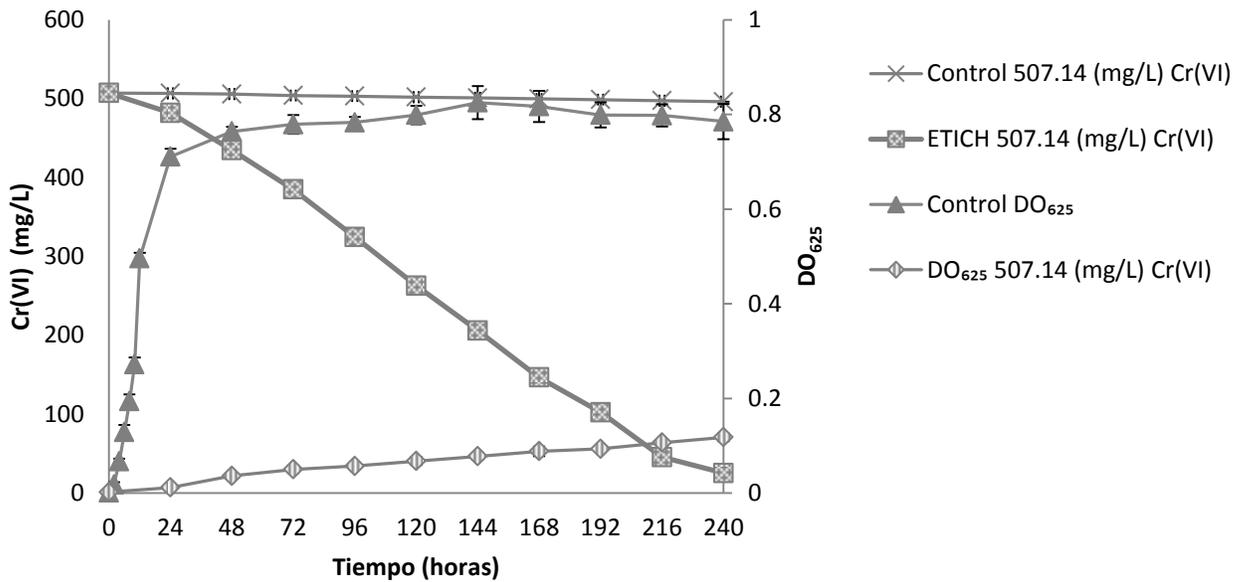


Figura 34. Cinética de reducción de Cr(VI) del aislado ETICH frente a crecimiento bacteriano.

El aislado ETICH presentó concentraciones de Cr(VI) decrecientes en el transcurso de la cinética. Sin embargo, el crecimiento bacteriano se aprecia radicalmente disminuido en comparación con su cinética control.

La cinética de pH del aislado ETICH en una solución de 507.14 mg L⁻¹ de Cr(VI) resultó con valores menores en comparación con su cinética control en condiciones bióticas; sin embargo, se observó con valores de pH más altos frente a su control abiótico hasta las 168 h (ver Figura 35).

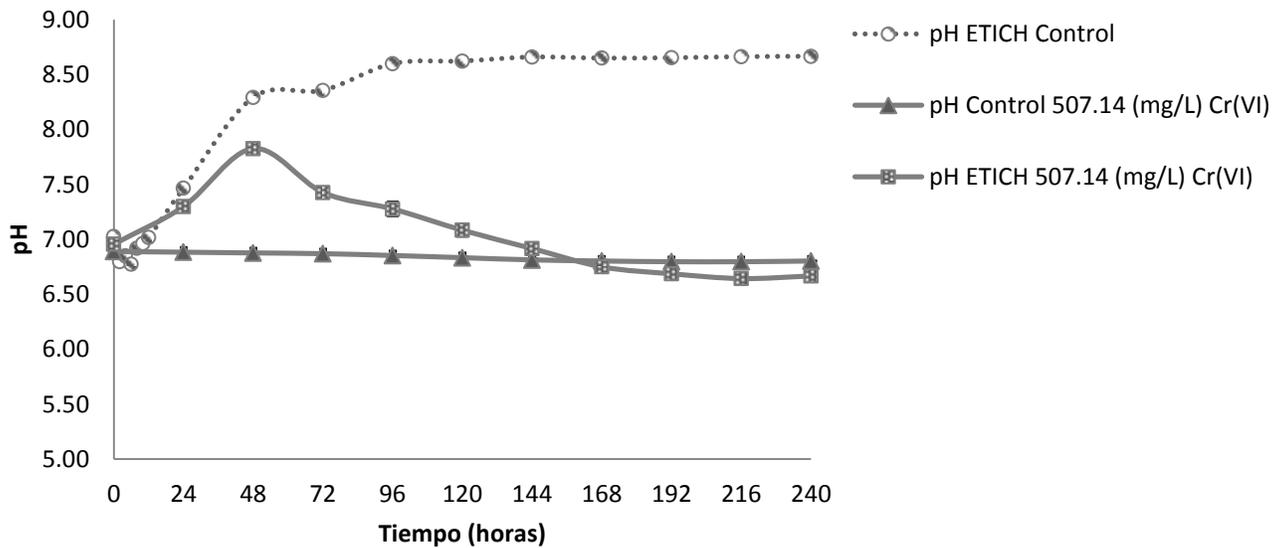


Figura 35. Cinética de pH del aislado ETICH en un tiempo de contacto de 240 horas con y sin cromo.

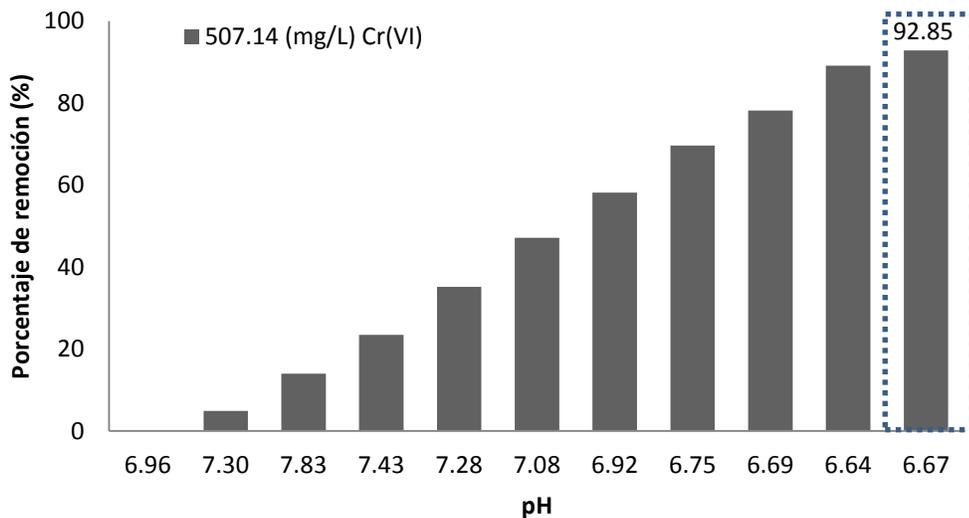


Figura 36. Porcentaje de reducción de Cr(VI) del aislado ETICH frente a su pH.

El mayor porcentaje de reducción para el aislado ETICH fue de 92.85% a las 240 h de contacto y a un pH de 6.67. Cabe señalar que los valores reportados son para la máxima concentración de Cr(VI) resistida, por lo que sería conveniente considerar en conjunto los factores: tiempo, porcentaje de reducción y concentración resistida de Cr(VI), al comparar con estudios ya reportados.

4) ETTIL

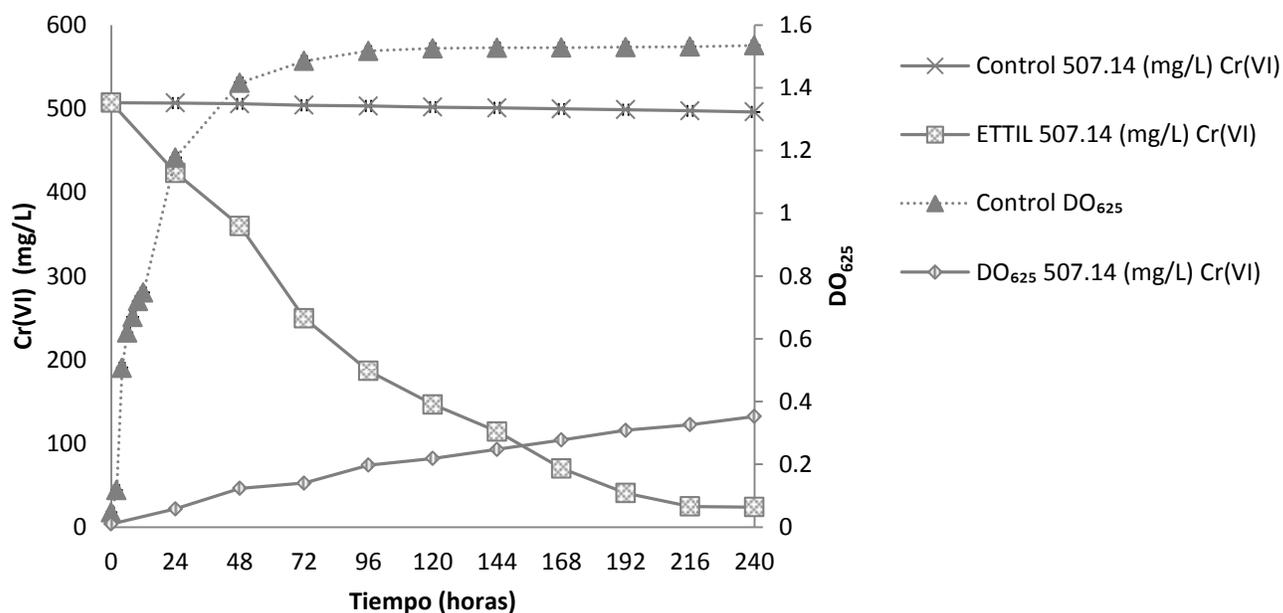


Figura 37. Cinética de reducción de Cr(VI) del aislado ETTIL frente a crecimiento bacteriano.

Durante la cinética de reducción del aislado ETTIL (ver Figura 37) se observó, al igual que en los casos anteriores, una disminución en el crecimiento bacteriano, en comparación con su cinética control. Sin embargo se alcanzó el más alto porcentaje de reducción (93.20%).

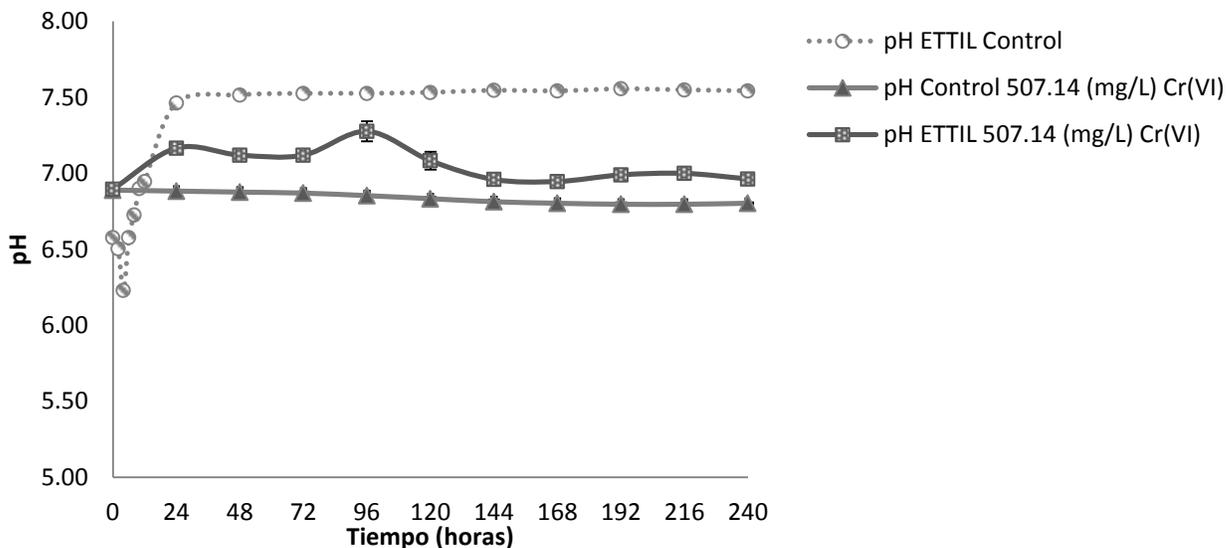


Figura 38. Cinética de pH del aislado ETTIL en un tiempo de contacto de 240 horas con y sin cromo.

En cuanto a la cinética de pH, se obtuvieron valores intermedios en comparación con sus cinéticas control.

El mayor porcentaje de reducción para el aislado ETTIL fue de 93.20% a las 216 h de contacto y a un pH de 6.96.

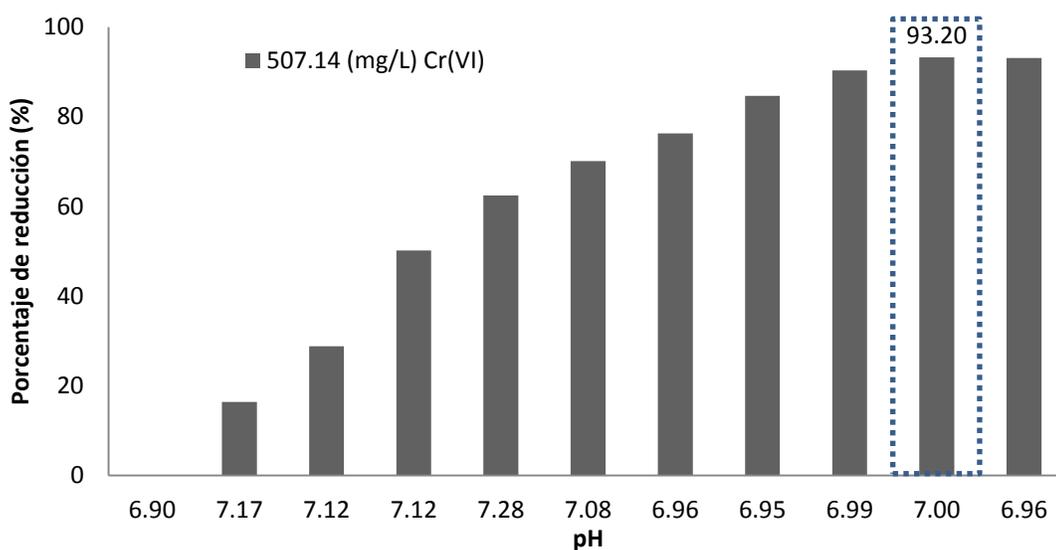


Figura 39. Porcentaje de remoción de Cr(VI) del aislado ETTIL frente a su pH.

5) EAIL

El aislado EAIL resistió la más alta concentración de Cr(VI) (804.76 mg L^{-1}) en comparación con los otros aislados en estudio. En la Figura 40 se aprecia la drástica disminución del crecimiento bacteriano frente a su control en ausencia de cromo. Así como también, se observa la constante disminución de Cr(VI) en el transcurso del ensayo hasta un tiempo de 192 h.

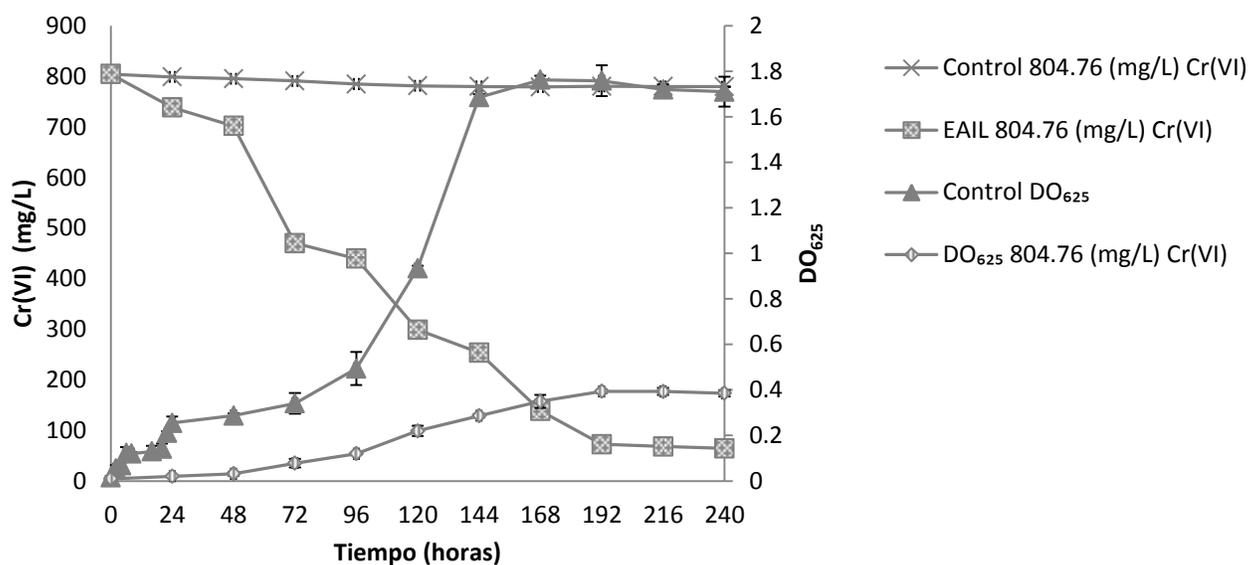


Figura 40. Cinética de reducción de Cr(VI) del aislado EAIL frente a crecimiento bacteriano.

No se observaron cambios bruscos en los valores de pH durante el transcurso del tiempo, al comparar la cinética del aislado EAIL obtenida en presencia de una solución de Cr(VI) frente a su cinética control en condiciones abióticas (ver Figura 41).

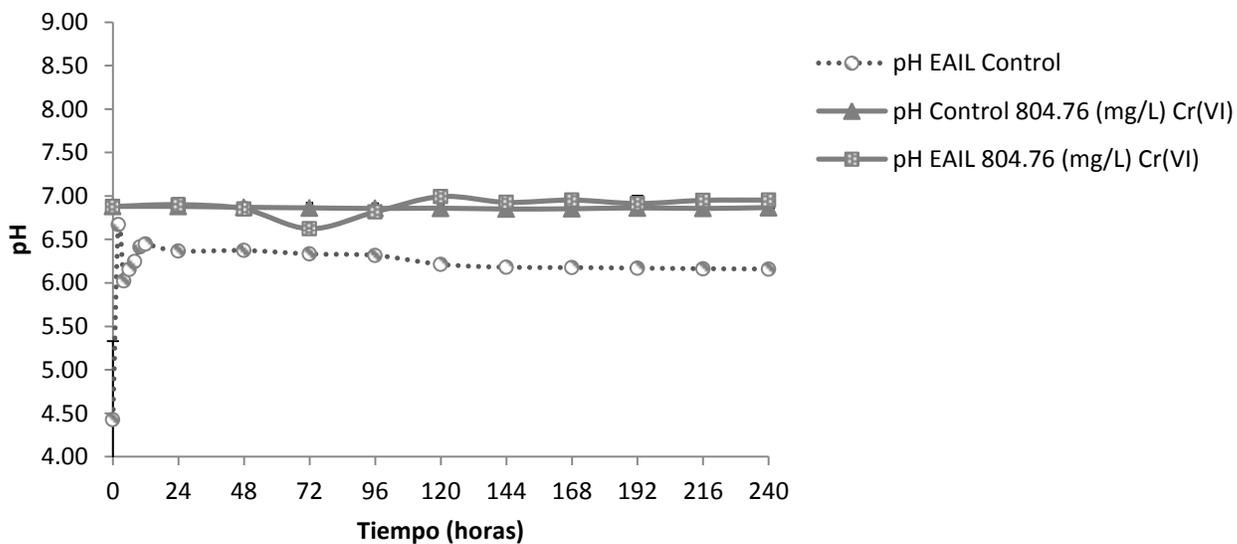


Figura 41. Cinética de pH del aislado EAIL en un tiempo de contacto de 240 horas con y sin cromo.

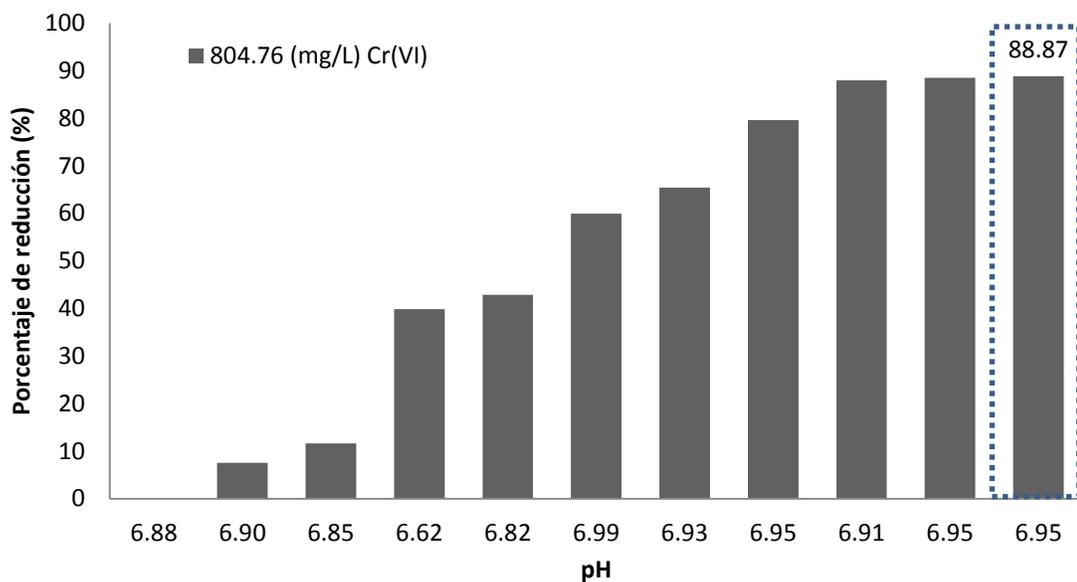


Figura 42. Porcentaje de reducción de Cr(VI) del aislado EAIL frente a su pH.

En la Figura 42 se observa que el mayor porcentaje de reducción de Cr(VI) obtenido por el aislado EAIL fue de 88.87% a las 240 h de contacto y a un pH de 6.95.

En la Tabla 26 se muestran las concentraciones de Cr(VI) presentes al inicio y al final del ensayo para cada aislado en estudio, así como el porcentaje de Cr(VI) reducido y que ha sido corregido con el blanco utilizado. Se resumen las concentraciones más altas a las cuales los aislados presentaron crecimiento.

Se puede observar que los porcentajes de reducción de Cr(VI) más altos, se alcanzan por los aislados ETTIL, ETICH Y EAIL, cuyas características generales son: bacilos Gram negativos y positivos, de origen industrial, productoras de pigmentos, así como de exopolisacáridos. Destacando su procedencia de sitios expuestos a metales pesados.

TABLA 26

PORCENTAJES DE REDUCCIÓN DE Cr(VI) PARA CADA AISLADO EN ESTUDIO.

Sitio	Aislado	Concentración Cr(VI) Inicial (mg L ⁻¹)	Concentración Cr(VI) Final (mg L ⁻¹)	% Cr(VI) Reducido
Prístino	PRM _A	396.0	241.7	37.74 ± 0.002
	Control	396.0	388.54	1.89 ± 0.001
Potencialmente Expuesto	PERM _I	507.1	329.0	33.12 ± 0.006
Expuesto	ETICH	507.1	25.2	92.85 ± 0.005
	ETTIL	507.1	23.9	93.20 ± 0.007
	Control	507.1	496.12	2.17 ± 0.002
	EAIL	804.8	64.5	88.7 ± 0.002
	Control	804.8	779.63	3.12 ± 0.008

En el caso de las especies PRM_A y PERM_I se alcanzan menores porcentajes de reducción a diferentes concentraciones iniciales de Cr(VI), lo que concuerda con las características propias de cada especie, ya que provienen de sitios que no han tenido contacto con Cr(VI) y de sitios potencialmente expuestos a dicho metal, respectivamente. Aunque PERM_I presentó reducción de una concentración de Cr(VI) inicial de 507.1 mg L⁻¹, semejante a la obtenida de los aislados ETICH y

ETTIL provenientes de sitios expuestos, su porcentaje de reducción fue menor en comparación con los mismos. La reducción total pudiera lograrse aumentando el tiempo de ensayo.

En la Tabla 27 se resumen porcentajes de reducción de Cr(VI) obtenidos por diversos géneros bacterianos en condiciones experimentales similares a las empleadas durante esta investigación. Los parámetros a considerar fueron: la concentración de Cr(VI) inicial, la temperatura, el pH, la agitación, el tiempo de contacto y el porcentaje de Cr(VI) reducido.

Los aislados obtenidos en esta investigación presentan potencial para la reducción de Cr(VI) de sitios contaminados, ya que fueron capaces de resistir altas concentraciones de cromo y presentaron porcentajes de reducción muy prometedores.

TABLA 27

PORCENTAJES DE REDUCCIÓN DE Cr(VI) PARA DIVERSOS MICROORGANISMOS

Microorganismo	Concentración Cr(VI) Inicial (mg L ⁻¹)	Temperatura (°C)	pH	Agitación (rpm)	Tiempo (h)	% Cr(VI) Reducido	Referencia
<i>B. subtilis</i> y <i>P. aeruginosa</i>	50	30	7.0	140	48	60	Bakiyaraj <i>et al.</i> 2014
<i>Vigribacillus</i> sp.	100	37	7.0	110	70	90.2	Mishra <i>et al.</i> 2012
<i>Bacillus</i> sp.	100	35	7.0	100	144	90	Dhal <i>et al.</i> 2010
<i>B. amyloliquefaciens</i> CSB 9	200	35	7.0	100	144	56.45±0.2	Das <i>et al.</i> 2014
PRM _A	396.0	37	6.51	150	144	37.74 ± 0.002	Esta investigación
<i>B. amyloliquefaciens</i> CSB 9	500	35	7.0	100	144	30.78±2.1	Das <i>et al.</i> 2014
PERM _I	507.1	37	6.91	150	144	33.04 ± 0.005	Esta investigación
ETICH	507.1	37	6.67	150	144	58.16 ± 0.006	Esta investigación
ETTIL	507.1	37	6.96	150	144	76.25 ± 0.006	Esta investigación
EAIL	804.8	37	6.95	150	144	65.42 ± 0.003	Esta investigación
<i>Proteus</i> sp. H24.	1000	35	7.0	160	144	100	Ge <i>et al.</i> 2013

6.3.3 Caracterización de bacterias con resistencia a Cr(VI)

Los 5 aislados seleccionados, al ser algunos de ellos consorcios y otros al presentar diferencias fenotípicas durante su crecimiento, se aislaron hasta obtener colonias puras de cada fenotipo característico observado, para después realizar la caracterización bioquímica y molecular de cada cepa obtenida.

En la Figura 43 se muestran los productos de PCR para la identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S de cada cepa en estudio.

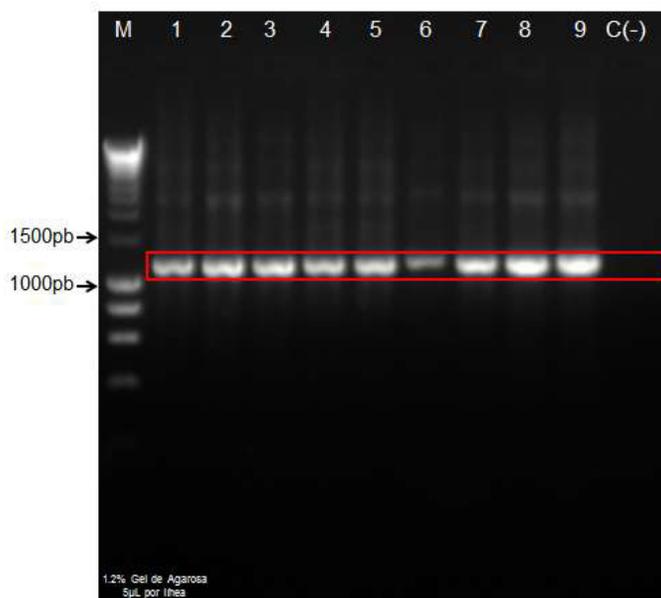


Figura 43. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de productos de PCR para la identificación bacteriana.

En la Tabla 28 se resumen los aislados obtenidos con su identificación taxonómica definitiva.

TABLA 28

IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS

Aislado	Clave	Pruebas Bioquímicas	ADNr 16S	Identificación Definitiva
1	PERM _I	<i>E. avium</i>	<i>Enterococcus avium</i> ATCC 14025 (100%)	<i>E. avium</i>
2	PRM _A	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (99%) <i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (99%)	<i>E. coli</i>
3	ETICH	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145 (100%)	<i>P. aeruginosa</i>
4	EAIL A	<i>E. avium</i>	<i>Enterococcus avium</i> ATCC 14025 (100%)	<i>E. avium</i>
5	EAIL B	<i>E. avium</i>	<i>Enterococcus avium</i> ATCC 14025 (100%)	<i>E. avium</i>
6	ETTIL B	<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i> WW4 (100%) <i>Serratia marcescens</i> subsp. Sakuensis (100%)	<i>S. marcescens</i>
7	ETTIL C	<i>E. avium</i>	<i>Enterococcus avium</i> ATCC 14025 (100%)	<i>E. avium</i>
8	ETTIL Blanca	<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i> WW4 (100%) <i>Serratia marcescens</i> subsp. Sakuensis (100%)	<i>S. marcescens</i>
9	ETTIL Transparente	<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i> WW4 (100%) <i>Serratia marcescens</i> subsp. Sakuensis (100%)	<i>S. marcescens</i>

6.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de Antibióticos

6.4.1 Actividad de los antibióticos frente a microorganismos Gram positivos

La respuesta de los microorganismos Gram positivos frente a los antibióticos ensayados se observa en la Tabla 29. El 25% de las cepas (EAIL B) fueron resistentes a la teicoplanina. No se encontró ningún tipo de resistencia para el resto de los antibióticos.

TABLA 29

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS ANTIBIÓTICOS FRENTE A MICROORGANISMOS GRAM POSITIVOS Y ESTIMACIÓN DEL ÍNDICE DE RESISTENCIA A MÚLTIPLES ANTIBIÓTICOS.

Aislado	Antibióticos												ÍNDICE MAR
	AUG	AMP	ERI	LEVO	LZD	NIT	NOR	PEN	SYN	TEI	TET	VAN	
<i>E. avium</i> (PERMI)	S	S	S	S	I	I	I	S	I	S	S	S	0.00
<i>E. avium</i> (EAIL A)	S	S	S	S	I	I	I	S	I	S	S	S	0.00
<i>E. avium</i> (EAIL B)	S	S	I	S	I	I	I	S	I	R	S	I	0.07
<i>E. avium</i> (ETTIL C)	S	S	I	S	I	I	I	S	I	S	I	S	0.00
TOTAL													
S	4 100%	4 100%	2 50%	4 100%	0	0	0	4 100%	0	3 75%	3 75%	3 75%	
I	0	0	2 50%	0	4 100%	4 100%	4 100%	0	4 100%	0	1 25%	1 25%	
R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 25%	0	0	

AUG- Amoxicilina/Ac. Clavulánico, AMP- Ampicilina, ERI- Eritromicina, LEVO- Levofloxacino, LZD-Linezolid, NIT- Nitrofurantoína, NOR- Norfloxacino, PEN- Penicilina, SYN- Quinupristin/Dalfopristin, TEI- Teicoplanina TET- Tetraciclina, VAN- Vancomicina

S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente; Índice MAR: Índice de Resistencia Múltiple a Antibióticos= a/b (a: número de antibióticos para los que la cepa fue resistente, b: número de antibióticos para los cuales dicha cepa fue evaluada).

6.4.2 Actividad de los antibióticos frente a microorganismos Gram negativos

El comportamiento de las bacterias Gram negativas (ver Tablas 30 y 31) mostró porcentajes de resistencia entre el 20 y 60% para ampicilina, ticarcilina/ac. clavulánico, cloranfenicol, tetraciclina y cefuroxima.

TABLA 30

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS ANTIBIÓTICOS FRENTE A MICROORGANISMOS GRAM NEGATIVOS Y ESTIMACIÓN DEL ÍNDICE DE RESISTENCIA A MÚLTIPLES ANTIBIÓTICOS

Aislado	Antibióticos											ÍNDICE MAR
	AMIK	AMP	AZA	FAL	FEP	FTA	FUR	CIP	CHLO _R	GEN	IPM	
<i>E. coli</i> (PRMA)	S	S	I	I	S	I	I	S	S	S	S	0.00
<i>P. aeruginosa</i> (ETICH)	S	NA	S	NA	S	S	NA	S	R	S	I	0.09
<i>S. marcescens</i> (ETTIL B)	S	R	I	I	S	I	R	S	I	S	S	0.14
<i>S. marcescens</i> (ETTIL BLANCA)	S	R	I	I	S	I	R	S	I	S	S	0.14
<i>S. marcescens</i> (ETTIL TRANSPARENTE)	S	R	I	I	S	I	R	S	R	S	S	0.18
TOTAL												
<i>S</i>	5 100%	1 20%	1 20%	0	5 100%	1 20%	0	5 100%	1 20%	5 100%	4 80%	
<i>I</i>	0	0	4 80%	4 80%	0	4 80%	1 20%	0	2 40%	0	1 20%	
<i>R</i>	0	3 60%	0	0	0	0	3 60%	0	2 40%	0	0	

AMIK- Amikacina, AMP- Ampicilina, AZA- Aztreonam, FAL- Cefalotina, FEP-Cefepime, FTA- Ceftazidima, FUR- Cefuroxima, CIP- Ciprofloxacino, CHLOR- Cloranfenicol, GEN- Gentamicina, IMP- Imipenem, LEVO- Levofloxacino, MER-Meropenem, NIT- Nitrofurantoína, NOR- Norfloxacino, OFL- Ofloxacino, PIP- Piperacilina, P/T-Piperacilina/Tazobactam, TET- Tetraciclina, T/AC- Ticarcilina/Ac. Clavulánico, TBM- Tobramicina, SXT- Trimetopim/Sulfametoxazol

S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente, NA: Antibiótico que no aplica para la bacteria, de acuerdo al Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), documento M100; Índice MAR: Índice de Resistencia Múltiple a Antibióticos= a/b (a: número de antibióticos para los que la cepa fue resistente, b: número de antibióticos para los cuales dicha cepa fue evaluada).

TABLA 31

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS ANTIBIÓTICOS FRENTE A MICROORGANISMOS GRAM NEGATIVOS Y ESTIMACIÓN DEL ÍNDICE DE RESISTENCIA A MÚLTIPLES ANTIBIÓTICOS

Aislado	Antibióticos											ÍNDICE MAR
	LEVO	MER	NIT	NOR	OFL	PIP	P/T	TET	T/AC	TBM	SXT	
<i>E. coli</i> (PRMA)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0.00
<i>P. aeruginosa</i> (ETICH)	S	NA	NA	S	I	S	NA	NA	R	S	NA	0.09
<i>S. marcescens</i> (ETTIL B)	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	0.14
<i>S. marcescens</i> (ETTIL BLANCA)	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	0.14
<i>S. marcescens</i> (ETTIL TRANSPARENTE)	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	0.18
TOTAL												
<i>S</i>	5 100%	4 80%	1 20%	5 100%	4 80%	5 100%	4 80%	1 20%	4 80%	5 100%	4 80%	
<i>I</i>	0	0	3 60%	0	1 20%	0	0	0	0	0	0	
<i>R</i>	0	0	0	0	0	0	0	3 60%	1 20%	0	0	

AMIK- Amikacina, AMP- Ampicilina, AZA- Aztreonam, FAL- Cefalotina, FEP-Cefepime, FTA- Ceftazidima, FUR- Cefuroxima, CIP- Ciprofloxacino, CHLOR- Cloranfenicol, GEN- Gentamicina, IMP- Imipenem, LEVO- Levofloxacino, MER-Meropenem, NIT- Nitrofurantoína, NOR- Norfloxacino, OFL- Ofloxacino, PIP- Piperacilina, P/T-Piperacilina/Tazobactam, TET- Tetraciclina, T/AC- Ticarcilina/Ac. Clavulánico, TBM- Tobramicina, SXT- Trimetopim/Sulfametoxazol

S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente, NA: Antibiótico que no aplica para la bacteria, de acuerdo al Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), documento M100; Índice MAR: Índice de Resistencia Múltiple a Antibióticos= a/b (a: número de antibióticos para los que la cepa fue resistente, b: número de antibióticos para los cuales dicha cepa fue evaluada).

Se estableció el índice de resistencia múltiple a antibióticos (MAR), en el cual se demostró que las 9 bacterias aisladas y caracterizadas, no presentaron coeficientes mayores a 0.2, por lo tanto, se descarta resistencia múltiple.

El tema de resistencia a antibióticos es de suma importancia a nivel ambiental, ya que lo ideal es que las bacterias utilizadas no deben ser resistentes a antibióticos para que no se conviertan en vehículos de transferencia de genes de resistencia.

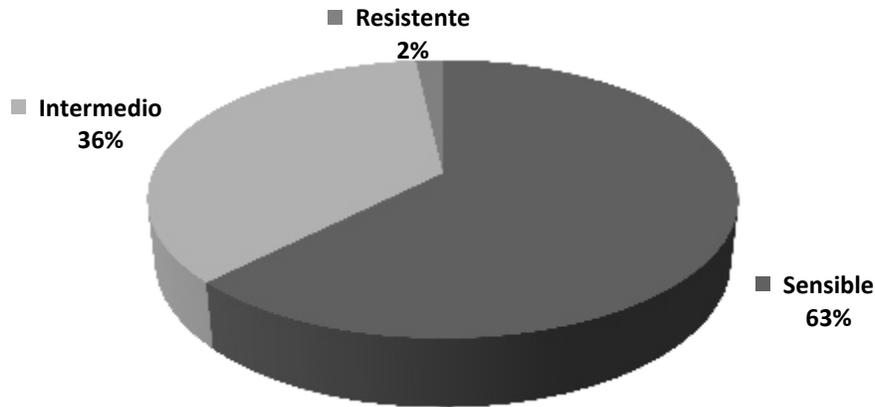


Figura 44. Porcentajes de actividad de los antibióticos frente a microorganismos Gram positivos.

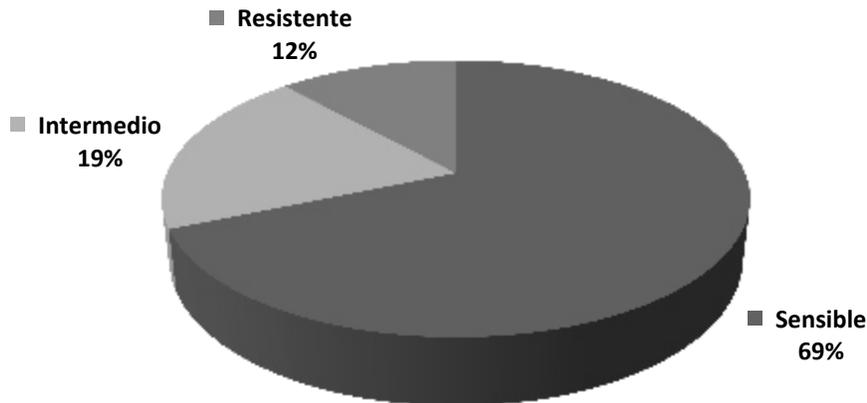


Figura 45. Porcentajes de actividad de los antibióticos frente a microorganismos Gram negativos.

Los resultados obtenidos proporcionan información útil, al descartar una posible limitación del empleo de los aislados en procesos de biorremediación, por presentar porcentajes de sensibilidad por encima del 60% (ver Figuras 44 y 45) e índices MAR por debajo de 0.2. Lo anterior ha sido reportado por Rahman y Singh (2014), al indicar que *Enterobacter* sp. DU17 se considera una opción viable para la eliminación de la toxicidad de Cr(VI) del medio ambiente por presentar una eficiente capacidad reductora de Cr(VI) y un índice MAR de 0.08.

6.5 Determinación del posible mecanismo de resistencia a Cr(VI)

El experimento para determinar el mecanismo de resistencia a Cr(VI) se realizó con la cepa ETTIL a una concentración inicial de 50 mg L⁻¹ de Cr(VI).

El sobrenadante producido a las 72 h se empleó para observar la posible reducción extracelular (ver Figura 46).

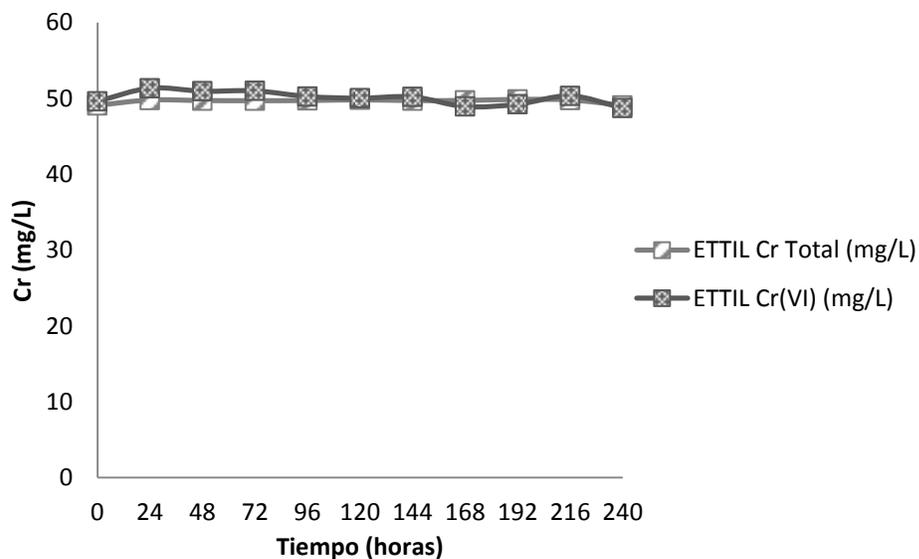


Figura 46. Cinética de reducción extracelular de Cr(VI) del aislado ETTIL a pH 7 y 37 °C

El cromo se mantuvo constante en el transcurso de los 10 días, por lo que se descarta una reducción extracelular.

Para evaluar una reducción Intracelular las cinéticas se realizaron empleando la biomasa del aislado en contacto con una solución de 50 mg L⁻¹ de Cr(VI ; ver Figura 47). El sobrenadante proveniente del anterior ensayo se utilizó para evaluar una posible reducción Ectocelular (ver Figura 48).

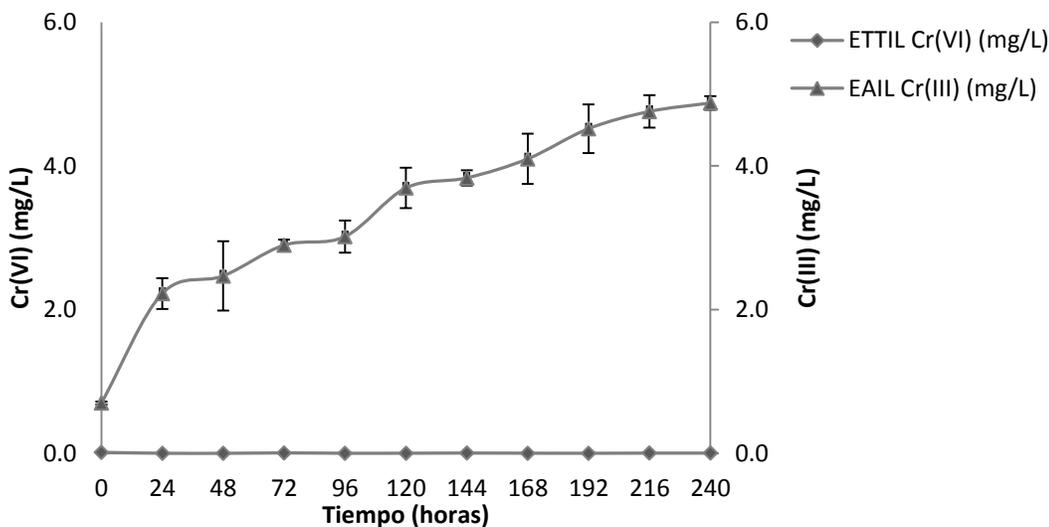


Figura 47. Cinética de reducción intracelular de Cr(VI) del aislado ETTIL a pH 7 y 37 °C

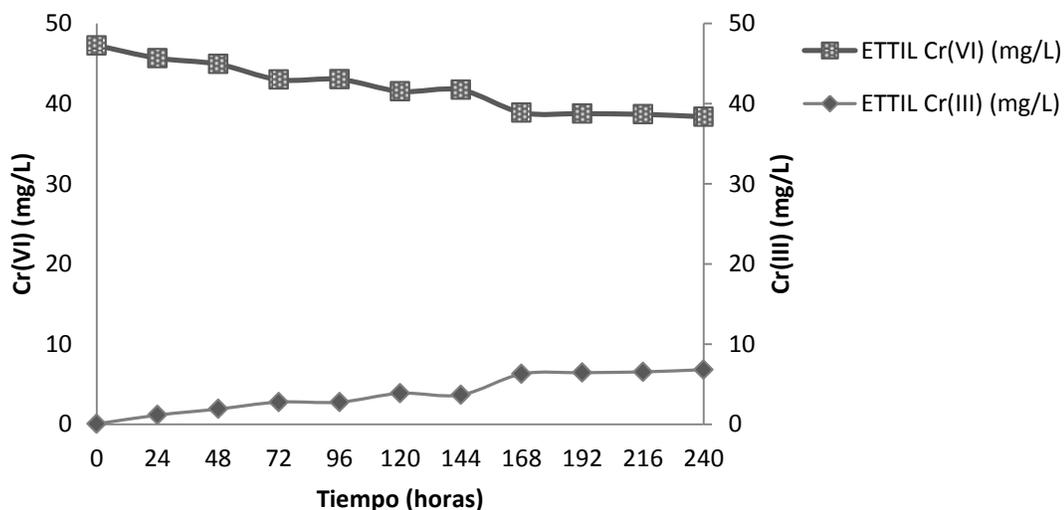


Figura 48. Cinética de reducción ectocelular de Cr(VI) del aislado ETTIL a pH 7 y 37 °C

El cromo total disminuyó en el sobrenadante, por lo que se sospecha de una bioacumulación. Lo anterior ya ha sido reportado en *Streptomyces* sp. MC1, quien logró bioacumular hasta 3.54 mg de Cr(III) por gramo de biomasa, reduciendo el 98% de Cr(VI) y removiendo 13.9% de cromo del cultivo (Polti *et al.* 2011). El cromo que entra a la célula puede ser reducido por enzimas u otros agentes

reductores, mientras que si el microorganismo presenta sistemas de transporte puede estar expulsándolo nuevamente al sobrenadante, lo que genera un aumento en la concentración de cromo total y por ende en el Cr(III) al ser reducido el Cr(VI).

A las 24 horas comienza la aparición de Cr(III), es importante recalcar que el microorganismo entra en fase estacionaria, por lo que se pueden formar metabolitos secundarios que fomentarían la reducción de cromo. Tal es el caso de: ácidos orgánicos (Mangaiyarkarasi *et al.* 2011), aminoácidos (Sandana *et al.* 2015) y exopolisacáridos (Harish *et al.*, 2012), etc.

6.6 Evaluación de la capacidad reductora de las biomasas a pH 1

Para conocer el potencial de la biomasa como agente reductor de Cr(VI) se llevó a cabo la determinación de la capacidad reductora. Para ello se utilizó una dosis de biomasa pequeña y una concentración del metal muy alta, esto con el fin de saturar la superficie de la biomasa y así determinar la capacidad máxima reductora.

En la Figura 49, se muestra el aumento de la capacidad reductora con respecto al tiempo para cada aislado en estudio. Se observó que la biomasa de ETTIL proporcionó mejores resultados, ya que su capacidad reductora fue de 487.66 mg g⁻¹ en un tiempo de 240 h.

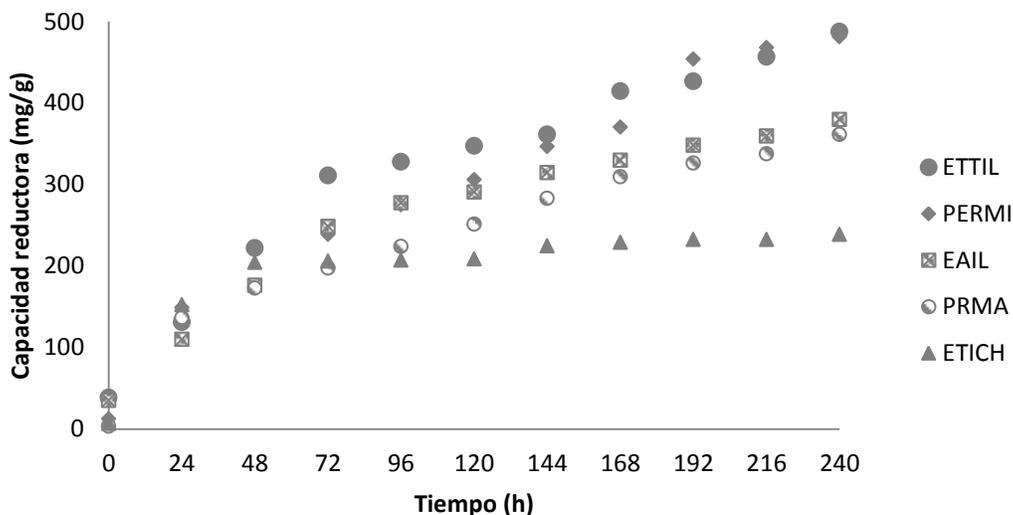


Figura 49. Variación de la capacidad reductora de las biomosas bacterianas con respecto al tiempo.

En la Tabla 32 se muestra una comparativa de las capacidades reductoras obtenidas en esta investigación, con respecto a diferentes biomosas reportadas previamente bajo diversas condiciones.

TABLA 32

CAPACIDAD REDUCTORA DE DIVERSAS BIOMASAS

Biomasa	pH	Dosis biomasa (g L ⁻¹)	[Cr(VI)] _o (mg L ⁻¹)	tiempo (h)	Capacidad reductora (mg g ⁻¹)	Referencia
PRMA	1	0.5	508.47	240	361.56	Esta investigación
PERMI	1	0.5	508.47	240	481.49	Esta investigación
ETICH	1	0.5	508.47	240	238.99	Esta investigación
ETTIL	1	0.5	508.47	240	487.66	Esta investigación
EAIL	1	0.5	508.47	240	380.08	Esta investigación
<i>Aspergillus niger</i>	1	4.0	400	48	117.33	Khambhaty <i>et al.</i> 2009
<i>Pinus aristata</i>	1.5	0.7525	500	480	371.1	Park <i>et al.</i> 2008
<i>Ectodemis de Opuntia</i>	2	100	100	0.5	4.30	Campos-Medina 2008
<i>Ecklonia sp.</i>	2	0.0515	100	720	227.22	Park <i>et al.</i> 2005

En general, las biomásas bacterianas pueden ser muy eficientes como biosorbentes de metales, ya que la mayoría presentó capacidades reductoras muy por encima de las reportadas por diversos grupos de investigación, por lo que son candidatas viables a ser utilizadas en la eliminación del Cr(VI) de soluciones acuosas.

6.7 Espectros de Infrarrojos con Transformada de Fourier (FTIR) de biomásas bacterianas

Se analizaron 10 espectros provenientes de los aislados seleccionados.

El criterio de evaluación se basó en los grupos funcionales asignados para cada ventana espectral. Lo anterior se resume en la Tabla 33.

TABLA 33

PRINCIPALES GRUPOS FUNCIONALES PARA LAS VENTANAS ESPECTRALES FRECUENTEMENTE EMPLEADAS EN EL ANÁLISIS DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS

Ventana Espectral	Rango espectral (cm ⁻¹)	Grupos Funcionales
V1	3,000-2,800	Estiramientos simétricos y asimétricos de los enlaces C-H de las cadenas de ácidos grasos y grupos metilos Estiramiento del enlace O-H de grupos hidroxilos Estiramiento del enlace N-H de proteínas.
V2	1,800-1,500	Estiramiento del doble enlace C=O de ésteres y grupos carboxílicos Estructura secundaria de proteínas (amida I y amida II).
V3	1,500-1,200	Contribución de proteínas (amida III) Estiramiento asimétrico del enlace P-O de grupos fosfatos Deformación del enlace C-H.
V4	1,200-900	Deformación de estructura de carbohidratos Estiramiento del enlace C-C y de grupos fosfato.
V5	900-700	Región de Huella dactilar

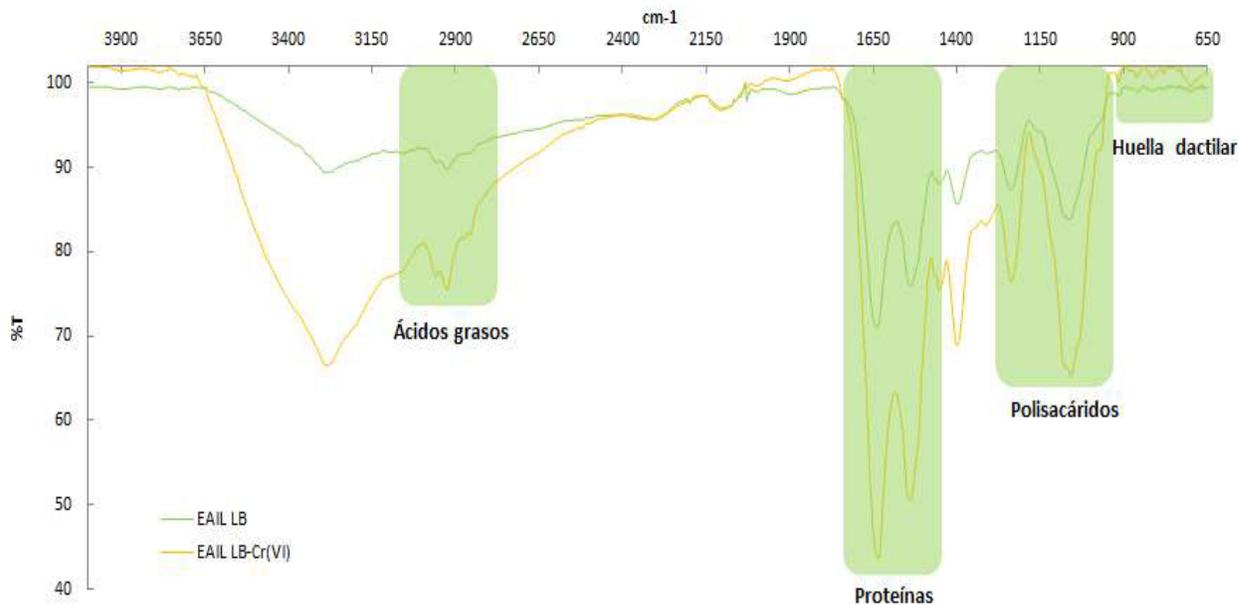


Figura 50. Comparación entre los espectros FTIR del aislado EAIL sin tratamiento (línea verde) y con tratamiento (línea amarilla) con Cr(VI).

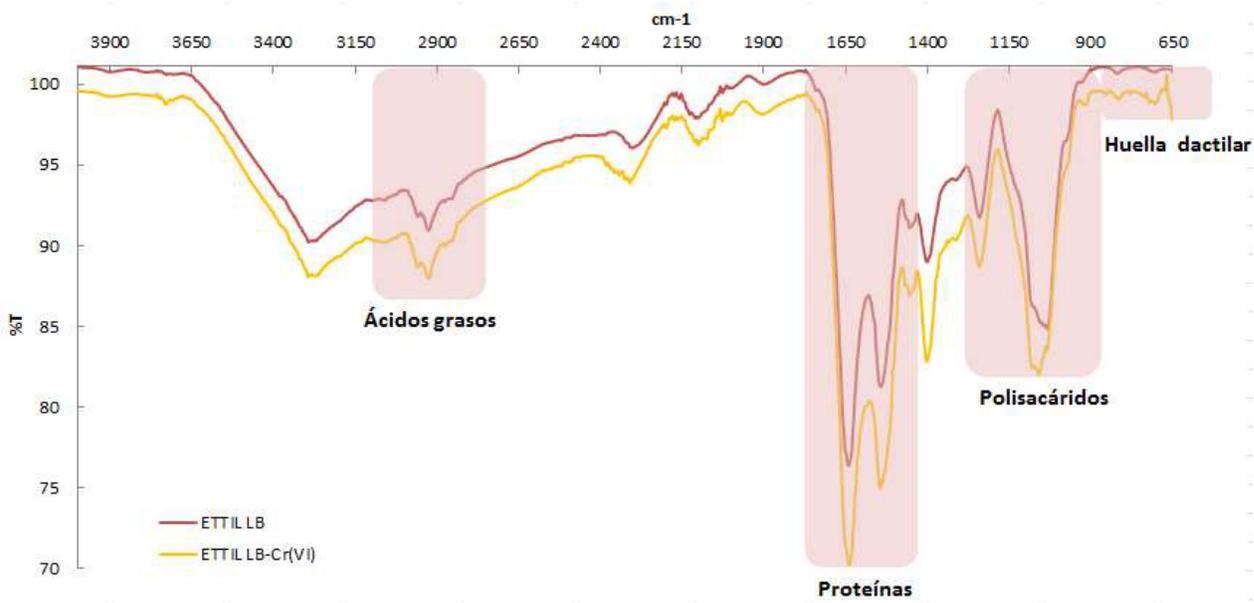


Figura 51. Comparación entre los espectros FTIR del aislado ETTIL sin tratamiento (línea roja) y con tratamiento (línea amarilla) con Cr(VI).

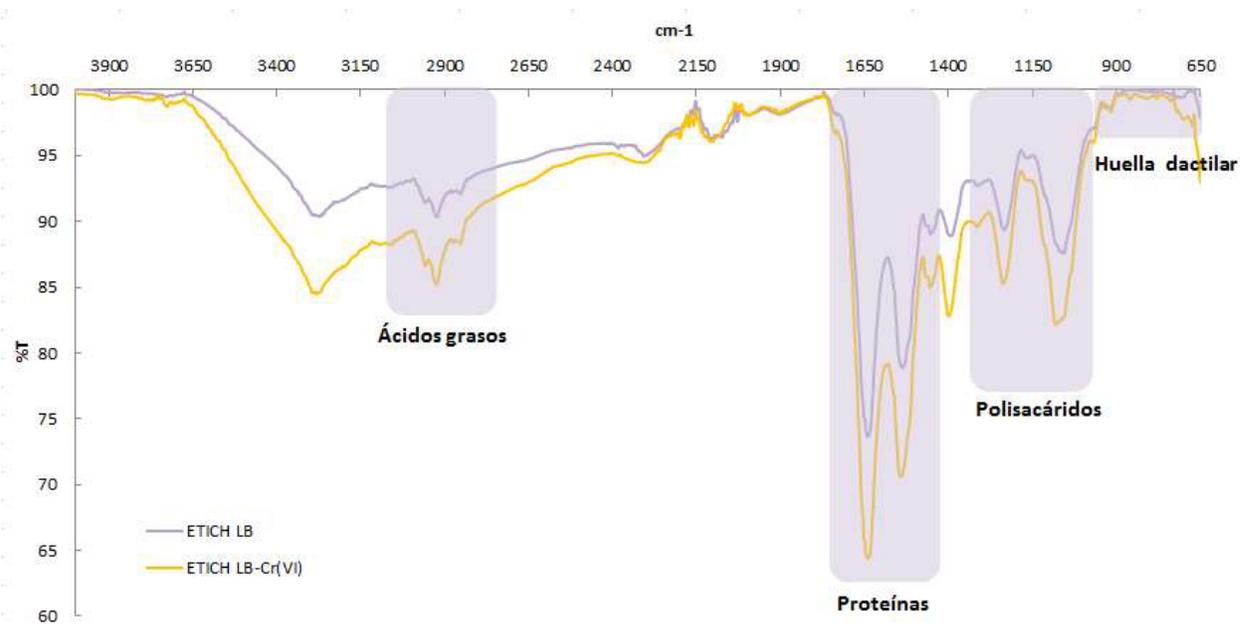


Figura 52. Comparación entre los espectros FTIR del aislado ETICH sin tratamiento (línea lila) y con tratamiento (línea amarilla) con Cr(VI).

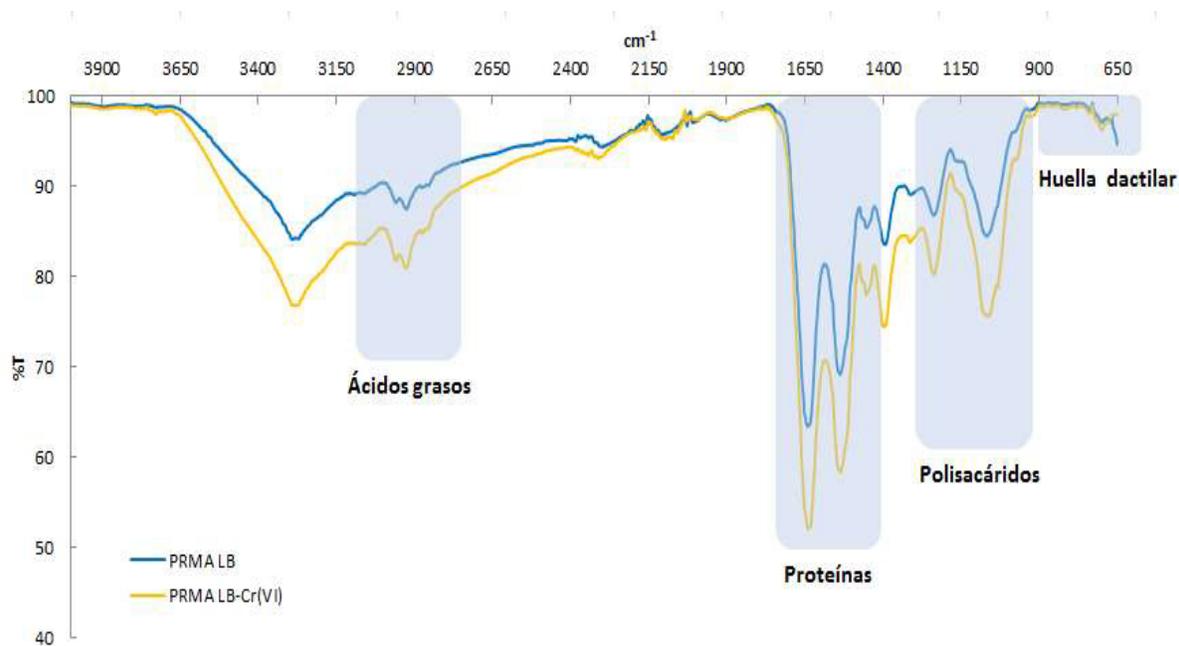


Figura 53. Comparación entre los espectros FTIR del aislado PRMA sin tratamiento (línea azul) y con tratamiento (línea amarilla) con Cr(VI).

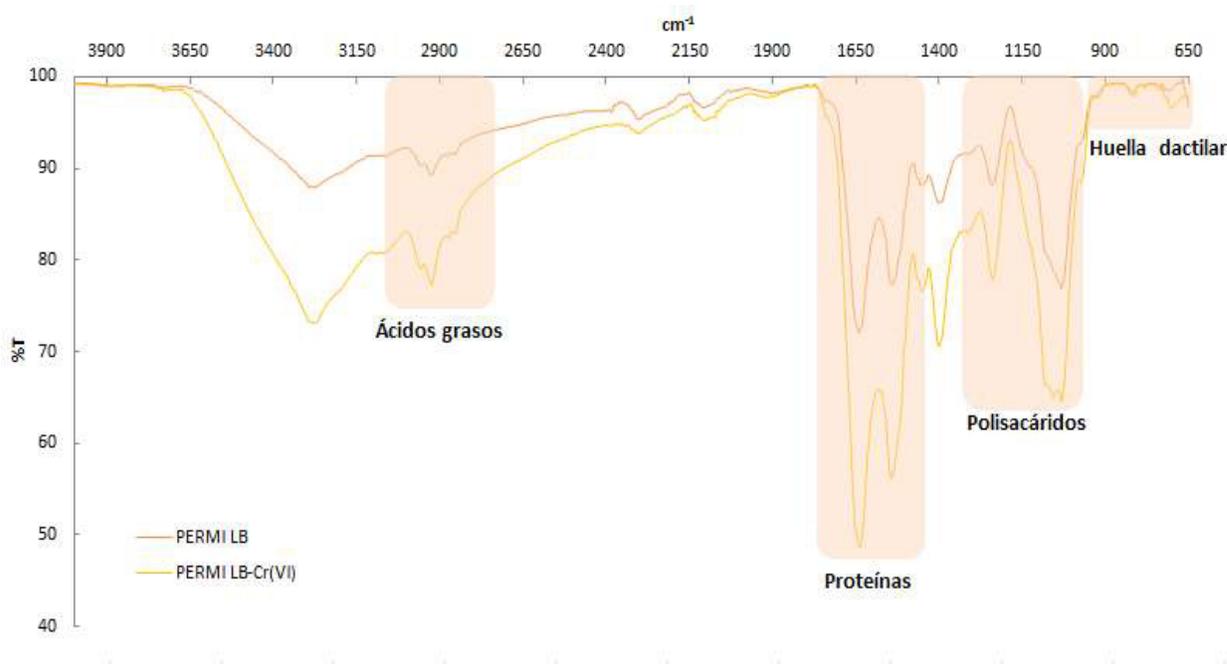


Figura 54. Comparación entre los espectros FTIR del aislado PERMI sin tratamiento (línea naranja) y con tratamiento (línea amarilla) con Cr(VI).

Las bandas observadas en los espectros IR corresponden a la presencia de proteínas, lípidos, polisacáridos y grupos fosfato, en base a los rangos espectrales antes mencionados (Ede *et al.* 2012; Ojeda *et al.* 2008; Probst *et al.* 2013). Luego del estudio comparativo realizado se observa un aumento en la intensidad de las bandas de cada microorganismo al estar en contacto con Cr(VI). Lo anterior se atribuye a cambios en el metabolismo bacteriano que se refleja fuertemente en la producción de proteínas, ácidos grasos y polisacáridos. Esto último ha sido comprobado por Batool *et al.* (2015), al demostrar que las bacterias: *P. aeruginosa* Rb-1 y *O. intermedium* Rb-2, ambas productoras de EPS, producían mayor cantidad de EPS en presencia de Cr(VI).

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

- Los genes involucrados en los diversos mecanismos de resistencia a cromo, están ampliamente distribuidos en diversos filos bacterianos, en su mayoría, aquellos pertenecientes al grupo bacteriano de *Proteobacterias*, específicamente las clases β y γ .
- La mayor distribución del gen *chrA* encargado del eflujo de iones cromato al exterior de la célula se encontró en *Betaproteobacterias*, y de los genes *yieF* y *mucD*, que reducen Cr(VI) a Cr(III) y producen exopolisacáridos, respectivamente, en *Gammaproteobacterias*.
- Se obtuvieron 23 aislados bacterianos capaces de crecer en presencia de Cr(VI) de todas las muestras tratadas, a pesar de la variabilidad de su composición metálica.
- La mayor cantidad de aislados resistentes a Cr(VI) obtenidos provienen de las muestras de León, Guanajuato.
- Los microorganismos localizados en ambientes contaminados con diversos metales, son naturalmente resistentes a dichos metales. Las bacterias aisladas poseen potencial para la biorremediación de sitios contaminados con diversos metales.
- Los porcentajes de remoción de Cr(VI) más altos (por encima del 85%) se alcanzan por las especies biológicas ETTIL_R, ETICH Y EAIL, cuyas

características generales son: bacilos Gram negativos y positivos, de origen industrial, productoras de pigmentos, así como de exopolisacáridos. En el caso de las especies PRM_A y PERM_I se alcanzan menores porcentajes de remoción (por debajo del 35%) a diferentes concentraciones iniciales de Cr(VI), lo que concuerda con las características propias de cada especie, ya que provienen de sitios que no han tenido contacto con Cr(VI) y de sitios potencialmente expuestos a dicho metal, respectivamente.

- Los aislados obtenidos son de los géneros *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* y *Serratia*.
- Los resultados obtenidos en los antibiogramas proporcionan información útil, al descartar una posible limitación del empleo de los aislados en procesos de biorremediación, por presentar índices MAR por debajo de 0.2.
- Se comprobó la bioacumulación y bioreducción del aislado ETTIL como posibles mecanismos de resistencia a Cr(VI).
- La capacidad reductora de las biomasas a pH 1 en contacto con 500 mg L⁻¹ de Cr(VI) oscilo entre 239 y 498 mg g⁻¹, representando la cualidad de ser buen material bioreductor.
- El estudio comparativo de los espectros IR indicó un aumento en la intensidad de las bandas de interés, siendo atribuido a cambios en el metabolismo bacteriano que se refleja fuertemente en la producción de proteínas, ácidos grasos y polisacáridos.

CAPÍTULO 8

RECOMENDACIONES

- Caracterizar los metabolitos y posibles reductasas que producen los aislados por el efecto del Cr(VI) para determinar el origen de la reducción de Cr(VI).
- Estudiar el mecanismo de remoción de Cr(VI) en diferentes condiciones de experimentación para conocer los parámetros óptimos de reducción.
- Estudiar las condiciones de pH, temperatura y dosis de biomasa para evaluar el potencial de los aislados bacterianos como agentes bioreductores.
- Secuenciación de los genomas completos de los aislados de interés para comprobar la presencia de los genes implicados en los diversos mecanismos de resistencia a Cr(VI).

DISPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS GENERADOS

Los residuos generados, fueron esterilizados y colocados en los contenedores correspondientes de acuerdo al Reglamento General de los Laboratorios de Facultad de ciencias Químicas.

Contenedores:

1. **Colorantes y Lugol.** Residuos de Tinciones
2. **E inorgánico.** Metales pesados Cr(VI)
3. **RPBI.** Cultivos esterilizados listos a disposición.

REFERENCIAS

- Ackerley DF, Gonzalez CF, Keyhan M, Blake R & Matin A (2004) Mechanism of chromate reduction by the *Escherichia coli* protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction. *Environmental Microbiology* 6: 851–860
- Aguilar E, Jerónimo P, Ramírez M, Rensing C & Cervantes C (2011) The ChrA homologue from a sulfure-regulated gene cluster in cyanobacterial plasmid pANL confer chromate resistance. *Microbiology and Biotechnology* 28: 865–869
- Bachate SP, Nandre VS, Ghatpande NS & Kodam KM (2013) Simultaneous reduction of Cr(VI) and oxidation of As(III) by *Bacillus firmus* TE7 isolated from tannery effluent. *Chemosphere* 90: 2273–2278
- Bakiyaraj R, Baskaran L, Chidambaram AL, Mahakavi T & Santhoshkumar M (2014) Bioremediation of Chromium by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3: 715–719.
- Barak Y, Ackerley DF, Dodge CJ, Banwari L, Alex C, Francis J & Matin A (2006) Analysis of novel soluble chromate and uranyl reductases and generation of an improved enzyme by directed evolution. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7074–7082.
- Barrera-Díaz CE, Lugo-Lugo V & Bilyeu B (2012) A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr(VI) reduction. *Journal of Hazardous Materials* 223-224: 1–12.
- Batool R, Yrjälä K, Shaukat K, Jamil N & Hasnain S (2015) Production of EPS under Cr(VI) challenge in two indigenous bacteria isolated from a tannery effluent. *Journal of Basic Microbiology* 54: 1-11
- Campos-Medina E (2008) Estudio de la adsorción de cromo hexavalente como biomaterial la *Ectodermis de opuntia*. *Quivera* 10: 16-31
- Castro-Díaz J (2009) Cromatos de México. Recuperado el 23 de Septiembre de 2013, de <http://www.jornada.unam.mx/2009/02/02/eco-c.html>
- Chai L, Huang S, Yang Z, Peng B, Huang Y & Chen Y (2009) Cr(VI) remediation by indigenous bacteria in soils contaminated by chromium-containing slag. *Journal of Hazardous Materials* 167: 516–522.

- Chardin B, Giudici-Ortoni MT, Luca G, Guigliarelli B & Bruschi M (2003) Hydrogenases in sulfate-reducing bacteria function as chromium reductase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 315–321
- Cheung KH & Gu JD (2007) Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 59: 8–15
- Coleman RN (1988) Chromium toxicity: effects on microorganisms with special reference to the soil matrix. In: Nriagu E & Nierboor JO (Eds) *Chromium in the Natural and Human Environments* (pp. 335–368). New York
- Colin VL, Villegas LB & Abate CM (2012) Indigenous microorganisms as potential bioremediators for environments contaminated with heavy metals. *International Biodeterioration and Biodegradation* 69: 28–37
- Das S, Mishra J, Das SK, Pandey S, Rao DS, Chakraborty A & Thatoi HN (2014) Investigation on mechanism of Cr(VI) reduction and removal by *Bacillus amyloliquefaciens*, a novel chromate tolerant bacterium isolated from chromite mine soil. *Chemosphere* 96: 112–121
- Das S, Ram SS, Sahu HK, Rao DS, Chakraborty A, Sudarshan M & Thatoi HN (2013) A study on soil physico-chemical, microbial and metal content in Sukinda chromite mine of Odisha, India. *Environmental Earth Sciences* 69: 2487–2497
- Dhal B, Thatoi HN, Das NN & Pandey BD (2010) Reduction of hexavalent chromium by *Bacillus* sp. isolated from chromite mine soils and characterization of reduced product. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85: 1471–1479
- Dhal B, Thatoi HN, Das NN & Pandey BD (2013) Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and miningmetallurgical solid waste A review. *Hazardous Materials* 251: 272– 291
- Díaz-Pérez C, Cervantes C, Campos-García J, Julián-Sánchez A & Riveros-Rosas H (2007) Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily. *FEBS Journal* 274: 6215–6227
- Dogan N, Kantar C, Gulcan S, Dodge CJ, Yilmaz B & Mazmanci MA (2011) Chromium (VI) bioremoval by *Pseudomonas* bacteria: Role of microbial exudates for natural attenuation and biotreatment of Cr(VI) contamination. *Environmental Science and Technology* 45: 2278–2285
- Dönmez G & Koçberber N (2005) Isolation of hexavalent chromium resistant bacteria from industrial saline effluents and their ability of bioaccumulation. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 700–705
- Ede S, Hafner L, Frost R & Will G (2012) Inactivation and structural changes of *E. cloacae* and *B. subtilis* endospores during IR laser water treatment. *Hydrology Current Research* 3: 1–4

- Elangovan R, Philip L & Chandraraj K (2010) Hexavalent chromium reduction by free and immobilized cell-free extract of *Arthrobacter rhombi*-RE. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160: 81–97
- Environmental Protection Agency (2011) Chromium-6 in drinking water. Recuperado el 22 de Septiembre de 2013, de <http://doi.org/815-F-10-005>
- Environmental Protection Agency (2014) Priority Pollutants. Recuperado el 21 de Febrero de 2015, de <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/pollutants.cfm>
- Eswaramoorthy S, Poulain S, Hienerwadel R, Bremond N, Sylvester MD, Zhang YB & Matin A (2012) Crystal structure of ChrR-A quinone reductase with the capacity to reduce chromate. *PLoS ONE* 7: 1–7
- Field EK, Gerlach R, Viamajala S, Jennings LK, Peyton BM & Apel W (2013) Hexavalent chromium reduction by *Cellulomonas* sp. strain ES6: The influence of carbon source, iron minerals, and electron shuttling compounds. *Biodegradation* 24: 437–450
- Focardi S, Pepi M & Focardi S (2013) Microbial reduction of hexavalent chromium as a mechanism of detoxification and possible bioremediation applications. *Biodegradation - Life of Science* <http://doi.org/10.5772/56365>
- Forbes B, Sahm DF & Weissfeld AS (2009) Principios de la acción y de la resistencia a los antimicrobianos. In: Bailey & Scott's (Eds) *Diagnóstico microbiológico* (12th ed.) Médica Panamericana (pp. 172–186). Buenos Aires, Argentina
- Gadd GM (1992) Metals and microorganisms: A problem of definition. *FEMS Microbiology Letters* 100: 197–204
- Gadd GM (2010) Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156: 609–643
- García A (2006) Ingesta de nutrientes: Conceptos y recomendaciones internacionales (2ª parte). *Nutricion Hospitalaria* 21: 437–447
- Garrity G (2009a) Part B The *Gammaproteobacteria*. In: Brenner DJ, Krieg NR & Staley JT (Eds) *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology* (2nd ed.) Springer US (pp. 354–379). USA
- Garrity G (2009b) Part B The *Gammaproteobacteria*. In: Brenner DJ, Krieg NR & Staley JT (Eds) *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology* (2nd ed.) Springer US (pp. 799–811). USA
- Ge S, Dong X, Zhou J & Ge S (2013) Comparative evaluations on bio-treatment of hexavalent chromate by resting cells of *Pseudochrobactrum* sp. and *Proteus* sp. in wastewater. *Journal of Environmental Management* 126: 7–12
- Gerbino, OE. Interacción de *Lactobacillus kefir* con plomo, cadmio, zinc y níquel: Análisis estructural y estudio de la capacidad secuestrante a nivel molecular [Tesis de Doctorado]. Universidad Nacional de la Plata, Buenos Aires; 2013.

- Gutiérrez JF, Espino AE, Coreño A, Acevedo FJ, Reyna GE, Fernández FJ, Tomasini A, Wrobel K & Wrobel K (2010) Mecanismos de interacción con cromo y aplicaciones biotecnológicas en hongos. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* 1: 47-63
- Harish R, Samuel J, Mishra R, Chandrasekaran N & Mukherjee A (2012) Bio-reduction of Cr(VI) by exopolysaccharides (EPS) from indigenous bacterial species of Sukinda chromite mine, India. *Biodegradation* 4: 87–96
- He M, Li X, Guo L, Miller SJ, Rensing C & Wang G (2010) Characterization and genomic analysis of chromate resistant and reducing *Bacillus cereus* strain SJ1. *BMC Microbiology* 10: 2–10
- He M, Li X, Liu H, Miller SJ, Wang G & Rensing C (2011) Characterization and genomic analysis of a highly chromate resistant and reducing bacterial strain *Lysinibacillus fusiformis* ZC1. *Journal of Hazardous Materials* 185: 682–688
- IARC (2015) Agents Classified by the IARC monographs. Recuperado el 16 de Marzo de 2015, de http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/vol1_112.php
- INEGI (2009) Censos Económicos 2009. Recuperado el 17 de Febrero de 2015, de http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/proyectos/censos/ce2009/pdf/M_Ind_calzado.pdf
- Jin H, Zhang Y, Buchko GW, Varnum SM, Robinson H, Squier TC & Long PE (2012) Structure determination and functional analysis of a chromate reductase from *Gluconacetobacter hansenii*. *PLoS ONE* 7: 1–12
- Kamaludeen SP, Megharaj M, Juhasz AL, Sethunathan N & Naidu R (2003) Chromium-microorganism interactions in soils: remediation implications. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 178: 93–164
- Khambhaty Y, Mody K, Basha S & Jha B 2009 Kinetics, equilibrium and thermodynamic studies on biosorption of hexavalent chromium by dead fungal biomass of marine *Aspergillus niger*. *Chemical Engineering Journal* 145: 489-495
- Kılıç NK & Dönmez G (2008) Environmental conditions affecting exopolysaccharide production by *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus* sp., and *Ochrobactrum* sp. *Hazardous Materials* 154: 1019–1024
- Kılıç NK, Stensballe A, Otzen DE & Dönmez G (2010) Proteomic changes in response to chromium (VI) toxicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresource Technology* 101: 2134–2140
- Kumar MA, Anandapandian KT & Parthiban K (2011) Production and characterization of exopolysaccharides (EPS) from biofilm forming marine bacterium. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 54: 259–265

- Long D, Tang X, Cai K, Chen G, Shen C, Shi J & Chen Y (2013) Cr(VI) resistance and removal by indigenous bacteria isolated from chromium-contaminated soil. *Microbiology and Biotechnology* 23: 1123–1132
- Madigan M, Martinko J & Parker J (2003) *BROCK Biología de los microorganismos* (10^a ed.) Pearson educación. Madrid, España
- Mangaiyarkarasi MS, Vincent S, Janarthanan S, Subba T & Tata BV (2011) Bioreduction of Cr(VI) by alkaliphilic *Bacillus subtilis* and interaction of the membrane groups. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18: 157–167
- Marrero-Coto J, Díaz-Valdivia A & Coto-Pérez O (2010) Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biologicas* 41: 67–78
- Mishra RR, Dhal B, Dutta SK, Dangar TK, Das NN & Thatoi HN (2012) Optimization and characterization of chromium (VI) reduction in saline condition by moderately halophilic *Vibrifacillus* sp. isolated from mangrove soil of Bhitarkanika, India. *Journal of Hazardous Materials* 227-228: 219–226
- Mishra S & Doble M (2008) Novel chromium tolerant microorganisms: Isolation, characterization and their biosorption capacity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 874–879
- Montañez H (2011) Contaminación por cromo en cuatro pozos en Tultitlán. Recuperado el 23 de Septiembre de 2013, de http://www.miradaregional.com/html/contaminacion_cromo.html
- Morais PV, Branco R & Francisco R (2011) Chromium resistance strategies and toxicity: what makes *Ochrobactrum tritici* 5bv11 a strain highly resistant. *BioMetals* 24: 401–410.
- Morel MA, Ubalde MC, Olivera-Bravo S, Callejas C, Gill PR & Castro-Sowinski S (2009) Cellular and biochemical response to Cr(VI) in *Stenotrophomonas* sp.: Research Letter. *FEMS Microbiology Letters* 291: 162–168
- Murugavelh S & Mohanty K (2013) Isolation, identification and characterization of Cr(VI) reducing *Bacillus cereus* from chromium contaminated soil. *Chemical Engineering Journal* 230: 1–9
- Myers CR, Carstens BP, Antholine WE & Myers JM (2000) Chromium (VI) reductase activity is associated with the cytoplasmic membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Journal of Applied Microbiology* 88: 98–106
- Ojeda JJ, Romero-Gonzalez ME, Pouran HM & Banwart S (2008) In situ monitoring of the biofilm formation of *Pseudomonas putida* on hematite using flow-cell ATR-FTIR spectroscopy to investigate the formation of inner-sphere bonds between the bacteria and the mineral. *Mineralogical Magazine* 72: 101–106

- Opperman DJ, Piater LA & Van-Heerden E (2008) A novel chromate reductase from *Thermus scotoductus* SA-01 related to old yellow enzyme. *Journal of Bacteriology*, 190: 3076–3082
- Park D, Yun YS & Park J (2005) Studies on hexavalent chromium biosorption by chemically-treated biomass of *Ecklonia* sp. *Chemosphere* 60: 1356–1364
- Park D, Yun YS, Lee HW & Park J (2008) Advanced kinetic model of the Cr(VI) removal by biomaterials at various pHs and temperatures. *Bioresource Technology* 99: 1141–1147
- Patra RC, Malik S, Beer M, Megharaj M & Naidu R (2010) Molecular characterization of chromium (VI) reducing potential in Gram positive bacteria isolated from contaminated sites. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 1857–1863
- Polti M, Amoroso MJ & Abate CM (2011) Intracellular chromium accumulation by *Streptomyces* sp. MC1. *Water, Air, and Soil Pollution* 214: 49–57
- Probst AJ, Holman H, DeSantis TZ, Andersen GL, Birarda G, Bechtel H & Moissl-Eichinger C (2013) Tackling the minority: sulfate-reducing bacteria in an archaea-dominated subsurface biofilm. *The ISME Journal* 7: 635–51
- PROFEPA (2014a) Programa de Procuración de Justicia Ambiental 2014-2018. Recuperado el 12 de Abril de 2015, de http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/5796/1/ppja_2014-2018.pdf
- PROFEPA (2014b) Juez niega suspensión provisional a Química Central por clausura de PROFEPA a sus instalaciones. Recuperado el 21 de Marzo de 2015, de http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/6064/1/mx.wap/juez_niega_suspension_provisional_a_quimica_central_por_clausura_de_profepa_a_sus_instalaciones.html
- Rahman Z & Singh VP (2014) Cr(VI) reduction by *Enterobacter* sp. DU17 isolated from the tannery waste dump site and characterization of the bacterium and the Cr(VI) reductase. *International Biodeterioration & Biodegradation* 91: 97–103
- Ramírez-Díaz MI, Díaz-Pérez C, Vargas E, Riveros-Rosas H, Campos-García J & Cervantes C (2008) Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *BioMetals* 21: 321–332
- Ravindranath SP, Henne KL, Thompson DK & Irudayaraj J (2011) Surface-enhanced Raman imaging of intracellular bioreduction of chromate in *Shewanella oneidensis*. *PLoS ONE* 6: 1–10
- Robins, K. J., Hooks, D. O., Rehm, B. H. a, y Ackerley, D. F. (2013). *Escherichia coli* Nema is an efficient chromate reductase that can be biologically immobilized to provide a cell free system for remediation of hexavalent chromium. *PLoS ONE* 8: 1–8
- Rocchetta I, Mazzuca M, Conforti V, Balzaretto V & De-Molina M (2012) Chromium induced stress conditions in heterotrophic and auxotrophic strains of *Euglena gracilis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 84: 147–154

- Sandana J, Sujatha D & Rose C (2015) Inducible chromate reductase exhibiting extracellular activity in *Bacillus methylotrophicus* for chromium bioremediation. *Microbiological Research* 170: 235–241
- SCFI (2015) Norma Mexicana NMX-AA-044-SCFI-2014 Análisis de agua. -Medición de cromo hexavalente en aguas naturales , salinas , residuales y residuales tratadas- Método de prueba (cancela a la NMX-AA-044-SCFI-2001). Recuperado el 21 de Enero de 2015, de <http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/NMX-AA-044-SCFI-2014.pdf>
- Schmieman E, Yonge D, Rege M, Petersen J, Turick C, Johnstone D & Apel W (1998) Comparative kinetics of bacterial reduction of chromium. *Journal of Environmental Engineering* 124: 449–455
- Sedláček V & Kučera I (2010) Chromate reductase activity of the *Paracoccus denitrificans* ferric reductase B (FerB) protein and its physiological relevance. *Archives of Microbiology* 192: 919–926
- SEMARNAT (1997) NOM-001-SEMARNAT-1996. Recuperado el 11 de Septiembre de 2013, de <http://www.semarnat.gob.mx/leyes-y-normas/nom-aguas-residuales>
- SEMARNAT (2007) NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Recuperado el 11 de Septiembre de 2013, de http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/1392/1/nom-147-semarnat_ssa1-2004.pdf
- SEMARNAT (2009) Metales Pesados. Recuperado el 21 de Enero de 2015, de <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/763-aqre-metales>
- SEMARNAT (2012a) Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Recuperado el 13 de Marzo de 2015, de http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_12/07_residuos/cap7_6.html
- SEMARNAT (2012b) El Libro Blanco. Recuperado el 20 de Septiembre de 2013, de [http://www.semarnat.gob.mx/transparencia/Documents/LIBRO BLANCO CROMATOS.pdf](http://www.semarnat.gob.mx/transparencia/Documents/LIBRO_BLANCO_CROMATOS.pdf)
- SEMARNAT (2013) Sitios contaminados registrados. Recuperado el 21 de Marzo de 2015, de http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/indicadores14/conjuntob/indicador/05_peligrosos/5_3.html
- SEMARNAT (2014) RESIDUOS. Recuperado el 21 de Marzo de 2015, de http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_resumen14/07_residuos/7_4_1.html
- Sharma S & Adholeya A (2011) Detoxification and accumulation of chromium from tannery effluent and spent chrome effluent by *Paecilomyces lilacinus* fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation* 65: 309–317

- Soni SK, Singh R, Awasthi A, Singh M & Kalra A (2013) In vitro Cr(VI) reduction by cell-free extracts of chromate-reducing bacteria isolated from tannery effluent irrigated soil. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 1661–1674
- Srivastava S & Thakur IS (2012) Biosorption and biotransformation of chromium by *Serratia* sp. isolated from tannery effluent. *Environmental Technology* 33: 113–22.
- Tebo BM & Obraztsova AY (1998) Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. *Source* 162: 193–198
- Thatoi H, Das S, Mishra J, Rath BP & Das N (2014) Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: A review. *Journal of Environmental Management* 146: 383–399
- Torres MC (2007) Remoción de metales pesados en aguas residuales utilizando una macrófita acuática (*Eleocharis acicularis*) muerta". Universidad Autónoma de Queretaro. Recuperado el 21 de Septiembre de 2013, de <http://www.geociencias.unam.mx/~bole/eboletin/tesisCarolina0408.pdf>
- TREK Diagnostic Systems (2012a) SENSITITRE™ Gram negative ID plate format. Recuperado el 18 de Febrero de 2015, de http://www.trekds.com/products/sensititre/clinical-files/Sensititre_GNID_Layout.pdf
- TREK Diagnostic Systems (2012b) SENSITITRE™ Gram positive ID plate format. Recuperado el 18 de Febrero de 2015, de http://www.trekds.com/products/sensititre/clinical-files/Sensititre_GPID_Layout.pdf
- Turick CE, Apel WA & Carmiol NS (1996) Isolation of hexavalent chromium-reducing anaerobes from hexavalent-chromium-contaminated and noncontaminated environments. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44: 683–688
- Whitman W (2009) The Firmicutes. In: Paul De Vos DJ, Garrity G, Krieg NR, Ludwig W & Whitman W (Eds) *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology* (2nd ed.) Springer (pp. 594–607). New York
- World Health Organization (1998) Health criteria and other supporting Information - addendum. Recuperado el 23 de Septiembre de 2013, de http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/2edaddvol2a.pdf
- Xu L, Luo M, Li W, Wei X, Xie K, Liu L & Liu H (2011) Reduction of hexavalent chromium by *Pannonibacter phragmitetus* LSSE-09 stimulated with external electron donors under alkaline conditions. *Journal of Hazardous Materials* 185: 1169–1176
- Zahoor A & Rehman A (2009) Isolation of Cr(VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater. *Journal of Environmental Sciences* 21: 814–820
- Zhitkovich A (2011) Chromium in drinking water: Sources, metabolism, and cancer risks. *Chemical Research in Toxicology* 24: 1617–1629

Zou L, Liu P & Li X (2013) New advances in molecular mechanism of microbial hexavalent chromium reduction. *Journal of Biotechnology and Food Science* 1: 46–55

ANEXOS

Anexo 1. Placas SENSTITRE

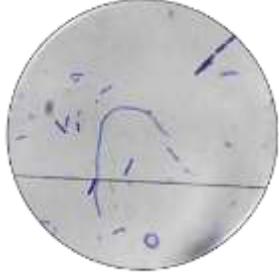
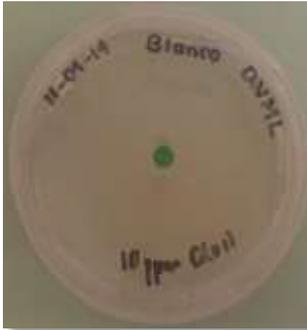
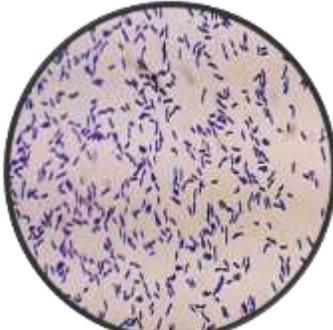
Pruebas bioquímicas bacterias Gram positivas				
	1	2	3	4
A	Urea	Esculina	Arginina	4MU β - D- Galactopiranosido
B	4MU β -D-Ribofuranosido	Ramnosa	Alanina-7AMC	Manitol
C	4MU β -D-Glucopiranosido	Trehalosa	D-Alanina-7AMC	Maltosa
D	4MU β -D-Manopiranosido	Ornitina-7AMC	Arginina-7AMC	4MU β -D- Glucurónido
E	4MU α -D-Glucopiranosido	Cisteina-7AMC	Glicerol	Treonina-7AMC
F	Metionina-7AMC	Glucosa	Sacarosa	Prolina-7AMC
G	Serina-7AMC	β -Metil Glucosidasa	Citrulina-7AMC	Piroglutamato-7AMC
H	Sorbitol	Tirosina-7AMC	Leucina-7AMC	Valina-7AMC

Fuente: (TREK Diagnostic Systems, 2012b)

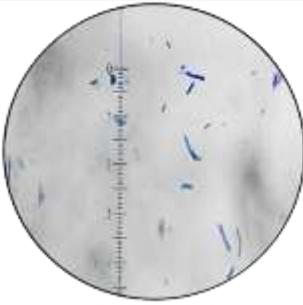
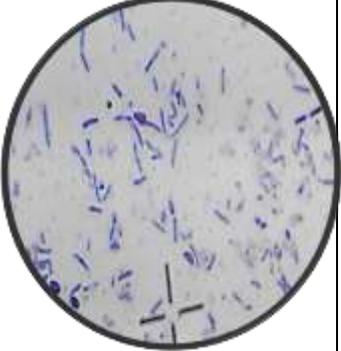
Pruebas bioquímicas bacterias Gram negativas				
	1	2	3	4
A	Lisina AMC	Urea	Ornitina	Sorbitol
B	Xilosa	2-Acetamido-2-deoxiglucósido MU + α -L-Arabinósido MU	Sacarosa	β -D-glucósido MU
C	Fosfato MU	Trehalosa	bis-Fosfato MU	Manitol
D	Maltosa	α -D-galactósido MU	Inositol	β -D-glucoside MU
E	Prolina AMC	Fructuosa	Esculina	Arabitol
F	Arabinosa	Lisina	TDA	Rafinosa
G	γ -Glutamina MU	Arginina	α -D-galactósido MU	Celobiosa
H	Malonato	Piruvato	Citrato	Valina-7AMC

Fuente: (TREK Diagnostic Systems, 2012a)

Anexo 2. Imágenes de los aislados en caldo y agar Mínimo.

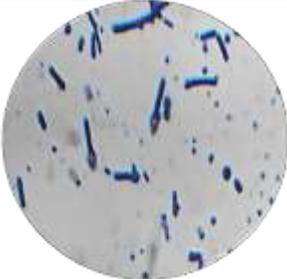
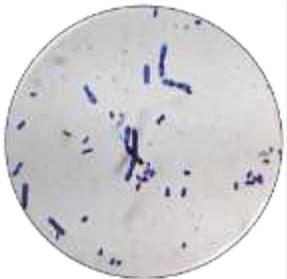
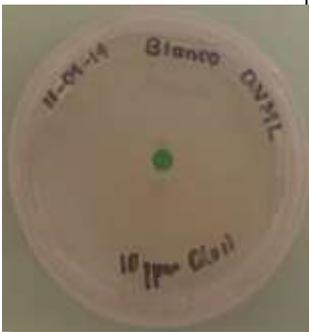
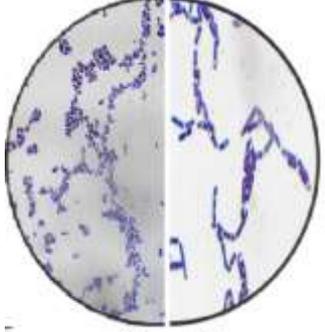
Anexo 2. Imágenes de los aislados en caldo y agar Mínimo.					
PRCC					
MEDIO MÍNIMO	CALDO	BLANCO			
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)	70 mg/L Cr(VI)
					
		CULTIVO (48 horas de incubación)			
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)	70 mg/L Cr(VI)
					
	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X			ND	ND
	AGAR	BLANCO 10 mg/L Cr(VI)	COLONIA	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X	
					
		ND: NO DISPONIBLE			

Anexo 2. Imágenes de los aislados en caldo y agar Mínimo.

PSCC					
MEDIO MÍNIMO	CALDO	BLANCO			
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)	70 mg/L Cr(VI)
					
		CULTIVO (48 horas de incubación)			
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)	70 mg/L Cr(VI)
					
	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X			ND	ND
	AGAR	BLANCO 10 mg/L Cr(VI)	COLONIA	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X	
					
		ND: NO DISPONIBLE			

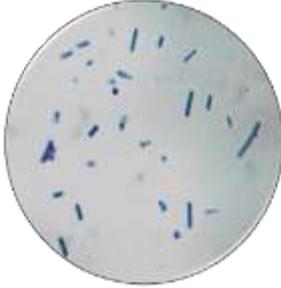
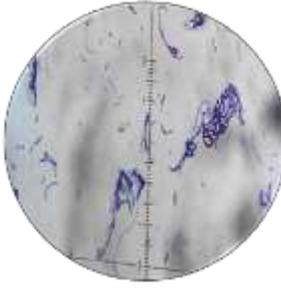
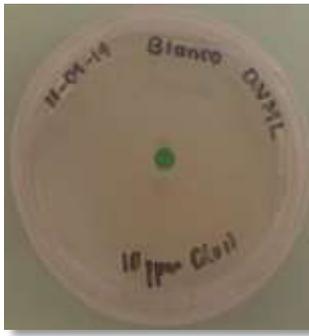
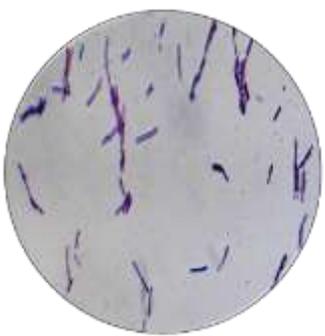
Anexo 2. Imágenes de los aislados en caldo y agar Mínimo.

PESPLB

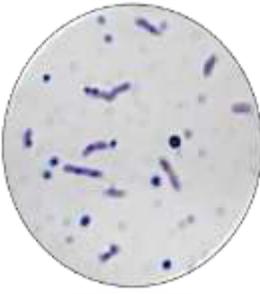
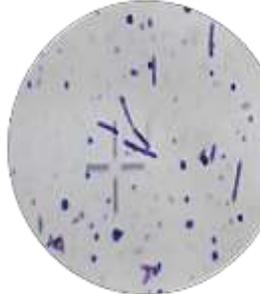
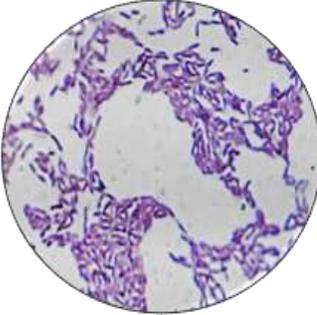
		BLANCO			
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)	70 mg/L Cr(VI)
MEDIO MÍNIMO	CALDO				
		CULTIVO (48 horas de incubación)			
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)	70 mg/L Cr(VI)
					
	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X			ND	ND
AGAR	BLANCO 10 mg/L Cr(VI)	COLONIA		TINCIÓN GRAM Objetivo 100X	
					

ND: NO DISPONIBLE

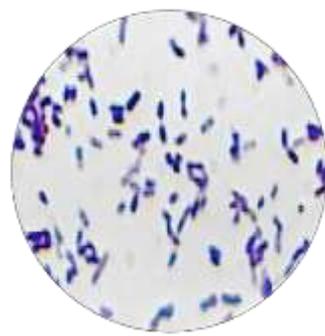
Anexo 2. Imágenes de los aislados en caldo y agar Mínimo.

PERLS					
MEDIO MÍNIMO	CALDO	BLANCO			
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)	70 mg/L Cr(VI)
					
		CULTIVO (48 horas de incubación)			
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)	70 mg/L Cr(VI)
					
	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X			ND	ND
	AGAR	BLANCO 10 mg/L Cr(VI)	30 ppm Cr(VI)	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X	
					
		ND: NO DISPONIBLE			

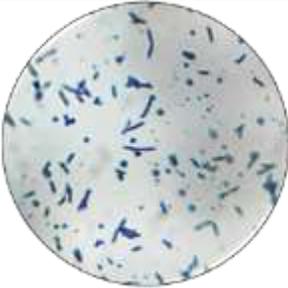
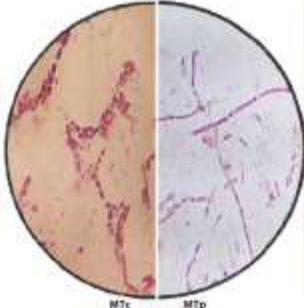
Anexo 2. Imágenes de los aislados en caldo y agar Mínimo.

PERM₁					
MEDIO MÍNIMO	CALDO	BLANCO			
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)	70 mg/L Cr(VI)
					
		CULTIVO (48 horas de incubación)			
	10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)	70 mg/L Cr(VI)	
					
TINCIÓN GRAM Objetivo 100X			ND	ND	
AGAR	BLANCO 10 mg/L Cr(VI)	COLONIA	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X		
					
	ND: NO DISPONIBLE				

Anexo 2. Imágenes de los aislados en caldo y agar Mínimo.

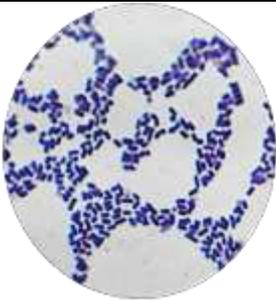
PRM_A					
MEDIO MÍNIMO	CALDO	BLANCO			
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)	70 mg/L Cr(VI)
					
		CULTIVO (48 horas de incubación)			
	10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)	70 mg/L Cr(VI)	
					
TINCIÓN GRAM Objetivo 100X			ND	ND	
AGAR	BLANCO 10 mg/L Cr(VI)	COLONIA	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X		
					
	ND: NO DISPONIBLE				

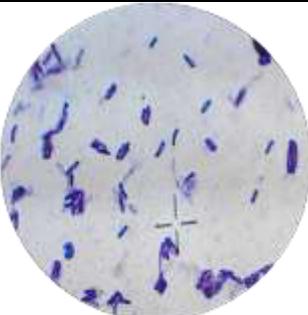
Anexo 2. Imágenes de los aislados en caldo y agar Mínimo.

ETTIL					
MEDIO MÍNIMO	CALDO	BLANCO			
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)	70 mg/L Cr(VI)
					
		CULTIVO (48 horas de incubación)			
	10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)	70 mg/L Cr(VI)	
			X	X	
TINCIÓN GRAM Objetivo 100X			X	X	
AGAR	BLANCO 10 mg/L Cr(VI)	COLONIA	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X		
					
			M7c M7p		

X: Sin crecimiento

Anexo 3. Imágenes de los aislados en caldo y agar LB Lenox sin Cr(VI).

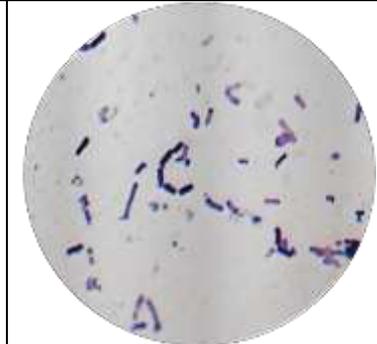
Anexo 3. Imágenes de los aislados en caldo y agar LB Lenox sin Cr(VI).			
PRCC			
MEDIO LB SIN CROMO	CALDO		
	BLANCO	CULTIVO	
			
	AGAR		
BLANCO	CULTIVO	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X	
			

Anexo 3. Imágenes de los aislados en caldo y agar LB Lenox sin Cr(VI).			
PSCC			
MEDIO LB SIN CROMO	CALDO		
	BLANCO	CULTIVO	
			
	AGAR		
BLANCO	CULTIVO	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X	
			

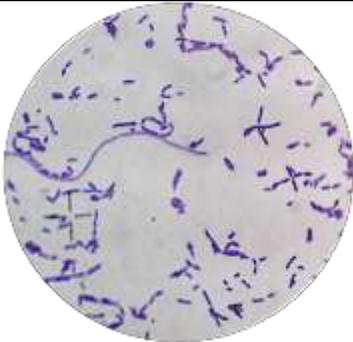
Anexo 3. Imágenes de los aislados en caldo y agar LB Lenox sin Cr(VI).

PESPLBa			
MEDIO LB SIN CROMO	CALDO		
	BLANCO	CULTIVO	
			
	AGAR		
	BLANCO	CULTIVO	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X
			

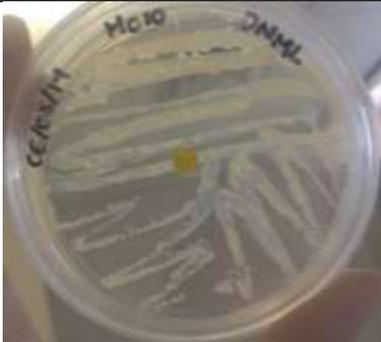
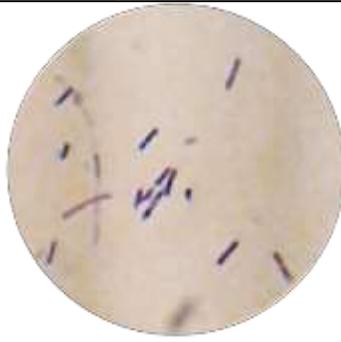
Anexo 3. Imágenes de los aislados en caldo y agar LB Lenox sin Cr(VI).

PESPLBc			
MEDIO LB SIN CROMO	CALDO		
	BLANCO	CULTIVO	
			
	AGAR		
	BLANCO	CULTIVO	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X
			

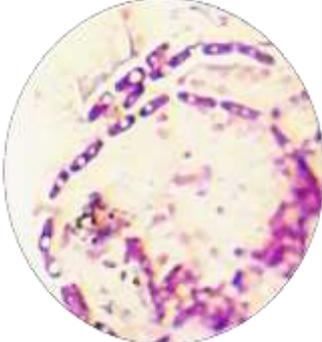
Anexo 3. Imágenes de los aislados en caldo y agar LB Lenox sin Cr(VI).

PERLS			
MEDIO LB SIN CROMO	CALDO		
	BLANCO	CULTIVO	
			
	AGAR		
	BLANCO	CULTIVO	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X
			

Anexo 3. Imágenes de los aislados en caldo y agar LB Lenox sin Cr(VI).

PERM₁			
MEDIO LB SIN CROMO	CALDO		
	BLANCO	CULTIVO	
			
	AGAR		
	BLANCO	CULTIVO	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X
			

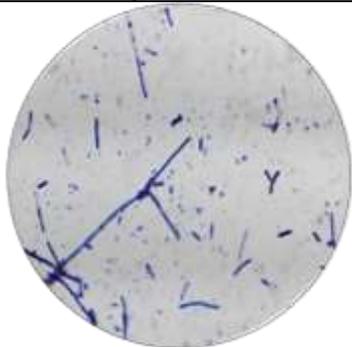
Anexo 3. Imágenes de los aislados en caldo y agar LB Lenox sin Cr(VI).

PRM_A			
MEDIO LB SIN CROMO	CALDO		
	BLANCO	CULTIVO	
			
	AGAR		
BLANCO	CULTIVO	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X	
			

Anexo 3. Imágenes de los aislados en caldo y agar LB Lenox sin Cr(VI).

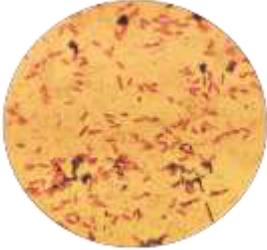
ETTILc			
MEDIO LB SIN CROMO	CALDO		
	BLANCO	CULTIVO	
			
	AGAR		
BLANCO	CULTIVO	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X	
			

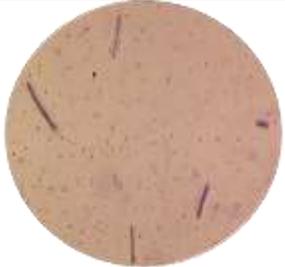
Anexo 3. Imágenes de los aislados en caldo y agar LB Lenox sin Cr(VI).

ETTILp			
MEDIO LB SIN CROMO	CALDO		
	BLANCO	CULTIVO	
			
	AGAR		
BLANCO	CULTIVO	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X	
			

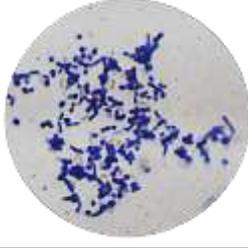
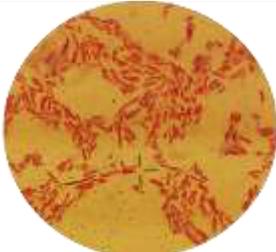
Anexo 4. Imágenes de los aislados en caldo y agar MacConkey

Anexo 4. Imágenes de los aislados en caldo y agar MacConkey				
PERM ₁				
MEDIO MACCONKEY	CALDO	BLANCO		
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)
		CULTIVO		
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)
	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X			
	AGAR	BLANCO		
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	

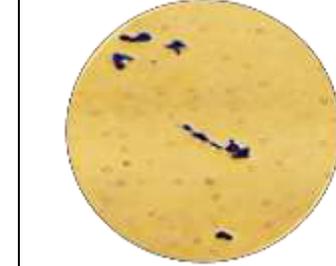
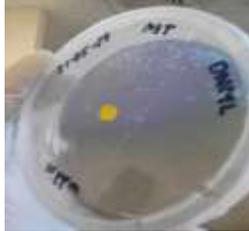
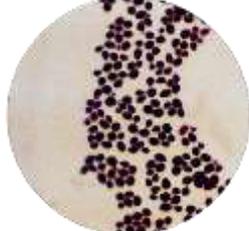
	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X		
--	-------------------------------------	---	--

Anexo 4. Imágenes de los aislados en caldo y agar MacConkey				
PSCC				
MEDIO MACCONKEY	CALDO	BLANCO		
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)
				
				
	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X	CULTIVO		
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)
				
<p>Nota: La cultivos líquidos de PSCC se transfirieron a medio sólido suplementado con 10 mg/L de Cr(VI). Se incubo a dos diferentes temperaturas (28°C y 37°C) y no se obtuvo crecimiento durante el transcurso de 7 días. PSCC se desarrolla mejor en suspensión.</p>				

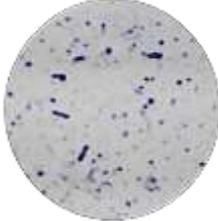
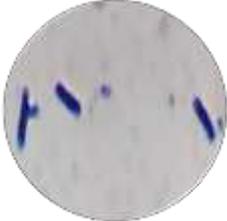
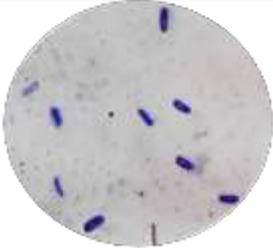
Anexo 4. Imágenes de los aislados en caldo y agar MacConkey

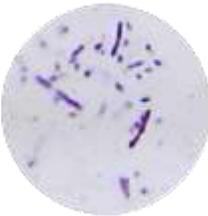
PRM _A				
MEDIO MACCONKEY	CALDO	BLANCO		
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)
				
		CULTIVO		
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)
				
	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X			
	AGAR	BLANCO		
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	
				
COLONIA				
				
TINCIÓN GRAM Objetivo 100X				

Anexo 4. Imágenes de los aislados en caldo y agar MacConkey

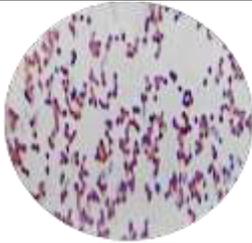
ETTIL				
MEDIO MACCONKEY	CALDO	BLANCO		
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)
				
		CULTIVO		
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	50 mg/L Cr(VI)
				
	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X			
	AGAR	BLANCO		
		10 mg/L Cr(VI)	30 mg/L Cr(VI)	
				
				
TINCIÓN GRAM Objetivo 100X				

Anexo 5. Imágenes de los aislados en caldo y agar LB Lenox sin Cr(VI).

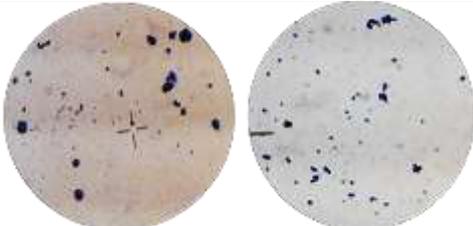
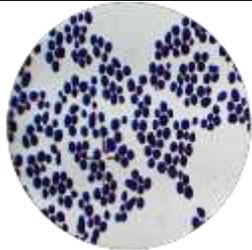
Anexo 5. Imágenes de los aislados en caldo y agar LB Lenox sin Cr(VI).				
PSCC				
MEDIO LB SIN CROMO	CALDO			
	BLANCO	CULTIVO	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X	
				
	AGAR			
BLANCO	CULTIVO	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X		
				

Anexo 5. Imágenes de los aislados en caldo y agar LB Lenox sin Cr(VI).				
PERM₁				
MEDIO LB SIN CROMO	CALDO			
	BLANCO	CULTIVO	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X	
				
	AGAR			
BLANCO	CULTIVO	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X		
				

Anexo 5. Imágenes de los aislados en caldo y agar LB Lenox sin Cr(VI).

PRM_A			
CALDO			
MEDIO LB SIN CROMO	BLANCO	CULTIVO	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X
			
AGAR			
MEDIO LB SIN CROMO	BLANCO	CULTIVO	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X
			

Anexo 5. Imágenes de los aislados en caldo y agar LB Lenox sin Cr(VI).

ETIL			
CALDO			
MEDIO LB SIN CROMO	BLANCO	CULTIVO	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X
			
AGAR			
MEDIO LB SIN CROMO	BLANCO	CULTIVO	TINCIÓN GRAM Objetivo 100X
			

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Dora Nely Menchaca López

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología Aplicada

Tesis: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS METALÓFILAS RESISTENTES A CROMO HEXAVALENTE CON POTENCIAL APLICACIÓN EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN

Campo de Estudio: Biotecnología

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Nueva Rosita, Coahuila el 23 de Agosto de 1990, hija de Felipe Menchaca Rosas y Dora Estela López Rodríguez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo.

Experiencia Profesional:

Oct-Abr 2013

Constructora Industrial Agropecuaria S.A de C.V.

Auxiliar de Investigación y Desarrollo

Función: Participación en la elaboración de diversos productos innovadores a nivel de planta piloto y su posterior empaquetamiento por diferentes métodos.

Medición de parámetros fisicoquímicos importantes en la evaluación de los productos de la empresa (totopos, tortillas, harinas, etc.,) mediante métodos internos.

Adicional, se realizaron análisis microbiológicos para el monitoreo en la vida de anaquel de los productos antes mencionados, tomando en cuenta los lineamientos tanto de las Normas Oficiales Mexicanas como de las NMX.

Feb-Ago 2012

Consultorio Monterrey de Petróleos Mexicanos

Departamento de Farmacia

Función: Dispensación de medicamentos.

Verificación y archivo de antibióticos.

Llenado de libros de control.

Levantamiento de inventario.

Recepción de medicamentos.