



UNIVERSIDAD  
DE GUANAJUATO

Campus Guanajuato  
División de Ingenierías



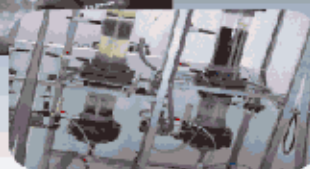
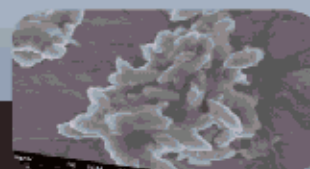
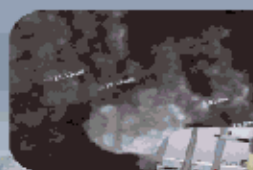
# 2do. Simposio Internacional de Bioingeniería Ambiental - SIBA

24 al 26 de septiembre del 2014

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



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



**Organización:**

Cuerpo Académico de  
Bioingeniería, Biotecnología y  
Gestión Ambiental

Departamento de Ingeniería Civil  
División de Ingenierías  
Campus Guanajuato

[www.ugto.mx](http://www.ugto.mx)

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



# “BIOINGENIERÍA AMBIENTAL”

ISBN: 978-607-441-330-4



DR. © 2014 Universidad de Guanajuato

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

Guanajuato, Guanajuato. México

24 al 26 de Septiembre de 2014

**“BIOINGENIERÍA AMBIENTAL”**

Primera edición 2014

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

Edición: Grupo de Investigación “Bioingeniería, Biotecnología y Gestión Ambiental”

Arodí Bernal Martínez  
Germán Cuevas Rodríguez  
Sergio Antonio Silva Muñoz  
Elcia M. Souza Brito

ISBN: 978-607-441-330-4

## ÍNDICE

### LA PARTICIPACIÓN DE LA UNIVERSIDAD PÚBLICA EN EL DESARROLLO COMUNITARIO

Felipe Macías Gloria, Patricia Campos Rodríguez y Eloy Juárez Sandoval..... 1

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

Ortiz-Prieto Jorge A.<sup>1,2</sup>, Acosta-Slane Damaris<sup>1</sup>, Lozoya-Márquez Luis A.<sup>1</sup>, Gómez-Vargas  
Ramón<sup>1</sup>, González-Sánchez Guillermo<sup>1</sup>..... 14

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

Víctor Jiménez-Quero<sup>□</sup>, Pedro Montes-García..... 23

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

Luz Brenda Montserrat Crespo, Arodí Bernal Martínez y Germán Cuevas Rodríguez ..... 30

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

T. V. Cervantes Melesio<sup>3</sup>, F. A. Horta Rangel<sup>3</sup>, M. A. Ramírez Morales<sup>1</sup>, G. Cruz Jiménez<sup>1</sup>,  
R. Navarro Mendoza<sup>2</sup> U. Morales Álvarez<sup>3</sup> <sup>□</sup>..... 37

### SECADO DE BIOMASA ALGAL EN SECADOR SOLAR

Moreno Funes José Saul, Davalos Navarrete Siikmine, Valle Moreno Andrés, Cervantes  
Torre-Marín Gemma\* ..... 44

### ESTIMACIÓN RESPIROMÉTRICA DEL RENDIMIENTO HETERÓTROFO DEL MODELO ASM1 PARA UNA PTAR EN CHIAPAS

Valeria Zuarth Coutiño<sup>1</sup>, Cristina Blanco González<sup>1</sup>, Josué Chanona Soto<sup>1</sup> y Gustavo Yáñez  
Ocampo<sup>1</sup>..... 52

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

Jesús Fernando López Vázquez<sup>1</sup>, Pamela Romo Rodríguez<sup>1</sup>, J. Felix Gutiérrez Corona<sup>1</sup> ... 57

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

Javier Ulises Hernández-Beltrán<sup>1</sup>, Ivette Michelle Navarro-Gutierrez<sup>1</sup>, Karla Cervantes-  
Quintero<sup>1</sup>, Héctor Hernández-Escoto<sup>1</sup> <sup>□</sup>..... 63

ELABORACIÓN DE CELDAS SOLARES TIPO GRÄTZEL EMPLEANDO  
SENSIBILIZADORES DE DIFERENTE PROCEDENCIA

Mónica Cedillo Alaniz<sup>1</sup>□, Juan Carlos Baltazar Vera<sup>2</sup>, Rosalba Fuentes Ramírez<sup>3</sup> ..... 69

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

Andrés Valle Moreno, Miguel Ángel Tapia Bustos, Cristina Ortega Nonoal, Gemma  
Cervantes Torre-Marín\* ..... 74

CONCRETE WITH RAW POLYETHYLENE TEREPHTHALATE

Luis Elias Chavez Valencia<sup>1</sup>, Claudia Hernandez Barriga<sup>2</sup>, Miguel Angel Manrique Ibarra<sup>3</sup>,  
Antonio Castro Lozano<sup>4</sup> ..... 83

BIOCOMPATIBILIDAD DE COMPOSITOS ÓSEOS - OSTEOLASTOS HUMANOS

M. Sabanero López<sup>1</sup>□, L. L. Flores Villavicencio<sup>1</sup>, Z. Miranda Rodríguez<sup>1</sup>, G. Barbosa  
Sabanero<sup>2</sup>, C. Piña Barba<sup>3</sup> ..... 86

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

Marco A. Silva, Germán Cuevas□ ..... 90

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

J. Merced Martínez Rosales<sup>1</sup>, Miriam Rocío Contreras García<sup>1</sup>, Antonio Pérez Nieto<sup>2</sup> y  
Gabriela Arroyo Figueroa<sup>2</sup> ..... 97

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

M. M. Marmolejo Lara<sup>2</sup>, L. Arroyo Álvarez<sup>1</sup>, F. A. Horta Rangel<sup>2</sup>, M. A. Ramírez Morales<sup>1</sup>, G.  
Cruz Jiménez<sup>1</sup>, U. Morales Álvarez<sup>2</sup>□ ..... 102

RECICLAJE DE CELULARES POR SOLVÓLISIS PARA RECUPERAR METALES

Lorena Eugenia Sánchez Cadena<sup>1</sup>\*, Zeferino Gamiño Arroyo<sup>2</sup>, Mario Alberto González Lara<sup>3</sup>,  
Demetrio Quiroz Q.<sup>4</sup>, Oscar Coreño A.<sup>5</sup> ..... 109

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

Pablo Carmona Medina<sup>1</sup>, Juan Jesús Serafín Muñoz<sup>1</sup>, Francisco Agustín Vidó García<sup>1</sup>,  
Francisco Javier Acevedo Aguilar<sup>2</sup>, Leticia López Martínez<sup>2</sup> ..... 115

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

Chávez Elías Amelia Fabiola<sup>1</sup>, Romo Rodríguez Pamela<sup>1</sup>, Gutiérrez Corona J. Félix<sup>1</sup>□ ..... 121

DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE DISEÑO EN SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES Brett González <sup>1</sup> , Alejandra Cruz <sup>1</sup> .....	128
EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>TRAMETES VERSICOLOR</i> EN PRESENCIA DE FURADAN®, BOSCALID (CANTUS)® Y QUINTACENO® Fátima Ojeda-Rodríguez <sup>1</sup> , Héctor G. Nuñez <sup>2</sup> , Blanca E. Gómez <sup>3</sup> , Noé Saldaña <sup>4</sup> , ..... Graciela M. L. Ruiz-Aguilar <sup>1*</sup> .....	134
TRATAMIENTO VÍA FENTON DE AGUA RESIDUAL PROVENIENTE DE UNA INSTITUCIÓN EDUCATIVA Paola Abigail Martínez Aldape <sup>1</sup> , Carlos J. Escudero S. <sup>2</sup> .....	139
EFFECT OF THE WALNUT SHELL PECANERA IN GYPSUM Luis Elías Chávez Valencia <sup>1</sup> , Claudia Hernández Barriga <sup>2</sup> , Martín Alejandro Moreno Hernández <sup>3</sup> , Cesar Leonardo Ruiz Jaime <sup>4</sup> .....	144
ISOLATION OF SULFATE-REDUCING BACTERIA FOR POTENTIAL BIOREMEDIATION OF METAL-CONTAMINATED EFFLUENTS María Fernanda Pérez Bernal <sup>1*</sup> , Jéssica Jazmín Gómez Marmolejo <sup>1</sup> , Elcia M.S. Brito <sup>1</sup> , Germán Cuevas Rodríguez <sup>1</sup> .....	148
EVALUACIÓN DE UN CONSORCIO BACTERIANO Y UN EFLUENTE DE BIODIGESTOR ANAEROBIO PARA LA PRODUCCIÓN DE LOMBRICOMPOSTA Elsa A. Guerrero, Héctor G. Nuñez, Víctor Olalde-Portugal, Vicente J. Álvarez, Rafael Veloz Graciela M. L. Ruiz-Aguilar* .....	153
APLICACION OF MICROCULTURE FOR BACTERIAL ISOLATION FROM INDUSTRIAL RESIDUE CONTAMINATED BY HEXAVALENT CHROMIUM Mariana Pérez Medina <sup>1</sup> □, Carolina Alejandra Martínez Gutierrez <sup>2</sup> □, Reyna Edith Padilla-Hernández <sup>3</sup> , Julio Cesar Valerdi Negreros <sup>1</sup> , Germán Cuevas Rodríguez <sup>4</sup> , Elcia M.S. Brito <sup>4</sup> □ .....	158
AISLAMIENTO DE BACTERIAS ANAEROBIAS DEL LAGO ALKALINO DEL CRÁTER DEL RINCÓN DE PARANGUEO Rivera Martínez, Laura Guadalupe <sup>1</sup> □, Cuevas-Rodríguez, Germán <sup>2</sup> , Malm Olaf <sup>3</sup> , Brito Elcia M. S. <sup>2</sup> .....	163
USING TILLANDSIA <i>USNEOIDES</i> AS BIOMARKER OF HEAVY METALS IN THE ATMOSPHERE: GUANAJUATO TUNELS Pedro Antonio Zárate-Santoyo <sup>1</sup> , Elcia M.S. Brito <sup>1</sup> , Adan Lino <sup>2</sup> , Rodrigo Meire <sup>2</sup> , Olaf Malm <sup>2</sup> , Joao P.M. Torres <sup>2</sup> , Germán Cuevas-Rodríguez <sup>1</sup> .....	169
ANAEROBIC BIOTRANSFORMATION OF HEXAVALENT CHROMIUM IN BATCH REACTORS Alba América Moreno González, Sergio Antonio Silva Muñoz, Elcia Souza Brito, Germán Cuevas Rodríguez, Arodí Bernal Martínez .....	175

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

Mariana Pérez Medina<sup>1</sup>, Carolina Alejandra Martínez Gutierrez<sup>2</sup>, Reyna Edith Padilla-Hernández<sup>3</sup>, Julio Cesar Valerdi Negreros<sup>1</sup>, Germán Cuevas Rodríguez<sup>4</sup>, Elcia M.S. Brito<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México ([marianapermed@gmail.com](mailto:marianapermed@gmail.com)); <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Baja California, Baja California, México ([carolina.mg.seabacter@gmail.com](mailto:carolina.mg.seabacter@gmail.com));

<sup>3</sup>Biología, DCNyE, Universidad de Guanajuato, Mexico

<sup>4</sup>Ingeniería Ambiental D.I. Universidad de Guanajuato ([emsbrito@gmail.com](mailto:emsbrito@gmail.com))

**Keywords:** *Biotechnology, bioprospection, Cr(VI), phylogenie, extremophile, alkaline.*

### ABSTRACT

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

### RESUMEN

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

## **INTRODUCCIÓN**

La ciudad de León es conocida nacionalmente por su alta producción de zapatos y otros artículos de piel. Dicha actividad, hace uso del Cromo hexavalente [Cr(VI)] para curtir la piel, ya que por lo general las sales de cromo trivalente (como Cr(OH) SO<sub>4</sub>) se han utilizado para evitar la degradación de las moléculas de colágeno constituyentes del cuero[2]. La utilización desmedida de esta sal, sin el manejo adecuado de sus residuos, ha generado un gran impacto ambiental que está afectando el agua, aire y suelo de la ciudad. El cromo es un elemento que se encuentra presente de manera natural en rocas, animales, plantas, suelo y gases volcánicos. Funciona químicamente con diversas valencias, siendo las formas trivalente [Cr(III)] y hexavalente, las más estables. El Cr(III) es relativamente inocuo, mientras que el Cr(VI) es considerado la especie más tóxica, ya que este último es muy hidrosoluble atravesando fácilmente la membrana plasmática. Dentro de la célula el es transformado en formas muy reactivas que interactúan con el DNA, entre otras moléculas. A largo plazo la exposición al Cr(VI) puede generar problemas de salud, ya que puede actuar tanto como agente mutagénico como carcinógeno [2]. Debido a estas características el Cr(VI) está en la lista de las sustancias tóxicas que deben tener su manejo controlado. En nuestro país ese sal es regido por la norma Oficial Mexicana-052-Ecología-1993. Organismos cromatorreductores, tanto eucariotas como procariontes, han sido aislados y probados ser eficientes en la transformación del Cr(VI) a Cr(III). Estudios previos han identificado la presencia de bacterias, tanto en los residuos industriales como en los lixiviados de un residuo industrial de una empresa procesadora de cromina ubicado en el estado de Guanajuato [3]. Utilizando librería de clones, ellos han identificado que estos residuos sirven como microhábitat de diversas especies, con abundancia de las especies *Bacillus akibai*, *Lysobacter enzymogenes* y *Thiobacillus thioparus*. Pero en total han observado 20 especies distintas. Los microorganismos del género *Bacillus* son muy interesantes debido a que tienen la capacidad de producir esporas y han sido aislados de varios sitios con características ambientales extremas; algunos microorganismos del género *Lysobacter* han sido utilizados como fuente de enzimas y los organismos del género *Thiobacillus* han sido aplicados en procesos de biotransformación de metales. Dichas características destacan que estos residuos son muy interesantes, y que pueden ser utilizados como posible fuente de estos microorganismos para una aplicación biotecnológica para la bioremediación de este metal del ambiente. Reducir Cr(VI) a Cr(III) se puede hacer de diversas maneras, pero la reducción bacteriana ha demostrado ser una de las que presenta menor costo y no representa daños al ambiente [3]. Sin embargo, es necesario que los microorganismos estén aislados y estudiados a nivel laboratorial. Por ejemplo, cuestiones como ¿cuáles son los mecanismos metabólicos que estos utilizan para la biotransformación?, ¿cuáles son los productos de esta biotransformación? y ¿Cuál son los impactos que estos microorganismos podrán causar en el caso de que estos lleguen al medio ambiente? Por otro lado, es muy pequeña la cantidad de microorganismos que son aislados del medio ambiente, se estima que es sólo el 1%, y es un reto de la microbiología ambiental aumentar ese número. El objetivo de ese trabajo fue aislar bacterias extremófilas para su futura aplicación biotecnológica en la transformación de metales y metaloides. Se utilizaron técnicas tradicionales de cultivo en medio sólido y microcultivo en placas.

## **METODOLOGÍA**

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

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

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



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

*Extracción del ADN total* – Se extrajo el ADN de los aislados con *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* utilizando las indicaciones del proveedor que resumidamente son: al botón de células se le agregan 480  $\mu$ L de EDTA a 50mM, 10  $\mu$ L de lisozima y 10  $\mu$ L de acromopetidasa, se dejó incubar por 40 min a 37°C, se centrifugó (13000 rpm) y eliminó el sobrenadante. Después, se agregan 600  $\mu$ L de solución de lisis nuclear, y se dejó incubar durante 5 minutos a 80°C, inmediatamente se le agregaron 3  $\mu$ L de solución RNAasa y se dejó incubar a 37°C durante 30 min. Posteriormente se agregaron 200  $\mu$ L de solución precipitadora de proteínas, y se incubó en hielo durante 5min. Después centrifugar (13000 rpm por 3 min.) se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, conteniendo 600  $\mu$ L de isopropanol, que después de mezclado y centrifugado, se eliminó el sobrenadante. A ese, se le adicionaron 600  $\mu$ L de etanol al 70%, se centrifugó (13000 durante 2 min.) y se eliminó el etanol. Finalmente se le agregó 100  $\mu$ L de solución de rehidratación, se dejó incubar a 65°C durante 1 h, y se almacenó a -20 °C. Se utilizó electroforesis en gel de agarose 0.5% en TAE 1X para verificar y cuantificar (indirectamente) el ADN extraído. Para la electroforesis se utilizó una cámara horizontal con TAE 0.5X como fase móvil a un voltaje de 80 Volts por 30 min. En cada pozo se aplicó 5  $\mu$ L del ADN extraído mezclado con 2  $\mu$ L de tampón de carga (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L, 50  $\mu$ g), igualmente se aplicó 5  $\mu$ L del marcador de tamaño molecular (*Thermo Scientific® GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder*).

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

*El producto de PCR fue purificado con el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare® Life Science).*

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

## RESULTADOS Y DISCUSION

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

La técnica aplicada consistió en realizar estos cultivos en pequeños volúmenes de 200  $\mu\text{L}$  con diluciones seriadas hasta  $10^{-96}$  (Fig. 1). Después de un período de incubación de 24h, se observa una alícuota de cada microcultivo al microscopio óptico, hasta observar el microcultivo cuyas células presentan una única morfología, que en nuestro caso se encontraban entre las últimas diluciones. En algunos casos la dilución a  $10^{-96}$  no resultaba exitosa, por lo que se debía de esa dilución, volver a realizar otra placa y volver a diluir hasta alcanzar la dilución  $10^{-192}$ . A pesar de extenuante la técnica, sobretodo debido la observación microscópica, que son decenas de cultivos a observar, esa presentó buenos resultados, como se puede observar en la foto 2B y 2C que ilustra que en los cultivos presentan células con una única morfología. Hasta la fecha, con esta técnica fue posible obtener 13 cepas, donde 7 se aislaron con el medio LB y 6 con el medio NB. Sin embargo, hay varias que aun se encuentran en proceso de aislamiento.

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

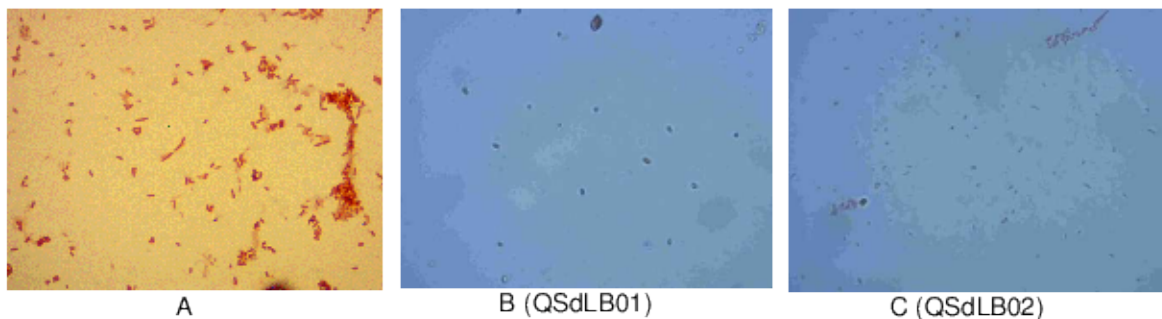


Figura 1. Cultivos en medio sólido y observación microscópica de los aislados antes y después de la técnica de microcultivo en placas. En A se observa tres morfologías celulares: bacilos alargados, coco-bacilos y cocos, y en B y C se ilustran las morfologías (diplococos) observadas después de aplicar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

Tabla 1. Características de los aislados obtenidos

Código de la cepa <sup>1</sup>	Características de la colonia	Características fisiológicas	Características microscópicas de las células
QSdLB01	Colonia transparente, circular, borde liso y pequeño.	Peroxidasa negativo, gram negativo	Baciliforme, presenta movimiento cuando está en medio líquido
QSdLB02	Colonia color crema circular, borde liso	Peroxidasa positiva, gram positivo	Baciliforme, relación diámetro-largo 1:3, presenta movimiento cuando está en medio líquido
C1 QSdLBO1	No observado	No realizado	Diplococos

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

En la figura 2 se ilustra el ADN extraído de los aislados y el gen ADNr 16S amplificado que se envió a secuenciación. Los resultados de la secuenciación no fueron satisfactorios, indicando contaminación por proteínas, e imposibilitando la reacción de secuenciación para la electroforesis capilar. A continuación, el ADN extraído será dializado en membrana de celulosa (Millipore VSWPO1300 MF) y el gene ADNr amplificado para realizar el estudio filogenético de estos aislado. También, se verificará la resistencia de estos aislados a diferentes concentraciones de cromato.

### CONCLUSIONES

La técnica de microcultivo hasta la exaustión se mostró eficiente para aislar microorganismos de difícil separación. Se ha logrado aislar x cepas. Se continuarán aplicar la técnica descrita para separar los microorganismos de los cultivos que aparentemente presentan mezclas de 2 o tres morfología. Todos los aislados se secuenciarán para realizar el estudio filogenéticos de estos.

### AGRADECIMIENTOS

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

### REFERENCIAS

- [1] Cheunga, K., Gu, J (2007) Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59(1), 8-15
- [2] Xu L, Luo M, Li W, Wei X, Xie K, Liu L, Jiang C, Liu H (2011) Reduction of hexavalent chromium by *Pannonibacter phragmitetus* LSSE-09 stimulated with external electron donors under alkaline conditions. *J Hazard Mater* 185:1169–1176
- [3] Brito EMS *et al* (2006) Bacterial biodiversity from anthropogenic extreme environments: a hyper-alkaline and hyper-saline industrial residue contaminated by chromium and iron. *Appl Microbiol Biotechnol* DOI 10.1007/s00253-012-3923-5